

[文章编号] 1000-1182(2009)04-0436-04

化疗患者口腔白假丝酵母菌的分布及基因分组研究

綦成¹ 孙静² 亓庆国²

(1.山东大学附属第二医院 口腔科; 2.山东大学口腔医院 口腔内科, 山东 济南 250012)

[摘要] 目的 研究以白假丝酵母菌(*S.albicans*)为代表的假丝酵母菌在化疗肿瘤患者口腔中的分布情况, 并对检出的白假丝酵母菌进行基因分组。方法 从390例接受化疗1年以上的肿瘤患者口腔中取样, 采用颊黏膜拭子法, CHROMagar Candida™鉴定培养基初步鉴定, 根据白假丝酵母菌25S rDNA基因多态性设计引物, 根据PCR产物多态性进行基因分组。结果 肿瘤患者口腔假丝酵母菌检出率为53.85%(210/390), 白假丝酵母菌的检出率为48.21%(188/390), 其余为光滑假丝酵母菌5.64%(22/390); 白假丝酵母菌基因分组A、B、C组均有检出, 其中以B组为主, 59.57%(112/188)。结论 肿瘤患者口腔的假丝酵母菌以白假丝酵母菌为主, 与健康人群的口腔白假丝酵母菌A组占有绝对多数的情况不同, B组白假丝酵母菌在化疗患者口腔中占主导地位。

[关键词] 口腔白假丝酵母菌; 基因分组; 化疗

[中图分类号] R 781 **[文献标志码]** A

Distribution and genotypic subgroup of oral *Saccharomyces albicans* isolated from cancer patients receiving chemotherapy QI Cheng¹, SUN Jing², QI Qing-guo². (1. Dept. of Stomatology, The Second Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Dept. of Oral Medicine, School of Stomatology, Shandong University, Jinan 250012, China)

[Abstract] **Objective** The objective of this study is to study the distribution and molecular characteristics of the oral *Saccharomyces albicans*(*S.albicans*) in the cancer patients receiving chemotherapy. **Methods** 390 cancer patients receiving chemotherapy were sampled by oral mucosal swab. The *Candida* species were identified by CHROMagar Candida™ differential medium. All the *S.albicans* were genotypic grouped by PCR using primers reported to span a transposable intron region in the 25S rDNA gene. **Results** The frequency of oral *Candida* carriage of the cancer patients receiving chemotherapy was 53.85%(210/390). Most of them were *Saccharomyces albicans*, the frequency was 48.21%(188/390). The frequency of oral *Candida glabrata* carriage was 5.64%(22/390). Genotypic subgroup A, B, C of *Saccharomyces albicans* were determined, and genotypic group B was the predominant group 59.57%(112/188). **Conclusion** *Saccharomyces albicans*, especially genotypic subgroup B, rather than subgroup A, is the prevalence subpopulation in the oral *Candida* obtained from cancer patients receiving chemotherapy.

[Key words] oral *Saccharomyces albicans*; genotypic subgroup; chemotherapy

白假丝酵母菌(*Saccharomyces albicans*, *S.albicans*)是口腔正常微生物群的组分之一, 也是口腔中重要的条件致病真菌^[1]。而恶性肿瘤患者手术前后常规采用的抗肿瘤放化疗, 导致肿瘤患者免疫力受损, 口腔真菌感染是最常见的并发症。有研究证实, 口腔黏膜的真菌感染与系统性真菌感染密切相关, 系统性真菌感染导致的死亡率非常高, 有报道指出免疫缺陷导致的假丝酵母菌感染成为近年来恶性肿瘤患者死亡的主要原因之一。假丝酵母菌感染

有5个特点: 高院内感染率、高死亡率、低实验室诊断率、低临床诊断率、病情恶化快。口腔假丝酵母菌的分布有地域特点, 而且不同菌种、同种内不同菌株间的致病性存在差异^[2]。研究肿瘤患者口腔中以白假丝酵母菌为代表的假丝酵母菌群的检出情况和分子生物学特征是白假丝酵母菌分子流行病学研究的重要内容, 对白假丝酵母菌的流行病学和致病性研究有重要价值。本实验通过研究化疗患者口腔中以白假丝酵母菌为代表的假丝酵母菌群的检出情况, 以及采用针对白假丝酵母菌25S rDNA中的一段可转移的内含子设计的一对引物对检出的白假丝酵母菌进行基因分组, 并与前期本课题组对健康人群口腔假丝酵母菌分布的研究结果比较, 分析白假

