DOI:10.16016/j.1000-5404.1988.03.010

过氧化氢对白色念珠菌超微结构及通透屏障影响的研究

俞晓峰 涂 瀛 （流行病学教研室）

提 要 本文用电镜观察和对同位素标记物漏出检测的方法，研究了一定浓度的H_2O_2对C.albicans超微结构及其通透屏障的影响。电镜观察到经H_2O_2处理的C.albicans超微结构及表面形态发生改变，并伴有内容物漏出的征象。漏出物dpm值检测进一步证明，H_2O_2可引起C.albicans DNA漏出，且DNA漏出的量与细胞存活数间呈负相关，提示H_2O_2对C.albicans通透屏障的破坏，造成其内DNA漏出是细胞致死的重要原因之一。

关键词 过氧化氢类—药效学；白念珠菌—药物作用；白念珠菌—超微结构

过氧化氢（H_2O_2）对真核微生物的杀菌机理迄今国内外未见报道。本文用电镜观察和同位素标记物测定法研究了一定浓度H_2O_2对白色念珠菌（C.albicans）超微结构及其通透屏障的影响，旨在为深入探讨H_2O_2的作用机理提供线索。

材 料 和 方 法

一、菌种及培养 C.albicans(AS.2.538中国科学院微生物学研究所提供）在37℃下于沙氏培养基培养48h，并制备成浓度为3.0～4.5×10CFU/ml的悬液。

二、H_2O_2的配制 H_2O_2为市售的30%H_2O_2溶液（上海桃浦化工厂产）。实验前用灭菌蒸馏水将已标定的H_2O_2溶液配成浓度分别为6%、12%、和20%的溶液。

三、C.albicans电镜样品制备及观察 (1)扫描电镜（SEM）样品的制备及观察，C.albicans悬液与等量的H_2O_2作用后，用3%戊二醛低温(0℃)固定约1.5h，细胞涂片，并用1%锇酸（OsO_4）低温固定2h，以下按常规法制备[1]。用SEM（AMR1000-A型，美国AMRAY公司，分辨率60Å）观察C.albicans形态改变。(2)透射电镜（TEM）样品的制备及观察：H_2O_2处理同SEM，经3%戊二醛和1%OsO_4低温下分别固定一定时间后，离心收集细胞，并按常规法制备超薄切片[1]。在TEM（DXB2-12型，上海新跃仪表厂，分辨率2.04Å）下观察C.albicans超微结构及其改变。

四、^{3}H-胸腺嘧啶核苷（^{3}H-TdR）标记C.albicans DNA及其漏出的检测 (1)合成培养基配制：称取一定量的10种氨基酸[2]与基础培养基成份[3]混合，过滤除菌（滤膜孔径0.22μm），并配成一定浓度的合成培养基。(2)^{3}H-TdR参入，取浓度为1μCi/ml的^{3}H-TdR（放射性比度25Ci/mM，放化纯度＞95%，中国原子能科学研究院）溶液3ml与合成培养基1ml、C.albicans悬液0.7ml混合，37℃下培养3天，离心沉淀清洗6次，配成浓度为3.0～4.0×10^3CFU/ml的悬液。(3)H_2O_2处理及滤液收集：用上述悬液与等量一定浓度H_2O_2分别于25℃和37℃水浴中作用一定时间，抽滤收集滤液。对照以无菌蒸馏水代替H_2O_2处理，重复5次。(4)样品每分钟衰变数（dpm）测定，取上述滤液各0.2ml，加至10ml闪烁液中[4]，用自动液体闪烁计数器（Rack，Beta 1217型，Finland）作各样品复管测定，直接求出其dpm值。

五、活菌计数 经H_2O_2处理的C.albicans悬液用平板涂布法[10]活菌计数，重复4次。

六、统计处理 检测的dpm值数据输入计算机（Sakata，SG-1000型）进行方差分析。

结 果

一、电镜观察C.albicans超微结构改变

（1）SEM观察：在SEM下，正常C.albi-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

cans表面呈光滑似球形，有以芽生方式出现在母体细胞表面的子体细胞，细胞间多有小梗连接(图1)。经H_2O_2处理后，C.albicans立体形态改变，出现凹陷及萎缩；有的表面可见似小孔样改变，严重破坏者可完全失去细胞形态（图2）。

