

耐药结核菌超微结构的观察

梅国华 程冬娥

(武汉钢铁公司结核病防治院)

邓海凡 王学兰

(中国科学院武汉病毒研究所)

细菌的耐药性是细菌对药物产生适应或细菌发生变异的后果。目前应用的抗结核药物已达 14 种之多,随着抗结核药物的相继问世,耐药性的问题也就显得更加突出了。国内学者对耐药菌的生物学性状,致病力^[1]及耐药发生的机制作了大量的研究工作,但对耐药菌的超微结构的研究国内尚未见报道,本文对部分试管诱导的耐药菌株及从临床患者痰中分离的耐药菌株进行了超微结构的观察,结果报告如下:

材 料 和 方 法

(一) 实验菌株

1. 试管诱导的耐药菌株:耐异烟肼(INH) 100 μ g/ml·耐链霉素(SM) 100 μ g/ml·耐卷曲霉素(CPM) 1000 μ g/ml·耐对氨基水杨酸钠(PAS) 100 μ g/ml 的强毒人型结核杆菌($H_{37}R_v$)。从临床分离的菌株:903号:耐利福平(RFP) 250 μ g/ml·乙胺丁醇(EB) 50 μ g/ml·卡那霉素(KM) 100 μ g/ml·PAS 1 μ g/ml。1558号:耐INH 10 μ g/ml·耐RFP 250 μ g/ml·KM 100 μ g/ml·PAS 10 μ g/ml·EB 5 μ g/ml。并以 $H_{37}R_v$ 为对照。

2. 刮取在含药 Löwenstein-Jensen 氏培养基上生长 2—3 周的菌落适量,研磨后接种于不含抗结核药物的 Dubos 培养基中,37℃ 培养 4 天后

以 3000 rpm 离心 30 分钟,弃去培养液,将菌悬液移种在新鲜配制的 Dubos 培养基中,37℃ 培养 24 小时。培养物经 3000 rpm 离心 30 分钟,弃去培养液,以 pH7.2 0.1M 磷酸盐缓冲液洗三次。

(二) 电镜样品的制备及电镜观察

1. 透射电镜样品的制备:取上述适量菌悬液于 0.05% 吐温 80 液中混匀,低速离心后取上层均匀菌悬液滴加在喷碳火棉胶的铜网上,待干,电镜观察并拍照。

2. 细菌的切片及观察:离心后的菌沉淀,用 2.5% 戊二醛固定 1 小时, pH7.2 0.1M 磷酸盐缓冲液洗涤三次,1% 锇酸固定 2 小时,经洗涤后用不同浓度的乙醇脱水,1% 醋酸铀块染色,苯二甲酸二丙烯酯浸透后,菌块投入塑料囊内聚合 72 小时,然后用 LKE-IV 型超薄切片机切片,样品最后置柠檬酸铅液中染色,待干,电镜观察并拍照。

结 果

1. $H_{37}R_v$ 切片相(图 1): $H_{37}R_v$ 细胞壁及细胞质膜均为三层结构,中层较不致密,内外二层致密,但质膜较薄而致密。细胞膜上的间体

指导者:张天民(武汉冶金医专)

