

噻唑蓝快速测定不同抗结核药物对卡介苗活性的影响

吕 斌* 徐顺清* 陈志飞**

摘要 目的 利用黄色染料噻唑蓝(MTT)可被活细胞消耗成紫色的甲臜结晶,溶解后可通过分光光度法进行定量测定的原理,快速检测体外培养卡介苗对不同浓度抗结核药物的耐药性,从而建立一种快速结核耐药测定方法。**方法** 用酶联免疫检测仪测定四种抗结核药物利福平,链霉素,异烟肼,对氨基水杨酸在不同浓度下对卡介苗活性的影响程度。**结果** 卡介苗总数与 MTT 的消耗量呈线性关系,死亡的卡介苗不能消耗 MTT,不同浓度的抗结核药物对 BCG 消耗 MTT 的抑制作用不同,呈剂量-效应关系。药物浓度高低与培养菌落数呈线性关系。**结论** 该法快速,敏感,便宜,可在 3 天内得到结果并可用肉眼观察,结果稳定,重复性好,可用于快速测定不同抗结核药物对卡介苗活性的影响,并极有可能用于临床快速检测结核杆菌的耐药情况。

关键词 MTT 抗结核药物 卡介苗活性 测定

Use of MTT for rapid detection of BCG viability influence of different anti-mycobacterial drugs

Lu Bin, Xu Shunqing, Chen Zhifei.

Institute of Environmental Medicine, Tongji Medical University, Wuhan 430030

Abstract Objective To use the ability of viable cells to reduce 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) to set up a test to detect 4 anti-mycobacterial drugs' influence on viability of in-vitro cultured BCG. **Method** To detect different concentration of 4 anti-mycobacterial drugs—Rifampin, Streptomycin, Isoniazid and P-aminosalicylic acid's viability influent level in BCG. **Result** The assay shows a linear relationship between the number of viable bacteria and the ability to reduce MTT. BCG exposed to anti-mycobacterial drugs showed concentration-dependent inhibition of the ability to reduce MTT. The inhibition paralleled the reduction in the number of colony forming units(CFU). **Conclusion** The assay can be visually read and requires less than 3 days to obtain susceptibility results. It is a cheap and rapid screening method for BCG vitality and be possible a cheap and rapid screening method for multidrug-resistant M. tuberculosis.

Key words MTT Anti-mycobacterial drugs BCG viability Detection

近年的监测发现结核病的发病率及死亡率在全球范围内均有上升的趋势,同时耐药菌株的感染增加,给结核病的防治带来了很大的困难。由于常规结核杆菌药物敏感试验方法须 6~12 周,无法为临床提供及时、准确的用药参考。因此,如何缩短药物敏感性试验时间,已引起国内外学者关注。本实验根据黄色染料溴化 3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯四唑(3-(4,5-diethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide),又称噻唑蓝(MTT)可被活细胞消耗成紫色的 MTT 甲臜结晶(溴化 3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯四唑甲臜),溶解后可通过分光光度法进行定量测定的原理,用 MTT 来测定

卡介苗暴露于 4 种常用抗结核药物后的细菌活性,为建立一种简单、快速的结核杆菌药敏试验提供方法。

材料与方法

1. 细菌培养和灭活:实验所用卡介苗(BCG)菌株由武汉市结核病防治所提供。将 BCG 接种于 M7H9 培养

* 同济医科大学环境医学研究所 430030

** 武汉市结核病防治所

本研究为国家自然科学基金面上课题(NO 39770679)

基中,内含 10% 的 OADC 增强子(油酸-白蛋白-葡萄糖过氧化酶)(DIFCO 公司产品)和 0.05% Tween-80。37℃ 摇床培养。细菌灭活则将细菌置于 100℃ 沸水中 15 分钟,或用 75% 酒精常温处理 15 分钟,然后用 PBS 洗 3 次,再重浮于等体积 M7H9 培养基中。