（2）TEM观察：在TEM下，正常C.albicans细胞壁结构完整，细胞膜清晰，胞核和空泡明显，胞浆内可见线粒体（图3）。经H_2O_2处理后，细胞壁完整结构破坏，中间电子疏密层出现电子致密颗粒，细胞膜结构消失，胞浆内容物混乱（图4）；有的可见内容物漏出的征象(图5)。

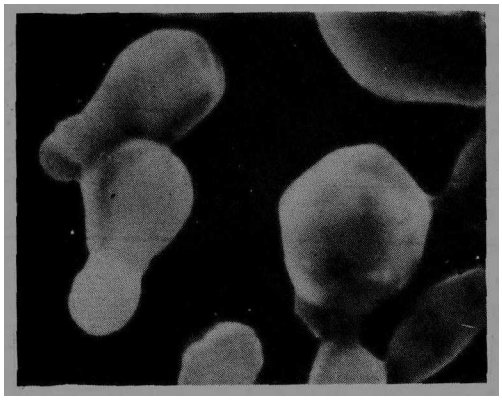


图1 正常C.albicans：表面光滑，呈球形，可见芽生子细胞及细胞间的小梗。×13 000

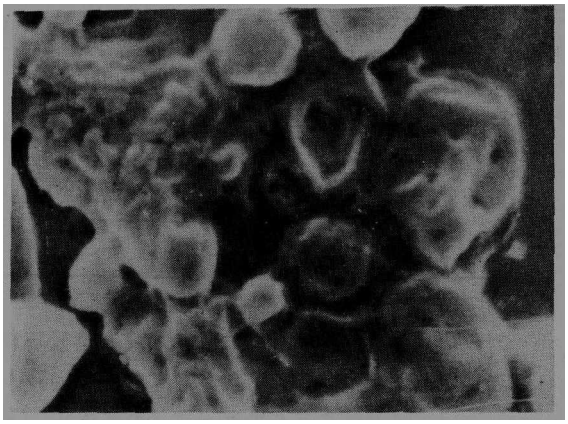


图2 6% H_2O_2 处理的 C.albicans (37℃，15min)：细胞表面出现似小孔样改变。×10 000

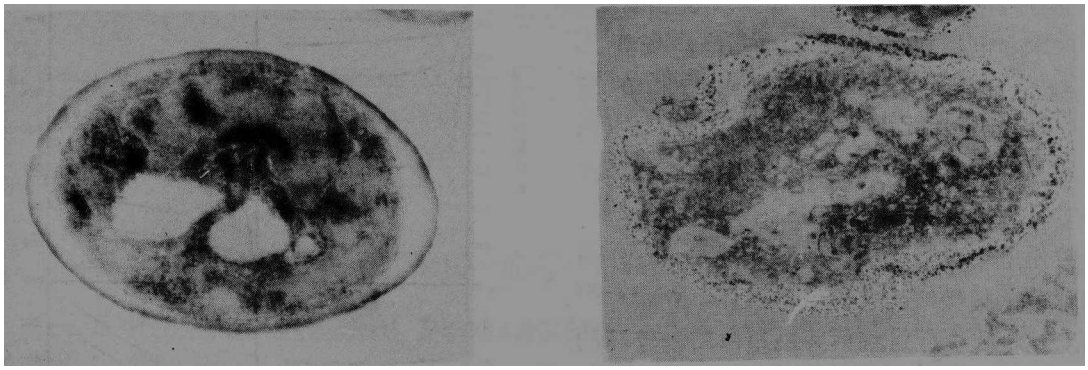


图3 正常C.albicans：细胞壁、细胞膜结构完整，胞浆内可见线粒体、细胞核和空泡。×22 000

图4 3% H_2O_2 处理的C.albicans（37℃，30min）：细胞壁、细胞膜间出现电子致密颗粒，胞浆结构混乱。×16 000

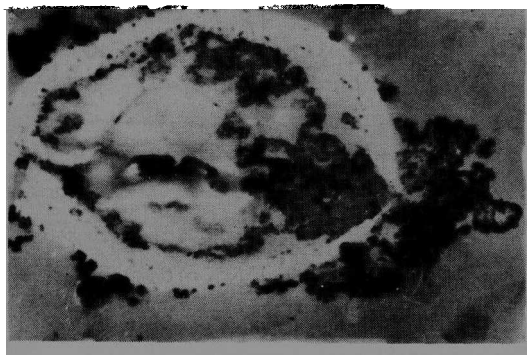


图5 10% H_2O_2 处理的 C.albicans(37℃，5 min)，可见有细胞内容物漏出的现象。(×12 000)

