

# 温度及酸碱度对角膜分离棘阿米巴虫株活性影响的实验研究

高敏 张琛 肖扬 王智群 罗时运 李然 孙旭光

## Influence of temperatures and pH value on biological activity of *acanthamoeba* isolated from keratitis

Gao Min, Zhang Chen, Xiao Yang, Wang Zhiqun, Luo Shiyun, Li Ran, Sun Xuguang. Department of Ophthalmology, Beijing Chaoyang Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100043, China

**Abstract Objective** *Acanthamoeba* survival at the forms of trophozoite and encyst inwrap, and the change of these two forms is associated with temperature and pH value. The trophozoite of *acanthamoeba* has the stronger pathogenicity. Present study aimed to observe the biological activity of *acanthamoeba* isolated from keratitis under different temperatures and pH value.

**Methods** The corneal tissue from penetrating keratoplasty for keratitis was obtained. The *acanthamoeba* was isolated from the cornea tissue with *acanthamoeba* keratitis. The cloned isolates were axenized and cultured in proteose-yeast-glucose (PYG) medium and passaged. The proliferation rate and growth statue were subsequently observed under the light microscope and inverted microscope. The growth *acanthamoeba* cultures were harvested to the density  $10^5$ /mL by centrifugation for 15 minutes, and then the MTT assay was performed using 20  $\mu$ L (5 mg/mL) of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl-tetrazolium bromide under the different pH values and temperatures. Initial cultures with  $10^4$ /mL were seeded under the different pH values (6.5, 7.0, 7.5, 8.0). Samples were examined for trophozoites and cysts at 12-hour interval by directly counting. All assay was performed in triplicate. **Results** Under the temperatures from  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  to  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ , *acanthamoeba* shranked or disrupted in pH values of 1.5 and 3.0, however, under the same temperature and alkali conditions with pH values 10 and 12, the *acanthamoeba* showed the irregular cysts and pre-cysts. Under the temperatures of  $4\text{ }^\circ\text{C}$  to  $35\text{ }^\circ\text{C}$  and pH values 3.0, 6.5, *acanthamoeba* proned to be trophozoite. On the same temperature with alkali condition (pH values 7.0, 7.5, 8.0), *acanthamoeba* existed at the fashion of cyst. The optimum temperature range and pH value for *acanthamoeba* to growth was  $4\text{ }^\circ\text{C}$  to  $35\text{ }^\circ\text{C}$  and 6.5 respectively. **Conclusion** *Acanthamoeba* is tend to be trophozoite and has higher reproducing ability in acid condition and suitable temperature. In alkaline environment, *acanthamoeba* exists as cysts and presents lower active ability.

**Key words** *acanthamoeba*; temperature; pH value; keratitis

**摘要 目的** 观察不同温度及 pH 条件对角膜分离的棘阿米巴虫株活性的影响,探讨抑制其生长的条件。 **方法** 从棘阿米巴性角膜炎患者角膜中分离培养棘阿米巴虫株,置于棘阿米巴液体培养基(PYG)中进行纯培养。利用四甲基偶氮唑盐(MTT)法,观察不同 pH 值及不同温度下棘阿米巴的增生率及其形态变化。 **结果** 在深低温条件下( $-80\sim -20\text{ }^\circ\text{C}$ ),酸性环境中的棘阿米巴多呈皱缩状,部分虫体破裂;在碱性环境中,棘阿米巴多呈典型的囊前期或包裹状态存在。培养温度为  $4\sim 35\text{ }^\circ\text{C}$ ,棘阿米巴虫株于酸性环境中,多以滋养体形式存在,其增生率随温度的升高而增加;相反,在  $\text{pH} > 8$  的碱性环境中,棘阿米巴虫株则多以包裹形式存在。 $28\sim 35\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $\text{pH} 6.5$  为棘阿米巴虫株体外生长的最适条件。 **结论** 棘阿米巴在酸性环境中适应生长,多以繁殖能力强的滋养体形式存在,而在碱性环境中,棘阿米巴则多以包裹的形式存在。

**关键词** 棘阿米巴; 温度; pH 值; 角膜炎

**分类号** R 772.21 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)08-0685-03

作者单位:100043 北京,首都医科大学附属北京朝阳医院眼科(高敏、肖扬);100005 北京,首都医科大学附属北京同仁医院 北京市眼科研究所(张琛、王智群、罗时运、李然、孙旭光)

