

# 口腔癌前损害与鳞癌患者口腔白色念珠菌分离株的磷脂酶活性研究

周敏 曾昕 陈谦明 赵曼 林梅 王晓毅 张纲 李秉琦

**摘要** 目的:研究口腔粘膜癌前损害和口腔鳞癌患者以及正常人的口腔白色念珠菌分离株的磷脂酶活性。方法:应用蛋黄培养基沉淀环面积测量法,研究来自于口腔粘膜癌前损害(21株)、口腔鳞癌(15株)患者以及正常人(19株)共55株白色念珠菌的磷脂酶活性大小。结果:虽然口腔癌前损害组的沉淀环面积平均值较正常对照组为高,但却无统计学差异;而口腔鳞癌组白色念珠菌的值较口腔癌前损害及正常对照组均小( $P < 0.05$ ),说明口腔鳞癌组分离株的磷脂酶活性较口腔癌前损害组及正常对照组高。结论:在口腔癌前损害和鳞癌患者口腔中的白色念珠菌分离株具有不同的毒力学特点,提示白色念珠菌在这两种具有关联性的疾病中所起的作用可能具有差异。

**关键词** 口腔白色念珠菌 磷脂酶 癌前损害 鳞癌

## Phospholipase Activities of *Candida albicans* Isolates from Oral Pre-malignant Lesions and Oral Cancers

Zhou Min, Zeng Xin, Chen Qianming, et al

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

### Abstract

**Objective:** The aim of this study is to compare activities of phospholipase of *Candida albicans* isolates from oral cavities of two groups of patients, including oral pre-malignant lesions and oral cancers. **Methods:** A total of 55 isolates, including oral pre-malignant lesions (21), oral cancers (15), and normal health control (19), were studied using the precipitate zone assay on the egg yolk agar. **Results:** No significant difference was found in phospholipase activities between these isolates from normal controls and oral pre-malignant lesions, while the activities of phospholipase of isolates from oral cancers were higher than those of the normal controls. **Conclusion:** *Candida albicans* may play different roles in different manners in these two closely related diseases.

**Key words:** *Candida albicans* phospholipase pre-malignant lesions squamous cell carcinoma oral cavity

白色念珠菌是口腔癌前损害患者口腔内最常分离得到的真菌,但该真菌与口腔癌前损害发生发展的关系尚存在争论且缺乏深入研究。本研究应用磷脂酶沉淀环带实验法,首次对口腔癌前损害和口腔鳞癌患者以及健康人的口腔白色念珠菌分离株的磷脂酶活性进行检测,以探讨白色念珠菌的毒力在口腔癌前损害和口腔鳞癌发生发展中的作用,为进一步深入研究白色念珠菌与上述口腔粘膜疾病发生的相关性提供线索和积累资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 分离株

四川大学华西口腔医学院口腔粘膜病学研究室保种的白色念珠菌临床分离株共55株,包括口腔癌前损害21株,口腔鳞癌15株,正常健康人19株。另外,用ATCC90028(*Candida albicans*)作为系统阳性对照,ATCC2001(*Candida galabrata*)作为系统阴性对照(标准株由香港大学牙学院口腔生物部实验室提供)。所有菌株解冻后,沙堡培养基<sup>37</sup>复苏培养24h,待用。

### 1.2 磷脂酶检测

1.2.1 蛋黄琼脂培养基配制 将32.5g沙堡氏葡萄糖琼脂、NaCl 29.22g(终浓度1mol/L)、CaCl<sub>2</sub> 0.2775g或CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 0.3675g(终浓度0.005mol/L)溶解于500ml蒸馏

本课题为国家自然科学基金资助项目(编号30070814)

作者单位:610041 四川大学华西口腔医学院

水中,高压灭菌,冷却后加入8%无菌蛋黄40 ml。

1.2.2 磷脂酶的检测 在蛋黄琼脂培养基上平放直径为6 mm的圆形消毒滤纸片。白色念珠菌在SDA上37℃生长24 h后,用无菌生理盐水调节菌悬液浓度,OD<sub>520nm</sub>值为0.075~0.080,滴加6 μl菌悬液于培养基中的滤纸上,37℃孵育5 d后观察结果。每一分离株分别重复3次实验。

1.2.3 磷脂酶的活性判定 采用QW500计算机辅助测量软件,分别测定滤纸上菌落生长的面积和菌落四周产生的明显的、界限清晰的、致密白色的沉淀环的面积,然后计算二者面积之比,得Pz值,即为磷脂酶活性。取每个菌株的3次重复试验测量值的平均数作为该菌株的Pz值纳入统计处理。根据此计算方法可知,Pz值的大小与白色念珠菌的磷脂酶活性大小成反比。

