

网络出版时间: 2015-11-18 10:12:35 网络出版地址: <http://www.cnki.net/KCMS/detail/34.1065.R.20151118.1012.054.html>

等离子体体外抑制白假丝酵母菌生长的实验研究

杜文辉¹, 黄升海¹, 李卉², 杨春俊³, 徐钰²

摘要 选择白假丝酵母菌 ATCC10231 作为实验菌株, 以低温等离子体对其进行照射, 观察照射后菌落生长情况。经低温等离子体照射 30、60、120、180 s 后, 在培养基中心照射位置处, 出现明显的抑菌环。随着照射时间的延长, 抑菌环逐渐增大; 连续观察 3 d, 抑菌环没有改变。低温等离子体在体外可抑制白假丝酵母菌的生长, 为其将来成为治疗白假丝酵母菌感染的一种新手段提供了实验室依据。

关键词 低温等离子体; 白假丝酵母菌; 抑制

中图分类号 R 814.4; R 379.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)12-1819-03

由于临床上长期大量使用免疫抑制剂、广谱抗生素^[1], 同时放化疗、抗癌药物的综合应用, 致使许多患者外源性真菌乘机侵入或者内源性真菌在体内大量生长繁殖, 从而导致侵袭性真菌感染有了很明显的上升趋势, 且导致系统性感染的病死率高达 50%^[2-3]。国内外报道^[4]引起感染的真菌种类中, 白假丝酵母菌最多见。近年来, 等离子体医学提供了一种新形式的治疗方法, 结合有效的物理效应, 已成功用于治疗许多疾病, 尤其在皮肤病领域^[5-6]。研究^[7]证实氩气和氧气的混合气体下等离子体对枯草芽孢杆菌具有较高的杀灭效果, 基于这些研究结果, 该实验对等离子体对白假丝酵母菌的抑制甚至杀灭作用进行研究。

1.1 实验材料 白假丝酵母菌 ATCC10231 标准株购自南京便诊生物科技有限公司; 沙堡琼脂培养基 SDA(4% 葡萄糖、1% 蛋白胨、2% 琼脂), YPD 固体培养基(2% 葡萄糖、2% 蛋白胨、1% 酵母提取物、2% 琼脂); 研磨器、比浊仪、血细胞计数板、等离子体放电装置; 37 °C 恒温培养箱(DHG-9202-DSA 型,

上海三发科学仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 白假丝酵母菌菌悬液的制备 将白假丝酵母菌常温解冻后, 在沙堡琼脂培养基 SDA 平皿上采用分区划线, 置于 37 °C 培养箱内进行分离培养, 纯化菌种。3 d 后挑取单个菌落, 转种于沙氏固体培养基上, 在 37 °C 恒温培养箱中使其大量繁殖。再过 3 d, 重复上一步操作 1 次。3 d 后, 取培养基表面的白假丝酵母菌菌落, 将其溶于少量 0.9% 氯化钠溶液中, 振荡, 使其彻底溶解, 用比浊仪调整菌悬液浓度至 $(1 \sim 2) \times 10^8$ CFU/ml, 并用血细胞计数板计数验证, 并将对其浓度进行调整达到 1×10^8 CFU/ml, 最终再经过稀释, 得浓度分别为 1×10^8 、 1×10^7 CFU/ml 的两组白假丝酵母菌菌悬液。

1.2.2 分组和制备反应平皿 选取 30 块内径 7 cm 的沙堡琼脂培养基平皿, 按试验白假丝酵母菌菌悬液溶度分为两个组, 每组 15 块平皿, 分别取 100 μ l 白假丝酵母菌菌悬液置于每块平皿的中央, 然后用无菌三角玻璃棒将其均匀摊开, 放置于水平试验台上静置 2 ~ 3 min。

