

本文引用:傅玮涛,苏敏,吴初活,施炜,卢芳国,向琴,谭劲,周小青.福赛斯坦纳菌体外培养实验技术的研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(1):43-46.

## 福赛斯坦纳菌体外培养实验技术的研究

傅玮涛<sup>1</sup>,苏敏<sup>1</sup>,吴初活<sup>1</sup>,施炜<sup>1</sup>,卢芳国<sup>1</sup>,向琴<sup>2</sup>,谭劲<sup>3</sup>,周小青<sup>2\*</sup>

(1.湖南中医药大学医学院,湖南长沙410208;2.湖南中医药大学中医诊断重点实验室,湖南长沙410007;

3.湖南中医药大学第一附属医院口腔科,湖南长沙410007)

**【摘要】目的** 探索福赛斯坦纳菌生长繁殖的基本条件,比较N-乙酰胞壁酸及不同营养因子对其生长繁殖的影响,筛选该菌体外培养的最佳营养条件,建立其体外培养的技术方法。**方法** (1)培养基制备:在血平板中加0.005%N-乙酰胞壁酸形成改良培养基;制备血平板与不同浓度(0.5、3、10、50、100 mg/L)的N-乙酰胞壁酸形成的培养基;制备10 mg/L N-乙酰胞壁酸与氯化血红素、酵母提取物、维生素K<sub>3</sub>、脱纤维羊血组合形成不同组别的培养基。(2)接种培养后,用磷酸盐缓冲液将细菌洗脱,并用酶标仪(OD<sub>600</sub>)测定其吸光度。**结果** 福赛斯坦纳菌在含N-乙酰胞壁酸的培养基中生长更好,浓度为10 mg/L时促进作用最明显且细菌形态更为典型。在组3培养基中生长最快。**结论** N-乙酰胞壁酸能促进福赛斯坦纳菌的生长繁殖,浓度为10 mg/L时促进作用最明显;N-乙酰胞壁酸及氯化血红素、维生素K<sub>3</sub>、酵母提取物和脱纤维羊血组合能使其生长周期明显缩短。

**【关键词】** 牙周炎;福赛斯坦纳菌;N-乙酰胞壁酸;体外培养

**【中图分类号】**R965.2;R780.2

**【文献标志码】**A

**【文章编号】**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.01.011

### Investigation of Experimental Technique of *Tannerella forsythia* Cultured in Vitro

FU Weitao<sup>1</sup>, SU Min<sup>1</sup>, WU Chuhuo<sup>1</sup>, SHI Wei<sup>1</sup>, LU Fangguo<sup>1</sup>, XIANG Qin<sup>2</sup>, TAN Jin<sup>3</sup>, ZHOU Xiaoqing<sup>2\*</sup>

(1. Medical School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Key Laboratory of

TCM diagnosis, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 3. Stomatology Department, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

**【Abstract】Objective** To investigate the basic requirements for the growth and proliferation of *Tannerella forsythia* and compare the growth-promoting effects with different nutritional factors and screen the optimum culture *in vitro conditions* and establish the technique of culturing it. **Methods** (1)Preparation of culture medium: 0.005% N-acetylmuramic acid was added to the blood agar medium, forming the modified medium. Different concentration of N-acetylmuramic acid (0.5, 3, 10, 50, 100 mg/L) was added to the blood agar medium. The different mediums of N-acetylmuramic acid (10 mg/L) combined with other nutritional factors (chlorhematin, yeast extract, Vitamin K<sub>3</sub>, off fiber sheep blood) were formed. (2)After culturing, use PBS to elute the bacterial and measure its absorbance with enzyme-labelled instrument (OD<sub>600</sub>). **Results** *Tannerella forsythia* grew more better in the culture medium containing N-acetylmuramic acid, and the concentration at 10 mg/L was most obvious in growth-promoting effect and can lead to the change of bacterial morphology. The medium which consisted of hemin, yeast extract, menadione and sheep blood was the most suitable condition for its growth. **Conclusion** N-acetylmuramic acid can promote the growth of *Tannerella forsythia*, and the combination of N-acetylmuramic acid, hemin, menadione, yeast extract and sheep blood can shorten the growth cycle of it dramatically.

