

产生,为进一步探索纤维化发生机制,开发高效、低毒的抗纤维化药物进行了尝试,并为芍药苷未来用于治疗纤维化疾病提供了理论和实验依据。

参 考 文 献

[1] Junttila IS, Mizukami K, Dickensheets H, et al. Tuning sensitivity to IL-4 and IL-13; differential expression of IL-4R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 1, and  $\gamma$ c regulates relative cytokine sensitivity[J]. J Exp Med, 2008, 205(11): 2595-2608.

[2] Weng HL, Liu Y, Chen JL, et al. The etiology of liver damage imparts cytokines transforming growth factor-1 or interleukin-13 as driving forces in fibrogenesis[J]. Hepatology, 2009, 50(1): 230-243.

[3] Shinozaki S, Mashima H, Ohnishi H, et al. IL-13 promotes the proliferation of rat pancreatic stellate cells through the suppression of NF- $\kappa$ B/TGF- $\beta$ 1 pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 393(1): 61-65.

[4] Szanto A, Balint BL, Nagy ZS, et al. STAT6 transcription factor is a facilitator of the nuclear receptor PPAR $\gamma$ -regulated gene expression in macrophages and dendritic cells[J]. Immunity, 2010, 33(5): 699-712.

[5] Shi X, Cai W, Zhou Y, et al. IL-13 upregulates GPIIb expression in megakaryocytic cell lines via STAT6[J]. Anat Rec(Hoboken), 2010, 293(9): 1470-1476.

[6] Liu B, Yang ZY, Wei W. Determination of paeoniflorin in rat

plasma by LC-MS/MS and its pharmacokinetics [J]. Acta Univ Med Anhui, 2009, 44(6): 707-711. (in Chinese)  
(刘斌, 杨昭毅, 魏伟. LC-MS/MS 测定大鼠血浆中芍药苷及其药物动力学特征[J]. 安徽医科大学学报, 2009, 44(6): 707-711.)

[7] Cao BY, Yang YP, Luo WF, et al. Paeoniflorin, a potent natural compound, protects PC12 cells from MPP+ and acidic damage via autophagic pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 131(1): 122-129.

[8] Chu DY, Li CL, Yang F, et al. Effect of paeoniflorin on hepatic immunopathogenesis in mice with *Schistosoma japonicum* infection[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2008, 26(1): 10-15. (in Chinese)  
(储德勇, 李丛磊, 杨枫, 等. 芍药苷对日本血吸虫感染小鼠肝组织免疫病理的影响[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2008, 26(1): 10-15.)

[9] Li X, Shen J, Zhong Z, et al. Paeoniflorin; a monomer from traditional Chinese medical herb ameliorates *Schistosoma japonicum* egg-induced hepatic fibrosis in mice[J]. J Parasitol, 2009, 95(6): 1520-1524.

[10] Mitaka K, Miyazaki Y, Yasui M, et al. Th2-biased immune responses are important in a murine model of chronic hypersensitivity pneumonitis[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2010, 154(3): 264-274.

[11] Ferreira CM, Pereira AT, de Souza RS, et al. Role of IL-13 in a model of *Strongyloides venezuelensis* infection in rats[J]. Microbes Infect, 2010, 12(5): 409-414.

(收稿日期: 2010-10-26 编辑: 杨频)

文章编号: 1000-7423(2011)-02-0098-03

【研究简报】

棘阿米巴土壤分离株 CB/S1 内共生细菌的 16S rDNA 序列分析

玄英花, 崔春权, 郑善子\*

【摘要】用地衣红-卡红染色进行共生菌的形态观察, 鉴定棘阿米巴 CB/S1 内共生细菌。克隆内共生细菌的 16S rDNA 基因, 进行基因序列分析。结果表明, 经地衣红-卡红染色棘阿米巴 CB/S1 内共生细菌呈黑色和棒状, 在胞质内不规则分布。棘阿米巴 CB/S1 内共生细菌的 16S rDNA 基因长 1 534 bp, 与类亚洲嗜阿米巴杆菌(*Candidatus Amoebophilus asiaticus* 5a2)和韩国棘阿米巴分离株 KA/E21 内共生细菌的 16S rDNA 基因的同源性均为 98%。进化树分析表明, 棘阿米巴 CB/S1 内共生细菌与韩国棘阿米巴 KA/E21 内共生细菌、类亚洲嗜阿米巴杆菌、黑脚硬蜱内共生细菌和伯恩蚜小蜂内共生细菌等细菌构成单系。

