

马拉色菌蛋白酶、脂酶活性的研究

研究生：曾蔚

导师：贾文祥

目的 检测不同来源马拉色菌菌株的蛋白酶、脂酶活性，比较临床株和正常皮肤分离株酶活性的差异，并研究酶活性与其致病性的关系。方法 从花斑癣患者、包皮龟头炎患者和肾移植患者腹股沟脓肿分离鉴定马拉色菌临床株；从患者正常皮肤及健康人皮肤分离鉴定马拉色菌正常皮肤分离株。使用全脂牛奶平板法、BSA 平板法检测马拉色菌 7 株标准株、33 株糠秕马拉色菌、12 株合轴马拉色菌、4 株钝形马拉色菌临床分离株和 28 株糠秕马拉色菌正常皮肤分离株的蛋白酶活性，并检测有关温度、pH 值和蛋白酶抑制剂对蛋白酶活性的影响。使用对硝基苯丙酸酯作为脂酶特异性底物，检测 33 株糠秕马拉色菌临床株和 28 株正常皮肤分离株的脂酶活性。选择蛋白酶、脂酶活性不同的 3 株菌通过静脉内注射方式感染免疫抑制小鼠，以小鼠死亡率和平均生存时间作为评价菌株毒力的指标。结果 7 株马拉色菌标准株均被检出蛋白酶活性；糠秕马拉色菌临床分离株蛋白酶、脂酶活性均高于正常皮肤分离株 ($P<0.01$)；蛋白酶活性在 32℃、pH5.5 条件下表达最高，EDTA 能抑制蛋白酶活性。动物试验表明蛋白酶、脂酶活性愈高的菌株，相应小鼠死亡率愈高，平均生存时间愈短。结论 非嗜脂性和嗜脂性的 7 株马拉色菌标准株均具有蛋白酶活性；全脂牛奶平板

法是一项简便、可靠的测定马拉色菌蛋白酶活性的方法；糠秕马拉色菌临床分离株的蛋白酶、脂酶活性高于正常皮肤分离株；蛋白酶、脂酶的活性与菌株的致病性相关。

【关键词】 马拉色菌 蛋白酶 脂酶 致病性

Study on The Proteinase and Lipase Activity of *Malassezia*

Postgraduate ZENG Wei ,

Tutor JIA Wenxiang

Objective To study the proteinase and lipase activity of *Malassezia* strains isolated from various specimens , furthermore research the relationship between the proteinase, lipase activity and pathogenicity.

Methods Totally 7 standard strains of *Malassezia spp*, 33 of *M.furfur* , 12 of *M.sympodialis*, 4 of *M.obtusa* isolated from clinical specimens and 28 of *M.furfur* isolated from healthy person were cultured on the whole-fat-cow's-milk plate and BSA plate at 32°C for 14 days respectively to test their proteinase activities. The effect of temperature, pH and proteinase inhibitor on this assay was also evaluated. *P*-nitrophenylpalmitate was used as lipase substrate to detect the lipase activity of 33 strains of *M.furfur* isolated from clinical specimens and 28 of *M.furfur* isolated from normal person. The mortality rate and average survival time of immune-comprised mice injected with three isolates of different proteinase, lipase activities was observed to determine the pathogenicity. **Results** Activity of proteinase with different levels showed in the 7 species of *Malassezia* . There was significant difference of proteinase, lipase activity between the *M.furfur* isolated from clinical

specimens and normal person ($P<0.01$). The optimal temperature and pH for expressing the proteinase activity are 32°C and pH5.5 respectively. The proteinase activity could be inhibited by EDTA. Animal experiment showed that the higher proteinase, lipase activity was associated with the higher mortality rate and shorter average survival time. **Conclusion** All the 7 species of *Malassezia* showed activity of proteinase with different levels. It's the simple and reliable method to detect the activity of proteinase by the way of whole-fat-cow's-milk plate method in the lipophilic yeast of *Malassezia*. The proteinase, lipase activity of *M.furfur* isolated from clinical samples were higher than that of which isolated from normal person. It seems that the proteinase and lipase activity may correlate with the virulence.

Key words *Malassezia* Proteinase Lipase Pathogenicity

部分专业英语单词:

Malassezia: 马拉色菌

M. furfur: 糜秕马拉色菌

M. pachdermatis: 厚皮马拉色菌

M. sympodialis: 合轴马拉色菌

M. sloofiae: 斯洛菲马拉色菌

M. obtusa: 钝形马拉色菌

M. globosa: 球形马拉色菌

M. restricta: 限制性马拉色菌

Proteinase: 蛋白酶

Lipase: 脂酶

P-nitrophenylpalmitate: 对硝基苯榈酸酯

Balanoposthitis: 包皮龟头炎

Pityriasis versicolor: 花斑癣

Abscess of groin: 腹股沟脓肿

马拉色菌蛋白酶、脂酶活性的研究

前言

马拉色菌 (*Malassezia*) 是人类和温血动物皮肤的常驻菌群, 亦是一种条件致病真菌。根据生理生化和分子生物学特性, 马拉色菌分为 7 个种^[1], 分别为厚皮马拉色菌 (*M. pachdermatis*)、合轴马拉色菌 (*M. sympodialis*)、糠秕马拉色菌 (*M. furfur*)、斯洛菲马拉色菌 (*M. sloofiae*)、钝形马拉色菌 (*M. obtusa*)、球形马拉色菌 (*M. globosa*) 和限制性马拉色菌 (*M. restricta*)。除厚皮马拉色菌外, 其余 6 种均为嗜脂性酵母菌。马拉色菌相关皮肤病 (MASD) 有花斑癣、马拉色菌毛囊炎、脂溢性皮炎、特应性皮炎、银屑病等疾病^[2, 3], 可分为二型: 一型是以马拉色菌高密度粘附在皮肤角质层细胞上为特点, 如花斑癣、马拉色菌毛囊炎; 另一型以低密度的粘附伴炎症反应为特点, 如脂溢性皮炎、特应性皮炎^[4]。

马拉色菌在皮肤角质层细胞上的粘附能力与菌体所分泌的侵袭性酶密切相关, Coutinho^[5]等已采用平板法测得马拉色菌属中非嗜脂性的厚皮马拉色菌能分泌蛋白酶。近年的研究表明真菌的蛋白酶参与真菌对表皮的侵袭和粘附过程, 与致病性相关^[6]。但目前尚不清楚马拉色菌属中其他 6 种嗜脂性的马拉色菌, 如糠秕马拉色菌、合轴马拉色菌等是否也能产生蛋白酶; 也不清楚马拉色菌的蛋白酶是否与致病性相关。

马拉色菌在皮肤上粘附引起炎症反应的能力也与脂酶有关, 已有的研究表明糠秕马拉色菌的脂酶能分解三酰甘油成游离脂肪酸为菌体生长

提供能量，对糠秕马拉色菌的生长起关键作用^[7]；脂酶活性升高也有利于马拉色菌由酵母相向菌丝相转化，使该菌从寄生性向致病性转变^[8]，在花斑癣、包皮龟头炎等患者皮损区的鳞屑中我们可观察到大量的马拉色菌菌丝体。

为进一步明确马拉色菌蛋白酶、脂酶的生物学特性及其致病性，本实验从以下方面进行研究：

- 1、从花斑癣患者、包皮龟头炎患者和肾移植患者腹股沟脓肿分离鉴定马拉色菌临床株，从患者正常皮肤及健康人皮肤上分离鉴定马拉色菌正常皮肤分离株。
- 2、改进测定蛋白酶活性的方法，使用全脂牛奶平板法、BSA 平板法检测马拉色菌 7 株标准株、33 株糠秕马拉色菌、12 株合轴马拉色菌、4 株钝形马拉色菌临床分离株和 28 株糠秕马拉色菌正常皮肤分离株的蛋白酶活性，并检测温度、pH 值和蛋白酶抑制剂对蛋白酶活性的影响。
- 3、使用对硝基苯榈酸酯为脂酶特异性底物检测 33 株糠秕马拉色菌临床株和 28 株正常皮肤分离株的脂酶活性。
- 4、选择蛋白酶、脂酶活性不同的 3 株菌采用静脉内注射方式感染免疫抑制小鼠进行毒力实验，以小鼠死亡率和平均生存时间来评价菌株毒力。

第一部分 马拉色菌菌种的分离鉴定 材料与方法

(一) 培养基:

- 1、沙保培养基: 质量分数为 1%蛋白胨, 4%葡萄糖, 2%琼脂, 0.05%氯霉素, 0.05%放线菌酮。
- 2、菜子油培养基: 质量分数为 1%蛋白胨, 4%葡萄糖, 0.01%酵母浸膏, 1.8%琼脂, 0.25%单硬脂酸甘油酯, 1%吐温-80, 2%菜子油, 0.05%氯霉素, 0.05%放线菌酮。
- 5、七叶苷培养基: 含菜子油的培养基中加入 0.1%七叶苷和 0.2%枸橼酸铁。

(二) 标准菌株

- 1、合轴马拉色菌 (*M.sympodialis* CBS 7222)
- 2、糠秕马拉色菌 (*M.furfur* CBS 1878)
- 3、钝形马拉色菌 (*M.obtusa* CBS 7868)
- 4、斯洛菲马拉色菌 (*M.slooffiae* CBS 7956)
- 5、球形马拉色菌 (*M.globosa* CBS 7966)
- 6、限制性马拉色菌 (*M.restricta* CBS 7877)
- 7、厚皮马拉色菌 (*M.pachydermatis* CBS 1872)

由四川大学华西医院皮肤性病科冉玉平教授提供。

(三) 临床分离株和正常皮肤分离株的采集、分离与鉴定

- 1、临床分离株采集对象为 2001 年 6 月至 2002 年 5 月在四川大学华西医院皮肤性病科临床诊断为花斑癣、包皮龟头炎的患者, 以及一例肾移植术后腹股沟脓肿患者。

