

[文章编号 1000-1182(2005)06-0537-02]

口腔扁平苔藓患者白色念珠菌分离株的颊细胞粘附力研究

曾 昕¹, 陈谦明¹, 聂敏海², 李秉琦¹

(1. 四川大学华西口腔医院 口腔黏膜病科, 四川 成都 610041;
2. 泸州医学院附属口腔医院 口腔内科, 四川 泸州 646000)

[摘要] 目的 研究健康人和口腔扁平苔藓患者口腔白色念珠菌分离株的颊细胞粘附力。方法 应用颊细胞粘附实验法, 比较来自于健康人(26株)、糜烂型口腔扁平苔藓患者(62株)以及非糜烂型口腔扁平苔藓患者(24株)共112株白色念珠菌对人类颊细胞粘附力的大小。结果 糜烂型口腔扁平苔藓患者组的白色念珠菌分离株的平均粘附数较健康对照组高($P < 0.05$), 说明糜烂型口腔扁平苔藓患者组白色念珠菌分离株的颊细胞粘附力高于健康对照组。结论 糜烂型口腔扁平苔藓患者组的白色念珠菌分离株与健康对照组相比, 具有不同的毒性特征, 白色念珠菌与糜烂型口腔扁平苔藓发生发展可能相关。

[关键词] 白色念珠菌; 粘附力; 口腔扁平苔藓

[中图分类号] R 781.5 **[文献标识码]** A

Adhesion to Buccal Epithelial Cells of *Candida albicans* Isolates from Oral Lichen Planus ZENG Xin¹, CHEN Qianming¹, NIE Min-hai², LI Bing-qi¹. (1. Dept. of Oral Medicine, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Oral Medicine, School of Stomatology, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the adhesion to buccal epithelial cells of *Candida albicans* isolates from erosive oral lichen planus (OLP) and nonerosive OLP, and its role in the development of OLP. **Methods** A total of 112 isolates, comprising healthy control (26), erosive OLP (62) and nonerosive OLP (24), were screened for the adhesion by using buccal epithelial cell (BEC) assay. **Results** The adhesion to buccal epithelial cells of the isolates from erosive OLP group was stronger than that of those from healthy control. **Conclusion** *Candida albicans*, some isolates with a special virulence attribute may contribute to the occurrence and progression of erosive OLP.

[Key words] *Candida albicans*; adhesion to buccal epithelial cells; oral lichen planus

白色念珠菌与口腔扁平苔藓(oral lichen planus, OLP)的关系尚不明确,但数十年来一直受到口腔微生物学家和临床医生的关注。以往的研究多针对 OLP 患者白色念珠菌分离率等流行病学的研究,而缺少对分离的念珠菌的进一步分析,如研究 OLP 患者与健康对照组分离的白色念珠菌是否具有毒力特征的差异,故未能更深入地说明白色念珠菌在 OLP 发生发展过程中的作用。本研究旨在应用颊细胞粘附实验,分析健康人和 OLP 患者的口腔白色念珠菌分离株对人类细胞的粘附力,探讨白色念珠菌的毒力在 OLP 发生发展中的作用,为深入研究白色念珠菌与 OLP 发生的相关性提供线索和积累资料。

1 材料和方法

1.1 分离株的获取

从 1999 年 3 月~2000 年 6 月就诊于四川大学华西口腔医院黏膜病门诊室并确诊为 OLP 的 300 例患者和 128 例健康对照(健康对照为未患有口腔黏膜疾病,取样前 2 个月未服用抗生素和激素的健康志愿者)中选取白色念珠菌临床分离株共 112 株,其中包括健康人 26 株,糜烂型 OLP 62 株,非糜烂型 OLP 24 株。所有分离株采用含漱液浓缩培养法分离培养并经过微生物学鉴定法鉴定。所有菌株解冻后,沙堡培养基 37℃ 复苏培养 24 h,待用。

1.2 对颊细胞粘附力的检测

1.2.1 白色念珠菌悬液的制备 将健康对照组、糜烂型 OLP 组、非糜烂型 OLP 组的白色念珠菌在沙堡葡萄糖琼脂(sourbaud dextrose agar, SDA)上 37℃ 生长过夜,在分光光度计上用无菌 PBS 调节菌悬液浓度至 McFarland 值为 4,即 OD_{520 nm} 为 0.375~0.385,菌悬

[收稿日期 2004-09-12; 修回日期 2005-06-27]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30300387);“十五”国家科技攻关计划资助项目(2004BA720A28)

[作者简介] 曾 昕(1970-),女,重庆人,副教授,博士

[通讯作者] 陈谦明, Tel: 028-85503480

液浓度相当于每毫升 $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ 个细胞,备用。

1.2.2 颊上皮细胞悬液的制备 收集4个健康人的颊上皮细胞,分散于10 ml 无菌 PBS 中,旋涡混匀器震荡1 min,洗去附着的微生物,2 500 g 离心10 min,弃上清,再如上加10 ml 无菌 PBS,震荡,离心,弃上清,沉淀重悬于2 ml 无菌 PBS 中,用血球计数仪调整颊细胞浓度为每毫升溶液中含 10^5 个颊上皮细胞。