2. 实验分组:实验时将细菌悬液用 PBS 洗 3 次后重浮于等体积的 M7H9 培养基中,用 722 型分光光度计 620nm 处测光密度(A), $A=1$ 时细菌浓度为 2×10^9 个细菌。同时用倒置显微镜进行微菌落计数。用 M7H9 培养基将细菌悬液稀释。在药敏实验中的细菌浓度为 10^7 /孔。用不同浓度的抗结核药物进行处理。4 种抗结核药物用双蒸水或二甲基甲酰胺(用于溶解利福平)配成浓度为 10^{-4} , 4×10^{-4} , 8×10^{-4} , 10^{-3} , 2×10^{-3} , 4×10^{-3} , 8×10^{-3} , 10^{-2} , 2×10^{-2} , 4×10^{-2} , 8×10^{-2} , 10^{-1} , 2×10^{-1} , 4×10^{-1} , 8×10^{-1} , 10^0 , 2×10^0 , 4×10^0 , 8×10^0 , 10^1 , 2×10^1 , 5×10^1 , 10^2 , 2×10^2 , 5×10^2 , 10^3 $\mu\text{g/ml}$ 共 26 个剂量组。

3. 微菌落计数:50 μl BCG 悬液加入 200 μl 培养基(M7H9-OADC 并含 0.2% 甘油)的 96 孔培养板中,连续进行 8 次 5 倍稀释。培养 10~12 天后用倒置显微镜观测微菌落数,然后根据稀释倍数和样本量计算出每毫升菌液的菌落形成单位数(CFU)。计数后取 40 μl 的细菌

悬液进行 MTT 及药敏分析。

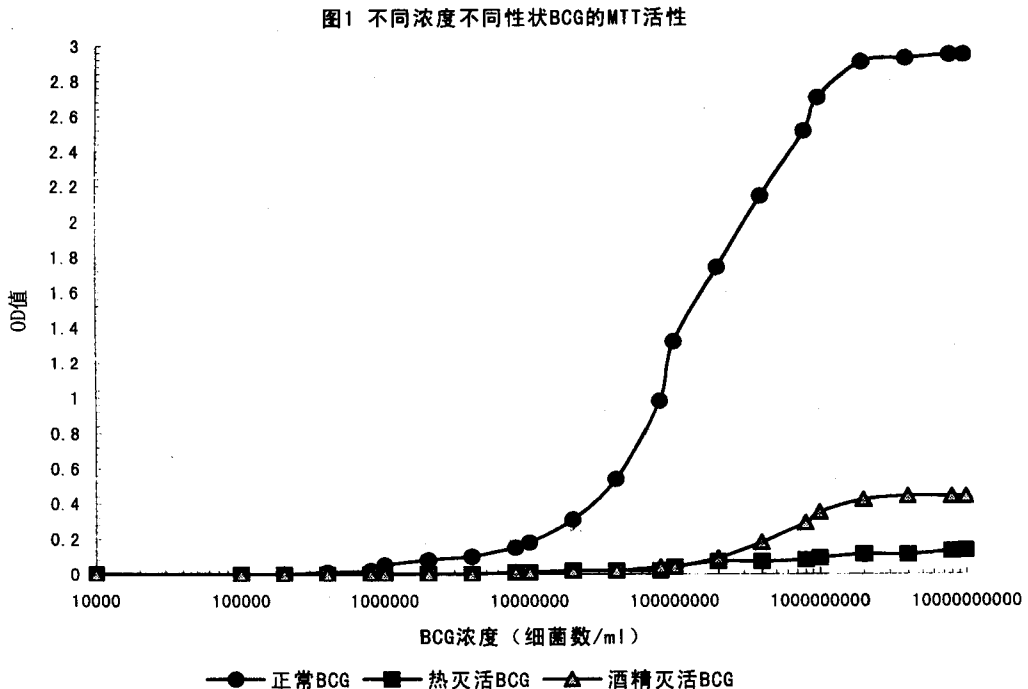
4. MTT 分析:96 孔细胞培养板每孔加入细菌悬液 40 μl ,每次 6 孔作为平行样本。MTT(Fluka 公司,溶于 pH = 7.2 的 PBS 中)浓度为 5mg/ml,每孔加入 10 μl ,37 度孵育 4 小时,然后每孔加入 50 μl 裂解液(内含 50% 二甲基甲酰胺和 10% SDS)37 度孵育过夜,采用 BG3022A 酶联免疫检测仪(南京)在波长 570nm 处测光密度值。空白对照为 M7H9 - OADC + MTT + 裂解液。