纳入标准：

- ① 典型的临床表现；
- ② 皮损区皮屑直接镜检菌丝及孢子阳性；
- ③ 2 周内局部未使用过抗真菌制剂；
- ④ 1 月内未服用过抗真菌药物。

2、正常皮肤分离株采集对象为：

- ① 临床患者的非皮损区；
- ② 华西基础医学与法医学院微生物学教研室的教师和研究生，无毛囊炎、脂溢性皮炎等马拉色菌相关性疾病。

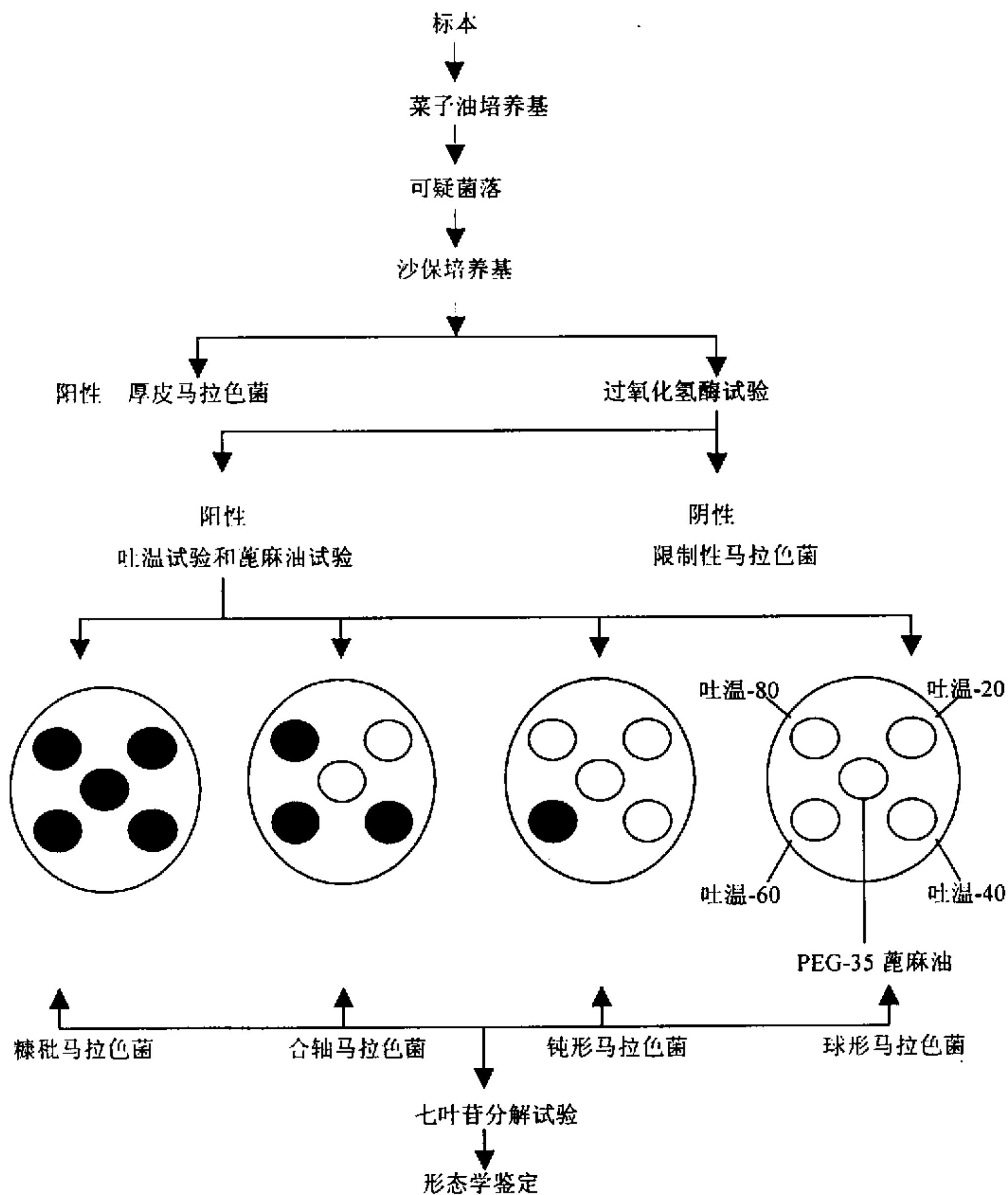
3、标本的采集区域：

- ① 临床患者的皮损区；
- ② 非皮损区采集额、胸、背部区域。

4、采集方法：采用胶带粘贴法^[9]，使用高压蒸汽灭菌的一次性微孔透气胶带（3M 中国有限公司），粘贴于取材部位，每个部位粘贴约 1-2 分钟后，无菌平镊取下，分别贴于沙保培养基和含菜子油培养基上培养，观察 3-4 周，待菌落长出后挑选不同形态的菌落，经 50% 派克墨水-10% KOH 染色后置镜下观察，确定为马拉色菌后，转种菜子油培养基平板，进行生化鉴定。肾移植术后腹股沟脓肿患者采集病灶中脓液及坏死组织，用平板划线法分离马拉色菌菌株。

5、菌种鉴定：采用 Guillot 报告的对该菌形态学和生理生化特性的鉴定方法进行鉴定。鉴定的过程见图 1。

图 1 马拉色菌属分类鉴定流程图



[1] 过氧化氢酶试验：分别挑取以上菌株一环涂在载玻片上，滴加 3% 过氧化氢一滴观察，有气泡生成为阳性。

[2] 吐温和蓖麻油试验：将以上菌株分别与沙保培养基混合，制成浓度为 $10^6/ml$ 的含菌基，用打孔器在含菌平板上无菌打孔 5 个，顺时针方向分别加入 100% 吐温-20、100% 吐温-40、100% 吐温-60、100% 吐温-80 和 100%PEG35 蓖麻油各 $10\mu l$ ，置 32°C 孵育 7~14d，观察菌落生长情况。在 5 种脂源周围都生长的为糠秕马拉色菌；在 100% 吐温-40、100% 吐温-60、100% 吐温-80 周围生长而在 100% 吐温-20 和 100% PEG35 蓖麻油周围不生长的为合轴马拉色菌；在 100% 吐温-60 周围生长而在其余 4 种脂源周围不生长的为钝形马拉色菌。（照片 1、2、3）

[3] 七叶昔试验：将分离出的菌株分别加入七叶昔培养基中， 32°C 孵育 72 小时后观察结果。

[4] 形态学鉴定：挑选不同形态的单个菌落，经 50% 派克墨水-10%KOH 染色后置镜下观察形态。（照片 4、5、6）

以上试验均以马拉色菌标准菌株为对照，选取形态典型，生化反应符合的菌株为试验研究的菌株。马拉色菌属 7 个种的形态学及生理生化特征见表 1。

结 果

（一）菌种鉴定结果：

1、从患者皮损处分离鉴定出糠秕马拉色菌 33 株、合轴马拉色菌 12 株和钝形马拉色菌 4 株，患者正常皮肤和正常人皮肤上分离鉴定出糠秕马拉色菌 28 株。

2、过氧化氢酶试验结果：滴加 3% 过氧化氢一滴后观察，有气泡生成为阳性，可能为糠秕马拉色菌、合轴马拉色菌、钝形马拉色菌和球形马拉色菌。

[2] 吐温和蓖麻油试验：将以上菌株分别与沙保培养基混合，制成浓度为 $10^6/ml$ 的含菌基，用打孔器在含菌平板上无菌打孔5个，顺时针方向分别加入100%吐温-20、100%吐温-40、100%吐温-60、100%吐温-80和100%PEG35蓖麻油各 $10\mu l$ ，置32℃孵育7~14d，观察菌落生长情况。在5种脂源周围都生长的为糠秕马拉色菌；在100%吐温-40、100%吐温-60、100%吐温-80周围生长而在100%吐温-20和100%PEG35蓖麻油周围不生长的为合轴马拉色菌；在100%吐温-60周围生长而在其余4种脂源周围不生长的为钝形马拉色菌。（照片1、2、3）

[3] 七叶昔试验：将分离出的菌株分别加入七叶昔培养基中，32℃孵育72小时后观察结果。

[4] 形态学鉴定：挑选不同形态的单个菌落，经50%派克墨水-10%KOH染色后置镜下观察形态。（照片4、5、6）

以上试验均以马拉色菌标准菌株为对照，选取形态典型，生化反应符合的菌株为试验研究的菌株。马拉色菌属7个种的形态学及生理生化特征见表1。

结 果

（一）菌种鉴定结果：

1、从患者皮损处分离鉴定出糠秕马拉色菌33株、合轴马拉色菌12株和钝形马拉色菌4株，患者正常皮肤和正常人皮肤上分离鉴定出糠秕马拉色菌28株。

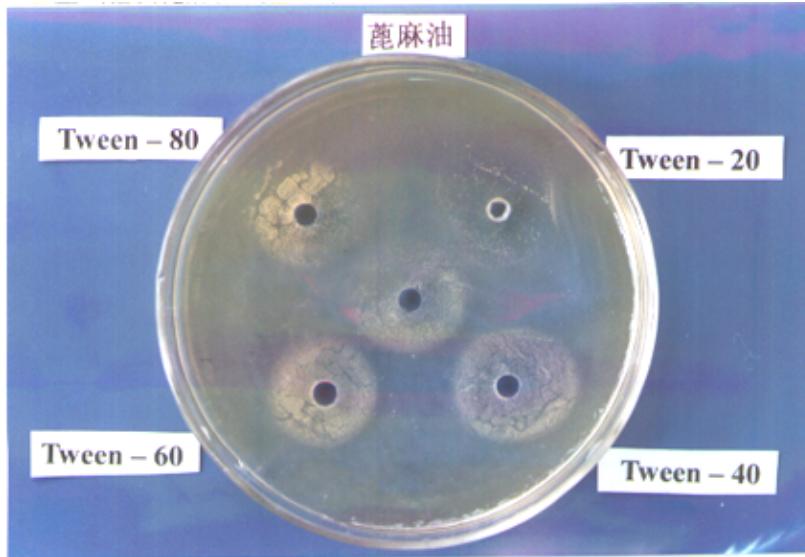
2、过氧化氢酶试验结果：滴加3%过氧化氢一滴后观察，有气泡生成为阳性，可能为糠秕马拉色菌、合轴马拉色菌、钝形马拉色菌和球形马拉色菌。

