

不吸水链霉菌代谢产物体内外 抗致病真菌作用的观察

杨石璋

侯芳玉

(吉林省农科院农副产品加工研究中心,公主岭 136100)(白求恩医大基础医学院微生物教研室)

提 要 不吸水链霉菌(*Streptomyces ahgrosopicus*)是吉林省农科院胡吉成研究员从土壤中筛选出的一株放线菌(SM),其代谢产物(简称 SAMP)具有广谱抗真菌作用^[1]。本实验观察了 SAMP 对常见的浅部真菌和白色念珠菌、新型隐球菌在体内外的抗菌作用。结果表明,SAMP 在体外有明显的抗真菌作用,其效果与二性霉素 B 相近。SAMP 可明显降低白色念珠菌血行感染和新型隐球菌脑内感染小鼠的死亡率。明确了 SAMP 对真菌有明显的抑制作用。

关键词 不吸水链霉菌;代谢产物;抗真菌;白色念珠菌;新型隐球菌

真菌的种类繁多,所引起的感染难以治愈,尤其是免疫功能低下的病人,真菌感染更多见,且危险。然而,抗深部真菌感染的药物很缺乏,为此,寻找高效、低毒和广谱的抗真菌药物十分必要^[2]。我们曾对高效价不吸水链霉菌代谢产物的产生条件进行过筛选^[3],本文主要介绍了 SAMP 对真菌的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 菌种

狗小孢子菌、石膏样小孢子菌和红色毛癣菌由白求恩医科大学一院皮肤科惠赠,新型隐球菌和白色念珠菌为白求恩医科大学基础医学院微生物教研室保存的菌种,不吸水链霉菌菌种购自中国农科院土肥所菌种保藏室。

1.2 培养基

由白求恩医科大学基础医学院微生物教研室制备。

1.3 药物

二性霉素 B(amphotericin B)为上海第三制药厂生产,硝酸咪康唑软膏为鞍山第四制药厂生产,SAMP 由白求恩医科大学基础学院微生物教研室制备。将不吸水链霉菌在固体培养基上传 3 代后,取第三代菌接种于 50 mL 液体培养基中,在往复式摇床上培养 36 h 后,取培养物转种于 250 mL 液体培养基内,接种量为 5%。继续在 28 ℃摇床上培养 72 h 后,将菌液离心沉淀 30 min,离心速度为 1 500 r/min,取上清液用 G6 滤器滤过除菌后,放入冰箱保存备用。此上清液中含不吸水链霉菌的代谢产物。

1.4 供试动物

Swiss 小鼠,体重 20 ± 2 g,雌雄不限;豚鼠 300 g,雌雄不限,均由白求恩医科大学实验动物部提供。

1.5 体外抑菌试验

平板打孔法^[4]:将待试各菌按需要量(白色念珠菌和新型隐球菌各为 1×10^5 CFU 孢子量,狗小孢子菌、石膏样小孢子菌、絮状表皮癣菌和红色毛癣菌各为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ CFU 分生孢子量)接种于平板培养基上,等距离打孔,孔径为 5 mm,孔距为 2 cm,然后加入 SAMP,设二性霉素 B 为阳性对照,浓度为 4 mg/L。白色念珠菌和新型隐球菌在 30 ℃ 下培养 24 ~ 48 h,其它各菌在 28 ℃ 下培养 7 d,培养终止时测量抑菌环直径。

试管法:将 SAMP 用肉汤倍比稀释,再以 1:9 的 SAMP 与培养基之比混合制成含系列 SAMP 浓度的培养基,分装于试管中,每管 5 mL。将各菌按上述量接种于斜面上,设二性霉素 B 为阳性对照管和不加 SAMP 的为阴性对照管。以有无细菌生长和细胞的数量来判定 SAMP 的抑菌作用及抑菌强度。

1.6 疗效

1.6.1 对皮肤癣菌病的治疗效果 在豚鼠背部两侧各剪毛 4 cm × 4 cm,取石膏样毛癣菌菌落加 5 mL 无菌生理盐水,搅匀后涂于剪毛区皮肤上,约 1 周待皮疹分布于整个剪毛区后开始治疗。治疗组分别用 SAMP 和硝酸咪康唑(阳性对照组药)直接涂于患处,每日两次,对照组不治疗。在治疗 5、10 和 14 d 时分别取局部鳞屑镜检。

1.6.2 对白色念珠菌和新型隐球菌感染小鼠的保护作用 将小鼠按体重分层随机分组,每组 10 只,分别进行尾静脉和颅内感染。感染前先恢复菌的毒力,测出 10 d 内使小鼠 100% 死亡的致死量,以此菌量作为感染的菌量。白色念珠菌经尾静脉注射菌液 0.2 mL(含 1×10^6 CFU),接种 2 h 后开始腹腔注射 SAMP 1.0、0.5、0.25 mL,每天给药 1 次。连续给药 7 d,停药后观察 7 d。新型隐球菌颅内感染为注射该菌液 0.1 mL(含 1×10^7 CFU),接种 2 h 后开始腹腔注射 SAMP,剂量同上,每日 1 次,连续治疗 14 d,停药后观察 7 d。实验终止时取白色念珠菌感染小鼠的肾脏均浆液和新型隐球菌感染小鼠的脑组织匀浆,做倾注培养,计数菌落数。同时设二性霉素 B 组和生理盐水组为对照。二性霉素 B 组腹腔注射二性霉素 B 1.5 mg/kg,给药及观察时间同 SAMP 组,生理盐水对照组注射灭菌生理盐水 0.2 mL/只,观察 100% 死亡,作为治疗组疗效判断参考。