二、C.albicans ^{3}H-TdR-DNA漏出

经H_2O_2处理后，^{3}H-TdR标记的C.albicansDNA漏出，其漏出的dpm值高低与H_2O_2浓度及作用时间有关(附表)；且在37℃下漏出^{3}H-TdR-DNA的dpm值较在25℃下漏出的dpm值高。F检验结果表明，在同一处理温度下，处理组与对照组之间^{3}H-TdR-DNA漏出的dpm值的差异均有非常显著的意义（$p<0.01$）。

三、C.albicans存活数与其内容物漏出的关系

由图6表明，H_2O_2引起的C.albicans存活数的下降与其引起的^{3}H-TdR-DNA漏出dpm值的增

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

加均呈对应关系，^{3}H-TdR-DNA漏出量与存活数间为负相关（$r=-0.8392\sim-0.9915$），提示C.albicans ^{3}H-TdR-DNA漏出的增加与其死亡的增加是一致的。

附表 H_2O_2对C.albicans ^{3}H-TdR-DNA漏出的dpm值影响（X±SD）

时间(min)	对照		3% H_2O_2		6% H_2O_2		10% H_2O_2		p
	25℃	37℃	25℃	37℃	25℃	37℃	25℃	37℃	
5	244±13	320±13	345±28	697±89*	457±33	781±64*	644±87	1045±93	<0.01
15	253±18	330±14	398±46*	924±56	515±43*	1167±74*	747±78	1257±120*	<0.01
30	263±24	357±12	457±44*	1113±105	546±36*	1497±109*	870±102	1555±91*	<0.01
60	292±21	364±15	492±26	1253±82	645±64	1803±149	1102±99	1972±157	<0.01
p	>0.05	>0.05	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	

对照组各时相点差异无显著意义（p>0.05）

对照组与各处理组各时相点差异均有非常显著意义（p<0.01）

处理组内各时相点差异有显著意义（p<0.05），但*两时相点（25℃下）差异无显著意义(p>0.05)

处理组间同一时相点差异有非常显著意义（p<0.01），但*两处理组间（37℃下）差异无显著意义（p>0.05）

讨　论

本文电镜观察发现C.albicans经3% H_2O_2处理后，即出现细胞超微结构的破坏，并伴有细胞内容物漏出的征象（图5），而且H_2O_2的破坏作用随其处理浓度和时间的增加而明显加强。Samoilenko[5]等曾用电镜观察到H_2O_2对大肠杆菌和葡萄球菌的超微结构有类似的破坏。Weiter[6]等发现在H_2O_2对细菌芽胞超微结构破坏的同时，伴有大量钙离子的丢失。含有双硫键和SH基的氨基酸所构成的蛋白质在维持细胞壁结构完整性上起着重要的作用，而这类蛋白质对过氧化物的氧化作用极为敏感，并引起细胞壁的破坏[7][8]。本文用SEM观察到的C.albicans表面形态的改变，如凹陷、萎缩及似小孔样改变等，可能与H_2O_2对C.albicans表面结构的氧化，造成内容物漏出或溶解有关。H_2O_2对C.albicans细胞通透屏障的直接破坏，不仅使细胞内大分子物质易于漏出，而且也有利于H_2O_2进入细胞内敏感部位，发挥协同作用[9]。在TEM下所见的C.albicans胞浆电子低密度或无密度区

