DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.05.032

白色念珠菌粘附肠上皮细胞及 IgA对其作用的体外观察*

Study on the adhesion of *candida albicans* to IEC-6 and the effect of IgA on the adhesion *in vitro*

白晓东** 肖光夏 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所) 重庆, 400038
刘贤华 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室、复合伤研究所) 重庆, 400038

提 要 目的: 观察特异 IgA抑制白色念珠菌(白念菌)粘附的作用。方法: 首先建立肠上皮细胞 IEC-6在玻片表面生长模型; 将特异 IgA阳性肠粘液、阴性肠粘液以及抗 IgA血清中和后的肠粘液分别作用白念菌, 收集菌并与上述细胞共同孵育。计数粘附数, 并换算出抑制率。结果: 含有特异抗白念菌 IgA的肠粘液抑制白念菌优于其它肠粘液。结论: 特异 IgA在肠粘液中起重要的抗粘附作用。

白色念珠菌(白念菌)是常见的条件致病菌, 其肠源性感染是机会感染的主要方式[1]。本研究利用肠上皮细胞(Intestinal epithelial cell, IEC)体外培养观察不同性质的肠粘液(内含特异抗白念菌 IgA或缺如)对白念菌粘附的作用, 为利用 IgA抗体预防其机会感染提供依据。

1 材料和方法

1.1 肠上皮细胞培养及单层玻片生长模型建立

IEC-6细胞, 上海细胞所提供。常规传代后, 将细胞悬液调至 10^5/ml, 取 2 ml入内铺有玻片的玻璃平皿内, 37℃, 10% CO_2 培养至细胞贴壁并部分融合, 取出备用。

1.2 白色念珠菌

cmcc 44102, 标准株, 本所提供。在沙氏平板上 3次转种后, 洗菌并配成菌悬液, 浓度见后。

1.3 白念菌粘附肠上皮细胞观察

白念菌浓度为 8×10^6、8×10^5、8×10^4、8×10^3 cfu/ml, 各取 1 ml菌悬液离心收集菌, 1 ml细胞培养液重新悬浮后, 加入上述已长满细胞的玻片平皿中, 总体积 5 ml 37℃, 2 h, 取出玻片。用 PBS液冲洗玻片 10次, 洗去未粘附白念菌, 干燥固定后, 甲胺蓝染色, 封片。计数方法: 计数 1000个细胞中被白念菌粘附的阳性细胞数。共计数 5次, 计算平均数。

1.4 不同浓度肠粘液阻止粘附观察

正常 SPF小鼠(本校动物中心提供), 活杀取肠粘液, 用 PBS混匀, 5000 r/min, 5 min取上清, 浓度调至 2 mg/ml, 经 ELISA检测, 粘液未含特异抗白念菌 IgA型抗体。另外 10只 SPF小鼠, 经口喂入 1.5×10^9 cfu/ml× 0.5 ml白念菌, 14 d后活杀取肠粘液, 处理同前, 浓度调至 2 mg/ml, 经 ELISA检测, 其内含特异抗白念菌 IgA型抗体。粘液提取物样本过滤除菌后, 同做 1∶10、1∶100、1∶1000稀释。取 1 ml不同稀释度样品与 4.8×10^6白念菌在 37℃下孵育半小时, 离心收集菌。同"1.3"相同方式粘附肠上皮细胞, 计数粘附数。以单纯白念菌粘附为阳性对照。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{阳性对照} - \text{实验组}}{\text{阳性对照}} \times 100\%$$

取上述特异抗白念菌 IgA抗体阳性(N+ C)及阴性(N-)粘液提取物, 调蛋白浓度为 4 mg/ml, 过滤除菌。各分为二份: A: 0.5 ml(特异抗白念菌 IgA阳性)粘液提取物。B: 0.5 ml特异抗白念菌 IgA阳性粘液中加入终末为 1∶20的羊抗鼠 IgA抗血清(Sigma公司); C: 0.5 ml阴性粘液; D: 0.5 ml阴性粘液中加入终末为 1∶20的羊抗鼠 IgA抗血清(Sigma)。分别与 1.18×10^6白念菌孵育半小时, 37℃离心收集菌后, 同前方式粘附肠上皮细胞。计数粘附数。以单纯白念菌粘附做为阳性对照。

1.6 统计学方法

SPLM软件处理, $P<0.05$为相差显著。

2 结果

2.1 光镜观察

粘附以菌体粘附为主。光镜观察示白念菌粘附后可侵入胞内, 形成侵袭性感染, 周围有溶解性空斑。

2.2 不同浓度白念菌粘附结果

8×10^6、8×10^5、8×10^4、8×10^3 4个浓度下粘附数分别为 662±25、405±24、70±12、29±12 随着浓度下降, 粘附数明显下降。

