

· 论 著 ·

铜绿假单胞菌对致病真菌的抑制作用*

徐令清,汪峰,侯红艳,刘彩林,欧国平,孙明月,孙自镛[△]

(华中科技大学同济医学院附属同济医院检验科,武汉 430030)

摘要:目的 观察临床分离的 24 株铜绿假单胞菌(PA)对致病性真菌(如白色念珠菌、热带念珠菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌、克柔念珠菌、葡萄牙念珠菌等)的抑制作用。方法 收集临床上 24 株 PA,通过革兰染色、氧化酶试验及 API 20NE(法国梅里埃公司产品)进行鉴定;通过纸片法、十字交叉划线法及共培养检测 PA 对致病性真菌的抑制作用。十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对有抑制作用的 PA 和无抑制作用的 PA 分泌蛋白进行电泳。结果 24 株 PA 中部分菌株对常见的致病性真菌有显著抑制作用,而部分 PA 菌株有一定抑制作用,另外一些完全没有抑制作用;共孵育试验显示 PA 可能是通过抑制真菌的菌丝生长而产生抑制作用。SDS-PAGE 显示有抑制作用的 PA 和无抑制作用的 PA 分泌物蛋白间存在明显差异。结论 PA 对常见的致病真菌具有抑制作用,推测可能与抑制真菌的菌丝生长及分泌抑制真菌生长的各种蛋白类物质有关。

关键词:假单胞菌,铜绿;真菌;绿脓菌素;十字交叉划线法

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.07.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)07-0769-03

The inhibiting effect of pseudomonas aeruginosa to the growth of pathogenic fungi*

Xu Lingqing, Wang Feng, Hou Hongyan, Liu Cailin, Ou Guoping, Sun Minyue, Sun Ziyong[△]

(Department of Clinical Laboratory, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong

University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China)

Abstract: Objective To explore the inhibitory effect of 24 pseudomonas aeruginosa(PA) on pathogenic fungi, such as candida albicans, candida tropicalis, candida glabrata, candida parapsilosis, candida krusei, mucous spore bacterium(MSB) etc. Methods 24 PA isolates were collected from clinical specimens and identified by Gram's stain, oxidase production and the API 20NE system(bioMerieux, France). Cross-streaking method and sterilizing filter paper-disk method and co-cultured method were applied to observe the inhibitory effect of PA. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) analyzed the difference of bacterial proteins of PA. Results The results showed that some strains of 24 PA had strong inhibitory effect against pathogenic fungi, some strain had partial effect and others had no effect. Co-cultured test showed that PA could inhibit the growth of fungal hyphae. SDS-PAGE displayed the significant difference in secretive proteins between the PA strains which had strong effect and no effect. Conclusion PA have inhibitory effect upon common pathogenic fungi and and this might be related to inhibit fungal hyphae formation, various protein secretion and inhibit the growth of fungi.

Key words: pseudomonas aeruginosa; fungi; pyocyanine; cross-streaking method

铜绿假单胞菌(PA)是一种无处不在的细菌,井水、河水、生牛奶、冻鱼、未经处理的污水、人畜的粪便及医院环境中都能分离到 PA,能够引起菌血症、创伤后伤口感染、肺炎、脑膜炎、附睾炎、眼部感染、乳突炎等。但有报道称,在感染 PA 的囊性纤维变性患者中,极少有真菌感染的发生,提示 PA 可能具有抗真菌的活性。

1 材料与方 法

1.1 材料 2012 年 5 月至 2012 年 9 月从本院住院部及门诊患者送检标本中共分离出不重复的 PA 24 株,经革兰染色、氧化酶实验、Vitek-2 全自动微生物鉴定仪(法国梅里埃公司)或 API 20 NE(法国梅里埃公司)对菌株进行鉴定。大肠埃希菌(EC) ATCC23922、肺炎克雷伯菌(KP) ATCC700603 及 PA ATCC25923 为质控菌株。真菌质控菌株为白色念珠菌(CA) ATCC90028、热带念珠菌(CT)、光滑念珠菌(CG)、近平滑念珠菌(CP)、克柔念珠菌(CK)、葡萄牙念珠菌(MSB)各 5 株,均分离自临床标本。由科玛嘉平板及 API-20CAUX 酵母样真菌鉴