【关键词】棘阿米巴; 16S rDNA; 内共生细菌; 类亚洲嗜阿米巴杆菌

中图分类号: R382.1 文献标识码: B

Sequence Analysis of 16S rDNA Gene of Endosymbiont of *Acanthamoeba* sp. CB/S1 Isolated from Soil

XUAN Ying-hua, CUI Chun-quan, ZHENG Shan-zi\*

(Department of Pathogenic Biology, College of Basic Medicine, Yanbian University, Yanji 133000, China)

【Abstract】The endosymbiont of *Acanthamoeba* sp. CB/S1 was identified by orcein-carmin staining and 16S rDNA sequence analysis. The endosymbiont bacteria were rod-shaped and darkly stained, and irregularly localized within the cytoplasm. The length of the 16S rDNA was 1 534 bp and its DNA sequence was closely related to those of *Candidatus*

基金项目: 吉林省教育厅科技项目 (No. 2006-6)  
作者单位: 延边大学基础医学院免疫学与病原生物学教研部, 延吉 133000  
\* 通讯作者, E-mail: szzheng@ybu.edu.cn

*Amoebophilus asiaticus* and *Acanthamoeba* sp. KA/E21 with 98% homology. Phylogenetic analysis showed that the endosymbiont of CB/S1, the endosymbiont of KA/E21, *Candidatus Amoebophilus asiaticus*, the endosymbiont of *Ixodes scapularis*, and the endosymbiont of *Encarsia pergandiella* constitute a monophyletic lineage in phylogenetic tree.

【Key words】 *Acanthamoeba*; 16S rDNA; Endosymbiont; *Candidatus Amoebophilus asiaticus*

Supported by a Science and Technology Project from the Education Department of Jilin Province (No. 2006-6)

\* Corresponding author, E-mail: szheng@ybu.edu.cn

自由生活阿米巴广泛存在于土壤、海水、淡水和腐败有机物中,可引起角膜感染和免疫功能低下人群的脑部、肺部和皮肤等感染<sup>[1]</sup>。近 20 年来,随着角膜接触镜的广泛使用,棘阿米巴 (*Acanthamoeba* sp.) 性角膜炎患者逐渐增加,有关棘阿米巴的研究越来越受重视。棘阿米巴不仅可直接感染人体,还可作为部分致病性细菌,如嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*)、肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*)、鸟分枝杆菌 (*Mycobacterium avium*) 和大肠埃希菌 (*Escherichia coli* O157) 等的载体<sup>[2-5]</sup>。这些细菌通过在阿米巴内共生来躲避外界不利的生存环境,提高其致病性和播散能力。本研究对国内棘阿米巴土壤分离株 CBS1 内共生细菌的 16S rDNA 进行序列分析,并与 GenBank 中相关细菌序列进行比较,为研究内共生细菌的分子生物学特点奠定基础。

## 1 材料与方法

1.1 棘阿米巴 CB/S1 的培养 卡氏棘阿米巴 (*Acanthamoeba castellanii* Castellani ATCC #30011) 由韩国庆北大学郑东一教授提供。棘阿米巴 CB/S1 为中国北京地区土壤分离株,按文献 [6] 方法进行分离培养。

1.2 地衣红-卡红染色 按文献 [7] 方法进行棘阿米巴内共生菌的染色镜检。经地衣红-卡红染色后,棘阿米巴内呈棒状和黑色的为其内共生细菌。

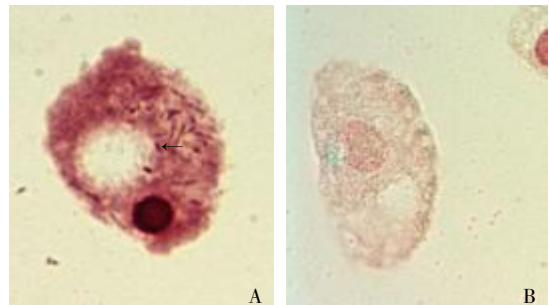
1.3 DNA 的提取和 16S rDNA 基因的克隆 将纯化的棘阿米巴 CB/S1 用常规酚/氯仿法提取基因组 DNA。内共生细菌 16S rDNA 引物<sup>[8]</sup>为: 5'-ATTCGTCGACAGAGTTTGATCCTGGCTC-AG-3' 和 5'-CCCGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3'。PCR 反应条件为: 94 °C 3 min; 94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 2.5 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。将 PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,连接至 pGEM-T easy 载体 (美国 Promega 公司产品),转化入大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  中,提取质粒,经 *EcoR* I 酶切鉴定后,送韩国 Macrogen 公司测序。

