

低频低强度超声对白色念珠菌急性损伤效应的实验研究

向洋 李帅 叶合敏 谢霜 杜永洪

摘要 目的 探讨低频低强度超声对白色念珠菌的急性损伤情况,以及对其细胞壁通透性的影响。方法 取 5 ml 浓度为 1.5×10^7 cfu/ml 的白色念珠菌菌液于六孔板中。采用频率为 42 kHz、探头直径为 5 cm 的圆形平面超声治疗头,分别选择超声强度 0.13 W/cm^2 、 0.35 W/cm^2 辐照六孔板中的白色念珠菌菌液 5 min (0.13 W/cm^2 组、 0.35 W/cm^2 组);对照组不经超声辐照。培养 48 h 计数各组菌落在培养皿上的存活数。扫描电镜和透射电镜观察细菌外部形态、内部结构的损伤情况。**结果** 对照组菌落计数为 21 cfu, 0.13 W/cm^2 组菌落计数为 20 cfu; 0.35 W/cm^2 组菌落计数为 14 cfu。低频低强度超声辐照白色念珠菌后,扫描电镜下可见 0.13 W/cm^2 组和 0.35 W/cm^2 组菌体均明显肿胀、外形变大,细胞外液进入细胞内明显增加; 0.35 W/cm^2 组透射电镜下见核物质在边缘聚集,细胞壁受损,形成空泡,大量细胞外液进入细胞。**结论** 随着超声辐照强度的增加,白色念珠菌的死亡率显著增加;低频低强度超声辐照白色念珠菌能促进其细胞壁通透性的增加。

关键词 低频低强度超声;白色念珠菌;扫描电镜;透射电镜;通透性,细胞壁

[中图分类号] R-33;R445.1

[文献标识码] A

Acute damage effect of low-frequency and low-intensity ultrasound on *Candida albicans*

XIANG Yang, LI Shuai, YE Hemin, XIE Shuang, DU Yonghong

Institute of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

ABSTRACT Objective To investigate the acute damage effect of low-frequency and low-intensity ultrasound (LFLIU) on *Candida albicans*, and to investigate the effect of LFLIU on the permeability of the cell wall. **Methods** *Candida albicans* bacteria liquid was prepared, which concentration was 1.5×10^7 cfu/ml, then 5 ml bacteria was taken to single flageolet culture plate. With the frequency for 42 kHz, the diameter of plane ultrasonic probe was 5 cm, six well culture plate beads bacterium solution were irradiated by ultrasonic intensity with 0.13 W/cm^2 , 0.35 W/cm^2 for 5 min (0.13 W/cm^2 group and 0.35 W/cm^2 group). The control group was not irradiated by LFLIU. After 48 h survival of colonies on petri dish was counted by ultrasound irradiation. The external shape and internal structure of the bacteria were observed using transmission electron microscope and scanning electron microscope. **Results** The count of colony was 21 cfu in control group, 20 cfu in group with 0.13 W/cm^2 , 14 cfu in group in 0.35 W/cm^2 . 0.13 W/cm^2 group and 0.35 W/cm^2 group were markedly swollen, became larger and extracellular fluid into the cells increased significantly by scanning electron microscope. Nuclear matter aggregated at the edge, cell membrane damaged, formation of vacuoles and large amounts of water into cells were observed in 0.35 W/cm^2 group by transmission electron microscope. **Conclusion** With the increase of ultrasonic irradiation intensity, the mortality rate of *Candida albicans* significantly increases. *Candida albicans* in LFLIU can promote the increase of the permeability of the cell wall.

KEY WORDS Low-frequency and low-intensity ultrasound; *Candida albicans*; Scanning electron microscope; Transmission electron microscope; Permeability, cell wall

白色念珠菌是引起免疫力低下宿主感染的重要条件致病真菌,尽管可用抗真菌药物治疗,但真菌菌血症

导致的病死率仍高,特别是念珠菌菌血症的死亡率高达 40%~80%^[1]。目前白色念珠菌引起的相关疾病主要

基金项目:国家自然科学基金预研资助项目(NSFY201528);重庆市基础科学与前沿技术研究专项(csc2016jcyjA0098)