**【Keywords】** periodontitis; *Tannerella forsythia*; N-acetylmuramic acid; culture *in vitro*

牙周炎(Periodontitis)是一种由细菌感染引起的炎症性疾病,其病理过程是宿主对细菌的免疫反应造成牙齿支持组织的破坏,是成年人牙齿丧失的首要原因。此外,牙周炎还与许多全身疾病如心血管疾病、糖尿病、胃肠道疾病等有密切联系<sup>[1-4]</sup>。近期研究表明,牙周炎的发生发展还与龈沟液中铁离子

含量有关<sup>[5]</sup>。目前学术界普遍认为牙菌斑生物膜是牙周炎发病的始动因子,其发生发展与龈下菌斑的多种致病菌有关。1996年牙周病世界专题讨论会(World Workshop for periodontics)明确提出牙龈卟啉单胞菌(*porphyromonas gingivalis*, P. g)、福赛斯坦纳菌(*tannerella forsythia*, T.f)和伴放线聚集杆菌

**【收稿日期】**2017-03-18

**【基金项目】**2016年度湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目(1021-001017094)。

**【作者简介】**傅玮涛,男,在读本科生,研究方向:牙周炎与全身系统性疾病研究。

**【通讯作者】**\*周小青,男,教授,博士研究生导师,E-mail:1470128077@qq.com。

(*actinobacillus actinomycetemcomitans*, A.a) 是目前证据充分的牙周炎致病菌。福赛斯坦纳菌是 1986 年由 Tanner 等<sup>[6]</sup>人从牙周炎患者口腔中分离出来的一种革兰氏阴性菌,是牙周炎的主要致病菌。由于其营养要求苛刻,在体外很难进行增殖培养,导致对这种细菌的研究始终没有突破性进展<sup>[7-8]</sup>。国内尚无学者对其基本形态和生长特性进行系统性描述,也尚无该菌体外培养技术的研究报告。本研究旨在探索福赛斯坦纳菌的生长繁殖条件,比较 N-乙酰胞壁酸及 N-乙酰胞壁酸与其他营养因子组合后对其生长的影响,筛选该菌体外培养的最佳营养条件,建立其体外培养的技术方法,为该菌的后期研究奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验菌株

福赛斯坦纳菌 ATCC43037,购自广东省微生物研究所。

### 1.2 实验试剂

牛心脑浸出液(广东环凯微生物科技有限公司),无菌脱纤维羊血(鸿泉生物科技有限公司),酵母提取物、维生素 K<sub>3</sub>(上海生工生物工程股份有限公司)氯化血红素(国药集团化学试剂有限公司),N-乙酰胞壁酸(阿拉丁试剂公司),胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司)。

### 1.3 主要仪器

GNP-9270 型隔水式恒温培养箱(上海三发科学仪器有限公司),C31 型厌氧培养盒(日本三菱瓦斯化学株式会社),2.5L 厌氧产气袋(日本三菱瓦斯化学株式会社),DEN-1 型麦氏比浊仪(Grand Instruments Ltd),DNM-9602 型酶标分析仪(北京普朗新技术有限公司),JA2003 型电子天平(上海恒平科学仪器有限公司),pH 仪(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),MX100-4A 型自动震荡仪(杭州奥盛仪器有限公司),YLN-28 型全自动菌落分析仪(北京亚力恩机电技术研究所)。

### 1.4 培养基的配制及细菌培养

1.4.1 添加 N-乙酰胞壁酸的营养培养基(改良培养基)的配制 以血琼脂平板为基础,加入经 0.22 μm 微孔滤膜滤过除菌的 0.005%N-乙酰胞壁酸形成改良培养基。用接种环刮取福赛斯坦纳菌至无菌生理盐水中,用麦氏比浊仪配制浊度为 2.0 的菌悬液(6×10<sup>8</sup> CFU/mL)。取 100 μL 菌悬液分别加入血平板和改良培养基,并用 L 棒涂布均匀。于 37 ℃,厌氧恒温培养第 10 天、15 天、20 天,观察福赛斯坦纳菌生长情况并进行革兰氏染色,记录菌落及细菌形态。