1.2.3 粘附力的检测 将0.5 ml 颊上皮细胞分别加入0.5 ml 健康对照组、糜烂型 OLP 组、非糜烂型 OLP 组的白色念珠菌的菌悬液中,每个菌株做3个平行管,以不加白色念珠菌的颊上皮细胞作为对照。在37 摇床中孵育1 h,转速75 r/min。用无菌 PBS 稀释上述溶液至5 ml,用孔径为20 μ m 的聚碳酸酯微孔滤膜过滤,颊上皮细胞不能透过滤膜,而游离的白色念珠菌则能透过滤膜。用无菌 PBS 洗去未被颊上皮细胞粘附的白色念珠菌;将滤膜有颊上皮细胞的一面印在玻片上,15 s 后移去滤膜,空气中晾干后进行革兰染色。

1.2.4 结果判定 每张滤膜印迹在光镜下($\times 400$)观察50个颊上皮细胞,计数其上粘附的白色念珠菌数量。只计数孤立的颊上皮细胞,而不计数重叠、丛集或折叠的颊上皮细胞。光镜下未脱离白色念珠菌母细胞胞体的子细胞不计算。计算每一菌株各个平行管的平均粘附数,即50个颊细胞上粘附的白色念珠菌个数,再计算每个菌株的平均粘附数,定义为H值,H值代表白色念珠菌粘附力的大小,且其大小与对颊细胞的粘附力成正比。

1.3 统计学处理

在SPSS10.0统计软件包上采用方差分析分析各组分离株的颊细胞平均粘附数。

2 结果

2.1 白色念珠菌的鉴定

所有分离株均符合白色念珠菌的特点,即在SDA上生长48 h后,菌落形态呈乳白色奶酪状圆形;用改良革兰染色法染色后,光镜下呈革兰阳性、细胞体积较大、菌体为圆形或卵圆形双层环状结构;在米粉吐温80琼脂培养基上37 孵育4~6 h后可形成芽管;在SDA上45 孵育48 h,仍然生长良好;应用API 20C AUX 念珠菌鉴定系统进行鉴别的读数均符合该系统提供的数据库中的白色念珠菌读数。

2.2 白色念珠菌对颊细胞的粘附力

健康对照组、糜烂型 OLP 组、非糜烂型 OLP 组白色念珠菌分离株对颊细胞粘附力分别为(2.211 2 \pm 0.483 3)、(3.950 4 \pm 1.343 6)、(2.883 2 \pm 1.298 8)。糜烂型 OLP 患者组口腔中分离的白色念珠菌的H值

大于健康对照组分离的白色念珠菌的H值($P < 0.05$)。非糜烂型 OLP 患者口腔中分离的白色念珠菌的H值与健康对照组相比,虽然具有增高的趋势,但不具有统计学意义($P > 0.05$)。此外,该组与糜烂型 OLP 患者组相比,其差异有显著性($P < 0.05$)。由此可得出糜烂型 OLP 患者口腔中分离的白色念珠菌的粘附力强于健康对照组分离的白色念珠菌。

3 讨论

念珠菌定植和感染的首要步骤是念珠菌对宿主黏膜表面或对丙烯酸树脂及其他塑料表面的粘附¹。口腔是一个持续流动性的环境,念珠菌细胞必须借助其粘附能力以免被唾液冲刷掉或被吞咽。只有在粘附发生之后,念珠菌才能成功在口腔中定植并随之致病。因此,粘附力在念珠菌的定植中具有重要意义。更有研究显示,就白色念珠菌而言,某些菌株较其他菌株更能成功地定植在健康个体体内,并在免疫力降低的患者体内取代原有的共生菌成为致病菌^{2,3}。这提示各型白色念珠菌具有粘附力的差异,这种差异又导致了致病性的差异。基于上述原因,本研究选择颊上皮细胞粘附力作为白色念珠菌毒力特征的指标之一,分析 OLP 患者和健康对照组白色念珠菌分离株的毒力学差异。

本研究结果显示,糜烂型 OLP 患者组的白色念珠菌分离株与健康对照组相比,对颊上皮细胞的粘附力更强。此前尚无学者对 OLP 患者口腔中分离的白色念珠菌进行粘附力检测,只是有学者对艾滋病患者与健康对照组口腔白色念珠菌分离株的颊上皮细胞粘附力进行研究,得出的结果为艾滋病患者白色念珠菌分离株的粘附力强于健康对照组的白色念珠菌分离株⁴。基于此可推测,具有较强粘附力的白色念珠菌在糜烂型 OLP 的发生发展中发挥了一定作用。这些白色念珠菌的较强的对颊上皮细胞的粘附力,为其他毒力因素作用的发挥提供了良好的条件,从而参与了病变的发生发展。

[参考文献]

- 1] Sundstrom P. Adhesion in *Candida spp* J. Cell Microbiol, 2002, 4 (8): 461-469.
- 2] Calderone R, Suzuki S, Cannon R, et al. *Candida albicans*: Adherence, signaling and virulence J. Med Mycol, 2000, 38 (Suppl 1): 125-137.
- 3] Schmid J, Hunter PR, White CG, et al. Physiological traits associated with success of *Candida albicans* strains as commensal colonizers and pathogens J. J Clin Microbiol, 1995, 33(11): 2920-2926.
- 4] Sweet SP, Cookson S, Challacombe SJ. *Candida albicans* isolates from HIV-infected and AIDS patients exhibit enhanced adherence to epithelial cells J. J Med Microbiol, 1995, 43(6): 452-457.

(本文编辑 王 晴)