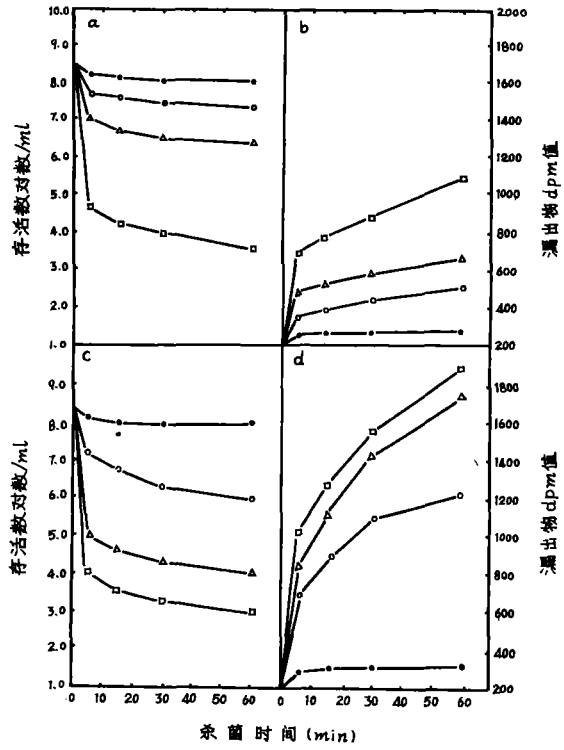


图6　C.albicans存活数与漏出的^{3}H-TdR-DNA的dpm值的关系
a、b，25℃下H_2O_2处理；c、d，37℃下H_2O_2处理
·—·对照；·—·3%H_2O_2；△—△6%H_2O_2；□—□10%H_2O_2

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

域，以及混乱无序现象，可能与H_2O_2进入胞浆内使其组份氧化溶解有关。

为进一步证明H_2O_2对C.albicans通透屏障的破坏，本文用^{3}H-TdR标记C.albicans DNA，并检测经H_2O_2处理后，滤液中漏出物（^{3}H-TdR-DNA）的dpm值。结果表明，H_2O_2可引起C.albiansDNA漏出，且漏出的量与H_2O_2浓度、处理时间及温度有关，证明H_2O_2能破坏C.aldicans通透屏障，造成细胞内大分子物质漏出。分析DNA漏出量与细胞存活数的关系发现两者间呈负相关（r=-0.8392～-0.9915），提示H_2O_2引起C.albicans DNA的漏出是细胞致死的重要原因之一。至于H_2O_2在杀菌过程中对DNA结构的破坏作用，则有待于进一步研究。

（本文承蒙校电镜室刘萍、朱师和以及同位素室傅国君、张广运同志的帮助，特致谢意！）

参考文献

1. 第三军医大学仪器中心研究室。电子显微镜技术 1986:24～26
2. 柯克兰VW.真菌生理学。北京：科学出版社 1965:260
3. （日）微生物研究法讨论会编，程光胜等译。微生物学实验法。北京：科学出版社 1981:341
4. 程绍钧。医学生物学中的同位素技术。1983:82～87
5. Samoilenko II, et al. Mechanism of the bactericidal action of H_2O_2. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 1983;(12):30～33
6. Weiter WM, et al. Changes in spores of clostridium bifermentans caused by treatment with hydrogen peroxide and cations J Gen Microbiol 1976;93:388～396
7. 牟希亚，等。白色念珠菌表面结构及其致病性。国外医学微生物学分册 1982;5:214
8. Костина ГИ，涂瀛摘译。消毒药物抑菌机理。ЖМэИ 1981；8:25～32
9. Nadine JR. Water disinfection with the hydrogen peroxide-ascorbic acid-copper (II) system Appl. Environ Microbiol 1982;44:555～560
10. 《消毒杀虫灭鼠手册》编写组编。消毒杀虫灭鼠手册。北京：人民卫生出版社 1979:162～180

Studies of the Effects of Hydrogen Peroxide on the Ultrastructure and Permeability of Candida Albicans

Yu Xiaofeng and Tu Ying (Department of Epidemiology, Third Military Medical College)

The Effects of hydrogen peroxide(H_2O_2) on the ultrastructure, cellular peameability barrier and ^{3}H-TdR-DNA leakage of C. albicans were studied. Damage of the cell, especially leakage of cytoplasm were found under transmission electron microscope. Morphological changes and small hole like structures were also found under scanning electron microscope. Radioactivity assay of the leakage of ^{3}H-TdR-DNA leakage of C. albicans further suggested that the ^{3}H-TdR-DNA leakage of C. albicans was directly due to the damage of cellular permeability barrier. Negative correlation (r = -0.8392～-0.9915)between the extent of ^{3}H-TdR-DNA leakage and the number of surviving colony-forming units was found. This indicated that the damage of cellular permeability barrier and leakage of DNA of C. albicans caused by H_2O_2 was one of the most importent causes of cell killing.

Key words: Hydrogen peroxide/pharmacodynamics; Candida albicans/drug effect; Candida albicans/ultrastructure

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net