文章编号:1000-5404(2005)09-0901-03

论著

单抗 Mab03.2C1C2 影响白念珠菌芽管形成及粘附作用的实验研究

唐 玮,王 鲁,唐书谦,钟白玉,叶庆俏 (第三军医大学西南医院皮肤科,重庆市皮肤性病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观察抗白念珠菌芽管单抗 Mab03.2C1C2 在体外对白念珠菌感染的保护性作用。**方法** 将不同浓度的 Mab03.2C1C2 分别与白念珠菌孢子悬液、白念珠菌孢子和人口腔粘膜上皮细胞混合液、白念珠菌孢子和胎儿脐静脉内皮细胞混合液共同孵育,观察 Mab03.2C1C2 对白念珠菌芽管生成的抑制作用及其对白念珠菌对上皮细胞、内皮细胞粘附的抑制作用。**结果** Mab03.2C1C2 能显著降低白念珠菌芽管生成率及在芽管形成条件下对上皮细胞、内皮细胞的粘附,其抑制作用与该单抗的浓度成正比。**结论** Mab03.2C1C2 在体外能抑制白念珠菌芽管的形成,通过抑制白念珠菌芽管的形成而抑制白念珠菌对上皮细胞、内皮细胞的粘附,降低白念珠菌的侵袭力。

关键词: 白念珠菌;芽管;单克隆抗体;保护性

中图法分类号: R379.4; R392.11; R756.5 **文献标识码:** A

Mab03.2C1C2 inhibits the germ tube formation and adhesion of *C. albicans*

TANG Wei, WANG Lu, TANG Shu-qian, ZHONG Bai-yu, YE Qing-yi (Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate protective effects of monoclonal antibody Mab03.2C1C2 specific against *C. albicans* germ tube. **Methods** The different concentrations of Mab03.2C1C2 was incubated with *C. albicans* spores, the mixed suspenion of *C. albicans* spores and human buccal epithelial cells, the mixed suspenion of *C. albicans* spores and endothelial cells of fetal umbilical vein. **Results** In the protective Mab screening experiment, it was found that Mab03.2C1C2 could inhibit *C. albicans* germ tube formation and adhesion of *C. albicans* to epithelial and endothelial cells. **Conclusion** Mab03.2C1C2 could inhibit the adhesion of *C. albicans* to the epithelial and endothelial cells and decrease the invasion of *C. albicans* due to its inhibition effects on the formation of *C. albicans* germ tube.

Key words: *Candida albicans*; germ tube; monoclonal antibody; protection

念珠菌是一种条件致病菌。目前念珠菌感染已跃居临床深部真菌感染的第1位,其中又以白念珠菌感染最为重要。近年来,已认识到体液免疫在抗念珠菌皮肤粘膜和系统性感染中均起重要作用[1,2]。为了深入理解体液免疫在抗念珠菌粘膜感染中的作用,在我科已制备出国内首株分泌抗白念珠菌芽管抗原单克隆抗体杂交瘤细胞株 03.2C1C2 的基础上,现拟通过白念珠菌芽管诱导抑制实验及粘附抑制实验初步探讨该抗体对白念珠菌粘膜感染的保护作用。

1 材料与方法

1.1 菌株

白念珠菌 ATCC-90028 标准株,第三军医大学军事预防医学院提供。

1.2 Mab03.2C1C2 腹水单抗的制备及纯化

参照文献[3]方法。应用饱和硫酸铵法纯化抗体。

1.3 抗白念珠菌芽管多克隆抗血清的制备

参考 Sundstrom 等[4]方法。

1.4 Mab03.2C1C2 抑制白念珠菌芽管诱导实验[5]

取白念珠菌孢子,完全 1640 培养液调整孢子浓度为 4×10^5/ml。将白念珠菌孢子悬液分为5组,每组9 990 μl,实验组加入 Mab03.2C1C2 单抗,最终浓度分别为 20、10、5 μg/ml (10 μl)。对照组加入抗白念珠菌芽管多克隆抗体,浓度 20 μg/ml (10 μl)。阴性对照组加入无菌 PBS (10 μl)。37 ℃孵育 3 h 后取样,高倍显微镜(×400)下计数 10 个视野,观察芽管生成率。芽管生成率 = [带芽管的孢子数目/(带芽管的孢子数目 + 孢子数目)] × 100%。

1.5 单抗抑制白念珠菌对上皮细胞的粘附实验[6]

