

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2017.08.004

· 基础研究 ·

## 氯化钙浓度对念珠菌溶血活性的影响

万蕾<sup>1</sup>, 卢海滨<sup>1</sup>, 罗刚<sup>2</sup>

1. 南方医科大学口腔医院牙周种植科, 广东 广州(510280); 2. 广州医科大学附属口腔医院·广州口腔疾病研究所·口腔医学重点实验室, 广东 广州(510280)

**【摘要】** 目的 通过将固定浓度的念珠菌悬液分别滴加到含有不同浓度CaCl<sub>2</sub>的羊血培养基上培养, 观察念珠菌溶血活性的差异, 评估CaCl<sub>2</sub>对念珠菌溶血活性的影响。**方法** 选择25株念珠菌, 其中包括21株临床分离株和4株标准株, 配制4个不同浓度CaCl<sub>2</sub>的羊血培养基, 分别为0%、0.5%、1%和2.5% (g/mL), 于37℃、5%体积分数CO<sub>2</sub>培养。观察24 h、48 h、72 h的溶血反应并拍照、记录。**结果** 念珠菌在不同浓度CaCl<sub>2</sub>的羊血培养基中的溶血指数存在差异, 差异具有统计学意义( $F = 24.929, P < 0.001$ )。其中不含CaCl<sub>2</sub>的溶血指数为 $2.749 \pm 0.103$ , 含0.5%、1%和2.5%依次为 $2.247 \pm 0.079$ 、 $2.013 \pm 0.092$ 和 $2.150 \pm 0.066$ 。**结论** 不同浓度的CaCl<sub>2</sub>会影响羊血培养基上念珠菌的溶血活性。

**【关键词】** 念珠菌; 毒力因素; 溶血活性; 电解质; 氯化钙

**【中图分类号】** R781.5 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2017)08-0494-04

**【引用著录格式】** 万蕾, 卢海滨, 罗刚. 氯化钙浓度对念珠菌溶血活性的影响[J]. 口腔疾病防治, 2017, 25(8): 494-497.

**Influence of concentrations of CaCl<sub>2</sub> on hemolytic activity of candida strains** WAN Lei<sup>1</sup>, LU Haibin<sup>1</sup>, LUO Gang<sup>2</sup>. 1. Department of Periodontology and Implantology, Stomatological Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China; 2. Key Laboratory of Oral Medicine, Guangzhou Institute of Oral Disease, Stomatology Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510140, China

Corresponding author: LU Haibin, Email: luhaibin-007@163.com, Tel: 0086-20-34314299

**【Abstract】 Objective** To investigate the influence of different concentrations of CaCl<sub>2</sub> on the hemolytic activity of candida strains. **Methods** A total of 25 candida strains were selected, including 21 candida strains recovered from clinical specimens, and 4 reference strains of *C. albicans* (ATCC 90028) (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA), *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. krusei* (ATCC 6258), and *C. tropicalis* (ATCC 13803) respectively. CaCl<sub>2</sub> was added at concentrations of 0%, 0.5%, 1% and 2.5 g % (wt/vol). Plates were cultured at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 24-72 h, and the hemolytic index (Hi) was analyzed. **Results** Comparisons of the hemolytic indices among the groups treated with 0.5% CaCl<sub>2</sub> (Hi = 2.247 ± 0.079), 1% CaCl<sub>2</sub> (Hi = 2.013 ± 0.092), 2.5% CaCl<sub>2</sub> (Hi = 2.150 ± 0.066) and the control (Hi = 2.749 ± 0.103) reached statistical significance ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** CaCl<sub>2</sub> may produce a decrease activity in the hemolysis of candida species.

**【Key words】** Candida species; Virulence factors; Hemolytic activity; Electrolytes; CaCl<sub>2</sub>

在过去的30年里,人类真菌感染的发病率显著增加<sup>[1]</sup>,念珠菌属是人类真菌感染中最常见的。

30%~70%健康人的口腔中存在念珠菌。导致念珠菌致病的原因很多,主要有环境因素、念珠菌本身的毒力因素和宿主对疾病易感性等。多数学者认为主要包括胞外和胞内两种毒力因素。胞外毒力因素包括黏附性能、表型转换和形态发生等。胞内的毒力因素有磷脂酶、分泌型天冬氨酸蛋白酶、溶血素、酸性代谢产物等<sup>[2]</sup>。