定试条(法国梅里埃公司)对临床分离的真菌进行鉴定。

1.2 方 法

1.2.1 纸片法 在沙堡罗培养基上涂布 2 个麦氏浊度的真菌菌液,然后贴上无菌滤纸片(直径 6 mm),将 PA 制成 0.5 个麦氏浊度的菌悬液,吸取 3 μ L 均匀涂在滤纸片上,孵育 48 h 后,观察结果。

1.2.2 十字交叉划线法 24 株临床 PA 菌株与 3 种质控菌株分别培养 24 h 后用 0.9% 生理盐水制成菌悬液,取 30 μ L 菌悬液至沙堡罗培养基上,用无菌棉签沿任意直径划宽为 1 cm 的划痕,然后放至 37 $^{\circ}$ C 培养基培养 24 h。用无菌刀片移除沙堡罗培养基上的菌苔,取 5 cm 的无菌滤纸浸满三氯甲烷后放入一金属小盒子中,将移除菌苔的沙堡罗培养基生长面朝向滤纸放好,三氯甲烷的蒸汽会杀灭残余的细菌,30 min 后将平板暴露于生物安全柜中抽吸几分钟,让三氯甲烷挥发掉。将上述真菌在沙堡罗培养基上培养 48 h 后,制成 1×10^6 /mL 菌悬液,棉签蘸取并沿着三氯甲烷处理过的菌痕作垂直相交划线。将平

板 30 ℃ 孵育 24 h 后, 观察结果。

24 株 PA 中每一株都与 6 种念珠菌中的每一株进行测试。平板按照以下规则判读, 完全抑制真菌生长记作: +; 部分抑制真菌生长记作: ±; 不能抑制真菌生长记作: -。

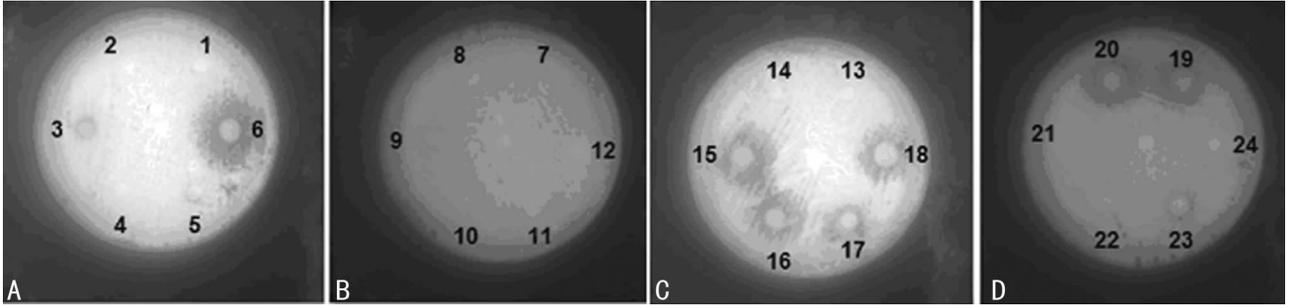
1.2.3 LB 液体培养基中共孵育实验 无菌 EP 管中装入 1 mL LB 液体培养基, 分别将上述纸片法中的每一株 PA 和每一株真菌菌悬液各 50 μ L 加入 EP 管中, 100 r/min 离心, 30 ℃ 摇菌 24 h, 取混悬液置显微镜下观察。另取 50 μ L 真菌菌悬液放入 1 mL LB 液体培养基中作对照。

1.2.4 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析菌体蛋白差异 将完全有抑制作用的 6 号与 15 号 PA 菌

株及完全无抑制作用的 1 号与 22 号 PA 菌株作 SDS-PAGE 蛋白分析。在 LB 液体培养基中 150 r/min 离心, 35 ℃ 摇菌 24 h, 取沉淀及上清液分别煮沸 10 min 后直接进行 SDS-PAGE 电泳, 脱色后观察结果。

2 结 果

2.1 纸片法结果 在 24 株 PA 与 30 株真菌的纸片法试验中, 24 株 PA 菌株中 6、15、16、17、18、19、20 号菌株对 6 种真菌的 30 株菌株均出现了明显的抑菌环, 抑菌环直径非常接近, 3、9、23 号菌株有抑菌环但不明显, 其余菌株及质控菌株均无抑菌环出现, 见图 1。



