

聚合酶链反应及染色法在口腔念珠菌 白斑诊断中的应用

陈小华, 林汉良, 程 斌, 李汝瑶

(中山医科大学口腔医学院口腔病理教研室, 广东 广州 510055)

摘要:【目的】探讨聚合酶链反应技术在检测口腔白斑中念珠菌感染的应用。【方法】应用组织化学染色法和聚合酶链反应技术对口腔白斑是否存在念珠菌进行检测。【结果】107例口腔白斑,经PAS和六胺银染色,16.8%(18/107)的口腔白斑检出念珠菌菌丝。念珠菌细胞色素P₄₅₀基因片段PCR检出率为10%(11/107),其中的白色念珠菌EO₃基因片段的PCR检出率为6.5%(7/107)。【结论】组织化学染色法能直观显示口腔白斑中念珠菌形态分布特点以及所引起的组织学改变,而PCR特异性强,可区分不同种属的念珠菌感染。

关键词: 念珠菌属; 口腔粘膜白斑病/诊断; 聚合酶链反应; 染色法

中图分类号: R781.31 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)04-0284-03

Application of the Polymerase Chain Reaction and Staining Methods for Diagnosis of Oral Candidal Leukoplakia

CHEN Xiao-hua, LIN Han-liang, CHENG Bin, LI Ru-yao

(Department of Oral Pathology, College of Stomatology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510055, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the application of the polymerase chain reaction (PCR) in diagnosis of oral candidal leukoplakia. 【Method】 The histochemical staining and polymerase chain reaction was used to detect oral leukoplakia. 【Results】 107 cases of oral leukoplakia were studied with PAS and silver stains, candida hyphae were found in 16.8% (18/107) of the cases. The detection rates of candida-cytochrome P₄₅₀ gene and *Candida albicans* EO₃ gene were 10% (11/107) and 6.5% (7/107) by PCR. 【Conclusion】 The shape and distribution of candida in oral leukoplakia can be directly observed through histochemical staining. PCR has high specificity, which can distinguish *Candida albicans* from other kinds of *Candida*.

Key words: *Candida albicans*; oral leukoplakia/diagnosis; polymerase chain reaction; staining

念珠菌(*Candida*)是口腔中最常见的条件致病真菌。自从 Jepsen 等 1965 年在口腔白斑上皮角化层中找到念珠菌菌丝以来,念珠菌与口腔白斑、口腔白斑癌变发生的关系引起了国内外学者的关注。但是由于常规 HE 染色切片,念珠菌着色不良或不着色,需要用组织化学特殊染色方法才能显示出来,这就造成了在口腔白斑的组织病理学诊断中对念珠菌感染的漏诊与忽视。近年来,聚合酶链反应技术(polymerase chain reaction, PCR)已被用于对

许多病原微生物的检测,但采用 PCR 反应技术检测组织蜡块的念珠菌,目前尚未见有关的报道。本文分别采用组织化学特殊染色法(PAS、六胺银法)和聚合酶链反应技术(PCR)对口腔白斑进行回顾性的检测,有助于提高对念珠菌感染的认识和诊断水平。

1 材料和方法

1.1 病例选择

收稿日期: 2000-03-20

基金项目: 中山医科大学科研基金资助项目(1994年度)

作者简介: 陈小华(1962-),女,广东普宁人,硕士,讲师。

从1988—1995年中山医科大学口腔病理教研室和1990~1995年孙逸仙纪念医院病理科存档的活检和手术取材的组织蜡块中挑选107例口腔白斑标本。标本经重做HE染色,根据WHO(1978)关于白斑的诊断标准,由两位工作5年以上的病理医师双盲法复查诊断,诊断结果相符者入选。

1.2 高碘酸—无色品红染色法(PAS染色法)

将5 μ m石蜡切片脱蜡至水,用5 g/L高碘氧化5~8 min,流水冲洗2 min,再用蒸馏水洗,入无色品红液于暗处并加盖作用10~20 min,5 g/L偏重亚硫酸钠滴洗2次,每次约1 min,流水冲洗5 min。Mayer苏木素复染数秒钟,常规脱水透明,中性树胶封固。念珠菌菌丝和孢子被染紫红色或红色,背景为蓝色。

