

10.3779/j.issn.1009-3419.2005.01.13

• 临床研究 •

肺癌患者深部真菌感染主要病原菌的FCM 分析

胡晓军 万力 林元株

【摘要】 背景与目的 深部真菌感染是晚期肺癌患者的重要并发症和致死原因之一, 研究和分析肺癌患者深部真菌感染病原菌有助于早期诊断和治疗晚期肺癌患者深部真菌感染。本研究在细胞生物学水平对肺癌患者深部真菌感染的主要病原菌进行研究, 以探讨肺癌患者深部真菌感染发生发展过程中病原菌的变化及其与发病的关系。方法 采用流式细胞技术(FCM)对肺癌患者深部真菌感染的主要病原菌——白念珠菌和对照组白念珠菌细胞总 DNA 含量、增殖指数(PI)及细胞周期进行测量。结果 肺癌组与对照组稳定生长阶段的白念珠菌细胞大多数处于 G₀/G₁ 期。两组 G₀/G₁、G₂/M 期的细胞构成比和细胞总 DNA 含量均无显著性差异; 肺癌组 S 期细胞构成比和增殖指数均显著高于对照组(P=0.040, P=0.038)。结论 肺癌患者深部真菌感染主要病原菌——白念珠菌细胞 DNA 合成期比例增加, 增殖活性增强, 发生了致病力的变化。

【关键词】 肺肿瘤 深部真菌感染 白念珠菌 流式细胞术

【中图分类号】 R734.2

Analysis of main pathogen of deep fungal infection in patients with lung cancer by FCM H U X i a o j u n , W A N L i , L I N Y u a n z h u . *Dermatology Department, The Fourth Affiliated Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050011, P. R. China*

Corresponding author: H U X i a o j u n , E-mail: hxjlhl@126.com

【Abstract】 Background and objective Deep fungal infection is one of the important complications and causes of death in late stage patients with lung cancer, to explore and analyze the pathogen of deep fungal infection is helpful to early diagnose and treat deep fungal infection in patients with lung cancer. The aim of this study is to investigate the changes and pathogenicity of the main pathogen of deep fungal infection in patients with lung cancer. **Methods** Total DNA per cell, proliferation index (PI) and cell cycle of the main pathogen of deep fungal infection were analyzed in patients with lung cancer by FCM. **Results** Histograms of stationary growth phase *Candida albicans* isolates demonstrated that the majority of population of the fungus were at the G₀/G₁ phase of cell cycle. There was no significant difference in cell proportion of G₀/G₁, G₂/M phases and the total DNA content per cell of strains between the lung cancer and normal control groups. The cell proportion of S phase and PI in lung cancer group were remarkably higher than those in control group (P=0.040, P=0.038). **Conclusion** The cell proportion at DNA composition phase of the main pathogen—*Candida albicans* significantly increases, the proliferation activity gets strengthened and the pathogenicity changes in deep fungal infection of patients with lung cancer.

【Key words】 Lung neoplasms Deep fungus infection *Candida albicans* Flow cytometry

随着医学科学的发展, 肺癌诊疗技术不断进步, 患者生存时间不断延长, 深部真菌感染的机会也明显增多。感染一旦发生, 则导致病情更加严重、诊治不易, 对其临床研究的重要性日益明显^[1]。目前, 对肺癌患者深部真菌感染的研究主要集中在临床分析中的危险因素, 对病原菌株研究得较少, 且主要集中于其形态学表型分型。危险因素主要有患者年龄、肺癌分期、反复放疗化疗及不合理使用抗生素、激素和免疫抑制剂

等^[1-3]。现用流式细胞技术(flow cytometry, FCM)对肺癌患者深部真菌感染的主要病原菌在细胞生物学水平进行分析研究。

1 资料与方法

1.1 材料与仪器 选择有深部真菌感染临床表现并经微生物学检查或治疗排除了其它微生物感染的肺癌患者, 采集和处理临床标本并进行真菌的镜检、培养及鉴定, 得到病例菌株 23 株, 为肺癌患者深部真菌感染的主要病原真菌, 来源于 2002 年 3 月~2003 年 12 月河北医科大学第四医院化疗科 放疗科 胸外科的住院

患者及皮肤科、内窥镜室、内外科的门诊患者;对照菌株 32 株,来源于健康人员的口腔。两组菌株均为白念珠菌。采用 FACS420 型流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 单细胞悬液的制备 将实验菌株接种于沙氏培养基上,37℃培养 7 天,挑取适量菌落用 4 ml 生理盐水洗两次,固定液(4% 甲醛 4 ml, 0.1 mol/L PBS 96 ml)4 ml 固定 7 天。生理盐水反复冲洗后,用 300 目铜网过滤,500~800 r/min,离心 2 min,弃上清液。

1.2.2 DNA 染色 取 1×10^5 的单细胞悬液 0.1 ml,鸡血红细胞作内参标准,与样品同步染色,加入溴化乙啶(EB)1 ml(EB 2 mg, RNA 酶 2 mg, 枸橼酸钠 200 ml, 生理盐水 130 ml, 双蒸水 70 ml, Triton X100 2 ml),在 4℃冰箱染色 30 min。