2 结果

2.1 体外抑菌试验

采用体外抑菌试验法观察到 SAMP 对多种真菌有抑制作用(表 1)。从表 1 可见,SAMP 对 6 种真菌均有抑制作用,除对红色毛癣菌的抑制作用优于二性霉素 B 外,对其余 5 种真菌的抑制效果与二性霉素 B 无明显差异($P > 0.05$)。

表 1 SAMP 在体外对常见致病真菌的抑菌作用

($\bar{x} \pm s$)

真 菌	抑 菌 环 直 径 (cm)		P 值
	SAMP	二性霉素 B	
白色念珠菌	2.00 ± 0.22	2.20 ± 0.14	> 0.05
新型隐球菌	2.86 ± 0.26	2.94 ± 0.18	> 0.05
狗小孢子菌	1.88 ± 0.11	2.12 ± 0.20	> 0.05
石膏样小孢子菌	1.84 ± 0.17	1.90 ± 0.15	> 0.05
絮状表皮癣菌	1.90 ± 0.14	1.84 ± 0.16	> 0.05
红色毛癣菌	2.08 ± 0.12	1.72 ± 0.20	< 0.05

注:抑菌环直径是 6 个培养孔的平均值。

体外抑菌试验试管法的结果表明,将 SAMP 用肉汤 2、4、6、8、10、16、20、30、40 倍稀释后,稀释 8 倍以内的培养管内无菌生长,10 倍以上的培养管内开始有细菌生长,稀释倍数越大,菌生长的越多。稀释 30 倍以上的试管内,菌苔与对照管相同,菌长满整个斜面。显微镜下见菌丝光滑、粗细均匀,大小分生孢子良好。稀释 10、16 和 20 倍的培养管内虽有菌生长,但镜下见菌丝变形,屈曲或聚集呈块状,厚膜孢子多而分生孢子少。

2.2 SAMP 的体内抑菌作用

用 SAMP 治疗豚鼠皮肤感染癣菌病 4 d,皮肤厚痂脱落,鳞屑减少,1 周后皮肤炎症明显减轻,脓性分泌物消失,2 周完全治愈。阳性对照药硝酸咪康唑治疗组治疗 1 周后皮损区缩小,炎症减轻,但局部仍有脓痂,16 d 后完全治愈。两组分别在治疗 4、6、10 d 时取鳞屑镜检,真菌均为阴性。对照组皮损扩大,第 3 周镜检真菌仍为阳性。

SAMP 对白色念珠菌和新型隐球菌体内感染小鼠的保护作用结果见表 2。从表 2 可见,SAMP 对白色念珠菌和新型隐球菌感染的小鼠有一定保护作用,而且随着 SAMP 剂量的增大,保护作用越明显。在白色念珠菌感染的小鼠 1 mL/只 SAMP 组仅 1 只死亡,0.5 mL/只 SAMP 组和 0.25 mL/只 SAMP 组分别死亡 5 和 8 只,盐水组 10 只动物全部死亡。用 SAMP 治疗新型隐球菌颅内感染的效果与白色念珠菌的情况基本相同。将存活动物取肾脏(白色念珠菌)和脑(新型隐球菌)匀浆后培养,可见 SAMP 高剂量组培养出的细菌数明显少于低剂量组。

表 2 SAMP 对白色念珠菌和新型隐球菌感染小鼠的保护作用($n > 10$)

项 目	白色念珠菌		新型隐球菌	
	存活小鼠数(%)	真菌数($\bar{x} \pm s$)	存活小鼠数(%)	真菌数($\bar{x} \pm s$)
SAMP 1 mL/只	9(90)	70.4 ± 13.3	6(60)	15.5 ± 14.2
0.5 mL/只	5(50)	120.0 ± 25.8*	2(40)	73.8 ± 13.6
0.25 mL/只	2(20)	198.4 ± 30.5*	1(10)	110.4 ± 20.5*
二性霉素 B	10(100)	68.0 ± 27.4	8(80)	50.3 ± 11.4
生理盐水	1(10)	282.0 ± 40.3	0(0)	-

* $P < 0.05$ 1 mL 组比较/只

3 讨 论

本研究结果表明,SAMP 对常见的使人类致病的浅部和深部真菌在体内外均表现出明显的抑制作用。在体外研究中发现,SAMP 对红色毛癣菌的抑制效果明显优于二性霉素 B,对其它研究的各菌的抑制作用与二性霉素 B 无明显差异。这些结果表明,SAMP 的抑制真菌效果与目前常用的抗真菌药二性霉素 B 相当或稍优,应对 SAMP 的抑真菌作用进行更进一步的深入研究。

