

聚合酶链反应快速诊断酿酒工人浅部真菌病的实验研究

Rapid diagnosis on superficial mycosis with PCR technique in wine-makers

颜丹¹, 王强², 李燎¹, 李成文³, 胡朝惠¹YAN Dan¹, WANG Qiang², LI Liao¹, LI Cheng-wen³, HU Chao-hui¹

(1. 泸州医学院附属医院皮肤科, 四川 泸州 646000; 2. 95439 部队卫生队, 四川 泸州 646000; 3. 泸州医学院微生物教研室, 四川 泸州 646000)

摘要: 为探讨聚合酶链反应(PCR)法诊断酿酒工人浅部真菌病的意义, 采用蛋白酶消化法和煮沸法处理临床标本, 提取真菌DNA后进行PCR扩增检测, 并与培养法对比。收集的191例标本经PCR法检出阳性者173例(占90.58%), 培养法检出阳性者162例(占84.82%)。研究表明, PCR法具有快速、简便、敏感性和特异性高等特点, 可用于职业性浅部真菌病的检测和诊断。

关键词: 聚合酶链反应; 酿酒工人; 浅部真菌病

中图分类号: R756 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2007)02-0115-02

川南地区酿酒业发达, 酿酒工人数量庞大, 由于工作环境的温度、湿度和酸碱度都很适合真菌的生长和繁殖, 酿酒工人易患浅部真菌病。传统的诊断真菌病的方法主要依据直接镜检和培养, 前者操作简便、快捷, 但在不同的实验室阳性率差异较大, 且不能鉴定菌种; 后者能鉴定菌种, 准确率较高, 但耗时、操作过程复杂。为此, 我们将基因扩增检验技术应用于酿酒工人浅部真菌病临床标本的直接检测, 希望能寻求到一种快捷、简便、敏感性和特异性高的诊断职业性浅部真菌病的方法。

1 材料与与方法

1.1 病例选择

2005年11月至2006年6月, 选择川南地区5家名酒企业临床上疑为感染浅部真菌病的酿酒工人191名, 男性166名, 女性25名, 年龄17~46岁, 平均27.5岁。其中体癣患者55例, 股癣48例, 手足癣63例, 甲癣23例, 头癣2例。

1.2 方法

1.2.1 以培养法为金标准, 对检测对象采用培养法和PCR法两种方法进行诊断, 以观察PCR法与培养法检测结果的差异。

1.2.2 试剂 dNTP、Taq酶、10×PCR缓冲液、ddH₂O购自华美公司; 通用引物ITS1由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.3 标本处理 取材前先用75%乙醇消毒局部, 然后刮取病变活动部位的皮屑或甲屑, 头癣则取病发。所得标本分为

两部分, 一部分用于培养, 另一部分置于无菌微量离心管中备DNA提取。

1.2.4 真菌的培养 将患浅部真菌病酿酒工人皮损处皮屑、甲屑或病发接种于含氯霉素和放线菌酮的沙氏培养基上, 25℃培养2周。根据菌落形态、结构、颜色、边缘、生长速度、繁殖程度、下沉现象和显微镜下形态进行鉴定。

1.3 PCR检测

1.3.1 DNA的制备 按参考文献[1]的方法提取DNA。将所取病变处的标本放入1.5 ml离心管内, 加400 μl缓冲液(75 mmol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA, 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0); 再加入100 μl 0.01 g/L溶菌酶, 室温放置2 h; 然后加入50 μl 10%十二烷基硫酸钠(SDS)、5 μl 10 g/L的蛋白酶K, 于55℃孵育3 h, 其间多次摇荡离心管, 其后加入200 μl 5 mol/L NaCl, 750 μl 氯仿, 振荡混匀10 min; 10 000 r/min离心10 min; 将上清液移至另一1.5 ml离心管, 加入750 μl预冷的异丙醇, 振荡混匀, 12 000 r/min离心30 min, 倾去管内液体, 加入预冷的70%乙醇500 μl洗涤1次, 室温放置, 乙醇挥发; 加入100 μl TE缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)溶解DNA, 4℃储存备用。