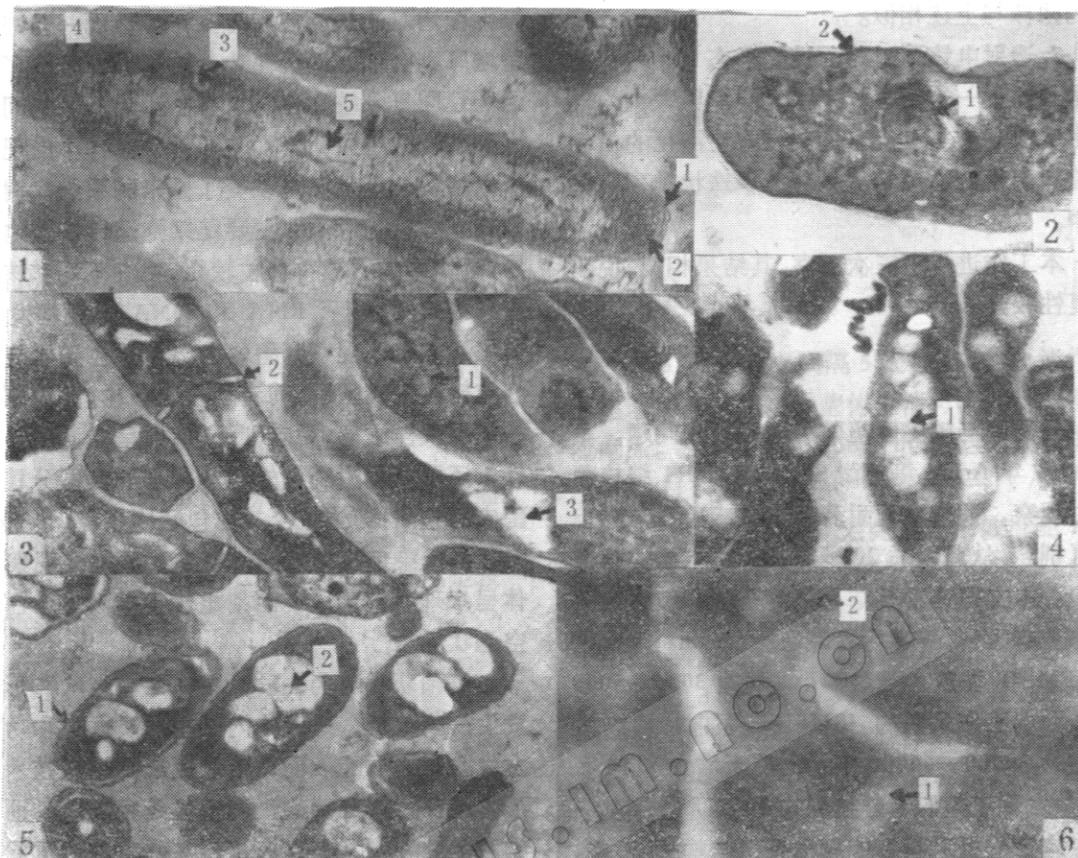


图1 H_37Rv 纵切, $\times 34000$, 1.细胞壁 2.细胞质 3.间体 4.核糖体 5.核质。

图2 耐 CPM $100\mu g/ml$ H_37Rv , $\times 34000$, 1.间体, 2.细胞质膜。

图3 耐 SM $100\mu g/ml$ H_37Rv , $\times 34000$, 1.间体, 2.分裂中隔, 3.包涵体

图4 耐 INH $100\mu g/ml$ H_37Rv , $\times 54000$, 1.包涵体。

图5 903号耐药菌株, $\times 20000$, 1.细胞壁, 2.包涵体

图6 耐 INH $100\mu g/ml$ H_37Rv 透射电镜图, $\times 10000$, 1.包涵体, 2.异染颗粒

是由质膜延伸并卷折而成囊状结构, 间体不是在细菌生长的任何阶段都能看到, 一般一个细菌仅有一个间体, 可位于细菌的两端, 也可位于菌体中心部位, 似与核区有联系。细胞质内可以见到均匀散布的核糖体, 细菌的核是以核质的形式散布在菌体中央部位, 多呈白色网状结构。

2. 耐 CPM $100\mu g/ml$ H_37Rv (图2): 菌体较正常细菌伸长, 弯曲呈不规则的杆状, 细胞壁内陷或凸起呈皱折状, 间体结构正常, 核糖体及核质密集, 核糖体为电子密度较高的颗粒状。

3. 耐 SM $100\mu g/ml$ H_37Rv (图3): 菌体呈不规则杆状, 细胞壁和质膜增厚, 间体出现频率及个数增多, 菌体内出现包涵体, 核糖体和核

质密集, 核糖体呈粗颗粒状。细菌分裂相明显, 分裂中隔正常。

4. 耐 INH $100\mu g/ml$ H_37Rv (图4): 菌体不规则, 一端膨大或尖细, 细胞壁及质膜电子密度高, 间体结构正常, 菌体包涵体增多, 呈串珠状, 核糖体颗粒较粗, 核质密集。