5. MTT 消耗量与 BCG 活力的关系:用不同浓度的抗结核药物对 BCG 处理 72 小时,然后用上述方法进行 MTT 分析,每个药物浓度做 6 个平行孔。并用倒置显微镜进行微菌落计数。在测定菌落数之前,用 PBS 将细菌洗 3 次,再将细菌重浮在培养基中。

6. 数据分析:数据采用线性回归分析。

结 果

1. 不同浓度 BCG 与 MTT 消耗量的关系:为确立 MTT 试验的最佳细菌浓度,用不同浓度的 BCG 进行了重复实验,并对灭活的 BCG 在不同浓度下进行了测定。结果如图 1 所示:

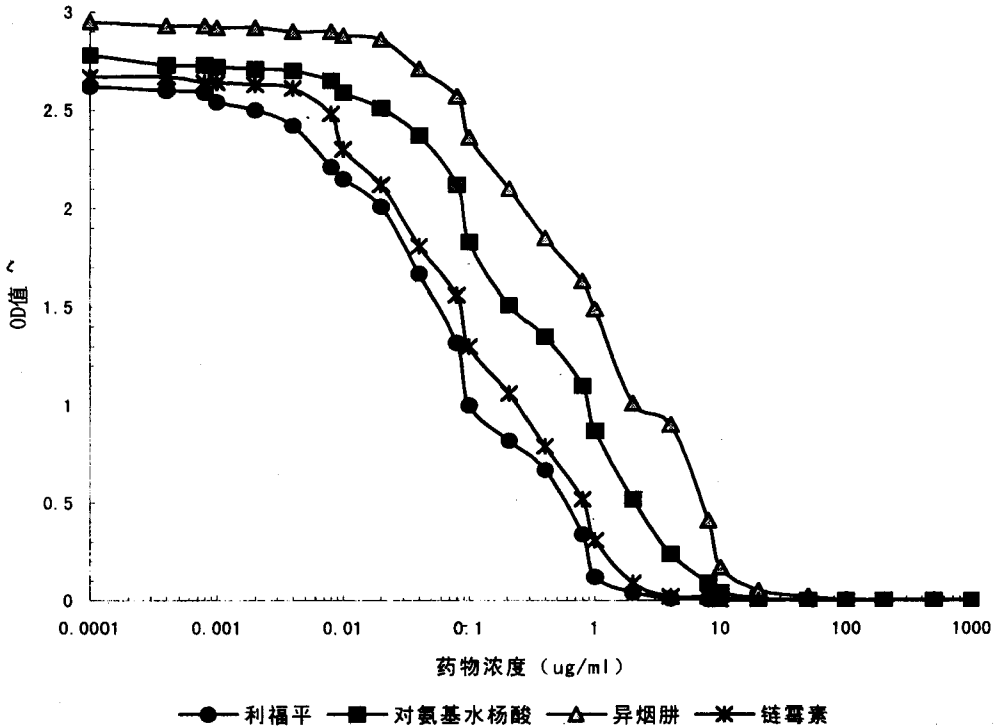


图中显示 MTT 吸收与 BCG 浓度间存在线性关系($R=0.904, P<0.001$), 此线性关系在细菌浓度为 $10^5 \sim 10^9/\text{ml}$ (各取 $40\mu\text{l}$ 于每孔培养孔中, 即 BCG 约 $10^5 \sim 10^7/\text{孔}$) 之间更为明显($R=0.968, P<0.001$)。加热后及酒精处理后的 BCG 对 MTT 几乎不吸收。仅在高浓度 $>10^8$ 有少量增加, 估计为细菌大量死亡后在培养孔内沉

积, 从而影响酶标仪的读数。

2. 利福平、链霉素、异烟肼、对氨基水杨酸对 BCG 降解 MTT 活性的影响。分别测定不同浓度的利福平、链霉素、异烟肼、对氨基水杨酸对 $4.2 \times 10^7/\text{孔}$ 浓度的 BCG 活性的影响。结果如图 2 所示:

图2 不同浓度抗结核药物对BCG活性的影响 (BCG $4 \times 10^7/\text{孔}$)

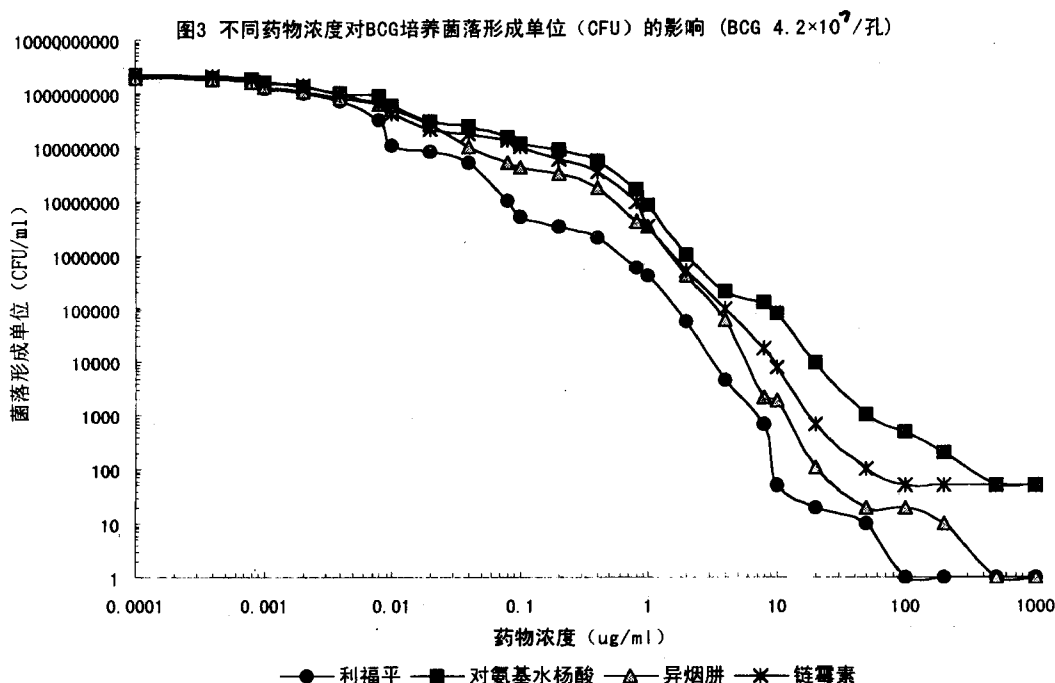


可见利福平抑制 BCG 对 MTT 降解的活性最高, 在 $0.01\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度即可产生抑制作用; 链霉素的抑制活性次之, 抑制浓度在 $0.2 \sim 0.4\mu\text{g}/\text{ml}$; 对氨基水杨酸的抑制活性较低, 约为 $1\mu\text{g}/\text{ml}$; 异烟肼最低, 为 $4 \sim 6\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

3. 不同药物浓度对微孔培养结果的影响: 分别测定不同浓度利福平、链霉素、异烟肼、对氨基水杨酸对微孔培养 BCG 菌落形成单位(CFU)计数的影响。采用 $4.2 \times$

$10^7/\text{孔}$ BCG 用不同浓度抗结核药物处理 72 小时后进行计数。结果见图 3。

从图 3 与图 2 对比可见除异烟肼外, 其余药物 CFU 值与 MTT 试验的结果有极好的相关性。利福平对 CFU 的抑制作用最强, 对氨基水杨酸对 CFU 的抑制作用最弱。异烟肼的 MTT 结果与 CFU 值相比, MTT 值偏高。