1.3.2 PCR检测 PCR反应体系共25 μl: dNTP(2.5 mmol/L) 2 μl, Taq酶(2U/μl) 1 μl, 10×PCR缓冲液2.5 μl, ddH₂O 2.5 μl, 引物ITS区的ITS1(18SF1.5'-AGGTTTCCTAGGGAACCT-3'; 5.8SR1.5'-TTCGCTGCGTTCTTCATCGA-3')各0.30 μmol/L, 模板DNA样品16 μl。PCR反应条件: 94℃变性5 min, 94℃1 min, 16℃45 s, 72℃90 s, 3个循环, 72℃延伸10 min, 94℃30 s, 36℃45 s, 72℃90 s, 32个循环。取15 μl扩增后的样品置于5%琼脂糖凝胶上, 60 V电压电泳2~3 h, 在紫外灯下分析观察。

1.4 统计学方法

临床资料采用 χ^2 检验。

2 结果

从所取标本中提取DNA, 用真菌通用引物ITS区的ITS1作PCR扩增, PCR扩出300~400 bp的DNA条带为阳性, 否则为阴性。检测的结果显示, 191名临床上疑为浅部真菌病酿酒工人中, 真菌检出阳性者173例, 占90.58%, 检出真菌菌种为红色毛癣菌、须毛癣菌、犬小孢子菌和絮状表皮菌。用培养法检测真菌阳性者162例, 占84.82%; 检出真菌菌种为红色毛癣菌、须毛癣菌和犬小孢子菌。PCR法与培养法的真菌阳性检出结果相比较, 差异无统计学意义($\chi^2=2.857$, $P>$

收稿日期: 2006-10-13; 修回日期: 2007-01-10

基金项目: 四川泸州医学院科研资助项目(No. 499)

作者简介: 颜丹(1959-), 男, 高级实验师, 从事皮肤病学的临床、科研与教学研究。

0.05), 两法的符合率为 0.817。PCR 法的灵敏度为 0.926 特异性为 0.207, 假阴性为 0.074, 假阳性为 0.793。

3 讨论

自 1985 年 Mallis 首创 PCR 以来, 该技术在分子生物学的各个领域展现出了广阔的前景。刘洁等^[3]将 PCR-RFLP 用于甲真菌病的快速诊断, 其敏感性高于镜检和培养, 特异性也较好。林俊萍等^[3]首次采用聚合酶链反应检测角化型手癣的真菌 DNA, 收到良好效果, 指出 PCR 可用于角化型手癣的临床诊断。冯义国等^[4]应用 PCR 建立鉴定真菌菌型的方法, 扩增产物电泳分析发现不同菌种间产生的 DNA 带型存在明显差异, 说明 PCR 用于真菌鉴定比较可靠、稳定。

本研究通过对 191 名临床诊断为浅部真菌病的酿酒工人所感染的真菌进行 PCR 法和培养法的检测, PCR 法检出的阳性率为 90.58%, 培养法检出的阳性率为 84.82%, 两种方法真菌的检出率差别不大, 检出的真菌菌种也基本相同。PCR 检测的优点主要是大大缩短了真菌检测的时间, 从标本收集到最终诊断仅需要 12 h, 且不依赖活菌体、生长状态及生化和形态学表型, 与传统的形态学方法即真菌培养比较, 较易操作, 而且敏感性高, 可以检测少量 DNA, 且可明确菌种。由于皮肤癣菌的基因型是稳定不变的, 其核苷酸组成和序列长度在同种内存在保守性, 在种间又有着高度特异性^[5], 因此从 DNA 水平分类和鉴定可以克服表型多变造成的鉴定困难^[7]。然而 PCR 检测的关键问题是避免假阳性, 提高特异性和敏感性。首先, 要避免环境中真菌的污染, 取材时要迅速将标本放在有盖的无菌试管或其他容器中, 同时也要注意防止在实验操作过程中的污染。用培养法检测真菌, 是皮肤科

一种传统的诊断和鉴定真菌的方法, 因此法具有准确可靠的优点, 现仍然广泛应用于浅部和深部真菌的诊断和鉴定, 但其培养的时间长, 需要约半个月的时间, 且其操作过程较复杂, 因此寻求更好的诊断方法成为医务工作者的努力方向。