**【收稿日期】** 2017-04-05; **【修回日期】** 2017-05-02

**【基金项目】** 广东省自然科学基金(2014A030310146);广东省医学科学技术研究基金(A2016241)。

**【作者简介】** 万蕾, 医师, 博士, Email: 907981250@qq.com

**【通信作者】** 卢海滨, 主治医师, 博士, Email: luhaibin-007@163.com

致病微生物能够利用血红素和血红蛋白做为铁来源从而在宿主体内生长。念珠菌通过降解血红蛋白,从宿主细胞中获得铁元素。因此,血红蛋白是病原微生物生存和持久存在于宿主体内的重要毒力因素<sup>[3-5]</sup>。虽然溶血素是公认的毒力因子,有助于念珠菌的传播和菌丝的侵入<sup>[6]</sup>,促进念珠菌的致病力,但是哪些因素能影响念珠菌的溶血活性目前还不完全清楚<sup>[7]</sup>。以往的研究并没有关注常见的电解质是否会影响念珠菌的溶血活性,因此需要更多的研究来丰富相关知识。本研究通过将固定浓度的念珠菌菌悬液逐一滴加到添加不同浓度CaCl<sub>2</sub>的羊血培养基上,观察念珠菌溶血活性的差异,计算念珠菌的溶血指数,评估不同浓度CaCl<sub>2</sub>对念珠菌溶血活性的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株 从广州市第八人民医院已确诊的HIV感染者的唾液中分离念珠菌菌株,共21株。4株标准株由香港大学牙医学院赠送,分别为白色念珠菌ATCC(American Type Culture Collection,美国菌种保藏中心)90028、光滑念珠菌ATCC 90030、热带念珠菌ATCC 13803和克柔念珠菌ATCC 6258。所有菌株经沙保氏葡萄糖培养基培养,经科玛嘉显色培养基培养鉴定,并通过念珠菌API 20C AUX鉴定系统进一步分类,然后用无菌水-79℃冻存储备用。本实验使用的念珠菌菌株,均已通过伦理委员会审核,且在本课题组以往的研究中<sup>[8]</sup>曾被使用。

1.1.2 试剂与仪器 沙保氏葡萄糖培养基(Sabouraud dextrose agar, SDA),羊血培养基(7 mL新鲜羊血添加到100 mL含3%葡萄糖的沙保氏葡萄糖培养基中,pH值为 $5.6 \pm 0.2$ ),含0.5%、1.0%、2.5%(g/mL)CaCl<sub>2</sub>的羊血培养基(上述培养基均由广州市迪景微生物科技有限公司制作),比浊仪(Vitecorimeter Model DR100; bioMerieux, France),二氧化碳恒温培养箱(BB5060/BB16, Heraeus, Germany),BHC-1000 II A/B3生物安全柜(Sanyo, Japan),细胞计数板(上海求精生化试剂仪器厂),显微镜及照相系统(Olympus, Japan),Image-Pro Plus 6.0软件。

### 1.2 方法

1.2.1 菌株复苏 将-79℃冻存的念珠菌菌株,分

别放入37℃的水浴箱中,待2 min左右菌株完全溶解后分别接种到SDA培养基上,37℃培养24~48 h。所有的菌种至少传代3次以上才应用于后续实验中,以确保菌种的活性。

1.2.2 制备菌悬液 用接种环挑取SDA上的念珠菌菌落,用无菌水制备成菌悬液,用细胞计数板计数并调整浓度至 $1 \times 10^8$ /mL。

1.2.3 测定溶血活性 将10 μL菌悬液分别滴加于含有不同浓度CaCl<sub>2</sub>的羊血培养基上,37℃、5%体质分数CO<sub>2</sub>培养。观察24 h、48 h、72 h的溶血反应并拍照、记录。所有的培养基在同一位置同一高度上拍照。在透射光下观察,可见溶血阳性的菌株菌落的最外围有一圈透明的、与菌落同圆心的溶血环,采用Image-Pro Plus 6.0软件测定菌落直径和总直径,并计算完全溶血指数:完全溶血指数=总直径/菌落直径,总直径=菌落直径+透明溶血环直径。此外,菌落与菌落最外围之间存在一个深色的溶血环,采用Image-Pro Plus 6.0软件测定菌落直径和内部深色溶血环直径,并计算部分溶血指数:部分溶血指数=内部深色溶血环直径/菌落直径。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件对各项结果进行统计分析。比较念珠菌在不同浓度CaCl<sub>2</sub>条件下溶血指数之间是否存在差异,采用重复测量的方差分析。与对照组相比,念珠菌在不同浓度CaCl<sub>2</sub>条件下溶血指数的变化程度之间是否存在差异,采用完全随机设计资料的方差分析,若方差不齐,则采用秩和检验。所有数据采用均数±标准差表示。检验水准 $\alpha = 0.05$ ,当 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