1~24; 1~24 号 PA 菌株; A: EC ATCC23922; B: KP ATCC700603; C: PA ATCC25923; D: 无菌水。

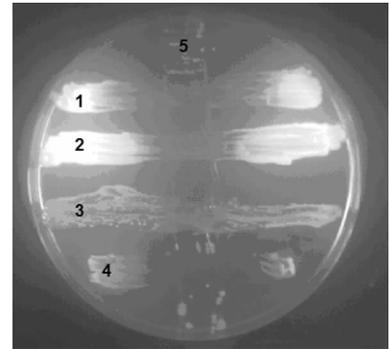
图 1 纸片法实验

2.2 十字交叉划线实验结果 部分 PA (6、15、16、17、18、19、20 号菌株) 出现明显的抑制现象, 部分 PA 菌株 (3、9、23 号菌株) 有轻微抑制作用, 其余菌株及质控菌株均未出现抑制现象, 这与纸片法结果一致, 见图 2。24 株 PA 对各种真菌的抑制活性情况见表 1。

2.3 LB 液体培养基中共孵育试验结果 有抑制作用的 PA 菌株 (6、15 号菌株) 与真菌共培养时, 发现真菌菌丝显著减少, 而无抑制作用的 PA 菌株 (1、22 号菌株) 共培养后菌丝数量与真菌单独培养相近, 见图 3。

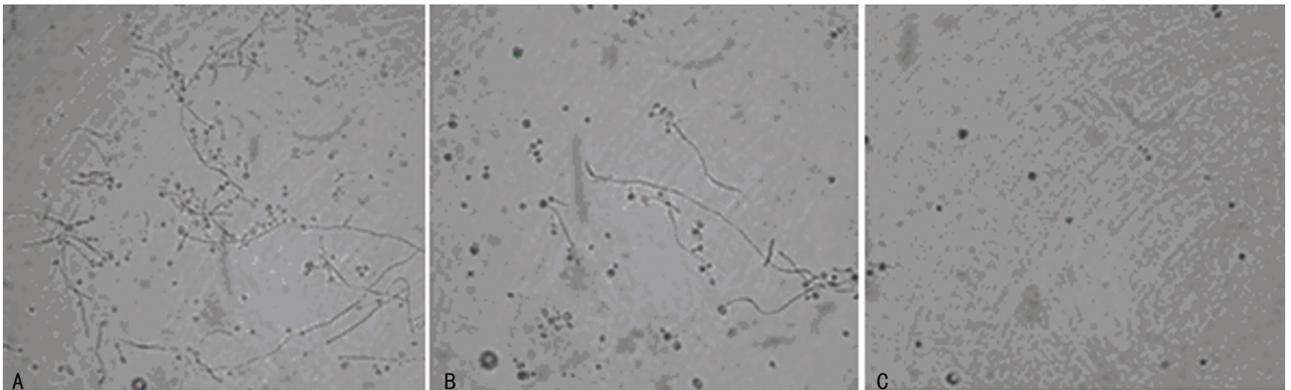
2.4 SDS-PAGE 分析菌株蛋白差异 几株 PA 的共同点是在 35×10^3 处均有一明显条带, 但其他条带存在明显差异: 无抑制作用的 1、22 号 PA 菌株只在 35×10^3 处有一明显条带, 有明显抑制效果的 6、15 号 PA 菌株在 $38、35、27、24 \times 10^3$ 处均有较清晰的条带, 即 6、15 号 PA 菌株要比 1、22 号 PA 菌株多

出好几个条带, 见图 4。



1: CA ATCC90028; 2: CT; 3: CG; 4: CP; 5: PA 三氯甲烷杀灭后。

图 2 十字交叉划线实验

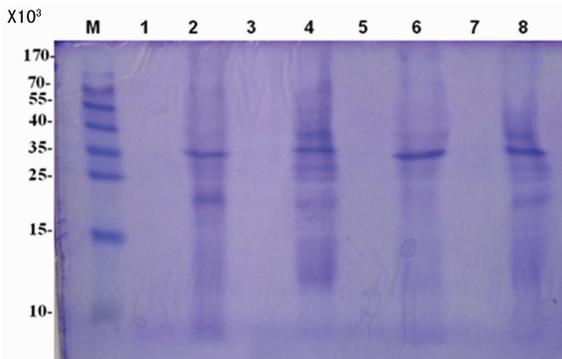


A: CA 单独在 LB 中培养 24 h 镜下结果, 见大量孢子及真菌菌丝生长; B: CA 与无抑制作用的 22 号 PA 菌株在 LB 中共同培养 24 h 镜下结果, 见大量孢子, 仍有较多真菌菌丝生长; C: CA 与有显著抑制作用 6 号 PA 菌株在 LB 中共同培养 24 h 镜下结果, 只见少量的孢子, 未见明显真菌菌丝生长。