1.2.3 流式细胞仪检测条件及参数 流式细胞仪激光光源为 2 W 氩离子激光器,输出功率 300 mW,激发波长 488 nm,进行单参数检测。DNA 检测以线性方式采集数据,输入 HP-Consort 30 计算机进行处理并打印出结果。检测前以鸡血红细胞作为标准样品调整仪器 CV 值在 5% 以内。

1.2.4 DNA 含量及增殖指数(PI)的计算方法

$$\text{DNA 总含量} = \frac{\text{检测细胞的 } G_0/G_1 \text{ 均值}}{\text{鸡红细胞的 } G_0/G_1 \text{ 均值}} \times 2.3 \text{ pg}$$

(2.3 pg 为每个鸡红细胞的 DNA 含量)

$$\text{PI} = \frac{S + G_2/M}{G_0/G_1 + S + G_2/M} \times 100\%$$

1.2.5 统计学处理 结果采用 SPSS10.0 统计软件进行 *t* 检验和 *t'* 检验。

2 结果

两组处于稳定生长阶段的白念珠菌细胞大多数处于 G_0/G_1 期,肺癌组和对照组 G_0/G_1 期的平均细胞构成为 77.08% 和 79.25%,两组间无显著性差异($t = 2.012, P = 0.054$);两组 G_2/M 期的平均细胞构成为 5.84% 和 6.06%,两组间无显著性差异($t = 0.570, P = 0.573$);两组 S 期的平均细胞构成为 16.78% 和 14.80%,肺癌组显著高于对照组($t = 2.150, P = 0.040$)。肺癌组细胞总 DNA 含量平均为 2.01 pg,对照组平均为 1.97 pg,两组间无显著性差异($t = 1.234, P = 0.227$);两组平均 PI 为 23.32% 和 20.75%,肺癌组显著高于对照组($t' = 2.183, P = 0.038$)。

3 讨论

FCM 是以流式细胞仪为工具来完成细胞等生物粒子理化特性研究的先进技术 它集激光技术,计算机

技术、电子物理技术、流体力学、细胞生物化学技术于一身,重要特点是可以在单细胞水平上对大量单个细胞进行快速、准确、多参数的定量分析及分选。FCM 很适合对大数量真菌细胞逐个进行快速多参数精确测量,检测同一生长阶段的白念珠菌可以真实地反映该阶段的 DNA 含量^[4]。王文莉等^[5]曾用 FCM 检测了 8 株念珠菌的 DNA 周期,结果表明稳定生长阶段的细胞绝大多数处于 G_0/G_1 期,且稳定生长阶段的总 DNA 含量有明显的种间和种内差异。本研究 FCM 的分析结果显示,两组稳定生长阶段的白念珠菌细胞绝大多数处于 G_0/G_1 期,两组细胞在 G_0/G_1 、 G_2/M 期的构成比差异没有统计学意义($P > 0.05$),不能认为这两组细胞数量有差别。两组 S 期细胞构成比比较有统计学意义($P < 0.05$),肺癌组 DNA 合成期细胞明显多于对照组,说明进入 DNA 合成期的细胞数量多、菌丝和孢子的数量也多,发生了致病力的变化。两组细胞的总 DNA 含量比较亦无统计学意义($P > 0.05$),不能认为病例组的总 DNA 含量高于对照组,说明两组白念珠菌系相同种属的菌株。PI 反映细胞增殖活性的高低,两组 PI 比较有统计学意义($P < 0.05$),肺癌组高于对照组,说明其增殖活性高,这与进入 DNA 合成期的细胞多、菌丝和孢子的数量多、发生了致病力改变相一致。因此,肺癌患者深部真菌感染主要在于危险因素,病原菌株可能只是在危险因素的作用下,发生了形态和致病力的变化。

参 考 文 献

- Zhang CP, Fan YS, Li X, et al. Investigation about causes of nosocomial fungal infection in patients with lung cancer. J Xinxiang Med College, 2002, 19(5): 416-417. [张彩平, 范迎胜, 李新, 等. 肺癌患者医院真菌感染原因调查分析. 新乡医学院学报, 2002, 19(5): 416-417.]
- Liu Z, Li ZY. Causes and countermeasures of deep fungal infection in old patients with lung cancer. Chin J Nosocomiol, 2002, 12(1): 46-47. [刘政, 李占燕. 老年支气管肺癌伴深部真菌感染的原因与对策. 中华医院感染学杂志, 2002, 12(1): 46-47.]
- Wang WW, Lin XL. Analyses about causes of fungal infection in 38 cases of lung cancer in hospital. Chin J Nosocomiol, 2000, 10(5): 343-345. [王文伟, 林欣莉. 肺癌并医院真菌感染 38 例原因分析. 中华医院感染学杂志, 2000, 10(5): 343-345.]
- Zuo LF eds. Flow cytometry and biomedicine. Shenyang: Scientific and Technical Publication in Liaoning, 1996. 8. [左连富主编. 流式细胞术与生物医学. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1996. 8.]
- Wang WL, Gao SQ, Gao JG, et al. Flow cytometric analysis of total DNA per cell in Candida species. Acta Mycologica Sinica, 1995, 14(1): 64-68. [王文莉, 高顺强, 高建国, 等. 几种念珠菌 DNA 总量的流式细胞分析. 真菌学报, 1995, 14(1): 64-68.]

(收稿: 2004-07-23 修回: 2004-10-09)

(本文编辑 李蓓兰)