1.3 六胺银染色方法

将5 μ m石蜡切片脱蜡至水,80 g/L铬酸水溶液氧化20 min,流水冲洗2 min,再用蒸馏水洗,5 g/L偏重亚硫酸钠液处理1 min,流水冲洗5 min,再用蒸馏水洗2次,入六胺银工作液于温箱(58 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C)60~90 min,至切片呈黄褐色,即在光镜下观察。控制染色,蒸馏水洗,用橙色G复染1~2 s,常规脱水透明,中性树胶封固。念珠菌菌丝和孢子呈明显的黑褐色,背景为橙黄色。

1.4 石蜡组织中念珠菌DNA提取

(1)将5~10片5~10 μ m厚的切片放入一个1.5 mL的Eppendorff管中。(2)管中加入1 mL二甲苯,脱蜡5 min,13 500 r/min,离心10 min,弃上清后重复一次。(3)加无水乙醇1 mL,13 500 r/min,离心10 min,弃上清后重复一次。(4)沉淀中加入100 mL胞壁消化液(0.5 g/L zymolyase, 2% β -巯基乙醇,1 mol/L sorbit, 0.1 mol/L EDTA),37 $^{\circ}$ C 30 min。(5)加入1 g/L SDS, 0.15 g/L蛋白酶K 37 $^{\circ}$ C消化5 min,煮沸5 min后致冷。(6)加入等体积酚/氯仿/异戊醇,轻颠倒5 min,13 500 r/min,离心10 min,吸取上层水相。(7)加入30 mL 3 mol/L醋酸钠混匀,再加入3倍体积冷乙醇离心10 min,沉淀用70%冷乙醇冲洗,风干沉淀。(8)加入20 mL TE液溶解,即为PCR扩增模板。

1.5 PCR扩增白色念珠菌P₄₅₀基因片段和白色念珠菌EO₃基因片段

1.5.1 主要试剂 Taq酶(Sigma)和PBR322/MSPI marker购自Sigma公司,引物1、2、3、4在上海复旦大学遗传所合成,序列为:

primer 1: 5'-CATAACTCAATATGCTATT-3';
primer 2: 5'-CTTTGACGATGATTCGA-3';
primer 3: 5'-CACCAACTCGACCAGTAGGC-3';
primer 4: 5'-CGGGTGGTCTATATTGAGAT-3'。

引物1、2扩增念珠菌P₄₅₀基因片段,引物3、4扩增白色念珠菌EO₃基因片段,白色念珠菌标准菌株DNA由南京皮肤病研究所提供。

1.5.2 方法 按20 μ L体积在500 μ L管中加入:10 \times 缓冲液2 μ L,2.5 mmol/L dNTP 2 μ L,P₄₅₀L_{1A}或EO₃一对引物(每一引物为1 μ L),靶DNA 2 μ L,灭菌双蒸水10 μ L,混匀,98 $^{\circ}$ C变性5 min,即置冰浴1~2 min,加入2 μ L Taq酶离心,加入20 μ L石蜡油。每次反应均设置阳性对照(加入白色念珠菌标准菌DNA 2 μ L)及阴性对照(加入灭菌双蒸水2 μ L)。按如下条件预设体外条件:变性94 $^{\circ}$ C 30 min,退火54 $^{\circ}$ C 30 min,延伸72 $^{\circ}$ C 120 min,最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min,计35个循环,4 $^{\circ}$ C终止反应,取10 μ L扩增液与1%溴酚兰混合点样,60 V电压电泳1 h,紫外灯下观察并照像。

扩增阳性结果应为:念珠菌P₄₅₀L_{1A}1基因扩增片段为243 bp,是位于PBR322/MSPI marker 309~240 bp之间的克隆带。白色念珠菌EO₃基因扩增片段为一位于PBR322/MSPI marker 217 bp以下的克隆带。

2 结 果

2.1 口腔白斑中念珠菌PAS和六胺银检测结果

选取107例口腔白斑,分别采用PAS和六胺银方法进行组织切片染色,PAS阳性标本可见紫红色菌丝或孢子侵入上皮角化层。六胺银阳性标本可见黑褐色菌丝或孢子侵入上皮角化层。两种方法皆检出18例口腔白斑念珠菌(16.8%,18/107)。