1.4 16S rDNA 基因序列分析 用 GenBank 的 BLAST 功能对所获基因序列进行比较分析,采用 Clustal X 软件和 Treeview 软件进行序列匹配排列分析和构建进化树。建立进化树所用相关细菌的 GenBank 登录号为: 发酵嗜纤维菌 (*Cytophaga fermentans*) 为 M58766, 鼻气管鸟杆菌 (*Ornithobacterium rhinotracheale*) 为 L19156, 约氏黄杆菌 (*Flavobacterium johnsoniae*) 为 M59053, 拉特噬胞菌 (*Cytophaga latercula*) 为 M58769, 蟑螂杆状体属 (*Blattabacterium* sp.) 为 X75624, 达尔文澳白蚁内共生细菌 (endosymbiont of *Mastotermes darwiniensis*) 为 Z35665, 栖瘤胃普雷沃氏菌 (*Prevotella ruminicola*) 为 AB004909, 脆弱类杆菌 (*Bacteroides fragilis*) 为 X-83938, 加拿大屈挠杆菌 (*Flex-*

*ibacter canadensis*) 为 M28805, *Sporocytophaga myxococcoides* 为 AJ310654, 哈氏噬纤维菌 (*Cytophaga hutchinsonii*) 为 M58768, *Flexibacter roseolus* 为 M58787, 棘阿米巴 KA/E21 内共生细菌为 EF140637, 类亚洲嗜阿米巴杆菌 (*Candidatus Amoebophilus asiaticus*) 为 AF366580, 黑脚硬蜱内共生细菌 (endosymbiont of *Ixodes scapularis*) 为 AB001518, 伯恩蚜小蜂内共生细菌 (endosymbiont of *Encarsia pergandiella*) 为 AF319783。

## 2 结果

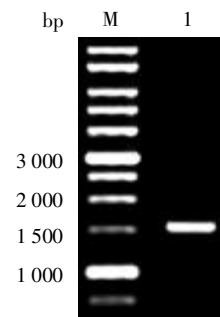
2.1 共生菌的地衣红-卡红染色 棘阿米巴 CB/S1 株的共生菌经地衣红-卡红染色呈黑色和棒状,不规则地散布于胞质内 (图 1A)。卡氏棘阿米巴胞质内未见共生细菌 (图 1B)。



A: 棘阿米巴 CB/S1 内共生菌; B: 卡氏棘阿米巴。

图 1 棘阿米巴 (地衣红-卡红染色,  $\times 1000$ )

2.2 共生菌 16S rDNA 的扩增 PCR 扩增结果表明,棘阿米巴 CBS1 内共生菌的 16S rDNA 基因约为 1 500 bp,与预期大小一致 (图 2)。测序结果表明,成功克隆到 16S rDNA 基因。



M: DNA 标志物; 1: CB/S1 内共生菌 16S rDNA 基因。

图 2 棘阿米巴 CB/S1 内共生菌 16S rDNA 的 PCR 扩增产物

2.3 内共生细菌 16S rDNA 序列分析 棘阿米巴 CB/S1 内共生菌的 16S rDNA 基因长 1 534 bp。BLAST 比对结果表明,棘阿

米巴 CB/S1 共生菌的 16S rDNA 基因序列与类亚洲嗜阿米巴杆菌 16S rDNA 基因和韩国临床分离株棘阿米巴 KA/E21 共生菌 16S rDNA 基因序列的同源性均为 98%。进化树分析表明, 棘阿米巴 CB/S1 内共生细菌与韩国棘阿米巴分离株 KA/E21 内共生细菌、类亚洲嗜阿米巴杆菌、黑脚硬蜱内共生细菌、伯恩蚜小蜂内共生细菌等细菌构成进化树状图中的单系(图 3)。

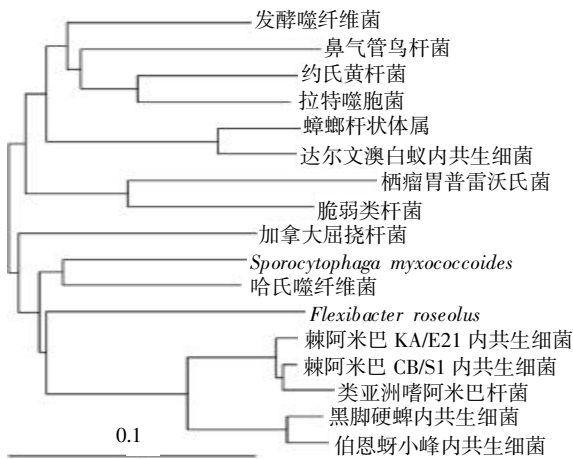


图 3 基于 16S rDNA 序列构建的 CB/S1 共生菌与相关细菌的进化树

### 3 讨论

在自然界中, 原虫细胞内的共生菌较普遍。Fritsche 等<sup>[9]</sup>报道, 约 24% 从自然界或临床患者中分离的棘阿米巴均有共生细菌。一般情况下, 细菌是棘阿米巴的主要食物, 但有些细菌不但可在棘阿米巴胞质内生存, 而且可通过细胞内的共生来躲避外界的不利环境, 有利于生物种的保种、播散和增强毒性。目前无法从棘阿米巴中分离共生菌, 且不同棘阿米巴虫种的特性差异较大, 故棘阿米巴和共生菌间的相互关系和相互作用尚不清楚。