无气泡生成者为阴性，为限制性马拉色菌。

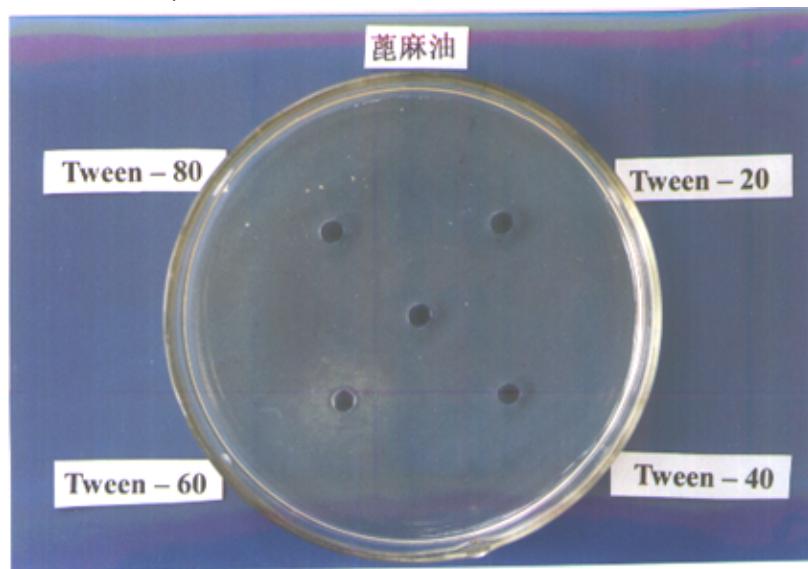
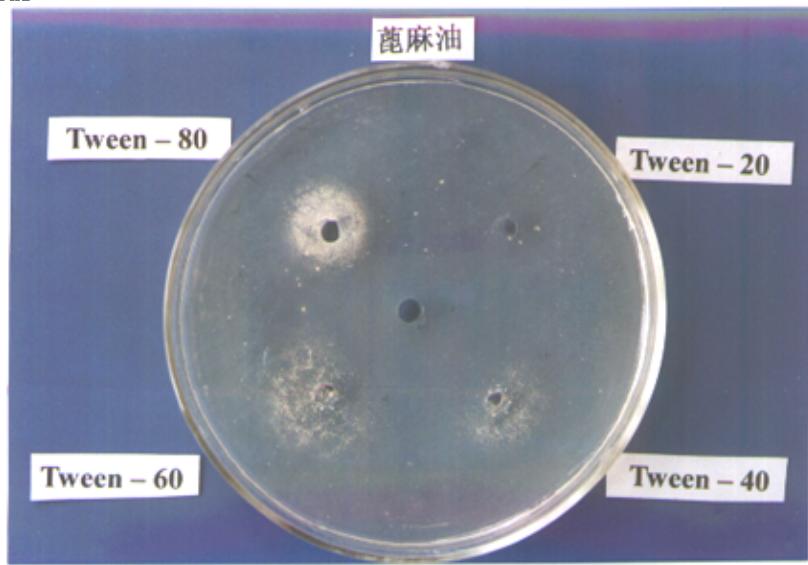
表1 马拉色菌属7个种的形态学及生理生化特征

	厚皮 马拉色菌	合轴 马拉色菌	糠秕 马拉色菌	斯洛菲 马拉色菌	钝形 马拉色菌	球形 马拉色菌	限制性 马拉色菌
形态	卵形,芽颈 最宽,有突 出痕迹	卵形或 球形,合 轴出芽	卵形或 球形,可 长菌丝	圆柱形, 芽颈处宽	圆柱形 或筒形 可长菌丝	球形,芽 颈窄,可 见芽管	卵形或 球形,芽 颈窄
沙保培养基	+	-	-	-	-	-	-
过氧化氢酶	±	+	+	+	+	+	-
七叶苷	±	+	-	-	+	-	-
蓖麻油	±	-	+	-	-	-	-
吐温-20	±	-	+	+	-	-	-
吐温-40	+	+	+	+	-	-	-
吐温-60	+	+	+	+	+	-	-
吐温-80	+	+	+	+	-	-	-

3、吐温试验及蓖麻油试验结果：

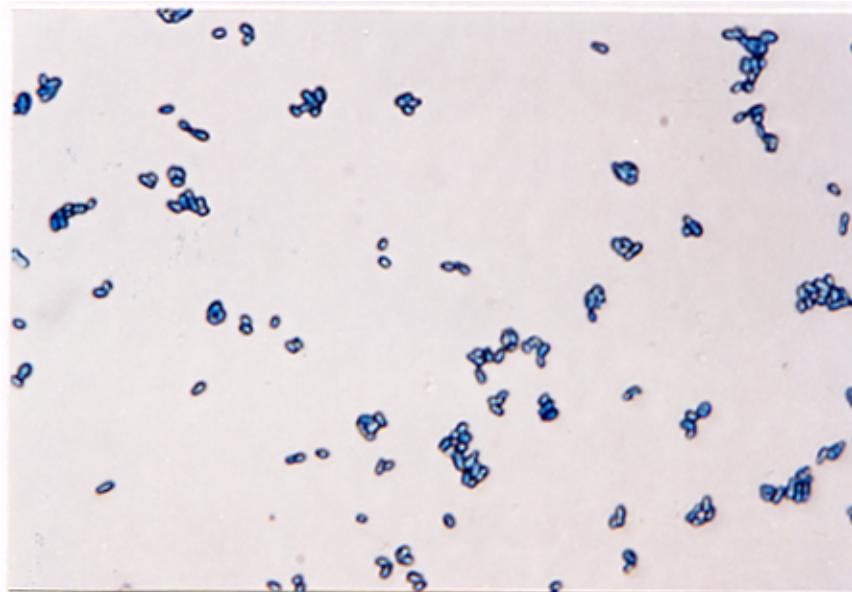


照片1 沙保培养基上32℃培养7d, 吐温-20、吐温-40、吐温-60、吐温-80周围和蓖麻油周围均能生长, 鉴定为糠秕马拉色菌。



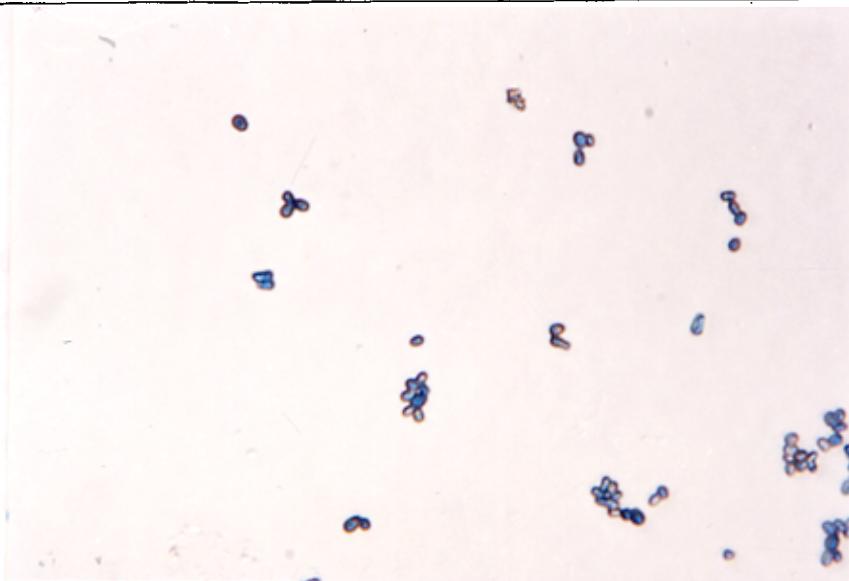
4、七叶苷试验结果：菌株接种七叶苷培养基中，32℃孵育 72 小时后观察。能使培养基完全变黑或变黑 1/3 以上的为合轴马拉色菌和钝形马拉色菌；只能使培养基轻微变黑的为糠秕马拉色菌；不能使培养基变色的为球形马拉色菌和限制性马拉色菌。

5、形态学观察：在菜子油平板上划线分离单菌落，32℃培养 7d，用 50% 派克墨水染色后镜下观察马拉色菌孢子形态：孢子为卵形，大小不等，多为糠秕马拉色菌；孢子卵形，有合轴出芽的多为合轴马拉色菌；孢子为筒形者鉴定为钝形马拉色菌。（见照片 4、5、6）



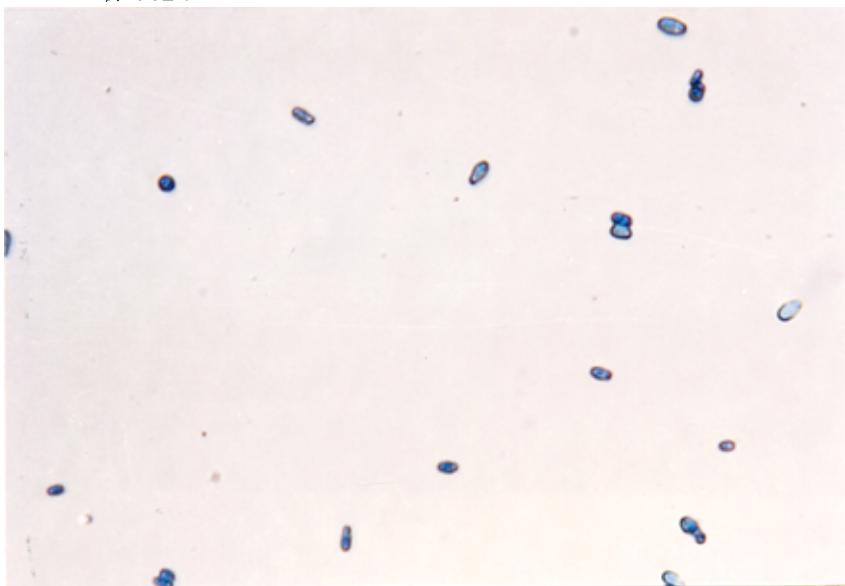
照片 4 糠秕马拉色菌 (50%派克墨水染色, $\times 400$)