5. 耐 PAS $100\mu g/ml$ H_37Rv : 菌体呈不规则多形杆状, 细胞壁及质膜正常, 菌体内可见到2—3个间体, 核糖体颗粒较粗, 菌体内出现包涵体, 核多位于菌体两端, 结构减少。

6. 903号耐药菌株 (图5): 菌体呈长短不一的杆状, 形态不规则, 细胞壁明显增厚, 可见到细胞膜内陷, 间体增多, 核糖体电子密度较高, 核质未见异常改变, 包涵体增多。1558号

耐药菌株与上述相似。

7. 透射电镜下耐药菌株的形态(图6): 菌体呈长短不一的杆状, 细胞上的异染颗粒为电子密度极高的黑点, 可见颗粒内空泡化的白色颗粒。菌体内的包涵体呈白色串珠状排列在菌体中。

本工作进行了三次观察, 其结果相似, 说明重复性较好。

讨 论

耐药菌与敏感菌超微结构的比较问题, 早在1957年 Arima 等对耐 SM 和耐 INH 结核菌作过观察, 他们发现耐药菌与敏感菌在形态上无区别^[2]。从此以后 20 多年来对这方面的报道较少。本文研究观察结果是耐药菌和敏感菌在形态上有区别, 其原因可能在于 Arima 等所用的 JEM-5L 型放大倍数较小, 仅为 3000—5000 倍, 而本工作采用的 JEM-100 型电镜的放大倍数为 34000—66000 倍, 比前者增大了 10 多倍, 故发现了他们未曾发现的变化。

本工作所观察到的菌体超微结构的改变, 如细胞壁和质膜增厚, 出现较多包涵体, 间体出现频率增多, 这与近年来国外一些报道相一致^[3]。此外我们还观察到耐药菌菌体出现不规则的多样性, 一般较敏感菌略长, 有的菌体一端膨大或尖细, 说明细菌耐药后其代谢发生一定改变, 致使分裂的形态受到影响。耐药菌的分裂相在电镜下较敏感菌缓慢^[4], 这可能是它的对数生长期较长的缘故。菌细胞壁和质膜增厚, 说明药物对菌体的渗透会受到阻碍, 但造成

细胞壁增厚的机制还有待探讨。然而一旦细胞壁增厚则会加剧耐药性的恶性循环, 减少了从耐药性回复到敏感性的可能性。耐药菌的间体出现率较敏感菌高, 而且在单个菌体中出现的个数增多, 提示细菌改变了原来酶系统代谢的方法。细菌的耐药性主要是细胞遗传基因的变异, 菌体中的核糖体颗粒较粗, 粗细不均和核质密集等改变, 提示 RNA 和 DNA 的结构发生变化。本文还观察到菌体中出现的包涵体与空泡结构有一些区别, 前者有一定结构, 即周围有一单层膜样结构, 后者则无, 单纯呈空泡状。另外, 还观察到耐药菌的包涵体与非典型分枝杆菌中的包涵体^[5]相似, 并且包涵体经 Ziehl-Neelsen 二氏染色法染色后不着色, 显微镜观察菌体呈串珠状杆菌, 在透射电镜下包涵体为白色空泡状。

细菌获得耐药性后, 菌体某些结构和形态发生一些改变, 是菌体内某些物质代谢和功能发生改变之后的表现, 所以用超微结构技术从形态上探讨耐药菌的耐药机理是粗浅的, 而菌的耐药性问题又是临床及其基础工作的重要研究课题, 今后还应从耐药菌的生理及核酸等方面进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 王凤连: 中华结核病杂志, 1: 178, 1975。
- [2] Arima, J. et al.: *Tuberculosis Research*, 8:9, 1957。
- [3] Kozulitsyna, I. I. et al.: *Probl Tuberk*, 10:49, 1979。
- [4] 戴自英: 实用抗菌素学, 上海人民出版社, 第79页, 1977年。
- [5] 梅国华等: 中华微生物学和免疫学杂志, 4: 228, 1982。