1.4.2 不同浓度 N-乙酰胞壁酸培养基 以脑心浸液肉汤(BHI)为基础培养基(5% BHI,pH 7.0~7.2),加

入 5% 血清,各组分别加入浓度为 0.5、3、10、50、100 mg/L 的 N-乙酰胞壁酸,以此为 5 个组。刮取母板福赛斯坦纳菌至无菌生理盐水中,配制浊度为 2.0 的菌悬液(6×10<sup>8</sup> CFU/ml)。各取 100 μL 菌悬液接种至各组试管中(3 mL 培养液),同时设置对照组,震荡充分,37 ℃恒温厌氧条件培养。

1.4.3 不同营养成分的培养基的配制 以 BHI 为基础培养基(5%BHI,1.5%琼脂,pH 7.0~7.2),121 ℃高压蒸汽灭菌 30 min。各营养成分用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,并将各组培养基添加物成分及浓度按表 1 所示分别添加到基础培养基中。刮取血平板中的福赛斯坦纳菌至无菌生理盐水中,配置浊度为 1.0 的菌悬液(3×10<sup>8</sup> CFU/mL),各取 100 μL 菌悬液分别接种至组 1~组 8 平板中,用 L 棒涂布均匀,每组设置平行对照,37 ℃恒温厌氧条件培养。

表 1 各组福赛斯坦纳菌培养基成分

组别	氯化血红素	维生素 K <sub>3</sub>	酵母提取物	N-乙酰胞壁酸	脱纤维羊血
	/5 μg·mL <sup>-1</sup>	/1 μg·mL <sup>-1</sup>	/0.5%	/0.001%	/5%
组 1	+	+	+	+	-
组 2	+	-	-	-	+
组 3	+	+	+	+	+
组 4	+	+	+	-	+
组 5	+	-	+	+	+
组 6	+	+	-	+	+
组 7	-	+	+	+	+
组 8	-	-	-	-	-

注:“+”表示添加有该物质,“-”表示未添加该物质。

### 1.5 福赛斯坦纳菌菌体及菌落形态学观察

细菌接种至血平板上培养成熟后取出,使用 YLN-28 型全自动菌落分析仪观察其菌落特征,并测定菌落直径;刮取细菌常规革兰氏染色、固定。滴加香柏油于载玻片上,在光学显微镜下(×1000 倍)观察,记录细菌形态。

### 1.6 福赛斯坦纳菌吸光度的测定

1.6.1 不同浓度 N-乙酰胞壁酸培养基 酶标仪(OD<sub>600</sub>)测定添加有不同浓度 N-乙酰胞壁酸各组试管,并记录。以培养时间为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制各组菌悬液的生长曲线图。根据酶标仪说明书提供公式  $Y=1.2 \times 10^9 X$  ( $Y$  为细菌浓度 cell/mL, $X$  为吸光度)可换算细菌浓度。

1.6.2 不同营养成分培养基 在细菌接种培养第 20 天时,将培养基上的菌落用 PBS 溶液洗脱,经离心(2 000 r/min,10 min)收集菌体,加入 3 mL 生理盐水充分混合,酶标仪测定 600 nm 的吸光度(OD<sub>600</sub>)。

### 1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计学分

析。采用单因素方差分析法检验,若  $P < 0.05$ , 则用 *Dunnnett-t* 检验比较。

## 2 结果

### 2.1 福赛斯坦纳菌的菌落及光镜特征

细菌接种至血平板上培养 17 d 后,平板表面有半透明薄层,再将半透明薄层转板复壮,转板培养 10 d 后可见血平板上开始出现针尖样菌落,直径小于 0.5 mm,颜色为白色,半透明状。继续培养至转板后的第 20 天,菌落直径约 1 mm,白色半透明,中央稍微凸起,边缘光滑,散在分布于培养基表面。福赛斯坦纳菌在血平板上生长缓慢,生长周期长。细菌接种至血平板上培养 15 d 后,对菌体进行革兰染色与观察。菌体为革兰氏阴性菌(光镜下呈红色),细菌形态多样化,大部分菌体呈梭形两端渐细,杆状,菌体长达 3~5  $\mu\text{m}$ ,宽 0.30~0.50  $\mu\text{m}$ ,可见菌体中间膨大(箭头处为膨大,见图 1)。改良培养基上的菌体量多,杆状,其菌体长度比血平板上的菌体稍短,但形态均一,且菌体中部未见膨大(见图 2),而血平板菌体量少,可见菌体中间膨大。