实验过程中观察发现培养24 h后,所有念珠菌菌落的周围只能观察到深色的溶血环。而培养48 h后可以看到溶血环变大,呈双层溶血环的现象,它不仅包括一个完全透明的溶血环,还包括一个深色溶血环。继续培养至72 h可见部分菌株溶血环的边界甚至变得有些模糊,因此为了测量溶血环的直径,获得定量的数据以便统一比较,我们最终采用48 h的溶血结果。

采用重复测量的方差分析对实验数据进行统计学处理,并用LSD法对不同浓度间多重比较以分析实验结果(表1)。

表1 念珠菌在不同浓度CaCl<sub>2</sub>的羊血培养基上溶血指数的统计结果

Tabel 1 Statistical analysis of the hemolytic index of *candida* species at different concentrations of CaCl<sub>2</sub> ( $\bar{x} \pm s, n = 25$ )

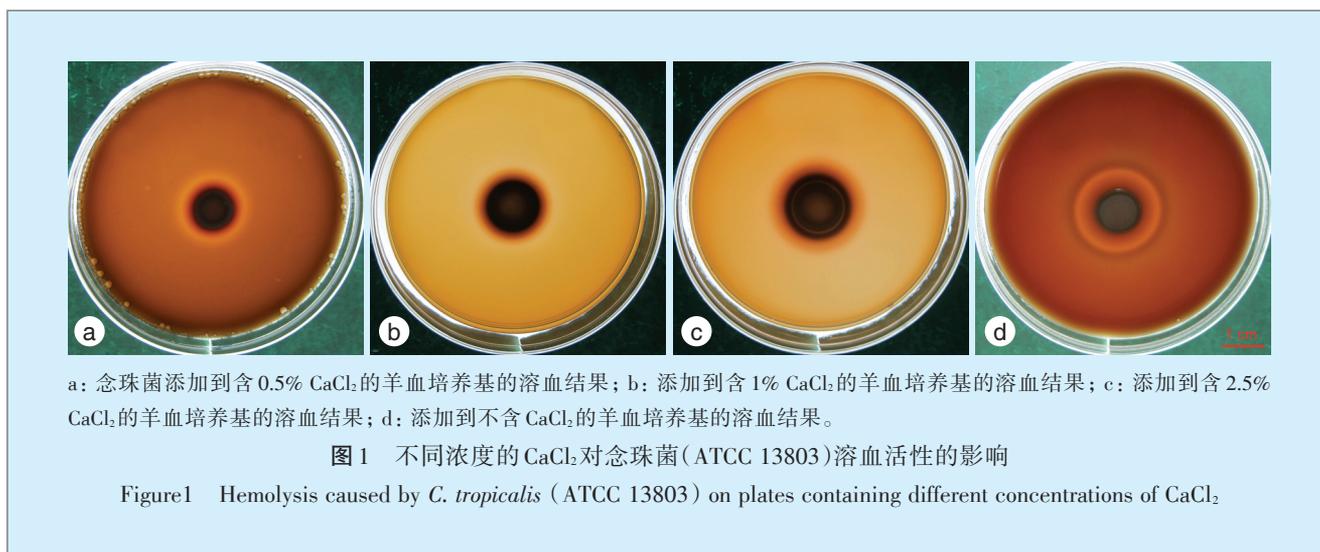
分组	完全溶血指数	部分溶血指数
0% CaCl <sub>2</sub>	2.749 ± 0.103	1.694 ± 0.366
0.5% CaCl <sub>2</sub>	2.247 ± 0.079 <sup>1)</sup>	1.676 ± 0.330
1% CaCl <sub>2</sub>	2.013 ± 0.092 <sup>1)</sup>	1.588 ± 0.342
2.5% CaCl <sub>2</sub>	2.150 ± 0.066 <sup>1)</sup>	
F值	24.929	1.064
P值	< 0.001	0.370

注 1)表示P < 0.001, vs 对照组。

结果显示念珠菌在3个不同浓度CaCl<sub>2</sub>的羊血培养基和不含CaCl<sub>2</sub>的培养基这4组完全溶血指数的结果存在差异,差异有统计学意义(F = 24.929, P < 0.001)。而且念珠菌在不含CaCl<sub>2</sub>组的完全溶血指数与其他3个不同浓度CaCl<sub>2</sub>组的完全溶血指数之间都存在差异,差异均具有统计学意义(P < 0.01)。典型图片如图1。