[收稿日期] 2009-02-09; [修回日期] 2009-06-10

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30400498)

[作者简介] 綦成(1972—), 男, 山东人, 主治医师, 硕士

[通讯作者] 亓庆国, Tel: 0531-88382213

丝酵母菌在化疗患者口腔中的分布及其基因型特点,为研究白假丝酵母菌在病理状态下的定植以及预防肿瘤患者等高危人群的假丝酵母菌感染提供依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象

接受化疗的肿瘤患者390例,分别来自山东大学齐鲁医院肿瘤防治中心化疗科、山东大学第二医院肿瘤科、山东省肿瘤医院肿瘤内科。男210例,女180例,平均年龄为48.8岁。纳入标准为:1)经病理诊断为恶性肿瘤,并经过了1年以上化疗过程;2)身体基本状况良好,无糖尿病等其他系统性疾病;3)口腔中无义齿;4)取样前2周没有使用过抗生素;5)患者未接受过口腔颌面部放射治疗。

1.2 主要实验器材和试剂

CHROMagar Candida™鉴定培养基(法国科玛嘉公司),PCR试剂盒(北京全式金生物技术有限公司),小量酵母菌DNA提取纯化试剂盒(天根生化科技有限公司),梯度PCR仪Gradient Thermal Cycle(Eppendorf公司,德国),gel-Doc 2000凝胶成像及分析系统(Bio-RAD公司,美国)。

1.3 取样及分离鉴定

1.3.1 取样方法 使用本课题组以前使用过的改良棉拭子法^[3],基本过程如下:在每名肿瘤患者的口腔颊黏膜处反复涂擦5次,将棉拭子头部剪断,放入事先消毒灭菌的装有500 μL生理盐水的离心管中,在2 h内送到实验室。将其在漩涡振荡器上振荡30 s,用无菌镊子将拭子头部的液体尽量挤出,弃去拭子。将所有离心管中的样本调至300 μL,5 000 g离心3 min,弃去上清液,用无菌PBS洗3遍,最终加入500 μL PBS准备接种。

1.3.2 接种培养和鉴定 取样本10 μL接种在CHROMagar Candida™鉴定培养基上,37℃恒温培养箱培养48 h,根据培养基上菌落的颜色来判断不同的假丝酵母菌种类,翠绿色菌落是白假丝酵母菌,紫色菌落是光滑假丝酵母菌,蓝色菌落是热带假丝酵母菌,白色为不能鉴定出来的其他假丝酵母菌。从每个患者的样本中取一个单菌落进行下一步研究,如果有检出一种以上假丝酵母菌,每种取一个菌落,白假丝酵母菌采用马血清诱导芽管形成和玉米吐温80培养上形成厚膜孢子进行进一步鉴定^[4]。

1.4 白假丝酵母菌DNA的提取和基因分组

1.4.1 白假丝酵母菌DNA的提取 按照小量酵母菌DNA提取纯化试剂盒使用说明要求,从YPD培养板上取单菌落,过夜培养,收集菌液用灭菌的PBS洗3

遍后,将细菌数目调整到每毫升 5×10^9 个,使用lyticase酶破细胞壁,蛋白酶K消化蛋白,RNase除去RNA,吸附柱法获得白假丝酵母菌的DNA,并用分光光度法测定DNA纯度和含量。

1.4.2 白假丝酵母菌基因分组 白假丝酵母菌在25S rDNA编码区内存在一可转座型内含子,内含子中至少存在3个插入片段:252、341、379 bp,形成可转座型内含子的大小可有3种:379 bp(插入379 bp)、621 bp(插入379和252 bp)、962 bp(插入379、252和341 bp)。根据相应的PCR产物进行分型,A型:450 bp(无内含子)、B型:840 bp(379 bp内含子)、C型:450、840 bp,379 bp可转座内含子对基因中核糖体串联区的不对称插入。根据McCullough等^[5]的方法,针对白假丝酵母菌25S rDNA的一段内含子序列设计一对引物,CA2INT2L:5'-ATAAGG-GAAGTCGGCAAAATAGATCCGTAA-3',CA2INT2R:5'-CCTTGGCTGTGTTTCGCTAGATAGTAGAT-3'。20 μL PCR反应体系:2×EasyTaqPCR SuperMix 10 μL,DNA模板1.5 μL,Primer(10 μmol/L)各2 μL,ddH₂O平衡至20 μL。反应条件是:94℃ 3 min预变性,然后94℃ 1 min,67℃ 1 min,72℃ 2 min 30 s,30个循环,4℃保温。反应产物用1.5%的琼脂糖凝胶电泳,100 V 30 min,溴乙锭显色,紫外灯下显影。根据扩增产物的大小确定不同的基因分组,480 bp为A组,840 bp为B组,以上2条产物都有者为C组,产物为1 080 bp的为D组,产物为1 400 bp的为E组。培养鉴定以及白假丝酵母菌的基因分型,阳性对照均采用白假丝酵母菌的参考菌株3153a(Kim Lewis/Lab of Northeastern Univ USA提供),为A型。