选择健康成人,木质压舌板轻刮口腔左右颊粘膜,将刮取的上皮细胞用无菌 PBS 洗涤 4 次,调整细胞浓度为 1×10^5/ml,分5组,每组 500 μl,实验组加入 Mab03.2C1C2 单抗,最终浓度

作者简介:唐 玮(1970-),女,重庆市人,硕士研究生,主治医师,主要从事白念珠菌单克隆抗体方面的研究。电话:(023)68754491

通讯作者:王 鲁,电话:(023)68754491

收稿日期:2005-01-19;修回日期:2005-03-30

分别为20、10、5 μg/ml (100 μl)。对照组加入抗白念珠菌芽管多克隆抗体,浓度20 μg/ml (100 μl)。阴性对照组加入无菌PBS (100 μl)。白念珠菌孢子浓度调整为 5×10^6/ml,取400 μl与上述各组混合,37 ℃孵育2 h,无菌PBS洗涤2次,涂片,甲醇固定,革兰染色后高倍显微镜下(×400)下观察50个上皮细胞上粘附的孢子数目。

1.6 单抗抑制白念珠菌对内皮细胞的粘附实验[7]

取健康新生儿脐带,分离内皮细胞[8],完全1640培养液调整细胞浓度为 8×10^4/ml,加入经鼠尾胶原处理过的24孔培养板中,每孔2 ml,置于37 ℃ 5% CO_2 培养箱静置培养,常规换液,4 d后进行粘附抑制实验。实验分组同上皮细胞粘附抑制实验。白念珠菌孢子悬液浓度调整为 1×10^7/ml,与Mab03.2C1C2单抗、抗芽管多抗37 ℃共同孵育90 min。弃掉培养板中培养液,加入孢子与抗体悬液,置37 ℃ 2 h后无菌PBS洗涤3次,行革兰染色,在高倍显微镜下(×400)观察100个内皮细胞上粘附的孢子数目。

1.7 统计学处理

计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 10.0统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 单抗抑制白念珠菌芽管诱导实验

与阴性对照组相比,Mab03.2C1C2单抗各组均显著抑制白念珠菌芽管生成率($P < 0.01$),单抗各组间也有显著差异($P < 0.01$),抗体浓度越高,抑制芽管形成的作用越明显。单抗各组与多抗组相比也有显著差异($P < 0.01$),即单抗Mab03.2C1C2抑制白念珠菌芽管形成的作用明显强于抗白念珠菌多克隆抗体,而多抗组与阴性对照组间无显著统计学意义,即多克隆抗体不能抑制白念珠菌芽管的生成(表1)。

表1 白念珠菌芽管生成率

Tab 1 Percentage of germ tube formation of *C. albicans*

Group	n (visual field)	$\bar{x} \pm s$ (%)
Test group1 (20 μg/ml)	10	$47.69 \pm 7.155^{**\Delta\blacktriangle}$
Test group 2 (10 μg/ml)	10	$60.77 \pm 5.469^{**\Delta\blacktriangle}$
Test group 3 (5 μg/ml)	10	$70.65 \pm 9.964^{**\Delta\blacktriangle}$
Pab control (20 μg/ml)	10	89.74 ± 3.738
Control	10	91.52 ± 4.273

**: $F = 11.38$, $P < 0.01$; Δ: $P < 0.01$, *vs* control group; ▲: $P < 0.01$, *vs* pab control group

2.2 单抗抑制白念珠菌对上皮细胞的粘附实验

Mab03.2C1C2浓度为20 μg/ml时,单个上皮细胞粘附的孢子数目少于阴性对照组,两组间有统计学上的意义($P < 0.05$),提示该单抗在高浓度时有一定的抑制白念珠菌对上皮细胞的粘附作用。其余各组与阴性对照组间均无显著统计学意义(表2)。

2.3 单抗抑制白念珠菌对内皮细胞的粘附实验

Mab03.2C1C2单抗各组内皮细胞上粘附的孢子数目均明显少于多抗组及阴性对照组,单抗各组间也有显著差异。而多抗组与阴性对照组间无显著统计学意义(表3)。

表2 白念珠菌对上皮细胞的粘附

Tab 2 Adhesion of *C. albicans* to epithelial cells

Group	n (epithelial cells)	$\bar{x} \pm s$ e/a epithelial cell
Test group1 (20 μg/ml)	50	$15.92 \pm 2.863^{\#}$
Test group2 (10 μg/ml)	50	16.62 ± 2.305
Test group3 (5 μg/ml)	50	16.98 ± 2.705
Pab control (20 μg/ml)	50	16.68 ± 3.125
Control	50	17.48 ± 3.896