图中孢子形态变化较大，大小不等的卵形孢子，芽颈明显



照片 5 合轴马拉色菌 (50%派克墨水染色, $\times 1000$)

卵形孢子, 较细小, 芽颈与子孢子相近, 可见合轴出芽



照片 6 钝形马拉色菌 (50%派克墨水染色, $\times 1000$)

筒形孢子, 芽颈窄, 痕迹不明显

讨 论

1、马拉色菌属 (the genus *Malassezia*) 的概念早在 1889 年由 Baillon 提出, 但该菌属的分类与命名一直比较混乱。植物学领域根据该菌产孢子和菌丝, 将其命名为马拉色菌; 皮肤病学领域则命名为糠秕孢子菌 (the genus *Pityrosporum*), 分为卵形糠秕孢子菌 (*Pityrosporum oval*)、圆形糠秕孢子菌 (*Pityrosporum orbiculare*) 和厚皮糠秕孢子菌。长期以来文献上对马拉色菌的分类鉴定方法多种多样, 有形态学、生理学的鉴定, 也有血清学的鉴定。

2、1996 年, Gueho^[10]等用比较系统的方法对 7 种马拉色菌的多个菌株进行形态学和生理生化的描述, 包括菌落形态, 孢子特征, 过氧化氢试验, 沙保培养基上生长能力, 不同温度的生长能力, 吐温利用情况。同年, Guillot^[11]等又用该菌属的 7 个种的多株菌株进行检测, 总结出较为全面的鉴定方法: (1) 分离培养菌种; (2) 沙保培养基上的生长能力; (3) 过氧化氢酶试验; (4) 吐温试验; (5) 显微镜观察。1997 年 Mayser 等^[12]在 Guillot 的基础上增加了 2 种检测手段: (1) PEG-35 蓖麻油作为脂源的生长能力; (2) 分解七叶苷的能力。进一步为合轴马拉色菌、糠秕马拉色菌、斯洛菲马拉色菌的鉴定提供了依据。

Guillot 的分类方法具有简便, 经济, 准确的特点, 使马拉色菌命名及分类长期的混乱局面到达一个比较统一的现状, 对于探明各菌种与各种皮肤病的关系具有重要的意义。

4、90 年代至今, 基因分型的研究逐渐开展, 主要方法有依靠检查马拉色菌核型的脉冲场凝胶电泳 (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) 和鉴定 DNA 随机引物扩增条带的随机扩增多态性分析 (Random Amplified

Polymorphic DNA, RAPD)^[13], 以及 rRNA 序列分析及 DNA 碱基对比较^[11]。马拉色菌的鉴定与分型更加地精确可靠。

目前国际上公认马拉色菌属包含 7 个菌种, 分别为厚皮马拉色菌 (*M. pachdermatis*)、合轴马拉色菌 (*M. sympodialis*)、糠秕马拉色菌 (*M. furfur*)、斯洛菲马拉色菌 (*M. sloofiae*)、钝形马拉色菌 (*M. obtusa*)、球形马拉色菌 (*M. globosa*) 和限制性马拉色菌 (*M. restricta*)。除厚皮马拉色菌外, 其余 6 种均为嗜脂性酵母菌。厚皮马拉色菌虽然可以不需要脂质, 但培养基中加入脂质可促进其生长。7 种不同的马拉色菌病原菌中, 在临幊上对人类有重要意义的是糠秕马拉色菌, 它被公认为是花斑癣和系统性感染的主要致病菌, 而厚皮马拉色菌则是引起猫、狗等动物外耳炎以及脂溢性皮炎的主要病原菌^[14]。

本实验采用 Guillot 对马拉色菌的生理生化鉴定方法, 从临幊标本和健康人群中分离鉴定出马拉色菌菌株, 供下一步研究使用。

第二部分 马拉色菌蛋白酶、脂酶活性 的测定与致病性研究

材料与方法

(一) 蛋白酶活性测定方法

1、培养基

[1] 全脂牛奶培养基：琼脂 2g，葡萄糖 4g 加蒸馏水 95ml，高压灭菌后待温度下降至 60℃，加入 5ml 无菌全脂牛奶，充分混匀后，倾注无菌平板，每一平板约 16ml，待冷却后，用直径 4mm 的打孔器在平板上打孔，置 4℃冰箱保存，1 周内使用。

[2]：配置方法同上，用 5% BSA 代替无菌全脂牛奶，另加入 1% 吐温-80，2% 菜子油作为脂源。

2、接种：

待测菌株预先在菜子油培养基上培养 7d，用无菌生理盐水配制成浓度为 10^5 - 10^8 /ml 的菌悬液，用微量加样器分别滴加 15 μ l 于全脂牛奶培养基和 BSA 培养基平板孔内，用透明胶带将平板封闭，以保持湿度，置孵箱中孵育。

3、结果测量：

于培养的第 14d 取出平板，10% 的三氯乙酸固定 2 小时，考马斯蓝 G250 染色过夜，次日用脱色液充分脱色。平板背景呈蓝色，如菌株能产生细胞外蛋白酶，则因该酶能分解蛋白质而使菌落周围出现透明环。测量菌落直径与蛋白分解圈的直径，计算两者的比值，蛋白酶活性的值以 Pa 表示：

第二部分 马拉色菌蛋白酶、脂酶活性 的测定与致病性研究

材料与方法

(一) 蛋白酶活性测定方法

1、培养基

[1] 全脂牛奶培养基：琼脂 2g，葡萄糖 4g 加蒸馏水 95ml，高压灭菌后待温度下降至 60℃，加入 5ml 无菌全脂牛奶，充分混匀后，倾注无菌平板，每一平板约 16ml，待冷却后，用直径 4mm 的打孔器在平板上打孔，置 4℃冰箱保存，1 周内使用。

[2]：配置方法同上，用 5% BSA 代替无菌全脂牛奶，另加入 1% 吐温-80，2% 菜子油作为脂源。

2、接种：

待测菌株预先在菜子油培养基上培养 7d，用无菌生理盐水配制成浓度为 10^5 - 10^6 /ml 的菌悬液，用微量加样器分别滴加 15 μ l 于全脂牛奶培养基和 BSA 培养基平板孔内，用透明胶带将平板封闭，以保持湿度，置孵箱中孵育。

3、结果测量：

于培养的第 14d 取出平板，10% 的三氯乙酸固定 2 小时，考马斯蓝 G250 染色过夜，次日用脱色液充分脱色。平板背景呈蓝色，如菌株能产生细胞外蛋白酶，则因该酶能分解蛋白质而使菌落周围出现透明环。测量菌落直径与蛋白分解圈的直径，计算两者的比值，蛋白酶活性的值以 Pa 表示：

$Pa = \text{菌落直径除以总直径 (菌落+透明环)}$ 。 Pa 值越低, 菌株蛋白酶活性越强。 $Pa=1$, 即蛋白酶活性为阴性, $0.64 < Pa < 1$ 为阳性, $Pa < 0.64$ 为蛋白酶活性强阳性^[5]。

4、温度对蛋白酶产生的影响

将接种 7 种标准菌株的全脂牛奶平板分别放置 25℃、32℃、37℃ 孵育 14d, 染色后测量菌落直径、透明环直径。

5、pH 值对蛋白酶产生的影响

调节 pH 值, 使培养基的 pH 值分别为 pH3.5、pH5.5、pH7.5, 接种 7 种标准菌株, 32℃ 孵育 14d, 染色后测量菌落直径、透明环直径。

6、蛋白酶抑制剂的影响

在全脂牛奶平板中分别加入抑胃肽 (Pepstatin, Sigma, 2.5 μ g/ml), 苯甲基黄酰氟 (Phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF, 1mmol/ml) 和乙二胺四乙酸 (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA, 10mmol/ml), 接种 7 种标准菌株, 32℃ 孵育 14d, 染色后观察有无透明环。

(二) 脂酶活性的测定方法

1、底物: 脂酶特异底物为对硝基苯酚酸酯 (*P*-nitrophenylpalmitate, pNPP, Sigma)。将 pNPP 溶于异丙醇配成 2mM 的原液, 取 0.5ml 加入 4.95ml 的 pH 值为 6.4 的 PBS 中, 再加入 0.05ml Triton X-100 摆匀备用。

2、标准脂酶及检测仪:

猪胰腺脂酶 (Sigma 公司), 活力 $\geq 10000U/g$, 检测仪为 511 酶标仪 (上海第三分析仪器厂生产)。

3、菌液制备:

待测菌株预先在菜子油培养基上32℃培养7d,用无菌生理盐水洗脱,并调节菌液浓度为 10^5 - 10^6 /ml备用。

4、脂酶活性的检测:

采用Plotkin^[6]的方法加以改良,具体步骤是:在通用的无菌一次性使用的96孔培养板上进行检测。第1列加300 μ l PBS,第二列加100 μ l PBS,200 μ l pH7.0的底物作对照。以下各列加200 μ l pH7.0的底物,再加上上述配制好的100 μ l菌液,每菌株四孔。然后用不干胶封闭有盖的96孔培养板侧缘,放入37℃孵育,1小时后在511酶标仪上用波长410nm检测结果。

5、脂酶活性的标准曲线测定:

第1列加300 μ l PBS,第二列加100 μ l PBS,200 μ l pH7.0的底物作对照。第3~10列分别加浓度为1000U/ml,500U/ml,250U/ml,125U/ml,62.5U/ml,31.25U/ml,15.625U/ml,7.8125U/ml的100 μ l标准脂酶液代替菌液检测结果。

(三)蛋白酶、脂酶活性与致病性的关系

1、测试菌株

选择3株蛋白酶、脂酶活性不同的*M.furfur*菌株,Ⅰ株 $Pa=0.25$ (强蛋白酶活性),脂酶活性443U/ml;Ⅱ株 $Pa=0.67$ (弱蛋白酶活性),脂酶活性361U/ml;Ⅲ株 $Pa=1.00$ (无蛋白酶活性),脂酶活性116U/ml。待测菌株预先在菜子油培养基上培养7天,用无菌生理盐水配制成菌悬液,用血球计数器计数孢子数并将其浓度调节为 10^7 - 10^8 个菌细胞/ml,用于注射小鼠。

2、实验动物分组：

雄性昆明种小鼠 42 只 (18~22g/只), 随机分入对照组 12 只, 实验组 30 只。对照组 12 只, 分 2 组对照各 6 只, 其中对照 1 组不做任何处理; 对照 2 组腹腔内注射醋酸泼尼松龙 500mg/kg, 进行免疫抑制, 不注射菌液感染, 观察免疫抑制后小鼠的生理状态。实验组分为 3 组, 每组 10 只, 腹腔内注射醋酸泼尼松龙 500mg/kg, 得到免疫抑制模型, 分别感染菌液, 详见表 1。

表 1 实验动物分组处理方法

Table 1 The groups of mice and handle process

分组	实验动物数量	处理方法
对照 1 组	6	不处理
对照 2 组	6	醋酸泼尼松龙 500mg/kg
实验 1 组	10	醋酸泼尼松龙 500mg/kg+ I 株菌液
实验 2 组	10	醋酸泼尼松龙 500mg/kg+ II 株菌液
实验 3 组	10	醋酸泼尼松龙 500mg/kg+ III 株菌液

3、免疫抑制状态的建立与观察: 对照 2 组腹腔内注射醋酸泼尼松龙 500mg/kg, 于注射后 1、2、3、5、7d 处死小鼠, 采集血液进行白细胞计数, 解剖脾脏称量重量。同时处死对照 1 组小鼠采集血液进行白细胞计数, 解剖脾脏称量重量作为正常小鼠对照。对照 1 组和对照 2 组分别固定 1 只小鼠每日称重, 记录体重变化。为避免免疫抑制小鼠继发细菌的感染, 每日在饮水中加入氨苄青霉素 (1mg/mL) ^[18]。

4、致病力的研究：

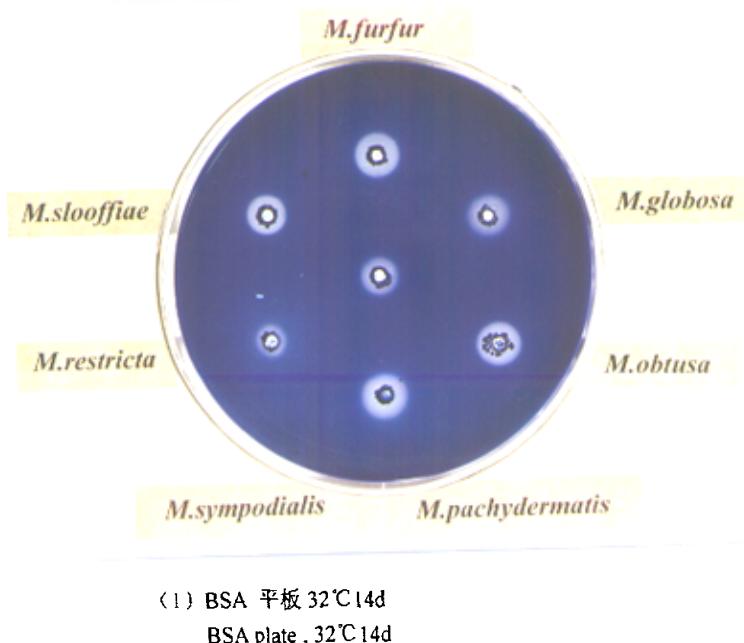
用浓度为 10^7 - 10^8 个菌细胞/ml 的三株菌液 0.5ml 经尾静脉分别注入实验组小鼠，每个实验小组的小鼠（10 只）注入同一菌株的菌液。每天观察，共 30d，记录小鼠死亡数和存活天数，计算小鼠死亡率和平均生存时间。

（四）统计分析：

用 t 检验比较两组间蛋白酶、脂酶活性的差异，用相关分析检验蛋白酶、脂酶活性与致病性的相关性。

结 果

（一）BSA 平板与全脂牛奶平板检测标准菌株蛋白酶活性的结果见图 1：



4、致病力的研究：

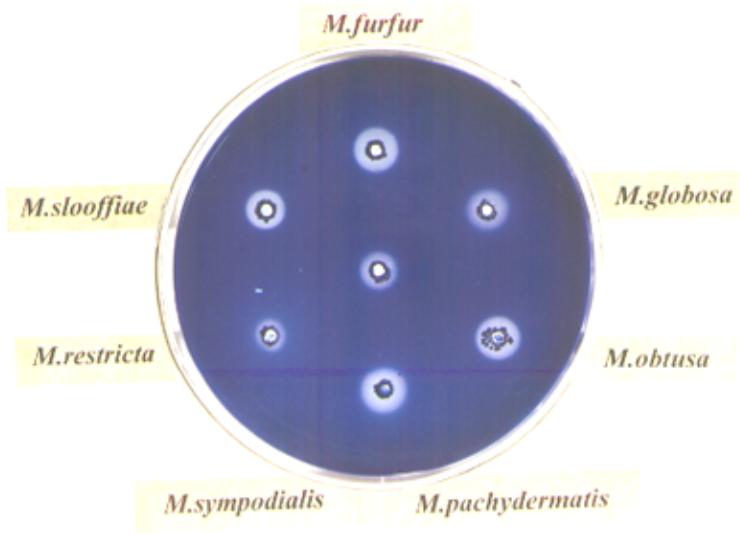
用浓度为 10^7 - 10^8 个菌细胞/ml 的三株菌液 0.5ml 经尾静脉分别注入实验组小鼠，每个实验小组的小鼠（10 只）注入同一菌株的菌液。每天观察，共 30d，记录小鼠死亡数和存活天数，计算小鼠死亡率和平均生存时间。

（四）统计分析：

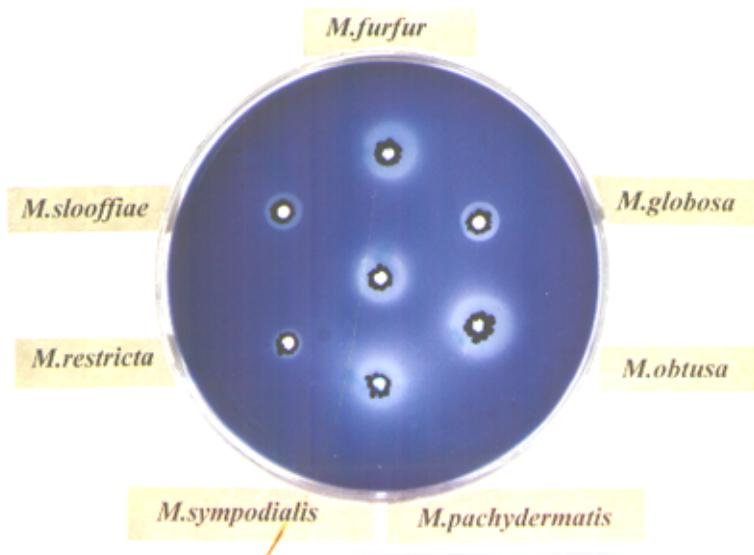
用 *t* 检验比较两组间蛋白酶、脂酶活性的差异，用相关分析检验蛋白酶、脂酶活性与致病性的相关性。

结 果

（一）BSA 平板与全脂牛奶平板检测标准菌株蛋白酶活性的结果见图 1：



(1) BSA 平板 32℃14d
BSA plate , 32℃14d



(2) 全脂牛奶平板, 32℃14d
Whole-fat-cow's-milk plate, 32℃14d

图 1 BSA 平板与全脂牛奶平板测标准菌株蛋白酶活性的效果比较
Fig.1 The results of the proteinase activity of 7 standard strains on BSA and the whole-fat-cow's-milk plate

7 株标准菌株在 BSA 平板和全脂牛奶平板上均能生长并产生蛋白酶, 形成透明的分解环。全脂牛奶平板上分解环大于 BSA 平板, 且菌株之间有差异。

(二) 全脂牛奶平板法检测临床株 *M.furfur*33 株、正常菌株 *M.furfur*28 株的结果见表 2。经 *t* 检验, *M.furfur* 临床株的蛋白酶活性与正常株相比, 统计学上有显著性差异 ($t=5.296 \quad P<0.01$)。临床株中, 来源于包皮龟头炎的 *M.furfur* 与来源于花斑癣的 *M.furfur* 的蛋白酶活性统计学上无显著性差异 ($t=0.468 \quad P>0.5$)。

表 2 棘孢马拉色菌临床株和正常皮肤分离株蛋白酶活性

Table 2 The proteinase activity of *Malassezia furfur* isolated

from clinical specimens and normal skin

Strains	No.of	No.of	Pa ($\bar{x} \pm s$)
			Strains Strong positive (%)
Clinical isolated strains	33	32 (96.9)	0.48±0.11*
balanoposthitis	15	14 (93.3)	0.49±0.12
pityriasis versicolor	12	12 (100)	0.47±0.13
abscess of groin	6	6 (100)	0.52±0.09
Strains from normal skin	28	12 (42.9)	0.67±0.16*
normal skin of patients	8	5 (62.5)	0.60±0.10
skin of normal person	20	7 (35)	0.71±0.17