2.3 不同浓度肠粘液提取物阻止粘附结果

含有特异 IgA的肠粘液抑制白念菌粘附效果优于不含特异 IgA的肠粘液, 见表 1。

2.4 不同性质肠粘液提取物阻止粘附结果

中和肠粘液中的 IgA后, 肠粘液抑制白念菌粘附的作用降低, 见表 2。

* 全军"九五"战创伤感染与免疫课题资助, No. 96L042
** 白晓东, 男, 30岁, 主治医师, 博士研究生

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 不同肠粘液阻止白念菌粘附结果

	N+ C			N			对照组
	1∶10	1∶100	1∶1000	1∶10	1∶100	1∶1000	
粘附数	57.80± 17.27	68.60± 12.75	97.00± 19.11	88.00± 26.54	66.40± 18.78	92.40± 34.39	312
粘附抑制率(%)	81	78	69	72	78	70	–

N+ C: SPF小鼠定植白念菌 14 d肠粘液; N: SPF小鼠肠粘液

表 2 中和 IgA后的肠粘液作用

	N+ C		N		对照组
	A	B	C	D	
粘附数	381.4± 146.08	167.60± 57.75△※	289.4± 45.77	485.00± 17.56	437
抑制率(%)	13	62	34	–	–

△: $P<0.05$与 A比较;※: $P<0.05$与 C D比较

3 讨论

白念菌粘附肠上皮细胞的数量与上皮细胞环境中的菌量密切相关[2],由此推论,一旦肠腔内发生菌群失调、白念菌大量增殖,必然导致粘附数量上升。肠腔表面 IgA抗体能起局部抑制粘附作用,并且具有一定的特异性[3]。本实验证实:含有特异抗白念菌 IgA抗体的粘液上清抑制能力高于普通粘液(未含特异 IgA)上清,并且随着粘液上清稀释,普通粘液上清抑制能力无变化,而含有特异 IgA的上清抑制能力下降,由此提示,特异 IgA在抑制白念菌粘附方面有可能起主要作用。为证实此点,将粘液中 IgA用抗血清中和,观察抗粘附能力变化,结果发现: IgA抗体的粘液上清,中和 IgA后,其抑制率由 62% 降至 13%。可见:① 抗白念菌 IgA抗体存在与否及稀释情况与粘液抑制白念菌粘附肠上皮能力有关,特异 IgA抗体可能起关键作用;② 未含特异抗白念菌 IgA抗体的粘液具有抑制白念菌粘附能力,主要与非特异抗粘附因素如粘蛋白等有关;③ 粘附发生率与环境中白念菌数量相关。

关键词 白色念珠菌;粘附; IgA
中图法分类号 R379.4; R392.11

参考文献

1 郭 力,张雅萍,肖光夏.烫伤及应用抗生素与肠道白念菌移位的实验研究.中华创伤杂志,1991,7(3): 198
2 郭宁如,吕桂霞,吴绍熙.念珠菌体外粘附上皮细胞的观察.中国医学科学院学报,1994,16(4): 312
3 Bos N A, Bun J C, Popma S H, *et al*. Monoclonal immunoglobulin A derived from peritional B cells is encoded by both germ line and somatically mutated V H genes, and is reactive with commensal bacteria. Infect Immun, 1996, 64(2): 616

(收稿: 1998-07-07;修回: 1999-03-18)
(编辑 王 红)

抗真菌药物对慢性阻塞性肺病继发真菌感染的疗效

The therapeutic effects of antifungal drugs on secondary saccharomycetic infection in COPD

段绪伟* 杨肇亨 张文俊 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所呼吸内科)重庆,400042

提 要 目的:应用氟康唑、酮康唑、咪康唑 3种药物对呼吸道真菌感染的疗效进行对照观察,探索防治继发性肺部真菌感染的有效药物和方法。方法:将患者分成 3组,各应用一种药物,每种药物治疗一疗程,观察其疗效。结果:氟康唑组真菌阴转率为 88.6%,酮康唑组真菌阴转率为 50%,咪康唑组真菌阴转率为 46%。结论:氟康唑疗效最佳,酮康唑次之,咪康唑居第 3位。

我院呼吸科从 1992年 1月至 1995年 5月共收治慢性阻塞性肺病(COPD) 726例,其中在患者呼吸道检出酵母样真菌 129例。其中 115例应用了抗真菌药物治疗,本研究就常规使用的 3种抗真菌药物氟康唑、咪康唑、酮康唑,对 COPD患者呼吸道真菌感染的疗效进行对照观察。旨在探索防治继发性肺部真菌感染的有效药物和方法,现总结分析如下。

1 对象与方法

1.1 一般资料

129例患者均系住院病人,男性 94例,女性 35例,男女之比为 2.7∶1,最小年龄 45岁,最大年龄 72岁,平均 62岁。

* 段绪伟,男,46岁,副主任医师,副教授

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net