图 3 LB 液体培养基中共孵育实验 (普通光学显微镜 $\times 400$)

表 1 PA 菌株抗真菌活性

真菌	PA 菌株																								质控菌株		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	EC	KP	PA
CA	-	-	±	-	-	+	-	-	±	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	±	-	-	-	-
CT	-	-	±	-	-	+	-	-	±	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	±	-	-	-	-
CG	-	-	±	-	-	+	-	-	±	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	±	-	-	-	-
CP	-	-	±	-	-	+	-	-	±	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	±	-	-	-	-
CK	-	-	±	-	-	+	-	-	±	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	±	-	-	-	-
MSB	-	-	±	-	-	+	-	-	±	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	±	-	-	-	-



M:蛋白 Marker;1:1号PA菌株上清;2:1号PA菌株沉淀;3:6号PA菌株上清;4:6号PA菌株沉淀;5:22号PA菌株上清;6:22号PA菌株沉淀;7:15号PA菌株上清;8:15号PA菌株沉淀。

图 4 SDS-PAGE 电泳图

3 讨 论

PA 是广泛存在于水、土壤、动物体内的一种条件致病菌，以往研究只关注 PA 作为致病菌在临床上能引起一些感染性疾病，但在环境与个体中 PA 常会与周围的其他微生物相互作用，抑制甚至杀死其他微生物。

已有资料表明，PA 的二代产物，如植物毒素、黏液、抗菌化合物的产生，对自然环境中的其他微生物有明显的选择作用。Hogan 等^[1]报道称，PA 能在 CA 菌丝上形成厚厚的生物被膜从而杀死 CA，表明 PA 影响的是 CA 的菌丝形成，而不是孢子形成，因为他们的细胞壁存在差异；另外一些 PA 的毒力因子（如四型菌毛、磷脂酶 C、吩嗪等）同样也与杀死 CA 的菌丝有关。Kaleli 等^[2]报道 PA 对 CA、CP、CK 及 CT 的抑制率在使用血平板和沙堡罗培养基时差异无统计学意义。

另有一些研究表明，PA 和 CA 在人体内相互作用。在囊胞性纤维症中有超过 80% 的患者会伴有 PA 感染，而广谱抗菌药物和类固醇激素的使用也会导致烟曲霉和 CA 的感染。Hughes 等^[3]发现在感染 PA 的囊胞性纤维症患者中只有 10% CA 皮肤试验阳性，而未感染 PA 的囊胞性纤维症患者中则有 30% 的阳性率，表明 PA 产生了一些抗真菌的物质防止念珠菌感染。另外也有报道称，PA 可以抑制隐球菌的生长^[4-5]。而到目前为止，还没有在囊胞性纤维症患者体内分离出隐球菌的报道，隐球菌与 PA 都是常见的肺部致病菌，如果这二者不能同时定植，那么有可能是 PA 抑制了隐球菌生长，绿脓菌素和喹诺酮系统可能是预防囊胞性纤维症患者肺部感染隐球菌的主要原因。

PA 能产生多种细胞间因子如群体感应系统丝氨酸内酯、

鼠李糖脂、氧化还原吩嗪、胰蛋白酶 E、磷脂酶 C、胞外多糖、胞藻酸盐等。Hogan 等^[6]发现 PA 能产生一种丝氨酸内酯，是一种细胞间信号分子，能充分抑制 CA 菌丝形成。

Grillot 等^[7]通过 PA 与酵母菌纯培养及混合培养来调查 PA 与酵母菌间的相互作用，报道显示所有被测试酵母菌在血平板和在与细菌的过滤液中共同培养时均受到抑制。Gupta 等^[8]报道有 59% 的念珠菌在烧伤时与细菌混合感染。然而，在有 PA 存在时，真菌的定植明显受到抑制。这也表明 PA 能杀死或抑制致病性真菌的生长。Kerr 等^[9]报道 PA 临床菌株的主要抗真菌活性是通过产生氧化还原色素、绿脓菌素等来抑制 CA 和烟曲霉的。绿脓菌素能降低人类上皮细胞中的环磷酸腺苷和三磷酸腺苷^[10-14]。