* 统计学上有显著性差异 ($t=5.296$ $P<0.01$)

全脂牛奶平板法检测临床株 *M.furfur* 33 株、*M.sympodialis* 12 株、*M.obtuse* 4 株的结果见表 3。来源于包皮龟头炎的 *M.sympodialis* 临床株与 *M.furfur* 临床株的蛋白酶活性相比，统计学上无显著性差异 ($t=1.578$ $0.20>P>0.10$)。

(三) 温度对蛋白酶产生的影响：

不同温度对 7 株标准菌株蛋白酶活性的影响见图 2。从图中可以看出，在 25°C、32°C、37°C 时，7 株标准株蛋白酶活性 Pa 值合计分别为 5.48、3.34 和 3.71。32°C 时合计值最小，说明蛋白酶活性最高

表 3 马拉色菌临床株蛋白酶活性

Table 3 The proteinase activity of *Malassezia* spp isolated from clinical specimens

Strains	Source	No of	No of Strong positive (%)	Average
		Strains		
<i>M.furfur</i>	Balanoposthitis	15	14 (93.3)	0.49±0.12
	Tinea versicolor	12	12 (100)	0.47±0.1
	Abscess of groin	6	6 (100)	0.52±0.09
<i>M.sympodialis</i>	Balanoposthitis	12	8 (67.8)	0.56±0.11
<i>M.obtusa</i>	Balanoposthitis	4	2 (50)	0.65±0.07

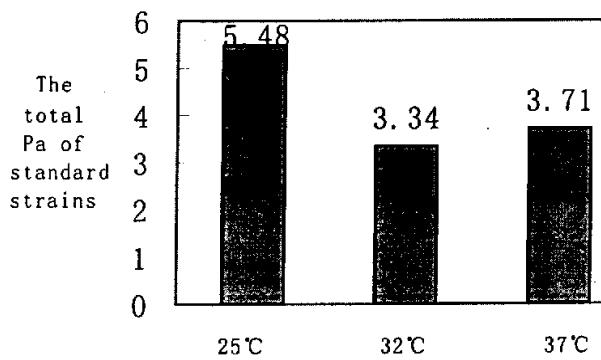


图 2 不同温度对蛋白酶活性的影响

Fig. 2 The effect of temperature on the activity of proteinase

(四) pH 值对蛋白酶产生的影响:

不同温度对 7 株标准菌株蛋白酶活性的影响见图 3。从图中可以看出，在 pH3.5、pH5.5、pH7.5 时，7 株标准株蛋白酶活性 Pa 值合计分别为

4.25、3.34 和 6.22。pH5.5 时合计值最小，说明蛋白酶活性最高。

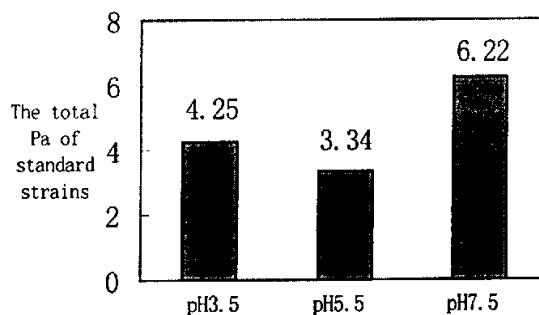


图 3 不同 pH 值对蛋白酶活性的影响

Fig.3 The effect of pH on the activity of proteinase

(五) 蛋白酶抑制剂的影响

Pepstatin (Sigma, 2.5 μ g/ml), PMSF (1mmol/ml) 不能抑制透明环的形成，无抑制作用。EDTA (10mmol/ml) 能抑制透明环的形成，有抑制作用。

(六) 脂酶测定标准曲线结果如下：

表 3 脂酶活性测定标准曲线值
Table 3 The lipase activity of standard curve

酶活性单位 (U)	1000	500	250	125	62.5	31.75	15.825
OD 值	0.798	0.522	0.285	0.208	0.122	0.008	0.005

标准曲线公式： $Y = 0.0946 + 0.000735X$

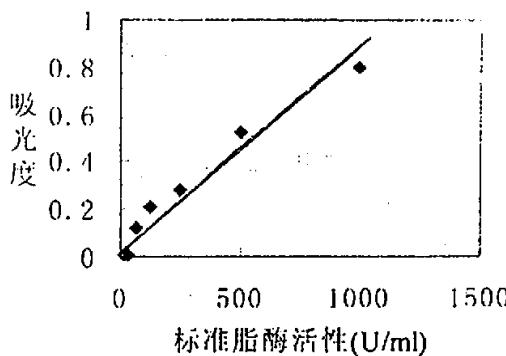


图 4 脂酶标准曲线直线回归图

Fig. 4 Correlation line of the lipase activity

(七) 糜秕马拉色菌脂酶活性结果:

经 t 检验, *M.furfur* 临床株的脂酶活性与正常株相比较, 统计学上有显著性差异 ($t=6.958 \quad P<0.01$)。临床株中, 来源于包皮龟头炎的 *M.furfur* 与来源于花斑癣的 *M.furfur* 的脂酶活性统计学上无显著性差异 ($t=0.766 \quad P>0.5$)。见表 5。

表 5 糜秕马拉色菌临床株和正常皮肤分离株脂酶活性

Table 5 The lipase activity of *Malassezia furfur* isolated from clinical specimens and normal skin

Strains	No. of Strains	Pa ($\bar{x} \pm s$)
Clinical isolated strains	33	$389 \pm 108.23^*$
balanoposthitis	15	417.33 ± 126.36
pityriasis versicolor	12	383.67 ± 94.55
abscess of groin	6	331.5 ± 64.48
Strains from normal skin	28	$211 \pm 88.60^*$
normal skin of patients	8	224.25 ± 105.23
skin of normal person	20	206 ± 83.52

* 统计学上有显著性差异 ($t=6.958 \quad P<0.01$)

(八) 免疫抑制小鼠模型: 在对照 2 组的 6 只小鼠腹腔内注射醋酸泼尼松龙 500mg/kg 后, 与未注射醋酸泼尼松龙的小鼠比较, 注射药物后 1 周内, 小鼠出现明显的耸毛, 食欲下降, 体重减轻, 脾脏减小等表现, 外周血白细胞数下降, 维持约 6d。见表 6。

表 6 免疫抑制小鼠体重、脾脏重量和外周血白细胞计数

Table 6 The body weight, spleen weight and WBC of immune-comprised mice

组别	体重 (g)	脾脏重量 (mg)	白细胞数 ($10^9/L$)
对照组	24.2±1.7	129.3±3.9	8.9±1.7
免疫抑制组	19.4±0.9	51.2±3.2	4.2±0.7

(九) $10^7\sim10^8$ 个菌细胞/ml 的 3 株 *M.furfur* 菌液经尾静脉分别注入免疫抑制小鼠体内, 实验 1 组 10 只小鼠均在 10d 内死亡, 平均生存时间 4.1d; 实验 2 组有 6 只小鼠 10d 内死亡 (占 60%), 平均生存时间 5.8d; 实验 3 组有 2 只小鼠于 10d 内死亡, 1 只小鼠 14d 时死亡, 平均生存时间 8.7d。见表 7。死亡小鼠无菌解剖, 取小鼠肾脏、脾脏、肝脏组织进行真菌培养, 均培养出糠秕马拉色菌。菌株蛋白酶活性 (Pa) 与小鼠平均生存时间存在相关性 ($r=0.9925$, $P<0.01$)。

表 7 实验组小鼠死亡率、平均生存时间

Table 7 The mortality rate and average survival time of

the immune-comprised mice

组别	只数	死亡只数	死亡率 (%)	平均生存时间 (d)
1	10	10	100	4.1
2	10	6	60	5.8
3	10	3	30	8.7

讨 论

(一) 近年来在真菌致病物质的研究中,蛋白酶已被证实与致病性相关:蛋白酶能分解角蛋白和胶原蛋白,使真菌能利用这两种氮源从而在皮肤及深部组织中定居、生长:此酶还可协助真菌粘附于宿主细胞并且对中性粒细胞、淋巴细胞具有趋化活性^[15]。

目前测定真菌蛋白酶活性的方法常用牛奶平板法,原理是在含有葡萄糖、酵母粉、琼脂的基质中加入脱脂牛奶作为蛋白质底物,观察蛋白酶分解蛋白质所产生的透明圈加以检测。Coutinho 等已用该方法测得非嗜脂性的厚皮马拉色菌 (*M.pachydermitis*) 具有蛋白酶活性。*M.furfur* 作为嗜脂性酵母菌,它的生长必须依赖脂源。本实验将牛奶平板法加以改进,在含有葡萄糖、酵母粉、琼脂的基质中直接加入经滤过除菌的全脂牛奶。全脂牛奶广泛应用于培养马拉色菌的培养基中,如 Leeming and Nortman 培养基^[16],经滤过除菌后,既有消毒的效果,避免细菌污染,又保存了牛奶的脂质和蛋白质成分,有利于马拉色菌的生长。实验结果显示全脂牛奶培养基中 *M.furfur* 生长良好,蛋白酶活性高,不同菌株之间有明显差异。

为进一步纯化培养基中蛋白质底物,实验中试采用牛血清白蛋白 (BSA)作为唯一的蛋白质成分,经滤过除菌后加入基质中,另加吐温 - 80 和菜子油作为脂源。实验结果显示马拉色菌在 BSA 平板上可以生长,但蛋白酶活性低,不同菌种马拉色菌之间无差异性。测定蛋白酶活性的方法中,全脂牛奶平板法优于 BSA 平板法。

实验中观察到 7 株马拉色菌标准株均具有蛋白酶活性,其中 *M.furfur*、

M.obtusa、*M.pachydermitis* 和 *M.sympodialis* 的蛋白酶活性较高, *M.restricta* 的蛋白酶活性最低。临床株 *M.furfur* 33 株、*M.sympodialis* 12 株蛋白酶活性明显高于正常皮肤分离株, 而临床株之间, 来源于包皮龟头炎的 *M.furfur* 与来源于花斑癣的 *M.furfur* 的蛋白酶活性无显著差异 ($t=0.468$ $P>0.5$)。