### 3 讨论

以往的研究表明,2.5% CaCl<sub>2</sub>会影响念珠菌的



溶血活性,当添加2.5% CaCl<sub>2</sub>之后,白色念珠菌的溶血活性升高而都柏林念珠菌的溶血活性却降低<sup>[9]</sup>。当CaCl<sub>2</sub>缺失时,不同的念珠菌溶血活性存在差异。因此我们针对CaCl<sub>2</sub>设计3个不同浓度,分别是1%、2.5%和5%。而在制备5% CaCl<sub>2</sub>培养基时发现培养基始终不能凝固,达不到培养基制备的要求。尽管尝试了多种方法,包括适当提高琼脂浓度,增加制备时的温度等,都达不到实验要求。因此将CaCl<sub>2</sub>浓度调整为0.5%, 1%和2.5%。

在研究CaCl<sub>2</sub>影响念珠菌溶血活性的相关实验开始之前,我们已经对所有的念珠菌进行了两次溶血活性检测,结果显示所有的念珠菌均为溶血阳性。添加了CaCl<sub>2</sub>之后,实验中的念珠菌虽然仍是溶血阳性,但溶血活性都较未添加CaCl<sub>2</sub>组降低。影响念珠菌溶血活性的因素很多,包括:温度<sup>[10]</sup>、葡萄糖<sup>[11]</sup>、某些离子如Fe<sup>3+</sup><sup>[12]</sup>、某些化合物(乙醇、正丁醇、正戊醇蒸气)<sup>[13]</sup>、血液的种类<sup>[14]</sup>。Franca<sup>[15]</sup>通过比较从同一部位提取的不同种类的念珠菌溶血活性,发现从血液中分离所得的热带念珠

菌溶血活性最高。然而,比较不同部位来源的念珠菌溶血活性时,发现从气道分泌物中提取的近平滑念珠菌的溶血活性最高。此外,培养基的不同批次、培养基的厚度、菌株复苏后活力的恢复情况等也可能影响念珠菌的溶血活性。

以上是影响念珠菌溶血活性的相关因素,然而有些因素可能对念珠菌的溶血活性并没有明显的影响。Favero<sup>[16]</sup>的研究表明热带念珠菌的培养条件对其溶血活性没有影响,不管是在普通的环境下培养还是提高CO<sub>2</sub>浓度,其溶血活性不会改变。另外,不管是采用加热至100℃的方式还是通过添加胃酶抑素A的方法都不能影响热带念珠菌的溶血活性。但是对于beta溶血活性的链球菌而言,培养环境对溶血活性有一定的影响。CO<sub>2</sub>浓度增高,达到5%~10%时溶血活性最佳<sup>[17]</sup>。因此CO<sub>2</sub>可能以某种特别的方式影响念珠菌的溶血行为。

电解质的相对平衡对机体的健康和功能起着非常重要的作用。电解质紊乱在心血管病的患者<sup>[18]</sup>,免疫功能低下的个体<sup>[19]</sup>和糖尿病人群<sup>[20]</sup>中非常常

见。另外,恶性肿瘤的患者一般也常伴有电解质异常,包括高钙血症等<sup>[21]</sup>。由于电解质紊乱非常复杂,体外难以完全模拟体内的微环境。但是在体表的局部环境下,如口腔黏膜、阴道黏膜等,电解质含量更容易受到外源性物质的影响,如:食物、药物、冲洗液等。使用含有碳酸氢钙的牙膏可能有助于预防口腔黏膜的念珠菌病,使用添加某种电解质的冲洗液可能有助于预防或治疗阴道念珠菌。机体局部环境中某种电解质的水平升高对定殖在其表面的念珠菌溶血活性有没有影响目前不得而知。通过本实验发现:与对照组相比,CaCl<sub>2</sub>组的溶血活性均下降,但是CaCl<sub>2</sub>组3个不同浓度之间的下降程度没有统计学差异。