#: $P < 0.05$, *vs* control group

表3 白念珠菌对内皮细胞的粘附

Tab 3 Adhesion of *C. albicans* to endothelial cells

Group	n (times)	$\bar{x} \pm s$ e/100 endothelial cells
Test group 1 (20 μg/ml)	5	$41.0 \pm 2.33^{\#\Delta\blacktriangle}$
Test group2 (10 μg/ml)	5	$63.0 \pm 3.67b^{\#\Delta\blacktriangle}$
Test group3 (5 μg/ml)	5	$73.2 \pm 5.133^{\#\Delta\blacktriangle}$
Pab control (20 μg/ml)	5	97.4 ± 3.733
Control	5	100.8 ± 5.867

▲: $F = 41.79$, $P < 0.01$; Δ: $P < 0.01$, *vs* control group; #: $P < 0.01$, *vs* pab control group

3 讨论

白念珠菌为双相真菌,可以导致严重的系统性感染。其致病因素包括对宿主细胞的粘附、芽管形成、抗吞噬作用及分泌各种水解酶等,其中白念珠菌粘附到宿主细胞表面是其致病的首要条件。白念珠菌可以粘附于上皮细胞、血管内皮细胞等细胞表面及细胞外基质,其机制是念珠菌胞壁上的粘附素与宿主细胞表面及细胞外基质中的相应配体结合。目前认为粘附过程包括两个阶段:第一阶段由传统的粘附素将白念珠菌孢子暂时粘附到上皮细胞和内皮细胞上;第二阶段当宿主的防御功能减退时,白念珠菌即开始形成芽管,不可逆地附着于宿主细胞上[9]。在抗白念珠菌感染免疫中,抗体免疫的作用一直有争议。自20世纪80年代以来,不少实验显示一些抗白念珠菌单抗与系统性白念珠菌病的转归有密切关系。这些单抗确切的保护性机制还不太清楚,可能与抑制芽管形成、抑制粘附、中和与毒力相关的酶及直接杀白念珠菌等作用有关[10]。

我科运用细胞融合技术,成功制备出一株分泌抗白念珠菌芽管胞壁外膜抗原单克隆抗体杂交瘤细胞株03.2C1C2。IIF证实该株单抗能识别白念珠菌芽管胞壁外膜抗原,而不能识别孢子相抗原。经SDS-PAGE和Western blotting技术,Mab03.2C1C2单抗能识别芽管胞壁外膜抗原提取物中分子量分别为 156×10^3、48×10^3、22×10^3 和 12×10^3 的抗原成分。

我们将 Mab03.2C1C2 单抗运用于体外保护性实验研究，结果表明该单抗能显著降低白念珠菌芽管形成率，并且在芽管形成的条件下明显减少白念珠菌粘附于新生儿脐静脉内皮细胞上的孢子数目。随着单抗剂量的增加，芽管形成及粘附于内皮细胞上的孢子数目相应减少。但在单抗抑制白念珠菌对上皮细胞的粘附实验中显示，除了大剂量单抗组外，几乎没有抑制作用。目前认为白念珠菌由酵母相转变为菌丝相的过程由念珠菌体内基因转换系统控制，菌相转换时，伴随有菌体胞壁上蛋白及其他成分在质和量上的改变[11]。不少实验表明芽管能促进白念珠菌与上皮细胞及内皮细胞的粘附，在有利于芽管形成的条件下白念的粘附力增加[10,12]。在芽管形成过程中，其表面成分的改变也可能是粘附力增加的原因。若能有效地阻止芽管的形成，即有可能降低白念珠菌对宿主细胞的粘附。因此我们推测 Mab03.2C1C2 单抗可能通过抑制白念珠菌基因转换过程和芽管胞壁蛋白的合成而抑制芽管形成，通过抑制芽管形成和芽管中某些成分如粘附素的表达而降低白念珠菌的粘附力。在本实验中：单抗抑制白念珠菌孢子对上皮细胞的粘附实验时，单抗的抑制作用不明显。在抑制白念珠菌粘附内皮细胞的实验时，我们将白念珠菌孢子 37 ℃孵育 90 min 后即在利于芽管形成的条件下再行实验，单抗的粘附抑制作用就非常明显。此结果也支持我们的推测。当然具体机制还有待进一步研究。另外表明多抗在此实验中没有抑制作用，我们认为多抗成分复杂，既有抑制芽管形成的抗体，也有促进芽管形成的抗体存在。

通过以上实验，我们初步认识到 Mab03.2C1C2 单抗在体外能抑制白念珠菌芽管形成，减少白念珠菌对上皮细胞及内皮细胞的粘附，从而推测 Mab03.2C1C2 单抗能降低白念珠菌的侵袭力，具有一定抗白念珠菌毒力的作用。

参考文献：

[1] Polonelli L, Magliani W, Conti S, *et al*. Therapeutic activity of an engineered synthetic killer antiidiotypic antibody fragment against experimental mucosal and systemic candidiasis[J]. Infect Immunol, 2003, 77(11): 6205 - 6212.