我国川南地区酿酒业生产规模大、从业工人较多, 酿酒工人患浅部真菌病的发病率较高^[7]。生产环境的温度偏高、湿度大, 工人劳动强度大, 出汗多, 是其高发病率的原因之一。用 PCR 法快速检测酿酒工人所患浅部真菌病, 及时进行诊治, 有利于降低酿酒工人浅部真菌病的发病率。

参考文献:

- [1] Liu D, Coloe S, Baird R, et al. Molecular determination of dermatophyte fungi using the arbitrarily primed polymerase chain reaction [J]. Br J Dermatol, 1997, 137: 351-355.
- [2] 刘洁, 雷鹏程, 应建明, 等. PCR-RFLP 用于甲真菌病病原菌诊断和鉴别 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2001, 15 (6): 264-267.
- [3] 林俊萍, 王雅坤, 白兆震, 等. 聚合酶链反应检测角化型手癣的病原菌 DNA [J]. 中国皮肤性病学杂志, 1999, 13 (3): 178-179.
- [4] 冯义国, 肖生祥, 谭升顺, 等. 应用 AP-PCR 进行真菌菌型鉴定的方法建立 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2000, 14 (3): 157-158.
- [5] Leclerc M C, Philippe H, Gueho E. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons [J]. J Med Vet Mycol, 1994, 32: 331-341.
- [6] Jackson J, Barton C, Evans E, et al. Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal DNA intergenic spacer regions [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37: 931-936.
- [7] 颜丹, 李焯, 陈德宇. 酿酒工人感染皮肤癣菌的现状与对策 [J]. 中国临床康复, 2006, 10 (24): 27-29.

六价铬对人胚肺细胞的毒性及绿茶对其拮抗作用的研究

Study on cytotoxicity of Cr(VI) in HEL cells and the antagonism of green tea

寇琰^{1,2}, 刘桂刚², 于素芳^{1*}, 傅玉芹³, 高雷³, 张春玲¹, 易超¹, 李国珍¹, 安丽红¹, 刘国庆¹

KOU Yan^{1,2}, LIU Gui-gang², YU Su-fang^{1*}, FU Yu-qin³, GAO Lei³, ZHANG Chun-ling¹, YI Chao¹, LI Guo-zhen¹,

AN Li-hong¹, LIU Guo-qing¹

(1. 山东大学劳动卫生与环境卫生学研究所, 山东 济南 250012; 2. 山东省卫生厅卫生监督所, 山东 济南 250011; 3. 山东大学第二医院, 山东 济南 250033)

摘要: 采用 RT-PCR 技术检测细胞内 p53 及 bcl-2 基因的改变, 以观察六价铬 [Cr(VI)] 对人胚肺细胞 (HEL) 内癌基因和抑癌基因的影响及绿茶对其的拮抗作用。结果显示, 不同浓度的 Cr(VI) 溶液和绿茶浸泡液处理 HEL 细胞 24 h 后, 5 μmol/L 及 10 μmol/L Cr(VI) 单独处理组细胞内 p53 mRNA 和 bcl-2 mRNA 含量显著高于阴性对照组 (P < 0.05)。绿茶浸泡液处理组与 Cr(VI) 单独处理组相比, 细胞内 p53 mRNA 和 bcl-2

mRNA 含量降低 (P < 0.05)。提示六价铬可引起 p53 及 bcl-2 mRNA 水平升高, 绿茶浸泡液可以降低其表达水平。

关键词: 六价铬; 人胚肺细胞; p53; bcl-2; 绿茶

中图分类号: O612.6 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2007)02-0116-03

六价铬 [Cr(VI), hexavalent chromium] 在工业上应用极广, 已被国际癌症研究机构 (IARC) 证实是一种强致癌剂, 可导致职业性肺癌^[1], 但其致癌机制还不是很明确。p53 基因是迄今发现与人类肿瘤相关性最高的抑癌基因, bcl-2 是研究最早的与凋亡有关的基因。有关 Cr(VI) 对于人胚肺细胞 (HEL) 内癌基因及抑癌基因改变的报道较少, 故我们采用 RT-PCR 技术

收稿日期: 2006-07-03; 修回日期: 2006-12-01

基金项目: 山东省自然科学基金 (Y2000C18); 山东省卫生厅资助项目 (99CAICAA13)

作者简介: 寇琰 (1978-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 工业分子毒理学。

*: 通讯作者, 副教授, 硕士生导师。