1.2.3 氩气和氧气的混合气体的等离子体的照射

两个浓度组的各 15 块平皿, 分为 5 个实验组, 每组 3 块平皿, 为了保证实验结果具有随机性和可重复性, 每个小组的 3 块平皿在相同实验条件下同时进行实验, 以实验 1、实验 2 和实验 3 对其结果进行区分, 分别照射 0 (即不经过等离子体照射, 作为空白对照)、30、60、120、180 s, 然后将经过等离子体照射过的平皿放置于 37 °C 恒温培养箱中培养观察, 连续 3 d 观察等离子体照射对沙堡琼脂培养基平皿上白假丝酵母菌的抑制作用。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析, 组间均值差异比较采用 χ^2 检验。

2 结果

经过等离子体照射后实验的第 2 天, 即显示两个浓度组中除了各 3 块空白对照平皿(没有经过等离子体照射)外, 其余 12 块沙堡琼脂培养基平皿上, 在等离子体照射的区域, 出现了明显的抑菌现

2015-10-14 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81371797); 安徽省自然科学基金(编号: 1308085MH129)

作者单位: ¹安徽医科大学基础医学院微生物学教研室, 合肥 230032

²安徽医科大学第一附属医院皮肤科, 合肥 230022

³安徽医科大学第二附属医院皮肤科, 合肥 230601

作者简介: 杜文辉, 男, 主管技师;

黄升海, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: huang-shh68@aliyun.com

象 连续观察 3 d 抑菌环的大小没有发生明显的改变 见图 1。抑菌环大小与菌液浓度呈负相关性,即菌液浓度越低,同样照射时间产生的抑菌环更大,按浓度分组检验 ($F = 52.18, P = 7.38 \times 10^{-7}$); 与等离子体照射时间呈正相关性,即同样浓度的菌液平皿,照射时间越长其产生的抑菌环越大,按照照射时间分组检验 ($F = 16\,511.82, P = 1.27 \times 10^{-3}$) ,见表 1。

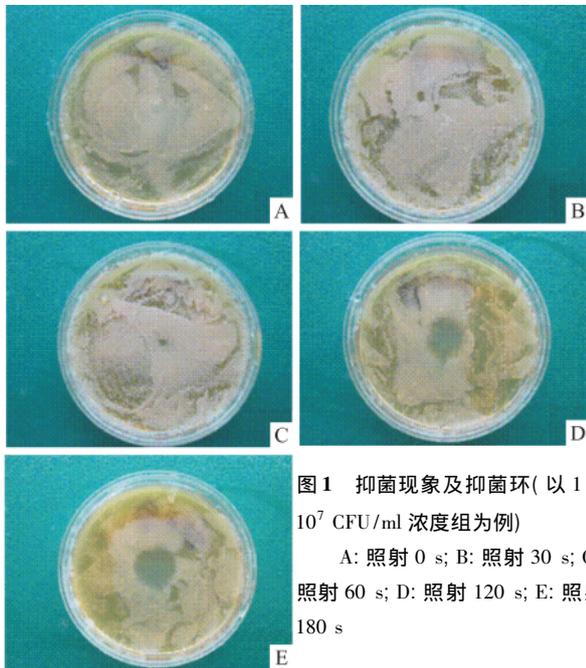


图 1 抑菌现象及抑菌环(以 1×10^7 CFU/ml 浓度组为例)
A: 照射 0 s; B: 照射 30 s; C: 照射 60 s; D: 照射 120 s; E: 照射 180 s

表 1 两浓度组在等离子射线不同照射时间下 各组平皿内抑菌环的情况(cm)

时间	1×10^7 CFU/ml			1×10^8 CFU/ml		
	实验 1	实验 2	实验 3	实验 1	实验 2	实验 3
0 s	0	0	0	0	0	0
30 s	0.158	0.156	0.158	0.143	0.139	0.146
60 s	0.224	0.218	0.221	0.198	0.201	0.199
120 s	1.401	1.404	1.399	1.328	1.324	1.329
180 s	1.549	1.547	1.55	1.496	1.501	1.487