本实验建立的方法能较简便、准确地测出马拉色菌蛋白酶的活性, 并发现蛋白酶活性与其致病性相关, 为进一步研究马拉色菌的致病机理奠定了基础。

(二) 不同 pH 值和温度对蛋白酶活性有影响, 从合计值看, pH5.5、32 °C 时蛋白酶活性最高。最适 pH 值和温度与马拉色菌在人体皮肤表面生活环境相近。蛋白酶抑制剂试验发现马拉色菌的蛋白酶与白念珠菌的酸性蛋白酶不同, 不被天冬氨酸蛋白酶抑制剂 Pepstatin 抑制^[6], 也不被丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 抑制, 而对金属蛋白酶抑制剂 EDTA 敏感。

(三) 马拉色菌为嗜脂性酵母菌, 具有脂酶活性, 脂酶能分解三酰甘油为游离脂肪酸, 给菌体生长提供能量, 脂酶活性升高也有利于马拉色菌菌丝相转化, 与致病性相关。本实验参照 Plotkin 的方法, 使用对硝基苯丙酸酯为脂酶特异性底物, 检测 33 株糠秕马拉色菌临床株和 28 株正常皮肤分离株的脂酶活性, 发现临床分离株的脂酶活性高于正常皮肤分离株 ($t=6.958$ $P<0.01$), 提示脂酶活性与致病性相关。

(四) 马拉色菌为条件致病性真菌, 为证实其致病性, 需采用免疫抑制的小鼠或大鼠作实验动物。参照《医学实验动物学》和相关文献资料^[17, 18, 19, 20], 经多次预实验, 调整免疫抑制方法后, 得到采用醋酸泼尼松龙

单次腹腔注射的方法。需要指出的是，对小鼠进行免疫抑制时使用的醋酸泼尼松龙的量，是以前文献报道的各种深部真菌病的动物模型中使用的常规用量的加倍，观察免疫抑制状态的指标为体重、脾脏重量和外周血白细胞计数。若体重增加，脾脏重量未见明显减轻，外周血白细胞计数未见下降，则提示药量不足，免疫抑制状态不理想。腹腔注射醋酸泼尼松龙后，小鼠饮水中加入氨苄青霉素 (1mg/mL)，以防止细菌引起的条件致病感染。

(五) 动物实验选择蛋白酶活性强 ($Pa=0.25$)、脂酶活性强 (443 U/ml) 的菌株；蛋白酶活性弱 ($Pa=0.67$)，脂酶活性较强 (361 U/ml) 的菌株和无蛋白酶活性 ($Pa=1.00$)，脂酶活性弱 (116 U/ml) 的菌株分别静脉注射免疫抑制小鼠，实验结果显示蛋白酶、脂酶活性愈强，小鼠死亡率愈高 (100%)，平均生存时间愈短 (4.1 天)；蛋白酶脂酶活性弱的菌株，小鼠死亡率低 (60%)，平均生存时间长 (5.8 天)；无蛋白酶活性、脂酶活性最弱的菌株，小鼠死亡率最低 (30%)，平均生存时间最长 (8.7 天)，表明蛋白酶、脂酶活性越强，致病性越强，两者密切相关 ($P<0.01$)。

结 论

采用生理生化及形态学方法, 对来源于花斑癣、包皮龟头炎和肾移植后腹股沟脓肿患者的皮损区与非皮损区的马拉色菌以及健康人皮肤的马拉色菌菌株进行分离鉴定。共得到 33 株糠秕马拉色菌、12 株合轴马拉色菌、4 株钝形马拉色菌临床分离株和 28 株糠秕马拉色菌正常皮肤分离株。使用全脂牛奶平板法检测马拉色菌 7 株标准株、临床分离株和正常皮肤分离株的蛋白酶活性, 发现 7 株马拉色菌标准株均检出蛋白酶活性, 糠秕马拉色菌临床分离株蛋白酶活性高于正常皮肤分离株 ($P<0.01$)。蛋白酶活性受温度、pH 值和蛋白酶抑制剂的影响, 发现蛋白酶活性在 32℃、pH5.5 时表达最高, EDTA 能抑制蛋白酶活性。使用对硝基苯榈酸酯为脂酶特异性底物检测 33 株糠秕马拉色菌临床株和 28 株正常皮肤分离株的脂酶活性, 临床分离株脂酶活性高于正常皮肤分离株 ($P<0.01$)。选择蛋白酶、脂酶活性不同的 3 株菌以静脉内注射方式感染免疫抑制小鼠进行毒力实验, 以小鼠死亡率和平均生存时间来评价菌株毒力。动物试验结果表明蛋白酶、脂酶活性愈高的菌株, 相应小鼠死亡率愈高, 平均生存时间愈短。提示马拉色菌的蛋白酶、脂酶活性与其致病性相关。

参 考 文 献

1. Guillot J, Gueho E. The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons (J). *Antonie van Leeuwenhoek*, 1995, 67 (3):297-314.
2. Gueho E, Boekhout T, Ashbee HR, et al. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens (J). *Medical Mycology*, 1998, 36:220
3. H.Ruth Ashbee, E.Glyn, V. Evans. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species (J). *Clinical Microbiology Reviews*, 2002, 15, 21-57.
4. Mittag H. Morphology of *Malassezia*-associated diseases (J). *Mycoses*, 1996;36(Suppl 1):13-19.
5. Coutinho SD, Paula CR. Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphatase production by *Malassezia pachydermatis* (J). *Med Mycol* 2000, 38: 73-76.
6. Ruchel R, De Bernardis F, Ray TL, et al. Candida acid proteinase (J). *J Med Vet Mycol*, 1992, 30(Suppl 1): 123-133.
7. Plotkin L I, Squierra L, Mathov I, et al. Characterization of the lipase activity of *Malassezia furfur* (J). *J Med Vet Mycol*, 1996, 34: 43-48
8. Ran Y, Yoshike T, and Ogawa H. Lipase of *M. furfur*: some properties and their relationship to cell growth (J). *J Med Vet Mycol*, 1993, 31:77-85.
9. 冉玉平. 检测糠秕马拉色菌的几种取材染色和培养方法介绍. 中国皮肤

- 性病学杂志 (J), 1999, 3: 181-182.
10. Gueho E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species (J). *Antonie van Leeuwenhoek*, 1996, 69:337
11. Guillot J, Guoho E, Lesourd M, et al. Identification of *Malassezia* species;a practical approach (J). *J Mycol Med*, 1996, 6(2):103-110.
12. Mayser P, Haze P, Papavassilis C, et al. Differentiation of *Malassezia* spp.-Selectivity of Cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur* (J). *Br J Dermatol*, 1997, 137(2):208-213.
13. Boekhout T, Kamp M, Guoho E. Molecular typing of *Malassezia* species with PEGE and RAPD (J). *Medical Mycology*, 1998, 36(4):365-372.
14. Weiss R, Raabe P, Mayser P. Yeasts of the genus *Mlassezia*: taxonomic classification and signification in (vererinary and) clinical medicine (J). *Mycoses*, 2000, (43 Suppl 1):69-72.
15. Ruchel R, De Bernardis F, Ray TL, et al. Candida acid proteinase (J). *J Med Vet Mycol* 1992, 30(Suppl 1):123-133.
16. Van Belkum A, Boekhout T, Bosboom R. Monitoring spread of *Malassezia* infection in a neonatal intensive care unit by PCR-mediated genetic typing (J). *J Clin Microbiol* 1994, 32: 2528-2532.
17. 徐宏彬, 刘维达, 王端礼. 真菌病的免疫抑制动物模型研究进展 (J). 国外医学皮肤性病学分册, 1996, 22(6): 337-340.

18. 黄复生. 卡氏肺孢子虫动物模型. 见魏泓主编. 《医学实验动物学》. 第1版. 四川: 四川科学技术出版社, 1998: 378-379.
19. 魏泓. 免疫缺陷动物的分类及其特点. 见魏泓主编. 《医学实验动物学》. 第1版. 四川: 四川科学技术出版社, 1998: 412-416.
20. 赵红梅. 肾移植患者皮肤脓肿中分离出糠秕马拉色菌的临床及实验研究. 四川大学临床医学硕士专业学位论文. 2003.

马拉色菌致病相关因子的研究进展

曾蔚 综述

贾文祥 审校

马拉色菌 (*Malassezia*) 是人类和温血动物皮肤的常驻菌, 亦是一种条件致病性真菌。已有的研究证实它可以引起花斑癣、马拉色菌毛囊炎、脂溢性皮炎、异位性皮炎和银屑病等多种疾病, 可能也与系统性感染有关^[1,2]。近年来马拉色菌致病机制在侵袭性酶、细胞微生物学等方面得到了深入研究, 本文在此加以综述。

1 侵袭性酶

1.1 脂酶活性及其生物学意义

根据形态学、生理生化特性及脉冲凝胶电泳 (pulsed field gel electophoresis, PFGE) 和随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 技术的应用, 马拉色菌分为 7 个种, 分别为厚皮马拉色菌 (*M. pachdermatis*)、合轴马拉色菌 (*M. sympodialis*)、糠秕马拉色菌 (*M. furfur*)、斯洛菲马拉色菌 (*M. sloofiae*)、钝形马拉色菌 (*M. obtusa*)、球形马拉色菌 (*M. globosa*) 和限制性马拉色菌 (*M. restricta*)^[3]。其中厚皮马拉色菌为非嗜脂性的酵母菌, 其余 6 种均为嗜脂性酵母菌。厚皮马拉色菌的生长虽然可以不需要脂质, 但培养基中加入脂质可促进其生长。马拉色菌能利用脂质的特性提示菌体具有能分解脂质的脂酶。冉玉平等^[4]先以橄榄油为基质, 用中和滴定法证实糠秕孢子菌具有脂酶活性, 再以 α -棕榈酸为基质, 根据其被分解成 α -萘酚的量, 用比色法测定糠