讨 论

结核病是目前造成死亡人数最多的感染性疾病^[1]。最近的研究表明多耐药结核杆菌感染率逐渐上升。大多数耐药主要是由于未严格按照系统用药方案造成的。由于常规方法须 6~12 周方可做出结核杆菌药物敏感试验结果,影响了择机用药的机会,因此缩短药物敏感性试验时间变得十分重要。近年国外采用一些新的药敏试验方法,如 DNA 杂交法, E test 法及生物发光法等^[2-4],但因这些方法设备、质量控制及人员要求高,价格昂贵,一般难以在临床推广,也不适用于大批量筛查,故急需建立一种简单、快速、便宜、完善的结核杆菌药敏试验方法来检测耐药菌株。黄色染料溴化 3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯四唑(又称噻唑蓝, MTT)可被活细胞消耗成紫色的 MTT 甲臜结晶,溶解后可通过分光光度计进行定量测定的原理,被广泛地用于快速检测体外培养细胞活性^[6-7],但采用 MTT 试验检测结核杆菌和卡介苗的活性在国内尚未见报道。在本实验中,我们采用 MTT 试验检测卡介苗的活性,结果显示:

1. MTT 可用于对 BCG 活性的测定:从上述实验结果分析可见,随着 BCG 浓度升高, OD 值越大,两者呈线性关系,灭活的 BCG 对 MTT 几乎完全无反应,不同浓度抗结核药物其浓度越高,对 BCG 的 MTT 反应抑制程度

越大。不同抗结核药物有不同的作用曲线,说明各种抗结核药物的有效抑菌浓度不同。细菌微计数结果与 MTT 的对应性相符合。可采用 MTT 试验检测 BCG 活性,并可进一步用 BCG 的结果进行 MTT 测定结核杆菌活性和耐药性测定的研究。

2. MTT 结果可用肉眼观察。由于结果的颜色对比明显,只要结果的颜色与对照有 0.1 的差别即可明显区分,无需用酶标仪逐个测量,尤其适于基层及大量样本筛查时使用。

3. 在对 MTT 结果进行验证的采用微孔 BCG 培养测定 CFU 后发现:除异烟肼外,其余 3 种抗结核药物的 CFU 值与 MTT 结果相关性很好。其中利福平作为杀菌药,其 CFU 结果在同等药物浓度在 4 种抗结核药物中最低,表明其抑 BCG 的作用最高;异烟肼的作用次之,链霉素再次之,对氨基水杨酸最低。但异烟肼的 CFU 结果低于 MTT 结果,表明异烟肼对 BCG 活性的实际抑制作用高于 MTT 的测定值。这估计与异烟肼易于被氧化,在培养过程中被氧化后产生与紫色甲臜颜色相近的紫蓝色,从而使 MTT 结果偏大。因此如何使 MTT 检测异烟肼对 BCG 活性的影响的判断标准化,是进一步的实验需解决的主要问题。

4. 为便于对 MTT 试验进行药敏试验的定量检测,我们对各个细菌浓度的药敏 MTT 试验进行了反复测定,结果发现用 10^7 /孔细菌进行药敏试验有较好的稳定

性。MTT 试验在对 BCG 活性检测中有较高的稳定性和可重复性。

本实验结果说明 MTT 试验具有简单,快速,可在 72 小时内得到结果的优点,且结果可用肉眼观察,特别适于基层和临床应用。是一种极有希望的检测 BCG 活性和药敏试验的方法,如有可能用于致病性分枝杆菌的快速检测和药敏试验。则在临床上将有更大的用途,也更适用于大样本的筛查和新的抗结核药物的筛查。

参 考 文 献

- 1 Bloom BR, Murray CJ. Tuberculosis: commentary on a reemerging killer. *Science*, 1992, 257: 1055—1064.
- 2 Jacobs WR Jr, Barletta KG, Udani R, et al. Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. *Science*. 1993, 260: 819—822.
- 3 Audrey W, Karen M. Testing of mycobacterium tuberculosis susceptibility to Ethambutol, Isoniazid, Rifampin and Streptomycin by using E test. *J. Clin. Microbio.* 1996, 34(7): 1672—1676.
- 4 Telenti AP, Imboden F, Marchesi D, et al. Detection of rifampicin resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*, 1993, 341: 497—501.
- 5 Carpels G, Fissette K, Limbana V, et al. Drug resistant tuberculosis in sub-saharan Africa: an estimation of incidence and cost for the year 2000. *Tubercle Lung Dis*. 1995. 76: 408—486.
- 6 Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods*. 1986, 89: 271—274.
- 7 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Methods*. 1983, 65: 55—63.