3 讨论

白假丝酵母菌是念珠菌属中一种在临床上很常见的条件致病菌,在正常机体内不易致病,但是对于一些自身免疫功能低下或严重受损的患者个体来说,则是可能危及其生命的重要致病菌。有文献^[8]报道,在肿瘤放化疗、骨髓移植后及艾滋病等患者人群中,医院内真菌感染率高达 10%,病死率甚至超过 80%,对于上述患者,特别是出现位于深部脏器的白假丝酵母菌等真菌感染,已成为直接导致患者死亡的重要原因之一。目前在临床上治疗白假丝酵母菌感染,主要使用氟康唑、伊曲康唑、卡泊芬净及米卡芬净等药物,有口服和外用两种,但是在深部真

菌感染的患者中,尤其是系统性真菌感染的病例中,由于抗真菌药物临床使用时间一般比较长,不良反应大,导致患者依从性较差,大量耐药的白假丝酵母菌菌株和新菌株的不断出现,使得该病的治疗越来越困难,复发率不断的上升^[9-10]。本试验研究中,以氩气和氧气混合气体下的低温等离子体照射对白假丝酵母菌产生了明显的抑制作用,被照射平皿上菌落,在照射后的第 2 天,就在照射区域出现抑制,甚至不生长现象,同时连续观察 3 d,甚至更长时间,显示在不同白假丝酵母菌浓度组各个不同照射时间下的培养平皿上,所产生的抑菌环及其大小均未消失或发生改变,这样使得等离子体在临床上治疗白假丝酵母菌感染成为一种新的可能的方式。作为一个初步的探究,为临床针对白假丝酵母菌感染性疾病的治疗提供了一个新的思路,这与国内外目前的一些研究^[11-12]报道一致。

低温等离子体抑菌机制包括等离子体物理和细胞分子生物学两个方面,可能与低温等离子体中的带电粒子的击穿作用和活性氧种的氧化作用导致微生物细胞壁、细胞膜的破裂有关。但是由于其成分复杂,在抑菌的过程中,究竟是带电粒子(离子和电子)、紫外线、活性氧,还是射线起主要作用,国内外还存在较大的争议^[13]。对于低温等离子体对人体的照射是否会产生相应的副作用,最佳的照射治疗时间,目前并不清楚,还需要进一步的研究。同时,目前的实验研究还仅仅是在等离子体抑制白假丝酵母菌研究中进行了体外实验部分的探究,如果需要彻底探究等离子体在临床上治疗白假丝酵母菌的应用前景,还需要做相应的动物模型实验和临床实验研究。

参考文献

- [1] 刘柏春, 陈素纯. 56 例肝胆外科病房深部真菌感染临床分析及防治措施[J]. 中国实用医药, 2010, 5(12): 77-8.
- [2] Lortholary O, Renaudat C, Sibon K, et al. Worrisome trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010) [J]. Intensive Care Med, 2014, 40(9): 1303-12.
- [3] Park M, Do E, Jung W H. Lipolytic enzymes involved in the virulence of human pathogenic fungi[J]. Mycobiology, 2013, 41(2): 67-72.
- [4] Conde-Rosa A, Amador R, Perez-Torres D, et al. Candidemia distribution, associated risk factors, and attributed mortality at a university-based medical center[J]. P R Health Sci J, 2010, 29(1): 26-9.

(下转第 1827 页)

网络出版时间: 2015-11-18 10:12:35 网络出版地址: http://www.cnki.net/KCMS/detail/34.1065.R.20151118.1012.060.html