目前关于离子对念珠菌溶血活性影响的研究并不多,正畸矫治器释放的Fe<sup>3+</sup><sup>[12]</sup>可能降低念珠菌的溶血活性。以往的研究表明Ca<sup>2+</sup>能够抑制人乳铁蛋白的杀菌效果<sup>[22]</sup>,但抑制念珠菌溶血活性的原因尚不清楚<sup>[23]</sup>。以往有研究显示细胞外阳离子的浓度会影响乳铁蛋白的杀菌效果<sup>[24]</sup>,并认为是通过人乳铁蛋白与白色念珠菌的细胞膜接触来发挥抗菌作用<sup>[25]</sup>。本结果显示CaCl<sub>2</sub>会影响念珠菌的溶血活性,但是具体机制有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Lass-Flörl C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe[J]. *Mycoses*, 2009, 52(3): 197-205.
- [2] Schaller M, Borelli C, Korting HC, et al. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*[J]. *Mycoses*, 2005, 48(6): 365-377.
- [3] Manns JM, Mosser DM, Buckley HR. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*[J]. *Infect Immun*, 1994, 62(11): 5154-5156.
- [4] Watanabe T, Takano M, Murakami M, et al. Characterization of a hemolytic factor from *Candida albicans*[J]. *Microbiology*, 1999, 145 ( Pt 3): 689-694.
- [5] Luo G, Samaranayake LP, Cheung BP, et al. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of HLP gene expression in *Candida glabrata* and its possible role in *in vitro* haemolysin production[J]. *APMIS*, 2004, 112(4-5): 283-290.
- [6] Odds FC. *Candida* and *Candidiasis*[M] 1988.
- [7] Silva S, Negri M, Henriques M, et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2012, 36(2): 288-305.
- [8] 董俊英, 徐平平, 罗刚, 等. HIV感染者口腔白色念珠菌磷脂酶活性的体外研究[J]. *广东牙病防治*, 2010, 18(4): 191-194.
- [9] Linares CE, de Loreto ES, Silveira CP, et al. Enzymatic and hemolytic activities of *Candida dubliniensis* strains[J]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 2007, 49(4): 203-206.
- [10] Tanaka WT, Nakao N, Mikami T, et al. Hemoglobin is utilized by *Candida albicans* in the hyphal form but not yeast form[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 232(2): 350-353.
- [11] Luo G, Samaranayake LP, Yau JY. *Candida* species exhibit differential *in vitro* hemolytic activities[J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(8): 2971-2974.
- [12] Ronsani MM, Mores RA, Meira TM, et al. Virulence modulation of *Candida albicans* biofilms by metal ions commonly released from orthodontic devices[J]. *Microb Pathog*, 2011, 51(6): 421-425.
- [13] Shuster A, Oshero N, Rosenberg M. Alcohol-mediated haemolysis in yeast[J]. *Yeast*, 2004, 21(16): 1335-1342.
- [14] Yigit N, Aktas E. Comparison of the efficacy of different blood medium in determining the hemolytic activity of *Candida* species[J]. *Journal De Mycologie Médicale*, 2009(19): 110-115.
- [15] Franca EJ, Furlaneto-Maia L, Quesada RM, et al. Haemolytic and proteinase activities in clinical isolates of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* with reference to the isolation anatomic site [J]. *Mycoses*, 2011, 54(4): e44-e51.
- [16] Favero D, Franca E J, Furlaneto-Maia L, et al. Production of haemolytic factor by clinical isolates of *Candida tropicalis*[J]. *Mycoses*, 2011, 54(6): e816-e820.
- [17] Ruoff KL. *Manual of Clinical Microbiology*[Z]. Washington, DC: 1995:299-305.
- [18] Hinkle C. Electrolyte disorders in the cardiac patient[J]. *Crit Care Nurs Clin North Am*, 2011, 23(4): 635-643.
- [19] Liamis G, Rodenburg EM, Hofman A, et al. Electrolyte disorders in community subjects: prevalence and risk factors[J]. *Am J Med*, 2013, 126(3): 256-263.
- [20] Sotirakopoulos N, Kalogiannidou I, Tersi M, et al. Acid-base and electrolyte disorders in patients with diabetes mellitus[J]. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 2012, 23(1): 58-62.
- [21] Rosner MH, Dalkin AC. Electrolyte disorders associated with cancer[J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2014, 21(1): 7-17.
- [22] Ellison RR, Laforce FM, Giehl TJ, et al. Lactoferrin and transferrin damage of the gram-negative outer membrane is modulated by Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>[J]. *J Gen Microbiol*, 1990, 136(7): 1437-1446.
- [23] Bennett RM, Bagby GC, Davis J. Calcium-dependent polymerization of lactoferrin[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1981, 101(1): 88-95.
- [24] Viejo-Diaz M, Andres MT, Perez-Gil J, et al. Potassium efflux induced by a new lactoferrin-derived peptide mimicking the effect of native human lactoferrin on the bacterial cytoplasmic membrane [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2003, 68(2): 217-227.
- [25] Viejo-Diaz M, Andres MT, Fierro JF. Modulation of *in vitro* fungicidal activity of human lactoferrin against *Candida albicans* by extracellular cation concentration and target cell metabolic activity [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(4): 1242-1248.

(编辑 罗燕鸿, 钟德钰)