[2] Mattews R, Burnie J. Antifungal antibodies: a new approach to the treatment of systemic candidiasis[J]. Curr Opin Investig Drugs, 2001, 2(4): 472 - 476.

[3] 徐志凯. 实用单克隆抗体技术[M]. 西安：陕西科学技术出版社，1992. 93 - 125.

[4] Sundstrom P M, Kenny G E. Characterization of antigens specific to the surface of germ tubes of Candida albicans by immunofluorescence[J]. Infect Immun, 1984, 43(3): 850 - 855.

[5] Moragues M D, Omaetxebarria M J, Elguezabal N, *et al*. A monoclonal antibody directed against a Candida albicans cell wall mannoprotein exerts three anti-C albicans activities[J]. Infect Immun, 2003, 71(9): 5273 - 5279.

[6] Ellepola A N, Panagoda G J, Samaranayake L P. Adhesion of oral Candida species to human buccal epithelial cells following brief exposure to nystatin [J]. Oral Microbiol Immunol, 1999, 14(6): 358 - 363.

[7] Klotz S A. Adherence of candida albicans to endothelial cells is inhibited by prostaglandin I2[J]. Infect Immun, 1994, 62(4): 1497 - 1500.

[8] 洪华山，吴　青，篮玉福，等. 人脐静脉内皮细胞的培养[J]. 福建医学院学报，1996, 30(1): 7 - 9.

[9] Sundstrom P. Adhesins in Candida albicans[J]. Curr Opin Microbiol, 1999, 2(4): 353 - 357.

[10] Lopez Ribot J L, Casanova M, Murgui A, *et al*. Antibody response to Candida albicans cell wall antigens[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2004, 41(3): 187 - 196.

[11] 石　婧，张　宏. 菌丝相和酵母相白念珠菌 ERG11 基因部分序列差异性的研究[J]. 中国现代医学杂志，2004, 14(1): 44 - 49.

[12] 刘晓红，廖万清，胡惠民，等. 白念珠菌与宿主细胞粘附机制的探讨[J]. 中华皮肤性病学杂志，1999, 13(2): 83 - 84.

（编辑　汪勤俭）

（上接 897 页）

及网状内皮系统的免疫增殖性反应，属良性病变，有恶性变可能。诊断有赖于病理。临床分为局灶性 CD 和全身性或中心性 CD。病理组织学分为透明血管型（HV 型）、浆细胞型（PC 型）、混合型（Mix 型）。局灶性 CD 中以 HV 型最多见，文献报道 HV 型占 90%，PC 型 10%。全身性 CD 大部分为 PC 型。此症多见于纵隔、肺门，其次为颈部，偶见于腹膜后，位于肾脏附近。由于本病起病隐袭，症状缺乏特异性，与某些疾病有相似处，早期易误诊为肺癌、淋巴瘤、结节病、肉芽肿等疾病。而且因肿大的淋巴结部位不同出现的压迫症状不同，加之影像学表现无特异性，也是引起误诊的原因，故术前确诊较为困难。本例患者先行 CT 引导下经皮肺穿刺活检术，术后病检结果提示为肉芽组织。而手术切除后病理诊断为巨大淋巴结增殖症。因此往往一次病理活检不能确诊，应反复多次不同部位送检，以期尽早明确诊断。CT 对诊断有一定帮助，但无特征性表现。关于治疗、目前尚无有效的、规范化治疗。对病变局限的可手术切除，术后放疗。病变广泛者可予全身化疗、抗白介素-6 治疗、骨髓移植、抗病毒和及强的松治疗。也有人用抗 CD20 单克隆抗体获得较好的临床缓解[2]。

关键词：巨大淋巴结增殖症；纵隔

中图法分类号：R733.4　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 阮美娟，祝善珠，潘文生，等. Castle man 病的临床探讨[J]. 中国临床医学，2001, 8(6): 653.

[2] 郑　文，勇威本，朱　军，等. Castle man 病一例[J]. 中华肿瘤杂志，2002, 24(6): 623.

（编辑　龙　亮）