

口腔扁平苔藓患者白色念珠菌检出率及分离株 SAP 表达的研究

林姬艳

舟山市口腔医院 口腔科 316000

【摘要】目的：观察分析口腔扁平苔藓(OLP)患者白色念珠菌检出率及分离株分泌性天冬氨酸蛋白酶(SAP)的表达相关性。方法：选取2014年1月~6月100例OLP患者为观察组，选取同期100例健康体检无口腔黏膜疾病者为对照组，采用含漱浓缩培养法收集白色念珠菌分离株，鉴定后与人口腔表皮样癌细胞(KB)共同培养，观察比较两组患者白色念珠菌检出情况、分离株形态学特点及与KB细胞共培养后不同时间段SAP表达阳性情况。结果：观察组白色念珠菌阳性率为34.0%，高于对照组的17.0%，差异有统计学意义($\chi^2=7.606, P<0.05$)，SAP1在共培养6、12、24h阳性表达率高于对照组，SAP3在共培养6、12、24h阳性表达率高于对照组，SAP5在共培养6、12h阳性表达率高于对照组，差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论：口腔扁平苔藓患者白色念珠菌检出率较健康人群高，与KB细胞共培养后在SAP1、3、5基因阳性表达较健康人群有显著增高，白色念珠菌(CA)的高毒力基因表达差异可能与CA和OLP有一定的相关性。

【关键词】口腔扁平苔藓；白色念珠菌；SAP表达

Oral lichen planus patients with *Candida albicans* isolates detected rate and expression of SAP

口腔扁平苔藓(OLP)是慢性扁平苔藓最为常见的口腔伴发病变，有研究认为^[1]其存在0~2%的恶变率，因此被认为是癌前状态表现之一，其危险因素较多，发病机制尚不明确^[2]，其中作为口腔感染最为常见真菌病原体，白色念珠菌感染(CA)感染与OLP感染临床表现较为相似，在OLP患者口腔及病损局部白色念珠菌检出率较高，抗真菌治疗对其有效^[3]，因此国内外对CA在OLP发病与进展及相关治疗中的作用逐步关注增多，作为CA细胞外水解酶中的分泌性天冬氨酸蛋白酶(SAPS)可促进CA上皮细胞粘附能力，破坏宿主组织防御系统^[4]。本文通过观察100例OLP患者CA检出率及分离株SAP表达的特点，分析CA的SAPS与OLP发生的关系，现报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取2014年1月~6月舟山市口腔医院就诊的OLP患者100例为观察组，所有患者均有典型OLP临床表现，经2名以上高年资医生确诊，入选前3个月未服用抗生素及抗真菌药物治疗，且无其他口腔黏膜疾病。其中男性45例，女性55例，年龄在47~69岁，平均年龄(56.3±4.2)岁，普通型OLP 63例，充血糜烂型OLP 37例。选取同期100例健康体检无口腔黏膜疾病者为对照组，其中男性44例，女性46例，年龄在45~68岁，平均年龄(55.8±5.2)岁。两组患者在性别、年龄等方面无统计学差异($P>0.05$)，具有可比性。

1.2 方法

两组患者均采用含漱浓缩培养法充分含漱灭菌PBS 1min后收集含漱液，3500rpm离心5min，取1mL沉淀涂在沙氏琼脂培养基上培养48h，出现菌落后挑取典型菌落划线接种在SDA上，隔日转种，连续3次，采用念珠菌显色培养、芽管形成试验、厚膜孢子形成实验及45℃生长试验鉴定白色念珠菌^[5]，RPM11640细胞培养液内悬浮培养并分时段收集观察形态学特点，接种环从SDA培养基上挑取经过鉴定的CA临床分离株菌落数个，加入不含胎牛血清fl向RPM11640细胞培养液中培养，与KB细胞共培养，提取细胞与CA共培养物的总RNA及SAP1-10基因表达情况^[6]。

1.3 观察指标

观察比较两组患者 CA 检出情况、分离株形态学特点及与 KB 细胞共培养后 6、12、24h SAP 表达阳性情况。

1.4 统计学方法

数据均用 SPSS17.0 统计分析软件包进行处理。计数数据采用 χ^2 检验。且 $P < 0.05$ 为对比差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CA 检出率

两组患者 CA 检出情况比较见表 1。观察组 CA 阳性率为 34.0%，高于对照组的 17.0%，差异有统计学意义 ($\chi^2=7.606$, $P < 0.05$)。

表 1 观察组与对照组 CA 检出情况比较

组别	例数	阳性例数	阳性率
观察组	100	34	34.0%
对照组	100	17	17.0%

2.2 KB 细胞共培养结果

CA 临床菌株分别与 KB 细胞共同培养 1 小时后，观察到孢子相 CA 开始生出菌丝，多数散在于细胞间空隙处，之后菌丝变长，数量增多，并与 KB 细胞相粘附，PBS 冲洗后粘附数量进一步增多，并纠结成团，集中于瓶底部位。24h 后晃动培养瓶，对照组培养物不与瓶底分离，而观察组在晃动后培养物边缘脱离瓶底。

2.3 SAP 基因表达阳性情况

两组患者 CA 分离株与 KB 细胞共培养不同时间段 SAP1-10 阳性表达情况比较见表 2。SAP1 在共培养 6、12、24h 阳性表达率高于对照组，SAP3 在共培养 6、12、24h 阳性表达率高于对照组，SAP5 在共培养 6、12h 阳性表达率高于对照组，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2 观察组与对照组不同时间段 SAP1-10 阳性表达情况比较