### 1.3 统计学处理

正常对照、口腔癌前损害及口腔鳞癌各分离株的磷脂酶活性的总体比较采用方差分析;其后的两两比较采用t检验。检验标准均为双侧α=0.05。统计分析在SPSS9.0统计软件包上进行。

## 2 结 果

各组白色念珠菌分离株的磷脂酶活性检测结果见表1。

表1 3组白色念珠菌分离株的Pz值比较(×10<sup>-3</sup>)

组 别	n	$\bar{x}$	s	最小Pz值	最大Pz值
正常对照组	19	2.936	0.615	2.15	4.01
口腔癌前病变	21	3.420	0.844	2.23	5.54
口腔鳞癌	15	2.577	0.219	2.15	2.84

从表中可见,3组白色念珠菌分离株所产生的磷脂酶量差异显著(P<0.05)。进一步的两两比较后发现,虽然口腔癌前损害组的Pz平均值较正常对照组为高(即磷脂酶活性较对照组为低),但统计学结果显示,二组间差异无显著性;而口腔鳞癌白色念珠菌的Pz值较口腔癌前损害及正常对照组均小(P<0.05),说明口腔鳞癌组分离株的磷脂酶活性较口腔癌前损害组及正常对照组为高。

## 3 讨 论

磷脂酶是一组具有水解一个或多个甘油磷酸键能力的酶的总称。在所有磷脂酶中,磷脂酶B(PLB)与90%的念珠菌磷脂酶细胞外活性有关<sup>1</sup>。磷脂酶与念珠菌毒力的相关性近年来逐渐受人注目。已经证实,磷脂酶在微生物对宿主细胞的穿入、损伤和溶解中发挥着作用。因此,磷脂酶被纳

入破坏宿主细胞的毒力因子的范畴内。基于上述原因,本研究分析口腔癌前病变和口腔鳞癌与正常对照组白色念珠菌分离株的毒力学差异。

磷脂酶破坏粘膜上皮的作用机制为:白色念珠菌磷脂酶活性增高,水解口腔粘膜上皮细胞细胞膜的主要成分磷脂的酯键,从而直接破坏宿主细胞膜;另外,由于磷脂酶是一种强力炎症介质,诱导炎症细胞和浆细胞的聚集和多种体内炎症介质的释放<sup>2</sup>,并且引发花生四烯酸和前列腺素的合成<sup>3</sup>,这些都可能提高白色念珠菌的毒力,加重宿主细胞膜的破坏。

本研究的结果显示,口腔鳞癌组分离的白色念珠菌与正常对照组及癌前损害组相比,磷脂酶活性较高,可以推测:具有较高磷脂酶活性的白色念珠菌参与了鳞癌病损表面的溃疡、糜烂等炎症反应,从而加重了对宿主的破坏。提示在临床工作中,应加强鳞癌患者的口腔卫生护理,必要时可以进行白色念珠菌培养及菌株耐药试验,针对性地应用一些抗真菌药物,以控制局部的感染。口腔癌前损害组白色念珠菌的磷脂酶活性与正常对照组相比,无显著性差异,且低于鳞癌组的白色念珠菌的磷脂酶活性,这也许是由于在口腔癌前损害和鳞癌患者口腔中的白色念珠菌分离株具有不同的毒力学特点,提示白色念珠菌在这两种具有关联性的疾病中所起的作用可能具有差异。上述研究仅从磷脂酶活性这一个方面初步探讨了白色念珠菌在口腔癌前损害及口腔鳞癌中的作用,尚需进一步深入全面地研究。此外,在今后的研究中还应进一步扩大研究的菌株数,以避免由于样本量过少而掩盖有用的信息。

## 参考文献

- 1 Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin Microbiol Rev, 2000, 13(1): 122~143
- 2 Meyers DJ, Berk RS. Characterization of phospholipase C from pseudomonas aeruginosa as a potent inflammatory agent. Infect Immun, 1990, 58(3): 659~666
- 3 Walker TS, Brown JS, Hoover CS, et al. Endothelial prostaglandin secretion: effects of typhus rickettsiae. J Infect Dis, 1990, 162(5): 1136~1141

(2000-12-29 收稿, 2001-03-23 修回)

(本文编辑 王 晴)