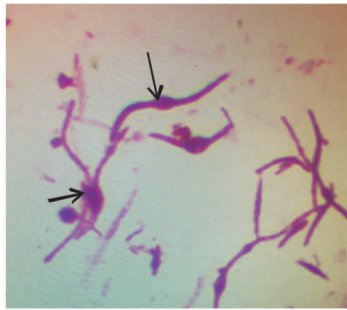


图 1 血平板上福赛斯坦纳菌光镜图(革兰染色,×1000)



图 2 改良培养基上福赛斯坦纳菌光镜图  
(革兰染色,×1000)

### 2.2 不同浓度 N-乙酰胞壁酸对福赛斯坦纳菌生长繁殖的影响

(1)N-乙酰胞壁酸浓度为 0.5 mg/L 组生长曲线的特征是:在接种培养 0~4 d 时生长曲线平坦,为生长迟缓期;在接种培养 7 d 后进入对数生长期;在接种培养 10 d 到达细菌生物总量最高峰;之后呈衰退的趋势。(2)N-乙酰胞壁酸浓度为 3 mg/L 组生长曲线的特征是:在接种培养 0~4 d 时生长曲线平

坦,为生长迟缓期;在接种培养 4 d 后进入对数生长期。(3)N-乙酰胞壁酸浓度为 10 mg/L 组福赛斯坦纳菌增长速度较快,也在第 10 天到达峰值,此后迅速衰退。(4)N-乙酰胞壁酸浓度为 50 mg/L、100 mg/L 两组生长曲线相近,其特征是:菌生长较为缓慢,第 7 天进入对数生长期。表明:N-乙酰胞壁酸在浓度为 10 mg/L 时对福赛斯坦纳菌的促进作用是最好的。此时细菌能有效利用 N-乙酰胞壁酸,持续增长至第 10 天到达峰值,10 d 后呈衰退趋势。见图 3。

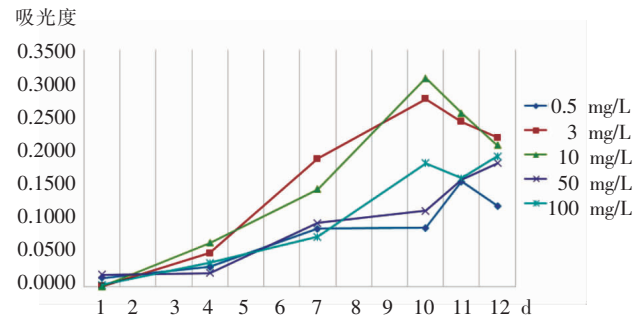
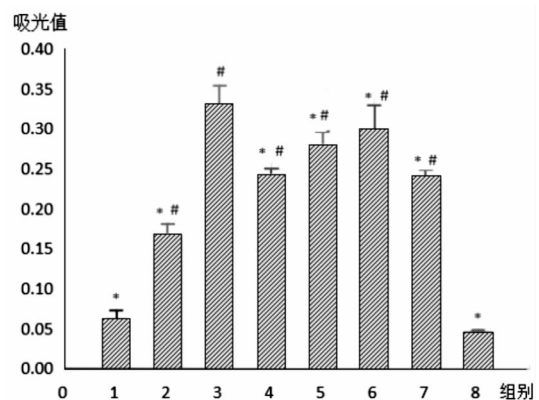