通讯作者:孙旭光 (Email: sunxuguang@yahoo.com)

棘阿米巴是一类自生生活原虫,广泛分布于自然界,可导致严重威胁视力的棘阿米巴性角膜炎<sup>[1]</sup>。棘阿米巴病原体以滋养体和包裹 2 种形式存在,滋养体

是其活跃期形式,为致病形式,二分裂繁殖,在一定条件下,滋养体和包囊可相互转化。滋养体对抗棘阿米巴药物比较敏感;包囊是棘阿米巴的静止期形式,有双层囊壁,对温度变化、干燥与常见消毒剂和抗棘阿米巴药物有较强抵抗力。深入研究棘阿米巴原虫的生物学特性有助于进一步了解其致病性和寻找有效的治疗方法。本研究旨在观察角膜分离的棘阿米巴虫株在不同温度及 pH 条件下的活力,探索抑制其生长的条件。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要试剂及配制

**1.1.1 棘阿米巴液体培养基 (Peptone-Yeast-Glucose, PYG)** 蛋白胨 10 g, 酵母提取 1 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.492 g,  $CaCl_2$  0.022 g, 柠檬酸钠 $\cdot 2H_2O$  0.500 g,  $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$  0.010 g,  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  0.448 g,  $KH_2PO_4$  0.170 g, 葡萄糖 9.9 g, 蒸馏水 500 mL, 高压灭菌后 4 °C 保存。

**1.1.2 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 液** 10 mg MTT 粉剂溶于 2 mL PBS 中, 配成 5 mg/mL, 0.22 μm 无菌滤膜过滤, 4 °C 避光保存, 有效期为 1 周。

**1.1.3 10% SDS 液** 10 g SDS 溶解于 100 mL 的 0.01 mol/L HCL 中。

#### 1.2 棘阿米巴的无菌化培养

将棘阿米巴角膜炎患者在穿透角膜移植术中取下的角膜片在无菌条件下接种于新鲜配制的 PYG 培养液中, 密封后置于 28 °C 恒温箱中静置培养 3 ~ 5 d。待棘阿米巴生长至一定 ( $10^4$ /mL) 浓度时, 传代培养。

#### 1.3 不同温度及 pH 值条件下棘阿米巴活力的研究

以 500 g 离心 15 min 收集棘阿米巴, 调整细胞悬液浓度为  $10^5$ /mL, 加入 96 孔板中, 每孔 100 μL, 每列 pH 值不同, 每个 pH 值设 9 个复孔, 同时设棘阿米巴阴性对照孔, 而后将载有棘阿米巴的 96 孔板分别置于 35、28、4、-20、-40、-80 °C 中 12 h, 取出倒置显微镜观察细胞形态学变化。加入 MTT 10 μL/孔, 28 °C 4 h 后, 每孔加入 100 μL 20% SDS-50% DMF, 37 °C 过夜, 酶标仪测 OD<sub>570</sub> 值。计算测定样本实验孔与棘阿米巴阴性对照孔的差值。

#### 1.4 统计学方法

应用 SPSS 10.5 统计学软件进行统计学分析。不同温度及 pH 值条件下棘阿米巴繁殖活力测定 OD<sub>570</sub> 值为培养前后的差值以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用两因素方差分析, 多重比较采用 SNK-q 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

### 2 结果

#### 2.1 棘阿米巴的无菌化培养

棘阿米巴在 PYG 培养液中生长良好, 3 ~ 5 d 达对数生长期, 大部分贴壁生长, 呈现典型的滋养体形态, 部分以包囊状态悬浮于液体中。

#### 2.2 不同温度及 pH 值条件下棘阿米巴形态及增生活性的观察

在 4 ~ 35 °C 的范围内, 于酸性环境中的棘阿米巴多以滋养体形式存在, 最适 pH 为 6.5 ~ 8 之间, 在此条件下几乎所有棘阿米巴均为活跃的滋养体形式 (图 1); 当 pH > 8 时, 棘阿米巴则倾向于转化为囊前期或包囊形式 (图 2)。在深低温度条件下 (-80 ~ -20) °C,