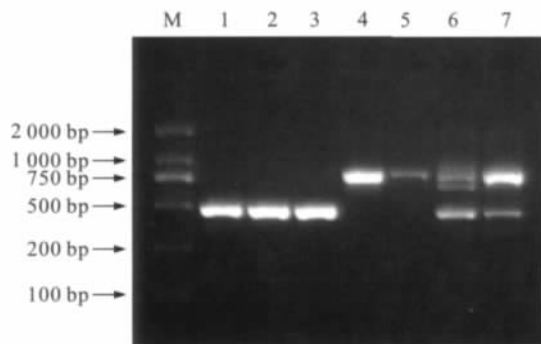
1.5 统计学方法

采用Fisher精确检验的方法对实验数据进行统计分析。

2 结果

在肿瘤患者口腔中检出白假丝酵母菌、光滑假丝酵母菌,假丝酵母菌的检出率是53.85%(210/390);白假丝酵母菌的检出率为48.21%(188/390);有22例检出光滑假丝酵母菌5.64%(22/390),未发现不同种假丝酵母菌共存现象。

对从肿瘤患者口腔中分离出的188株白假丝酵母菌进行基因型鉴定(图1),共检出A、B、C 3组基因型,没有发现其他2组,B组占主导地位;A、B、C组白假丝酵母菌的比例为A:33.51%(63/188);B:59.57%(112/188);C:6.91%(13/188)。本课题组检出的A组有450、480 bp 2种;C组部分有明显的3条扩增产物,而且特异性很强。



M: DNA Marker DL2000; 1~3: 白假丝酵母菌标准株3153a以及其他2个菌株为A型, PCR产物大约在480 bp处; 4~5: B型PCR产物大约在840 bp处; 6~7: C型PCR产物大约在480 bp和840 bp处

图1 白假丝酵母菌的不同基因分组PCR电泳结果

Fig 1 Genotypic subgroup of *Saccharomyces albicans* determined by PCR amplification diversity

3 讨论

从口腔中检测以白假丝酵母菌为代表的假丝酵母菌群的方法较多, 本课题组以前相关研究证实改良棉拭子法结合CHROMagar *Candida*TM培养鉴定是简单有效的方法^[3], 为保证白假丝酵母菌的鉴定, 同时采用了常规方法进一步鉴定。关于病例的选择, 由于颌面部接受放射治疗会导致唾液腺受损而产生唾液流量下降, 导致口腔假丝酵母菌的繁殖, 从而产生假丝酵母菌感染^[6], 这些患者应作为单独一个人群进行研究, 因此本课题组排除了这部分病例; 此外, 充分的证据表明义齿的存在以及糖尿病等系统性疾病与假丝酵母菌定植密切相关^[7-9], 为保证所有病例基线一致, 本课题组也排除了这些病例。

对肿瘤患者口腔假丝酵母菌的检出率, 不同研究结果有所差别^[10-11], 本课题组在不同患者口腔中只检出了白假丝酵母菌和光滑假丝酵母菌, 并没有发现2种假丝酵母菌共存的现象, 这与Ninane^[12]和Safdar等^[13]的研究结果有区别, 造成这种差别的原因包括: 取样人群的全身状态、地区、取样部位、取样方法和检出方法的差别。另外, 近年来各医院均加强了对肿瘤患者的口腔护理, 对检出结果也有一定的影响。

与本课题组以前对健康人群口腔假丝酵母菌分布的研究结果相比, 该研究结果显示白假丝酵母菌占检出的假丝酵母菌的构成比为89.52%(188/210), 而健康人群为35.48%, 两者相比具有统计学意义($P<0.0001$); 此外健康人口腔中可检出4种假丝酵母菌, 分别是白假丝酵母菌、光滑假丝酵母菌、热带假丝酵母菌和一些尚未确定的假丝酵母菌菌种, 并存在白假丝酵母菌、光滑假丝酵母菌、热带假丝酵母菌并存的现象, 而本课题组未在接受化疗的肿