图 3 福赛斯坦纳菌在不同浓度 N-乙酰胞壁酸培养基中培养的生长曲线

### 2.3 N-乙酰胞壁酸与不同营养物质组合后对福赛斯坦纳菌生长繁殖的影响

福赛斯坦纳菌接种到含有 N-乙酰胞壁酸及氯化血红素、维生素  $\text{K}_3$ 、酵母提取物和脱纤维羊血的(组 3)培养基上培养 5 d 后,观察到一层菌苔状薄膜,其余组别无细菌生长。在不含有维生素  $\text{K}_3$ (组 5)、不含有酵母提取物(组 6)及不含有氯化血红素(组 7)的培养基上培养 7 d 后观察到细菌生长;在不含有 N-乙酰胞壁酸(组 4)的培养基在培养 8 d 后细菌也开始生长;在只有氯化血红素的血平板(组 2)在第 12 天也出现薄膜状菌,20 d 后有少量菌苔形成,而在不含有脱纤维羊血(组 1)的培养基和琼脂培养基(组 8)培养 20 d 后仍无细菌生长。待细菌成熟后可见组 2~组 7 培养基中均形成菌苔。酶标仪测定 600 nm 的吸光度( $\text{OD}_{600}$ ),福赛斯坦纳菌在不同组别培养基上生长情况为组 3>组 6>组 5>组 7>组 4>组 2>组 1>组 8。见图 4。



注:与组 1 比较, # $P < 0.05$ ; 与组 3 比较, \* $P < 0.05$ 。

图 4 不同营养因子对细菌生长状况的影响

### 3 讨论

牙周炎可导致牙齿附着丧失,牙槽骨吸收甚至牙齿脱落。此外,大量研究表明牙周炎还与全身疾病如心血管,糖尿病等有关。牙周炎的始动因子是牙菌斑,牙菌斑是一个小型的生态系统,各种细菌在其中生长繁殖。目前临床上对龈下致病菌的检测,大多使用聚合酶链式反应(PCR)法,但PCR法技术敏感性较强,只能用于龈下菌斑菌种的鉴定。如需从龈下菌斑中分离致病菌株,并快速增殖牙周炎致病菌,以及在病原学上对牙周炎致病菌进行研究,仍需依赖细菌培养法。因此,建立福赛斯坦纳菌体外培养技术方法可为该菌的进一步研究奠定基础。

福赛斯坦纳菌最初是从牙周炎患者口腔中分离出来的细菌,与牙龈卟啉单胞菌和齿垢密螺旋体一起被称为定居在牙菌斑生物膜内的“红色复合体”<sup>[9-11]</sup>,其与慢性牙周炎时导致的牙周附着丧失高度相关<sup>[12]</sup>。其中牙龈卟啉单胞菌是目前研究最为广泛的牙周炎致病菌,仅血平板就能满足其生长的需求,而同样作为主要的牙周炎致病菌,福赛斯坦纳菌研究甚少,主要由于其对生长环境要求苛刻。为了更好的了解该菌在牙周炎发生发展过程中所起到的作用以及它的毒力机制,亟需一种快速培养该菌的技术方法。

有学者对福赛斯坦纳菌基因序列的研究结果表明<sup>[13]</sup>,该菌缺乏合成肽聚糖氨基糖的基因,故而自身不能合成N-乙酰胞壁酸这种构成细菌细胞壁的重要物质。本课题组在血平板中加入一定浓度的N-乙酰胞壁酸并与血平板中福赛斯坦纳菌的生长状况进行比较。实验结果显示该菌在改良培养基中生长比血平板迅速,在细菌培养20 d后,对改良培养基中的福赛斯坦纳菌进行革兰氏染色,光镜下可见大量杆状细菌,菌体长度比血平板中稍短,形态均一,且菌体中部未见膨大,而在血平板中菌体光镜下呈中间膨大,形态不一。Tanner<sup>[9]</sup>等猜测细菌中间膨大是细胞壁不完整导致的,而N-乙酰胞壁酸是构成福赛斯坦纳菌细胞壁的重要物质。福赛斯坦纳菌为革兰氏阴性菌,其细胞壁中肽聚糖含量较少,实验结果显示N-乙酰胞壁酸能明显促进该菌生长,猜测N-乙酰胞壁酸除了在构成细菌细胞壁起重要作用外,还可能在其他方面影响福赛斯坦纳菌的生长繁殖。