作者单位:400016 重庆市,重庆医科大学生物医学工程学院 省部共建国家重点实验室培育基地——重庆市超声医学工程重点实验室

通信作者:杜永洪, Email: duyonghong@yeah.net

通过药物治疗,但存在毒副作用大、治疗周期长及易产生耐药性等不足。超声波在一定强度和辐照时间范围内能提高细胞膜通透性,细胞膜短时间内开放使细胞内外发生物质交换(声孔效应),且其作用过程可逆,尤其低频低强度超声(low-frequency and low-intensity ultrasound, LFLIU)的空化效应等能够传递药物,在医学领域抗感染方面已展示出良好的应用前景^[2-3]。目前,关于 LFLIU 促进抗菌药物的增效作用的研究仅局限于一般敏感菌,如金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等^[4]。但白色念珠菌壁厚、结构特殊,LFLIU 促进其药物增效的机制与其他真菌不尽相同。本实验通过 LFLIU 辐照白色念珠菌,探讨 LFLIU 辐照对其的作用机制和损伤效应,有望为超声治疗真菌类感染提供新的思路。

材料与方法

一、实验设备

低频低强度超声设备(苏州工业园区海纳科技有限公司,频率 42 kHz,探头直径 5 cm,治疗头表面为圆形平面,输出功率 0.10~1.00 W/cm²);HD-650-u 超净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司,规格 650 mm×680 mm×625 mm);日立 HITACHI S-3000N 扫描电镜;日立 HITACHI-7500796 透射电镜;高速离心机(基因有限公司)。

二、实验器材与试剂

白色念珠菌菌株(上海宝录生物科技有限公司);LB 肉汤、LB 营养琼脂;0.9%生理盐水;4%戊二醛;一次性培养皿(直径 9 cm);10 ml 刻度吸管;1.5 ml EP 管;超声耦合剂;接种环。

三、实验方法

1.实验分组:在无菌超净工作台上,取琼脂培养皿中培养 48 h 的最大白色念珠菌菌落 1~2 cfu 接种于液体培养基中,150 r/min、37 °C 摇床培养 13~15 h。通过比浊管确定菌液浓度为 1.5×10⁹ cfu/ml,然后稀释到 1.5×10⁷ cfu/ml 备用。取 5 ml 菌液于六孔板中,在超声换能器顶部均匀涂布一层医用超声耦合剂,换能器垂直正对实验孔并紧贴于培养板底部,分别选择超声强度 0.13 W/cm²、0.35 W/cm² 辐照白色念珠菌菌液 5 min (0.13 W/cm² 组、0.35 W/cm² 组)。对照组不经超声辐照。LFLIU 辐照白色念珠菌菌液示意图见图 1。

2.琼脂培养皿计数:使用移液枪取出 100 μl 不同超声辐照强度后的实验组和对照组菌液,分别接种于琼脂培养基上,放置 37 °C 孵箱中培养 48 h 后,观察计

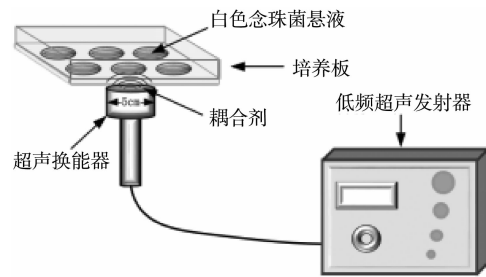


图 1 LFLIU 辐照菌液示意图

数琼脂培养皿上菌落数^[5]。

3.扫描电镜检查:取不同超声辐照强度后的实验组和对照组菌液各 1.0 ml,加入 EP 管中,高速离心机 4000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,加入无菌 0.9%生理盐水混匀,再离心,如此重复 3 次。最后将沉淀加于六孔板中的盖玻片上,加入 4%戊二醛固定 30 min,送扫描电镜检查^[6]。

4.透射电镜检查:取不同超声辐照强度后的实验组和对照组菌液各 1.0 ml,加入 EP 管中,高速离心机 6000 r/min 离心 15 min,弃去上清液,加入 4%戊二醛,4 °C 固定 2 h 后,进行常规电镜样品固定、脱水和包埋,超薄切片后用于电镜观察^[6]。