瘤患者口腔中检出后2种假丝酵母菌。由此可见, 对接受化疗的肿瘤患者来说, 白假丝酵母菌仍然是假丝酵母菌感染的主要致病真菌。光滑假丝酵母菌引起的真菌感染通常多见于免疫功能严重缺陷的患者, 在本课题组的病例人群中也存在年龄较大、全身状况较差的患者。

对白假丝酵母菌进行基因分组是从基因水平研究白假丝酵母菌的重要手段, 方法也比较多, 但是一般分类方法较复杂, 难以发现有规律性的分布特征。核糖体RNA基因广泛存在于各种生物体内, 在进化过程中具有相同的起源和功能, 可以反映物种间的进化关系; 其对基因研究的重大意义已被证实并被广泛用于多种生物的鉴定、分型及物种进化分析。McCullough等^[5]针对白假丝酵母菌的25S rDNA中的一段可转移的内含子序列设计的一对引物, 可以将白假丝酵母菌分为A、B、C、D组; Tamura等^[14]用这种方法又发现了一种新的基因型E组(1 040 bp)。该基因分组方法的主要优势在于: 1) 都柏林假丝酵母菌和白假丝酵母菌亲缘关系很近, 常规方法难以区分, 而都柏林假丝酵母菌通常具有较强耐药性; 而该分类方法中, D组即为都柏林假丝酵母菌, 这样就能将两者区分开来。2) 相关研究表明, 不同基因分组的白假丝酵母菌的分布有地域特征, 并且可能与耐药性有关。3) 本课题组前期使用该方法对从健康人群中分离到的白假丝酵母菌进行了基因分组, 对肿瘤患者口腔假丝酵母菌进行同样研究, 可以比较不同人群白假丝酵母菌基因分组的差别, 为研究假丝酵母菌的病理性演替提供资料。

本实验从肿瘤患者口腔中分离的188株白假丝酵母菌经PCR分为3型: A组占33.51%(63/188), B组59.57%(112/188), C组6.91%(13/188); 未发现D组和E组。本课题组检出的A组有450、480 bp 2种; C组部分有明显的3条扩增产物, 而且特异性很强, 与McCullough等^[5]的研究略有差别, 说明该内含子有一定的多态性和地域特点。而在健康人群, 本课题组也同样发现了这3个基因分组^[15], 比例分别为: A组88.4%(76/86), B组5.8%(5/86), C组5.8%(5/86), 经过统计学分析表明, A组白假丝酵母菌在健康人群口腔中占主导地位, 而B组则在化疗肿瘤患者口腔中占多数。

[参考文献]

- [1] Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans* [J]. Crit Rev Oral Biol Med, 1999, 10(3): 359-383.
- [2] Correia A, Sampaio P, Almeida J, et al. Study of molecular epidemiology of candidiasis in Portugal by PCR fingerprinting of *Candida* clinical isolates[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(12): 5899-