本实验研究了不同浓度N-乙酰胞壁酸对福赛斯坦纳菌生长曲线的影响,以探索该菌最适生长环境。实验结果表明不同浓度N-乙酰胞壁酸可导致福赛斯坦纳菌生长曲线发生显著变化,当N-乙酰胞壁酸浓度为10 mg/L时对福赛斯坦纳菌的促进作用最明显。另外,在N-乙酰胞壁酸浓度较低时能明显促进福赛斯坦纳菌生长繁殖,但随着N-乙酰胞壁酸浓度增大至100 mg/L时福赛斯坦纳菌生长繁殖放缓,

猜测其可能与福赛斯坦纳菌摄取外源性N-乙酰胞壁酸的能力有关。组5,组6,组7分别与组3比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),说明在缺乏维生素K<sub>3</sub>或酵母提取物或氯化血红素的平板上细菌生长减慢,提示其为福赛斯坦纳菌生长的重要因子,能促进其生长。组3去除血后(即组1)福赛斯坦纳菌不生长,且组3与组1比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ),猜测血中有该菌生长必不可少的成分。N-乙酰胞壁酸能促进该菌的增殖,但并非是其生长所必须的,其具体机制还有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] SHEN T C, CHANG P Y, LIN C L, et al. Risk of Periodontal Diseases in Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease[J]. *Medicine*, 2015,94(46):e2047.
- [2] 杨炳涛,徐菁玲,和璐,等.伴糖尿病牙周炎患者牙龈卟啉单胞菌FimA基因型的检测[J]. *中华口腔医学杂志*, 2016,51(1):20-24.
- [3] 刘欣,王冲,任秀云,等.口腔干预措施对伴动脉粥样硬化的慢性牙周炎大鼠颈动脉壁及血清C反应蛋白、白介素6的影响[J]. *中华口腔医学杂志*, 2016,51(11):680-685.
- [4] 谢美莲,余挺,卓颖,等.牙周局部炎症影响小鼠肠道机械及免疫屏障功能[J]. *华西口腔医学杂志*, 2016,34(4):414-418.
- [5] 朱莹,李涛,冯云枝.铁调素在慢性牙周炎性牙槽骨吸收中的作用[J]. *湖南中医药大学学报*, 2017,37(8):905-909.
- [6] TANNER A C R, LISTGARTEN M A, EBERSOLE J L, et al. *Bacteroides forsythus* sp. nov., a slow growing, fusiform *Bacteroides* sp. from the human oral cavity [J]. *Int J Syst Bacteriol*. 1986, 36(2): 213-221.
- [7] POSCH G, SEKOT G, FRIEDRICH V, et al. Glycobiology aspects of the periodontal pathogen *Tannerella forsythia* [J]. *Biomolecules*. 2012, 2(4):467-482.
- [8] AMANO A, CHEN C, HONMA K, et al. Genetic characteristics and pathogenic mechanisms of periodontal pathogens[J]. *Advances in Dental Research*, 2014, 26(1):15-22.
- [9] JUNG Y J, JUN H K, CHOI B K. Gingipain-dependent augmentation by *Porphyromonas gingivalis* of phagocytosis of *Tannerella forsythia*[J]. *Molecular Oral Microbiology*, 2016,31(6):457-471.
- [10] LANZA E, MAGAN-FERNANDEZ A, BERMEJO B, et al. Complementary clinical effects of red complex bacteria on generalized periodontitis in a Caucasian population [J]. *Oral Diseases*, 2016,22(5):430-437.
- [11] NANCE W C, DOWD S E, SAMARIAN D, et al. A high-throughput microfluidic dental plaque biofilm system to visualize and quantify the effect of antimicrobials [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2013,68(11):2550-2560.
- [12] BOUTAGA K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, et al. the additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens[J]. *J Clin Periodontol*, 2006, 33(6):427-433.
- [13] FRIEDRICH V, PABINGER S, CHEN T, et al. Draft Genome Sequence of *Tannerella forsythia* Type Strain ATCC 43037[J]. *Genome Announc*. 2015, 3(3): e00660-15.

(本文编辑 杨 瑛)