本次研究发现，部分 PA 对真菌有显著的抑制效果，部分 PA 有一定抑制作用，而另外一些则对真菌完全没有抑制作用。如 6 号 PA 菌株出现了非常明显的抑菌环（图 1），通过十字交叉划线及共培养进一步发现，6 号及 15 号 PA 菌株的抑制作用非常强，通过 SDS-PAGE 发现这两株菌与 1 号及 22 号 PA 菌株的蛋白条带比较差异明显，比后者多出 2~3 个条带（图 4），多出的条带是否与其抑制真菌的活性存在相关性，有待进一步研究。

综上所述，PA 在体内和体外都具有强大的抗真菌活性，原因可能是他能产生绿脓菌素形成生物被膜，及产生多种细胞间因子如群体感应系统丝氨酸内酯、鼠李糖脂、氧化还原吩嗪、胰蛋白酶 E、磷脂酶 C 等及分泌各种蛋白类物质抑制真菌菌丝从而抑制真菌生长。作者将进一步分离和纯化这些物质，作进一步研究。

参考文献：

[1] Hogan DA, Kolter R. Pseudomonas-Candida interactions: an ecological role for virulence factors[J]. Science, 2002, 296(5576): 2229-2232.
 [2] Kaleli I, Cevahir N, Demir M, et al. Anticandidal activity of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from clinical specimens[J]. Mycoses, 2007, 50(1): 74-78.
 [3] Hughes WT, Kim HK. Mycoflora in cystic fibrosis: some ecological aspects of Pseudomonas aeruginosa and Candida albicans [J]. Mycopathol Mycol Appl, 1973, 50(3): 261-269.
 [4] Caldwell CC, Chen Y, Goetzmann HS, et al. Pseudomonas aeruginosa exotoxin pyocyanin causes cystic fibrosis airway pathogenesis[J]. Am J Pathol, 2009, 175(6): 2473-2488.
 (下转第 778 页)

养老观念相关。丧偶、离婚、家庭关系紧张、家人重病等负性经历都容易导致老年人心理问题。进入老年期后,个体的社会、躯体功能均发生退化,躯体疾病逐渐增多,伴随生活自理能力逐渐下降,对家庭内外的人际关系均产生不良影响,容易造成心理负担,产生不良情绪体验,严重影响老年人心理健康。农村老年人常无固定收入,缺乏独立的经济来源和可靠的经济保障,生活水平较低,因经济问题造成的家庭成员之间的矛盾以及老年人在社会和家庭中经济地位的改变,也是影响老年人心理健康的因素之一。农村老年人 SCL-90 总分与 SSRS 总分及各因子分呈显著负相关关系,说明其所获得的社会支持越多,身心健康状况及心理状况越好。国内外大量研究发现,社会支持、阳性情感及阳性体验与个体的心理健康呈显著正相关^[17],对心理健康有促进作用。农村家庭养老的老年人 SCL-90 总分与神经质、精神质呈显著正相关,与内外向呈显著负相关,说明老年人情绪越稳定,精神质越低,性格越外向,其心理健康状况越好。

多元逐步回归分析表明,养老方式、婚姻状况、社会支持是影响农村老年人心理健康的主要因素。因此,应从改善养老条件、建立和谐家庭、较好地应用社会支持资源入手,提高老年人心理健康水平。

(志谢:重庆市精神卫生中心蒋国庆、罗英茂、廖春梅、赵晋、陈非、陈黎明、刘涛、程柯翔、张骁等医师协助调查和统计资料,一并志谢。)

参考文献:

- [1] 重庆日报. 重庆 60 岁以上老年人口 539 万权益保障水平大幅度提高 [EB/OL] [2013-10-18]. <http://www.cq.gov.cn/today/news/318910.htm>.
- [2] 中华人民共和国国家统计局. 2010 年第六次全国人口普查主要数据公报(第 1 号) [EB/OL] [2013-10-18]. http://www.stats.gov.cn/tjgb/rkpcgb/qgrkpcgb/t20110428_402722232.htm.
- [3] 李献云,王志青,费立鹏. 社区人群精神障碍患病率调查方法[J]. 中国心理卫生杂志,2010,24(3):191-194.