本研究用地衣红-卡红染色确定了棘阿米巴土壤分离株 CB/S1 内存在共生菌, 并对该细菌进行了 16S rDNA 序列分析, 发现其与类亚洲嗜阿米巴杆菌有 98% 的同源性。Horn 等<sup>[10]</sup>报道类亚洲嗜阿米巴杆菌在自由生活阿米巴内共生, 来源于亚洲, 但目前尚无亚洲嗜阿米巴杆菌引起人体疾病的报道。玄英花等<sup>[8]</sup>研究发现, 韩国临床分离株棘阿米巴 KA/E9、KA/E21、KA/E22 和 KA/E23 株内含共生细菌, 其中 KA/E9、KA/E22 和 KA/E23 株的共生菌属于脱黄菌 (*Caedibacter caryophilus*)。本研究的共生菌与韩国棘阿米巴 KA/E21 内共生菌有 98% 的同源性。

致病性棘阿米巴 18S rDNA 基因分型多为 T4 型, 其次为 T3 型。本研究棘阿米巴 CB/S1 株的共生菌虽和玄英花等<sup>[8]</sup>报道

的 KA/E21 分离株内共生细菌相似, 但棘阿米巴 CB/S1 株 18S rDNA 基因为 T5 型<sup>[11]</sup>, 而 KA/E21 株则为 T4 型。目前, 阿米巴内共生细菌对阿米巴毒性和致病性的影响尚未阐明。同样, 类亚洲嗜阿米巴杆菌是否在细胞内永久共生亦不清楚, 有待于进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans[J]. Clin Microbiol Rev, 2003, 16(2): 273-307.
- [2] Rowbotham TJ. Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man[J]. Isr J Med Sci, 1986, 22(9): 678-689.
- [3] Essig A, Heinemann M, Simmacher U, et al. Infection of *Acanthamoeba castellanii* by *Chlamydia pneumoniae*[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(4): 1396-1399.
- [4] Steinert M, Birkness K, White E, et al. *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(6): 2256-2261.
- [5] Barker J, Humphrey TJ, Brown MW. Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease[J]. FEMS Microbiol Lett, 1999, 173(2): 291-295.
- [6] Zheng SZ, Shen CH, Wang T, et al. Isolation and culture of the *Acanthamoeba* sp[J]. J Med Sci Yanbian Univ, 2003, 26(3): 168-170. (in Chinese)  
(郑善子, 申成华, 王铁, 等. 棘阿米巴的分离及实验室培养[J]. 延边大学医学学报, 2003, 26(3): 168-170.)
- [7] Zhou DY, Li HH, Xuan YH, et al. Detection of endosymbiont of *Acanthamoeba* sp. CB/S1 isolated from soil of China[J]. Chin J Lab Diagn, 2010, 14(3): 330-331. (in Chinese)  
(邹大勇, 李红花, 玄英花, 等. 从土壤分离的棘阿米巴 CB/S1 株中发现内共生细菌[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(3): 330-331.)
- [8] 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.
- [9] Fritsche TR, Gautam RK, Seyedirashdi S, et al. Occurrence of bacterial endosymbionts in *Acanthamoeba* spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses[J]. J Clin Microbiol, 1993, 31(5): 1122-1126.
- [10] Horn M, Harzenetter MD, Linner T, et al. Members of the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* phylum as intracellular bacteria of acanthamoebae: proposal of '*Candidatus Amoebophilus asiaticus*'[J]. Environ Microbiol, 2001, 3(7): 440-449.
- [11] Zheng SJ, Xuan YH, Wang YH. Genotype identification of 18S rDNA from *Acanthamoeba* sp. CB/S1 isolated from soil in Beijing [J]. Chin J Zoonoses, 2006, 22(11): 1039-1042. (in Chinese)  
(郑善子, 玄英花, 王月华. 棘阿米巴土壤分离株 CB/S1 的 18S rDNA 基因型鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(11): 1039-1042.)

(收稿日期: 2010-09-10 编辑: 高石)