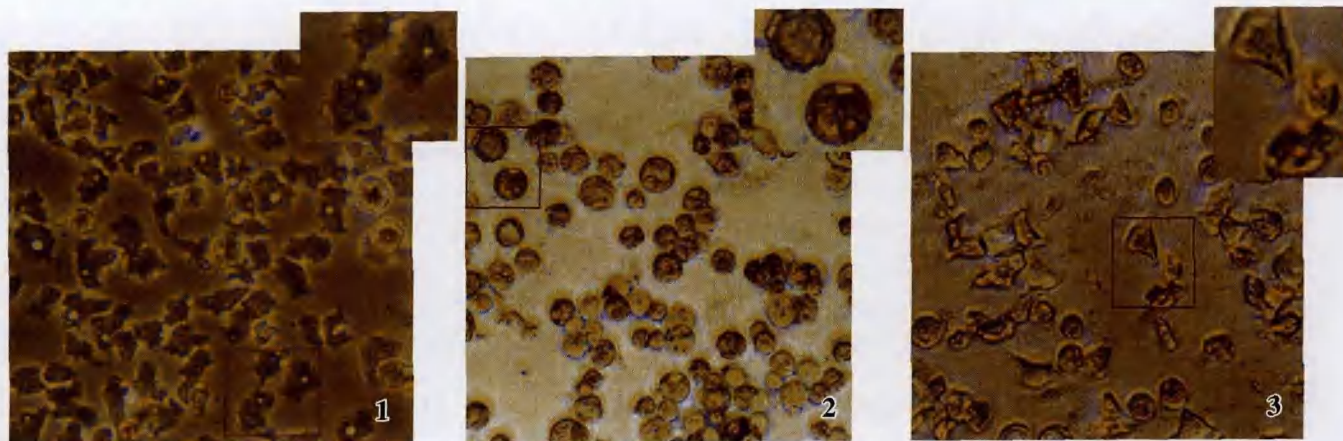


图 1 28 °C、pH 6.5 环境下棘阿米巴滋养体 图 2 4 °C、pH 10 环境下棘阿米巴包囊 图 3 -80 °C、pH 1.5 环境下棘阿米巴细胞的破裂

Fig.1 *Acanthamoeba* trophozoites under the temperature of 28 °C and pH 6.5 (contrast microscopy ×100) Fig.2 *Acanthamoeba* cysts under the temperature of 4 °C and pH 10 (contrast microscopy ×100) Fig.3 *Acanthamoeba* shrink or disrupt under the temperature of -80 °C and pH 1.5 (contrast microscopy ×100)

表 1 不同温度与 pH 条件下棘阿米巴繁殖活性测定 (OD<sub>570</sub> 值)  
Table 1 Reproduce activity of *acanthamoeba* under the different temperatures and pH value(OD<sub>570</sub> value)

Temperature (°C)	OD value of <i>acanthamoeba</i> in different pH value							
	pH 12	pH 10	pH 8.0	pH 7.5	pH 7.0	pH 6.5	pH 3.0	pH 1.5
35	0.000	0.083 ± 0.004	0.108 ± 0.004	0.221 ± 0.004	0.229 ± 0.004	0.411 ± 0.005	0.306 ± 0.013	0.000
28	0.000	0.083 ± 0.004	0.110 ± 0.003	0.221 ± 0.032	0.233 ± 0.001	0.415 ± 0.004	0.396 ± 0.006	0.000
4	0.000	0.080 ± 0.004	0.106 ± 0.004	0.212 ± 0.004	0.217 ± 0.005	0.379 ± 0.002	0.372 ± 0.005	0.000
-20	0.000	0.079 ± 0.003	0.107 ± 0.005	0.208 ± 0.005	0.216 ± 0.003	0.294 ± 0.004	0.102 ± 0.002	0.000
-40	0.000	0.078 ± 0.003	0.105 ± 0.002	0.198 ± 0.003	0.207 ± 0.003	0.254 ± 0.016	0.000	0.000
-80	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

$F_{\text{temperature}} = 6.581, P = 0.000; F_{\text{pH}} = 11.301, P = 0.000$  (Two-way ANOVA, SNK- $q$  test)