结 果

一、各组白色念珠菌计数比较

0.13 W/cm² 组、0.35 W/cm² 组 LFLIU 辐照后菌落数分别为 20 cfu 和 14 cfu,对照组无变化为 21 cfu。

二、扫描电镜观察不同超声辐照强度对白色念珠菌损伤情况

对照组白色念珠菌外形规则圆润体积较小(图 2);0.13 W/cm² 组白色念珠菌的细胞体积较对照组体积明显增大,细胞壁出现损伤,且形态由椭圆形变圆形、不规则形状(图 3);0.35 W/cm² 组白色念珠菌较对照组和 0.13 W/cm² 增大,细胞肿胀明显(图 4)。

三、透射电镜观察不同超声辐照强度对白色念珠菌损伤情况

对照组白色念珠菌细胞质电质密度均匀、无空泡,细胞膜连续、完整(图 5);0.13 W/cm² 组白色念珠菌损伤比较小,正常的细菌居多;受到损伤细胞的细胞质电质密度不均匀,水肿、密度较浅,可见细胞壁分层,核物质在边缘聚集(图 6);0.35 W/cm² 组损伤比较重,异常的真菌居多;受到损伤的白色念珠菌发生水肿,细胞壁受损,有空泡形成,大量细胞外液进入细胞(图 7)。

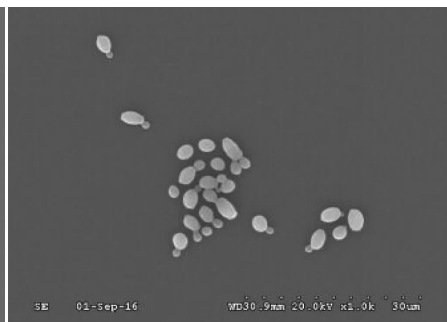
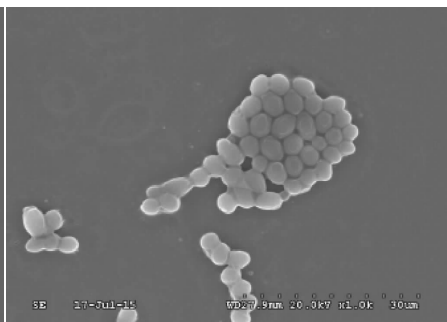
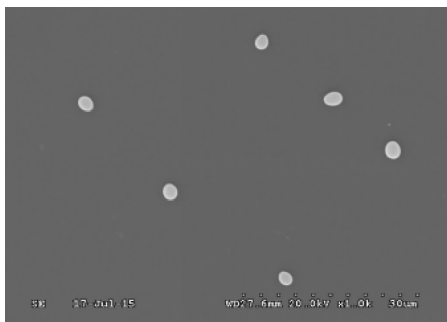


图 2 对照组白色念珠菌扫描电镜图(x1000)

图 3 0.13 W/cm²组白色念珠菌扫描电镜图(x1000)

图 4 0.35 W/cm²组白色念珠菌扫描电镜图(x1000)

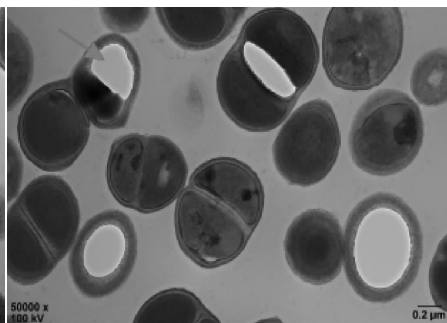
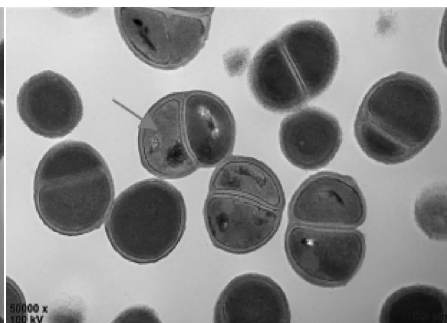
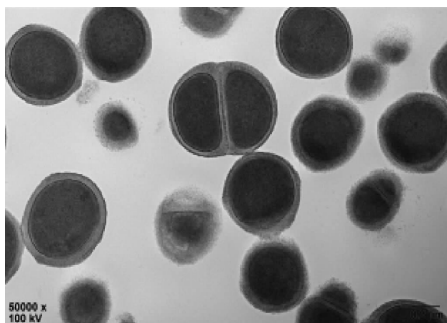