2.2 口腔白斑中念珠菌PCR检测结果

在提取组织中DNA后,用两对特异性引物分别扩增出念珠菌P₄₅₀基因上的243 bp片段(图1)和白色念珠菌EO₃基因上的125 bp片段(图2)。P₄₅₀基因有11例阳性(11/107,10.0%),EO₃基因有7例阳性(7/107,6.5%)。

3 讨 论

3.1 念珠菌在口腔白斑中的检出率及其意义



图1 念珠菌 P₄₅₀ 基因 PCR 扩增后电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis results of P₄₅₀ gene of oral candida albicans by PCR

M: Marker, A: positive control, B, C, D: negative samples, E, F, G: positive samples



图2 念珠菌 EO₃ 基因 PCR 扩增后电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis results of EO₃ gene of oral candida albicans by PCR

M: Marker, A: positive control, B, C: negative samples, D, E: positive samples

在白斑的病因学研究中, 口腔白斑与局部念珠菌感染的关系已引起国内外学者的重视^[1,2]。国外有学者报道口腔白斑中念珠菌感染率为 10.8%~65%不等。由于念珠菌在常规 HE 染色中一般不着色, 需要特殊染色方法才能显示出来, 这就容易造成在口腔白斑的组织病理学诊断中对念珠菌感染的漏诊与忽视。本研究对 107 例临床和病理上都诊断为白斑的石蜡标本重新作了 PAS 和六胺银染色观察, 结果在 107 例口腔白斑上中有 18 例可见念珠菌和孢子侵入到上皮表层中, 念珠菌的检出率为 16.8%, 提示部分口腔白斑与念珠菌感染有一定关系。

3.2 PCR 方法检测念珠菌感染的应用和意义

PCR 技术已被用于许多微生物病原体的检测^[3,5]。1990 年 Buchman 等^[4]率先选择白色念珠菌细胞色素 P₄₅₀L₁A₁ 基因作为体外扩增基因, 用于检测不同临床标本(尿、唾液、分泌物、血液和脑脊液)中的念珠菌。继 Buchman 后, 日本学者 Yozo 等^[6,7]选择白色念珠菌特异片段 EO₃ 内的一个 125 bp 短片段作为体外扩增基因, 结果表明, 只有白色念珠菌才出现 125 bp 扩增片段, 而不属于白色念珠菌的其他 7 种念珠菌无该扩增片段。传统的 PAS 和六胺银染色方法, 不能区分念珠菌的不同菌种。本研究通过用两对基因片段进行体外扩增, 能将白色念珠菌与其他念珠菌感染区分开来, 使我们对念珠菌感染的检测诊断水平提高到基因水平, 也

将为今后进一步探讨不同念珠菌的生物学行为和致病特点开辟一条新的途径。

参考文献:

- [1] 许国琪. 口腔癌前病变——白斑与扁平苔藓[M]. 北京: 中国医学科技出版, 1992. 60.
- [2] 郭宁如. 念珠菌和口腔白斑病菌[J]. 国外医学皮肤病学分册, 1991, 17(6): 336.
- [3] Syrjanen S M. Detection of human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions using in situ DNA-hybridization applied on paraffin sections[J]. Oral Surg, 1986, 63(2): 660.
- [4] Buchman T G, Rossier M, Merz W G, et al. Detection of surgical pathogens by in vitro DNA amplification. part 1. Rapid identification of *Candida albicans* by in vitro amplification of a fungus-specific gene [J]. Surgery, 1990, 108(2): 338.
- [5] 陈江汉. 聚合酶链式反应快速检测白色念珠菌[J]. 中华皮肤科杂志, 1993, 26(3): 204.
- [6] Yozo M, Mabuchi T, Kagaya K, et al. Isolation and characterization of a species-specific DNA fragment for detection of *Candida albicans* by polymerase chain reaction [J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(4): 894.
- [7] Yozo M, Mabuchi T, Fukazawa Y. New method for detection of *Candida albicans* in human blood by polymerase chain reaction[J]. Clin Microbiol, 1993, 31(12): 3344.

(编辑 刘清海)