于较强酸性的环境中,棘阿米巴多呈皱缩,甚至细胞体破裂、产生大量细胞碎片(图3);而在深低温碱性环境中,棘阿米巴仍能以完整的包囊或囊前期形式存在。

### 2.3 MTT 法测定棘阿米巴增生活性的 OD<sub>570</sub> 值

在不同温度和 pH 条件下棘阿米巴增生活性测定结果见表 1。

当 pH 为 12 及 1.5、温度为 -80 °C 时,实验孔 OD<sub>570</sub> 值均接近于阴性对照孔 OD<sub>570</sub> 值,表明在此条件下无棘阿米巴存活,与 pH 为 3、温度为 -40 °C 时结果相同。在其他温度和 pH 条件下,对于同一温度,各个 pH 实验组的培养前后 OD<sub>570</sub> 差值之间均有明显不同,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。pH 在 3 ~ 7 时,各个温度实验组 OD<sub>570</sub> 差值均有不同,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); pH 为 8,温度为 -20 °C 及 -40 °C 的实验组与其他温度实验组比较,其培养前后 OD<sub>570</sub> 差值低于后者,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ );其余各实验组之间比较,培养前后 OD<sub>570</sub> 差值差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

棘阿米巴角膜炎为一种严重的潜在致盲性眼病,由 Jones 等<sup>[1]</sup>首次报道。近年来,由于角膜接触镜的广泛使用,其发病率迅速增长<sup>[2]</sup>。据文献报道,在感染性角膜溃疡的患者中,16% 为棘阿米巴角膜炎患者,尽管诊疗技术和治疗策略不断改进,预后仍然较差<sup>[3]</sup>。

病原体棘阿米巴广泛存在于自然界如土壤、淡水、海水、空气及腐败植物中。其生活史分为滋养体和包囊 2 个阶段,滋养体是棘阿米巴的活动与感染形式,环境适宜时,棘阿米巴多以滋养体形式存在,不良条件下可转换成具有抗性的包囊<sup>[4]</sup>。棘阿米巴包囊对外界环境的抵抗力极强,在干燥、高温及化学物质的环境中均可存活。一般包囊在体外环境中可以存活一年左右<sup>[5]</sup>,最长可达 3 年之久<sup>[6]</sup>。

目前,常规的抗菌药物、氯化物、化学消毒剂等均无法将包囊杀死,而滋养体对药物较为敏感,因此通过改变条件使包囊向滋养体转化,可能对提高治疗效果缩短疗程有作用。

本研究表明棘阿米巴在极酸 (pH 1.5)、极碱 (pH 10) 及 -80 °C 的条件下均不能存活, pH 6.5、28 °C 的条件下棘阿米巴生长最佳,且在偏酸性的环境中,棘阿米巴活力较高,多以活跃的滋养体形式存在。相反,在偏碱性的环境中,棘阿米巴多以静止的包囊形式存在。提示可改变 pH 促使棘阿米巴向滋养体转化,并且深低温治疗可能有一定的有效性。

本研究在体外条件下对棘阿米巴在不同温度及 pH 条件下活力进行了初步的研究,为探索新的临床治疗方案提供了病原学基础,在适于转化的 pH 和温度条件下,加上抗棘阿米巴药物的效果观察将是未来研究的重点。

### 参考文献

- 1 Jones BR, McGill JI, Steele AD. Recurrent suppurative kerato-uveitis with loss of eye due to infection by *Acanthamoeba castellanii* [J]. Trans Ophthalmol Soc UK, 1975, 95 (2): 210 - 213
- 2 Xuan YH, Yu HS, Jeong HJ, et al. Molecular characterization of bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* isolates from infected corneas of Korean patients [J]. Korean J Parasitol, 2007, 45 (1): 1 - 9
- 3 Duguid IGM, Dart JK, Morlet N, et al. Outcome of *Acanthamoeba* keratitis treated with Polyhexamethyl Biguanide and Propamidine [J]. Ophthalmol, 1997, 104: 1587 - 1592
- 4 Turner NA, Russell AD, Furr JR, et al. *Acanthamoeba* spp. antimicrobial agents and contact lenses [J]. Sci Prog, 1999, 82 (Pt 1): 1 - 8
- 5 Schaumberg DA, Snow KK, Dana MR. The epidemic of *Acanthamoeba* keratitis: Where do we stand [J]? Cornea, 1998, 17 (1): 3 - 10
- 6 Badenoch PR. The pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis [J]. Ophthalmology, 1991, 19 (1): 9 - 20

(收稿: 2008-11-06 修回: 2009-06-18)

(本文编辑: 高红)