图 5 对照组白色念珠菌透射电镜图(x5000)

箭头所示损伤的细胞质密度不均匀, 水肿、密度较浅。

箭头所示细胞壁受损, 形成空泡, 大量细胞外液进入细胞。

图 6 0.13 W/cm²组白色念珠菌经透射电镜图(x5000)

图 7 0.35 W/cm²白色念珠菌透射电镜图(x5000)

讨 论

低频超声是指超声频率范围在 20 kHz~1 MHz 的声波, 其已在医学上得到广泛应用, 可用于止痛、脱敏、溶栓、预防免疫缺陷及肿瘤治疗等^[7], 但国内在低频超声与抗菌药物协同增效方面的研究仍处于初步探索阶段^[8-9]。目前, 未见 LFLIU 对白色念珠菌作用效果的相关文献报道。

本实验结果显示, 对照组菌落计数为 21 cfu, 0.13 W/cm² 组菌落计数为 20 cfu, 0.35 W/cm² 组菌落计数为 14 cfu。可见经 0.35 W/cm² 超声辐照后, 培养 48 h 菌落平均计数显著低于对照组和 0.13 W/cm² 组。说明 LFLIU 辐照可杀死白色念珠菌, 且随超声辐照强度的增加, 死亡率增加。LFLIU 辐照白色念珠菌后, 扫描电镜下可见菌体明显肿胀、体积变大、外形变化无规则, 细胞外液进入细胞内明显增加, 细胞通透性改变, 促使白色念珠菌细胞膜屏障打开。透射电镜下可观察细菌内部结构的变化, 本实验结果显示, 0.13 W/cm² 组细胞质密度变浅, 说明细胞壁受损, 有大量细胞外液进入细胞; 0.35 W/cm² 组损伤加重, 有空泡形成。透射电镜和扫描电镜观察均表明 LFLIU 可促使白色念珠菌细胞壁通透性的增加, 与苏杭等^[10]报道的 LFLIU 对耻垢分枝杆菌细胞壁通透性影响的实验研究结果一致。

综上所述, 随着 LFLIU 辐照强度的增加, 白色念

珠菌的死亡率显著增高; 一定剂量的 LFLIU 辐照白色念珠菌能促进其细胞壁通透性增加。

参考文献

- [1] 任南, 文细毛. 白色念珠菌致病机制的研究进展[J]. 中国感染控制杂志, 2003, 2(2): 157-158.
- [2] 冉海涛, 任红, 王志刚, 等. 超声波空化效应对体外培养细胞细胞膜作用的实验研究[J]. 中华超声影像学杂志, 2003, 12(8): 499-501.
- [3] 刘旭, 蔡芸, 白艳, 等. 低频超声与抗菌药物协同增效研究进展[J]. 中国药物应用与监测, 2013, 10(1): 55-58.
- [4] 卢群, 丘泰球. 超声场影响大肠杆菌细胞膜通透性的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2006: 55-66.
- [5] Serena T, Lee SK, Lam K, et al. The impact of noncontact, nonthermal, low-frequency ultrasound on bacterial counts in experimental and chronic wounds[J]. Ostomy Wound, 2009, 55(1): 22-30.
- [6] 胡镛, 张金安, 章立, 等. 草履虫的扫描及透射电镜标本制备[J]. 生物学通报, 1992, 41(8): 36.
- [7] 杜永洪, 陈畅, 陈飞, 等. 聚焦超声对早孕小鼠子宫平滑肌及胚胎的损伤效应观察[J]. 临床超声医学杂志, 2013, 15(1): 1-4.
- [8] 侯幼红. 白色念珠菌生物膜与侵袭及耐药[J]. 中国真菌学杂志, 2007, 2(3): 175-178.
- [9] Su H, Li Z, Dong Y, et al. Acute damage effects on BCG by low-frequency and low-intensity ultrasound: a pilot study[J]. J Ultrasound Med, 2016, 35(3): 581-587.
- [10] 苏杭, 江和逊, 杜永洪, 等. 低频低强度超声对耻垢分枝杆菌细胞壁通透性影响的实验研究[J]. 中国超声医学杂志, 2015, 31(11): 1044-1046.

(修回日期: 2016-08-02)