◇ 综 述 ◇

脊髓损伤后血脊髓屏障病变机制研究进展

刘明明^{1,2*} 程 建^{3*} 综述, 马 勇¹, 黄桂成¹ 审校

摘要 脊髓损伤常会遗留神经系统后遗症,甚至导致患者瘫痪,其病理过程包括原发性损伤和继发性损伤。继发性损伤是引起脊髓病变的主要原因,往往导致脊髓无法恢复正常功

能,而继发性损伤与血脊髓屏障形态与功能的异常变化密切相关。通过回顾近些年关于血脊髓屏障的基础试验研究,对脊髓损伤后血脊髓屏障的病理变化及发病机制进行综述。

关键词 脊髓损伤; 血脊髓屏障; 继发性损伤; 病理生理学

中图分类号 R 363.2; R-332

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)12-1827-04

2015-06-15 接收

基金项目: 江苏省自然科学基金(编号: BK2011180); 徐州市科技局社会发展项目(编号: KC14SH030)

作者单位: ¹南京中医药大学第一临床医学院, 南京 210046

²南京中医药大学附属徐州市中医院骨科, 徐州 221000

³东南大学医学院附属徐州医院骨科, 徐州 221000

作者简介: 刘明明, 男, 主治医师, 博士研究生;

黄桂成, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: lanbing3399@sina.com

* 对本文具有同等贡献

脊髓损伤是临床常见病, 受伤者以中青年居多, 最常见原因为交通事故。随着社会的快速发展, 其发病率正逐年增高。而脊髓损伤常会导致患者终生瘫痪, 给患者带来巨大痛苦。目前临床上对于脊髓损伤的治疗仍是一个难题, 因此, 对脊髓损伤的病理变

(上接第 1820 页)

- [5] 卢新培. 等离子体射流及其医学应用[J]. 高电压技术, 2011, 37(6): 1416-25.
- [6] Heinlin J, Morfill G, Landthaler M, et al. Plasma medicine: possible applications in dermatology [J]. J Dtsch Dermatol Ges 2010, 8(12): 968-76.
- [7] Shen J, Cheng C, Fang S, et al. Sterilization of *Bacillus subtilis* spores using an atmospheric plasma jet with argon and oxygen mixture gas [J]. Applied Physics Express 2012, 5(3): 339-45.
- [8] 喻楠, 尚元元, 贾伟, 等. 医院深部真菌感染危险因素分析[J]. 中华医院感染学杂志 2012, 22(13): 2789-91.
- [9] 潘彦卫, 冯文莉, 杨静, 等. 白色念珠菌伊曲康唑耐药和敏感菌株 SAP 活性与菌株毒力关系的研究[J]. 中国药物与临床,

2015, 15(5): 614-7.

- [10] 周澄宇. 基层医院真菌感染分布及抗真菌药物敏感性分析[J]. 实用预防医学 2015, 22(7): 882-3.
- [11] Daeschlein G, von Woedtke T, Kindel E, et al. Antibacterial activity of an atmospheric pressure plasma jet against relevant wound pathogens *in vitro* on a simulated wound environment [J]. Plasma Processes Polym 2010, 7(3-4): 224-30.
- [12] Weltmann K D, Kindel E, von Woedtke T, et al. Atmospheric-pressure plasma sources: prospective tools for plasma medicine [J]. Pure and Applied Chemistry 2010, 82(6): 1223-37.
- [13] 黄玉淑, 白丽. 白色念珠菌感染免疫应答的研究进展[J]. 基础医学与临床 2012, 32(9): 1103-6.

In vitro inhibition of low-temperature plasma on *Candida albicans*

Du Wenhui¹, Huang Shenghai¹, Li Hui², et al

(¹Dept of Microbiology, School of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Dept of Dermatology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract The *Candida albicans* ATCC10231 was selected as the experiment strain. After the irradiation with low-temperature plasma, the growths of the colonies were observed. By low-temperature plasma irradiation after 30, 60, 120 and 180 s, obvious bacteriostatic rings appeared in the irradiation location of the center of the culture medium, with the extension of irradiation time, the bacteriostatic rings increased gradually. The bacteriostatic rings have not changed during the observation period for 3 consecutive days. Low-temperature plasma can inhibit the growth of *albicans in vitro*. It will provide the laboratory basis for the new means of treatment for *Candida albicans* infection in the future.

Key words low-temperature plasma; *Candida albicans*; inhibition