- 5903.
- [3] 亓庆国, 周学东, 肖晓蓉, 等. 影响正常口腔假丝酵母菌检出率的方法学研究[J]. 中国微生态学杂志, 2004, 16(1) 29-30.
- QI Qing-guo, ZHOU Xue-dong, XIAO Xiao-rong, et al. The effects of methodological factors on the rates of isolation of *Candida* spp. in normal oral cavities[J]. Chin J Microecology, 2004, 16(1) 29-30.
- [4] Polak A. Virulence of *Candida albicans* mutants[J]. Mycoses, 1992, 35(1/2) 9-16.
- [5] McCullough MJ, Clemons KV, Stevens DA. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea* [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(2) 417-421.
- [6] Thaweboon S, Thaweboon B, Srithavai T, et al. Oral colonization of *Candida* species in patients receiving radiotherapy in the head and neck area[J]. Quintessence Int, 2008, 39(2) 52-57.
- [7] Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martínez F, et al. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis[J]. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2005, 10(Suppl 1) 27-39.
- [8] Gonçalves RH, Miranda ET, Zaia JE, et al. Species diversity of yeast in oral colonization of insulin-treated diabetes mellitus patients[J]. Mycopathologia, 2006, 162(2) 83-89.
- [9] Sahin I, Oksuz S, Sencan I, et al. Prevalance and risk factors for yeast colonization in adult diabetic patients[J]. Ethiop Med J, 2005, 43(2) 103-109.
- [10] Leung WK, Dassanayake RS, Yau JY, et al. Oral colonization, phenotypic, and genotypic profiles of *Candida* species in irradiated, dentate, xerostomic nasopharyngeal carcinoma survivors[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(6) 2219-2226.
- [11] Redding SW, Zellars RC, Kirkpatrick WR, et al. Epidemiology of oropharyngeal *Candida* colonization and infection in patients receiving radiation for head and neck cancer[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(12) 3896-3900.
- [12] Ninane J. A multicenter study of fluconazole versus oral polyenes in the prevention of fungal infection in children with haematological or malignancies. Multicenter study group[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1994, 13(4) 330-337.
- [13] Safdar A, Chaturvedi V, Cross EW, et al. Prospective study of *Candida* species in patients at a comprehensive cancer center[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(7) 2129-2133.
- [14] Tamura M, Watanabe K, Mikami Y, et al. Molecular characterization of new clinical isolates of *Candida albicans* and *C. dubliniensis* in Japan: Analysis reveals a new genotype of *C. albicans* with group intron[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(12) : 4309-4315.
- [15] 亓庆国, 周学东, 肖晓蓉, 等. 正常儿童口腔中白色假丝酵母菌的分布及基因分型[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2003, 23(9) 674-677.
- QI Qing-guo, ZHOU Xue-dong, XIAO Xiao-rong, et al. *Candida albicans* isolated and genotypic subgrouped from normal oral cavities of different aged children[J]. Chin J Microbiol Immunol, 2003, 23(9) 674-677.
- (本文编辑 汤亚玲)

(上接第432页)

- ZHANG Hong. Progression on study of comfort care[J]. Foreign Medical Sciences(Nursing), 2001, 20(1) 15-16.
- [2] Kolcaba KY. The art of comfort care[J]. Image J Nurs Sch, 1995, 27(4) 287-289.
- [3] 张宏, 朱光君. 舒适护理的理论与实践研究[J]. 护士进修杂志, 2001, 16(6) 409-410.
- ZHANG Hong, ZHU Guang-jun. The theory and practical study of comfort care[J]. J Nurses Training, 2001, 16(6) 409-410.
- [4] 李亚静, 王素婷, 李慧芳. 舒适护理理论的临床研究进展[J]. 护士进修杂志, 2004, 19(6) 498-499.
- LI Ya-jing, WANG Su-ting, LI Hui-fang. Progression on the clinical study of the theory of comfort care[J]. J Nurses Training, 2004, 19(6) 498-499.
- [5] 杨朝霞, 张江平, 梁云霞. 门诊口腔科患者舒适护理184例分析[J]. 中国误诊学杂志, 2008, 8(14) 3490-3491.
- YANG Zhao-xia, ZHANG Jiang-ping, LIANG Yun-xia. Analysis of comfort care for 184 oral out-patients[J]. Chin J Misdiagn, 2008, 8(14) 3490-3491.
- [6] 李宏存, 彭莲, 妥东哲. 舒适护理在口腔颌面外科门诊中的应用[J]. 解放军护理杂志, 2003, 20(4) 64-65.
- LI Hong-cun, PENG Lian, TUO Dong-zhe. Application of comfort care for out-patients of oral and maxillofacial department[J]. Nurs J Chin PLA, 2003, 20(4) 64-65.
- [7] 李灏来, 赵晓曦, 曾鸿斌, 等. 根管治疗术中根管充填的护理[J]. 华西口腔医学杂志, 2007, 25(2) 161-162.
- LI Hao-lai, ZHAO Xiao-xi, ZENG Hong-bin, et al. Nursing of canal obturation during root canal therapy[J]. West China J Stomatol, 2007, 25(2) 161-162.
- [8] 潘小兰, 黎燕红, 张超萍, 等. 浅谈如何构建和谐护患关系[J]. 国际医药卫生导报, 2006, 12(1) 69-71.
- PAN Xiao-lan, LI Yan-hong, ZHANG Chao-ping, et al. Discussion of building of a harmonious relationship between nurses and patients[J]. Int Medicine Health Guidance News, 2006, 12(1) : 69-71.
- (本文编辑 吴爱华)