SAP 基因家族编码	观察组 (n=34)			对照组 (n=17)		
	6h	12h	24h	6h	12h	24h
SAP1	24*	26*	28*	3	8	9
SAP2	27	33	34	12	16	17
SAP3	29*	28*	31*	7	9	11
SAP4	31	33	34	16	17	17
SAP5	25*	32*	32	8	11	15
SAP6	32	33	34	15	16	17
SAP7	14	19	24	6	8	9
SAP8	28	30	31	14	15	16
SAP9	31	33	34	16	17	17
SAP10	30	32	34	15	16	16

注：与对照组比较，* $P < 0.05$

3 讨论

白色念珠菌、热带念珠菌、克柔念珠菌、光滑念珠菌均是口腔环境中常见的共生状态^[7]，正常情况下，CA 可长期保持共生状态而不引发疾病，但在免疫缺陷患者中，CA 可引发如白色念珠菌病等口腔黏膜病变发生，近些年来对 OLP 患者的口腔真菌检测 CA 有较高

的检出率,这使得 OLP 发病与复发同 CA 感染之间的关系引起临床的重点关注^[8],一般 OLP 患者随着病损的加重,黏膜完整性会出现不同程度损伤,渗出逐步增多,渗出的组织液能够成为 CA 定植与繁殖的营养环境,而一旦 CA 定植,其产生的细胞外酶能够加重病损处的黏膜上皮损伤程度,增加渗出症状的加重,以此成为恶性循环,本文结果显示健康患者口腔 CA 检出率为 17.0%,这在临床报道的健康人 CA 检出率 15%~40%范围之内^[9],而 OLP 患者 CA 检出率高达 34.0%,显著高于健康者。

虽然 OLP 患者与口腔念珠菌病患者的临床症状相似,CA 检出情况均有显著提高,但是有研究表明口腔念珠菌病患者所感染的 CA 基因型与健康人较为接近,而对 OLP 患者 CA 基因型与健康人的进行对比却又显著的差别,这可能与 OLP 患者 CA 感染多为外源感染所致有关,另外 CA 的粘附力对其毒力特征的影响较为明显,粘附力较强的 CA 在 OLP 的发病与发展过程中尤为重要,其能加剧黏膜表面的损伤程度。分泌性天冬氨酸蛋白酶 Saps 为 CA 的重要毒力因子之一,其基因家族十个成员对感染的部位及阶段影响较大,有研究分析,SAP1、SAP3 之间表型转换具有协调作用,其对 CA 的多形态学及毒力特性影响较为明显,而 SAP5 与 SAP4、SAP6 均为菌丝相关基因,但 SAP5 对菌丝的依赖性较弱,但它对 CA 在体内黏膜表面的穿透和感染有一定的影响,上皮完整性的破坏能力较高,SAP9、SAP10 是细胞表面相关天冬氨酸蛋白酶,位于 CA 细胞膜或细胞壁上,在 CA 细胞表面完整性及细胞出芽分离时起作用,可增加 CA 在黏膜表面的适应性^[10],本文结果显示随着与 KB 细胞共生时间的增长 SAP1、3、5 阳性表达方面均高于健康对照患者,差异有显著性意义,也推测了 CA 的高毒力基因表达差异可能与 CA 和 OLP 有一定的相关性。

综上所述,本文通过观察 100 例 OLP 患者 CA 检出率及分离株 SAP 表达的特点,可见 OLP 患者 CA 检出率较健康人群高,与 KB 细胞共培养后在 SAP1、3、5 基因阳性表达较健康人群有显著增高,CA 的高毒力基因表达差异可能与 CA 和 OLP 有一定的相关性。

参考文献

- [1] 邱宏亮.脉冲 Nd-YAG 激光控制糜烂型扁平苔藓患者白色念珠菌检出率及分离株毒力的临床研究[J].实用口腔医学杂志,2014,30(1):85-88.
- [2] 刘斌杰,彭解英,张娟等.斯奇康联合曲安奈德治疗口腔扁平苔藓的临床疗效观察[J].实用预防医学,2010,17(2):336-337.
- [3] 左雯鑫, 李晓宇, 陈艳卿, 等.口腔扁平苔藓患者口腔健康相关生活质量的初步研究[J].华西口腔医学杂志,2012,30(1):40-44.
- [4] Clancy CJ, Nguyen MH. Finding the "missing 50%" of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care [J]. Clin Infect Dis, 2013, 56(9):1284-1292.
- [5] 谢三祥, 丰琳, 朱声荣, 等.IL-17 在口腔扁平苔藓病损中的表达及其对趋化因子 CCL20 表达的促进作用[J].实用医学杂志,2014,30(14):2225-2227.
- [6] Xie S, Ding L, Xiong Z, et al. Implications of Th1 and Th17 cells in pathogenesis of oral lichen planus [J]. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci, 2012, 32(3):451-457.
- [7] 张特.不同细胞角蛋白与人口腔扁平苔藓的相关性及对免疫功能的影响[J].中国老年学杂志,2013,34(33):1918-1919.
- [8] 张新,吕晓丹,漆明,等.Egr-1 与 TNF- α 在口腔扁平苔藓病损中表达的研究[J].重庆医科大学学报,2012,37(1):63-66.
- [9] 何娟,蔡扬.口腔扁平苔藓病损区 STAT1 和 IFN- γ 的表达[J].四川大学学报(医学版),2014,45(1):70-73.
- [10] 胡毓安,史利宁,李芳秋,等.白色念珠菌烯醇化酶双抗体夹心 ELISA 定量检测方法

的建立[J].南京医科大学学报(自然科学版), 2014,34(6): 826-830.