在体内试验中观察到,SAMP 对白色念珠菌血行感染的小鼠保护作用与二性霉素 B 相接近,然而,对新型隐球菌颅内感染小鼠的保护作用不如二性霉素 B 效果好。SAMP 1 mL/只组存活 6 只,而二性霉素 B 组存活 8 只。这种差异可能与 SAMP 通过血脑屏障的能力弱有关,使之在脑组织中不能达到有效的抑菌浓度,对感染重的小鼠不能有效地抑制新型隐球菌的生长、繁殖,致使小鼠死亡。这与 SAMP 体外对新型隐球菌的抑制效果略有不同。

不吸水链霉菌在培养过程中易受多种因素的影响,其代谢产物(SAMP)中的有效抑菌成分及其含量也会因条件变化而改变。由于 SAMP 是多种成分的混合物^[5],目前尚不能准确

测定出各有效成分的含量,故不同批次收集的 SAMP 的抑菌效果也有差异。如能把 SAMP 中抗真菌作用有效成分的含量,进一步提取、分离、纯化后再进行深入的研究,可能其效果会更令人满意。

(责任编辑:任 禾)

玉米大面积高产示范课题召开 年度工作会议

为总结课题 1997 年工作、制定布置 1998 年实施方案,吉林省科委、省农科院主持召开了“玉米大面积高产示范课题年度工作会议”,课题领导小组成员、11 个示范县(市)主管农业县(市)长、科委主任、农业局长、5 个专题 15 个子专题及 8 个招标单位负责人和主要参加人计 100 余人参加了会议。

会议首先传达了杨庆才副省长对大课题执行情况签署的意见,杨副省长高度评价了课题人员在 1997 年大旱条件下所做的工作,对课题创造的 15 840 kg 全国最高单产、总增产 10.2 亿 kg 玉米的成绩给予充分肯定,并对下一步工作的关键问题提出具体要求。课题主持人、省农科院冯巍院长向大会作了玉米大面积高产示范课题 1997 年度工作总结报告,报告详细总结了课题总体实施进展情况。课题总计落实“一田三区”面积 90.9 万公顷,比原计划增加 30%。高产样板田、试验区、示范区、辐射区公顷产分别达到 11 790、10 875.9 645.8 175 kg,比前三年分别增加 1 590、675、465、1 125 kg,创社会效益 4 亿元。攻关研究取得突破性进展,提出了我省玉米全程性模式化栽培体系,研制成功 IGH—2 型根茬粉碎还田机和 2BS—2 型玉米精密播种机,并研究出精密播种、深松蓄水、秸秆还田、大垄双行新耕作栽培配套技术。开展的玉米螟发生规律长期预测预报体系和综合防治技术获省科技进步二等奖,多功能种衣剂与应用技术获省政府科教兴农一等奖。在我省遭受历史罕见旱灾的条件下,课题取得了显著成绩,充分说明课题的研究成果和推广技术在农业生产中发挥了实实在在的作用,体现出科技人员在科教兴农活动中的先锋作用,显示了科学技术抗御自然灾害的巨大威力。

省科委李广臣副主任就如何做好 1998 年课题实施工作作了重要布署。他指出:1998 年是落实年,要真抓实干,要见实效。总的指导思想是“再度认识,增强信心,加大力度,务求突破”,继续强化技术集成、攻关研究、管理服务力度,力争在增产增收、科技攻关、科学化管理上有新的突破,迎接国家科委对课题的中期评估。攻关研究要抓住难点,争取在 6 个方面取得突出进展:一是提高果穗整齐度的研究,包括品种的优化组合、适宜密度,按照品种的吸肥特性制定施肥技术;二是以解决早衰、早收为中心的攻关技术研究,包括深松、深施肥、平衡施肥、适时晚追肥、化控技术、氮钾肥配合等;三是以培肥地力、培育根系、高产稳产为主的耕种体系研究,包括宽窄行交互种植、高茬还田、行间深施肥及配套机具;四是纸筒育苗移栽、地膜覆盖等特殊栽培技术研究;五是多抗品种筛选技术;六是秸秆压块饲料工艺及其开发研究。高产示范工作要以优良杂交种优化品种组合为中心,以培肥地力为基础,以机械为载体,因地制宜地应用深松蓄水、精细耕作、平衡施肥、综合防治病虫害鼠害、节水灌溉和化学调控等实用技术,防止叶片早衰和子粒败育,提高果穗整齐度,以达到高产优质、增收的目的。李副主任进一步要求课题人员要紧密配合,通力协作,发挥各部门力量,做好备耕培训工作,切实制定好技术、工作方案,把今年的工作尽早、尽快地落实下去。

玉米大面积课题办公室 王风华供稿

(责任编辑:任 禾)