- [4] 张明园. 精神科评定量表手册[M]. 2 版. 长沙:湖南科学技术出版社,1998:224-227.
- [5] 陈树林,李凌江. SCL-90 信度效度检验和常模的再比较[J]. 中国神经精神疾病杂志,2003,29(5):323-327.
- [6] 汪向东,王希林,马弘. 心理卫生评定量表手册(增订版) [M]. 北京:中国心理卫生杂志社,1999:217-219.
- [7] 汪文新,毛宗福,李贝,等. 纽芬兰纪念大学幸福度量表在农村五保老人幸福度调查的信度和效度[J]. 中国老年学杂志,2005,25(11):1330-1332.
- [8] 杨国愉,冯正直,夏本立,等. 社会支持评定量表在军人团体中的信效度和常模[J]. 中国心理卫生杂志,2006,20(5):309-312.
- [9] 钱铭怡,武国城,朱荣春,等. 艾森克人格问卷筒式量表中国版(EPQ-RSC)的修订[J]. 心理学报,2000,32(3):317-323.
- [10] 张维熙,沈渔邨,李淑然,等. 中国七个地区精神疾病流行病学调查[J]. 中华精神科杂志,1998,31(2):69-71.
- [11] 周建初,摘译. 发展中国家筛选老年人认知损害的一种问卷[J]. 国外医学:老年医学分册,1993,14(1):40.
- [12] 中国精神科学会. 中国精神障碍分类与诊断标准第三版(CCMD-3) [M]. 济南:山东科学技术出版社,2001.
- [13] 庞天鉴,译. DSM-IV 分类与诊断标准[M]. 北京:杨森科学研究委员会中国分会,2010.
- [14] 周建初,黄素珍,金初林,等. 万县地区老年人精神卫生状况的调查[J]. 老年学杂志,1993,13(3):138-140.
- [15] 王玲凤,傅根跃. 农村老年人心理健康状况的调查分析[J]. 中国临床心理学杂志,2003,11(2):128-129.
- [16] 罗国志. 研究生心理健康、人格特征、生活事件与社会支持的关系[J]. 中国民康医学,2009,21(5):530-532.
- [17] 肖霞,陈华. 干部病房老年病人幸福度及相关因素的调查研究[J]. 护理研究,2009,23(10):870-872.

(收稿日期:2013-11-15 修回日期:2014-01-07)

(上接第 771 页)

- [5] Rella A, Yang MW, Gruber J, et al. *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Cryptococcus* species[J]. *Mycopathologia*, 2012, 173(5/6):451-461.
- [6] Hogan DA, Vik A, Kolter R. A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology[J]. *Mol Microbiol*, 2004, 54(5):1212-1223.
- [7] Grillot R, Portmann-Coffin V, Ambroise-Thomas P. Growth inhibition of pathogenic yeasts by *Pseudomonas aeruginosa* in vitro; clinical implications in blood cultures[J]. *Mycoses*, 1994, 37(9/10):343-347.
- [8] Gupta N, Haque A, Mukhopadhyay G, et al. Interactions between bacteria and *Candida* in the burn wound[J]. *Burns*, 2005, 31(3):375-378.
- [9] Kerr JR. Suppression of fungal growth exhibited by *Pseudomonas aeruginosa*. [J]. *J Clin Microbiol*, 1994, 32(2):525-527.
- [10] de Macedo JL, Santos JB. Bacterial and fungal colonization of burn wounds[J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2005, 100

(5):535-539.

- [11] Dubern JF, Diggle SP. Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species[J]. *Mol Biosyst*, 2008, 4(9):882-888.
- [12] Diggle SP, Winzer K, Chhabra SR. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of lasR[J]. *Mol Microbiol*, 2003, 50(1):29-43.
- [13] Le Berre R, Faure K, Nguyen S. Quorum sensing: a new clinical target for *Pseudomonas aeruginosa*? [J]. *Med Mal Infect*, 2006, 36(7):349-357.
- [14] Keçeli Özcan S, Dündar D, Sönmez Tamer G. Anti-candidal activity of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains and in vitro inhibition of *Candida* biofilm formation[J]. *Mikrobiyol Bul*, 2012, 46(1):39-46.

(收稿日期:2013-10-14 修回日期:2013-11-20)