秕马拉色菌细胞外液、细胞内可溶性成分和细胞不溶性成分的脂酶活性。研究证实糠秕马拉色菌脂酶活性主要存在于细胞不溶性成分中, 活性范围 pH4.0~9.0, 以 pH5.0 时最高。同时发现糠秕马拉色菌的生长速度与脂酶活性呈相关关系, 对数生长期脂酶活性持续上升, 随菌生长速度减慢脂酶活性逐渐降低。脂酶的刺激剂牛黄胆酸盐 (STC) 可促进脂酶活性, 同时促使糠秕孢子菌从酵母相向菌丝相转化。

而 Plotokin 等^[5]用对硝基苯榈酸酯 (p-nitrophenylpalmitate, pNPP) 为脂酶特异底物, 测出糠秕孢子菌脂酶活性最适值为 pH7.5, 细胞可溶性成分、不溶性成分和培养物上清中都可测得脂酶活性。应用 FPLC (Fast Protein/Peptide/Performance Liquid Chromatography) 分析可溶性分泌物, 发现脂酶活性主要有三个峰, 与用 SDS-PAGE 法分离蛋白质成分取得的结果一致, 提示 *M. furfur* 至少有三种可以分解脂质底物的脂酶存在。Plotokin 等同时也测定了金属阳离子对 *M. furfur* 的脂酶活性的影响, 发现在 Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Ca_2^+ , Mg_2^+ , Mn_2^+ , Ba_2^+ , Cd_2^+ 阳离子中, K^+ 使脂酶活性明显增高, Cd_2^+ 明显降低脂酶活性, 其他阳离子影响作用不明显。

综上我们可见, 嗜脂性糠秕马拉色菌具有脂酶活性, 最高活性范围 pH5.0~7.5, pH 值与马拉色菌在人和动物皮肤上的生活环境近似。脂酶能分解三酰甘油为游离脂肪酸为菌体生长提供能量, 脂酶活性升高也有利于马拉色菌菌丝相转化, 与致病性相关。

1.2 蛋白酶及其他侵袭性酶

除脂酶活性外, Coutinho 等应用平板法测得非嗜脂性的厚皮马拉色菌 (*M. pachydermitis*) 具有蛋白酶活性^[6]。白念珠菌的酸性蛋白酶已被

证实与致病性相关：蛋白酶能分解角蛋白和胶原蛋白，使白念珠菌能利用这两种氮源从而在皮肤及深部组织中定居、生长；此酶还可协助白念珠菌粘附于宿主细胞并且对中性粒细胞、淋巴细胞具有趋化活性^[7]。其他 6 种嗜脂性的马拉色菌是否也具有蛋白酶，马拉色菌的蛋白酶是否具有致病性，是下一步需要研究的问题。此外，Coutinho 等也测得厚皮马拉色菌具有透明质酸酶、chondroitin-sulphatase 等侵袭性酶^[8]。

Riciputo 等测得糠秕马拉色菌具有磷脂酶(phospholipase)^[8]活性，最新的研究表明磷脂酶具有干扰细胞膜信号传递的功能，可调节宿主免疫反应，是重要的毒力因子^[9,10]。此外，马拉色菌还具有脂氧合酶(lipoxygenase)^[11]活性，可氧化游离和酯化的不饱和脂肪酸、角鲨烯和胆固醇，损伤细胞膜，影响细胞活性。

综上所述，目前的研究表明不同的马拉色菌具有不同的侵袭性酶，但它们与马拉色菌不同种间致病性差异的关系，仍是有待研究的问题。

2 马拉色菌菌种分布与疾病的关系

新的分类法将马拉色菌分为七个种，各个菌种在正常人体的分布以及菌种在致病性方面的差异成为研究热点。近年来陆续有按照新的分类标准调查不同疾病菌种分布的报道，现综述如下：Nakabayashi A^[12]报道对 42 例脂溢性皮炎、17 位异位性皮炎、22 位花斑癣及 108 位正常人皮肤马拉色菌分布的调查，正常人皮肤球形马拉色菌检出率 22%，合轴马拉色菌 10%，糠秕马拉色菌 3%，其他种马拉色菌偶见。脂溢性皮炎患者中，糠秕马拉色菌检出率 35%，球形马拉色菌 22%；异位性皮炎患者中糠秕马拉色

菌检出率 21%；花斑癣患者中，球形马拉色菌 55%，其他菌种检出率小于 10%。患者皮损区菌种分布与正常皮肤有差异，以高密度的球形马拉色菌为主。

Crespo E^[13]的报道为 96 例花斑癣患者中球形马拉色菌检出率 97%，其中 60.4% 为只检出球形马拉色菌，29% 与合轴马拉色菌共存，7% 与斯洛菲马拉色菌共存。直接镜检发现皮损区分布大量球形马拉色菌的菌丝和孢子。因此认为花斑癣的主要致病菌为球形马拉色菌的菌丝相。Aspiroz C^[14]等调查 79 名西班牙花斑癣患者，患者皮损区球形马拉色菌检出率 90%，合轴马拉色菌 41%。也认为球形马拉色菌可能为花斑癣的致病菌，其次为合轴马拉色菌。

但 Gupta 等^[15]报道用定量培养的方法调查加拿大 111 例花斑癣患者皮损区菌种分布结果则为合轴马拉色菌检出率 59.5%，球形马拉色菌检出率 25.2%，糠秕马拉色菌检出率 10.8%。说明菌种的分布具有差异性，可能与患者的人种和所处的地域不同有关。

同样 Gupta 等^[16]报道用定量培养的方法调查加拿大 110 例皮炎患者，其中花斑癣患者 23 例，脂溢性皮炎患者 28 例，牛皮癣患者 28 例，特异性皮炎患者 31 例，另有健康受检者 20 例。发现在异位性皮炎、牛皮癣和脂溢性皮炎患者皮损区马拉色菌的菌株数小于正常对照 ($P<0.05$)，而在花斑癣患者皮肤上，菌量与正常对照相同。说明脂溢性皮炎、异位性皮炎等疾病是以马拉色菌低密度粘附为特征。

综上各报道可见对马拉色菌分布调查的结果差异性较大，这与采用的培养基、是否采用定量的方法、菌种的采集部位是否规范一致等有密切

的关系。由于马拉色菌为皮肤常驻菌，因此调查时必须以同一地区正常人群不同解剖部位的菌种分布为对照，还应考虑年龄因素的影响。再比较皮损区菌种分布与正常对照的差异，可得出可靠的结果。

目前的看法为：球形马拉色菌、合轴马拉色菌、糠秕马拉色菌为人类花斑癣、脂溢性皮炎等疾病的主要致病菌。菌种的分布与人种和所处的地域不同有差异。

3、菌丝相与致病性的关系

早在上世纪 50 年代人们就观察到在花斑癣患者的皮屑中，马拉色菌以菌丝相和酵母相存在，因此提出马拉色菌为双相菌。1970 年 Mcclinley^[17] 等研究花斑癣患者正常皮肤和皮损区上马拉色菌菌丝相与酵母相的比例，发现皮损区菌丝相与酵母相的比例为 2.1：1，而正常皮肤上菌丝相与酵母相的比例为 0.21：1。Saadatzadeh MR^[18] 用糠秕马拉色菌、合轴马拉色菌的菌丝相作为抗原，检测花斑癣患者的细胞免疫功能，淋巴细胞转化实验结果表明患者对菌丝相抗原的反应大于对照，但白细胞趋化抑制实验的结果无差异。细胞免疫对菌丝相的低反应性可能与花斑癣的慢性、浅表性感染过程相关。Saadatzadeh MR^[19] 体外诱导菌丝相，发现只有表达 A 型血清抗原的马拉色菌才能诱导出菌丝相。根据新的命名系统，A 型血清抗原对应的菌种大部分为糠秕马拉色菌、合轴马拉色菌和钝形马拉色菌。但 Saadatzadeh MR 认为合轴马拉色菌无法诱导出菌丝相。

目前虽然有形态学的证据表明菌丝相与致病性相关，但仍缺乏菌丝相直接致病的证据。研究的困难性在于目前仍无很高效的方法体外诱导酵母相向菌丝相转化。进一步需要采用适当的细胞或动物模型，从细胞微生

物学、免疫学等方面做深入的研究。

4 马拉色菌对培养角质形成细胞的影响

马拉色菌属于皮肤常驻菌，观察马拉色菌与培养角质形成细胞的相互作用，有利于从细胞水平研究其致病机制。

2.1 形态学改变

冉玉平等^[20]首先建立了糠秕马拉色菌菌体与人角质形成细胞(keratinocytes)共同培养系统，定时将培养物作扫描和透射电镜观察，发现角质形成细胞被菌体活化以后可长出细长纤维丝及粗大颗粒状突起，一些纤维丝延伸到菌体表面与菌体粘附。在吞噬菌体的过程中，角质形成细胞表面出现裂隙，吞入菌体后，裂隙又重新融合。菌体周围出现似为次级溶酶体或由位于菌体壁/膜上的脂酶活性分解所致的空泡。罗东辉等^[19]也用透射电镜观察到与糠秕马拉色菌共同培养6~12小时的角质形成细胞，其细胞形态仍呈梭形，细胞膜完整，胞质内细胞器丰富，核糖体、线粒体脂滴数目增多，细胞功能活跃。与糠秕马拉色菌共同培养24~48小时后，部分细胞的细胞膜缺损，细胞核消失，胞质内细胞器破坏、消失。表明随共同培养的时间延长；糠秕马拉色菌可引起角质形成细胞的破坏、死亡。

2.2 细胞因子分泌量改变

马拉色菌引起角质形成细胞分泌细胞因子的测定结果不一，冉玉平等用ELISA法定量检测糠秕马拉色菌与角质形成细胞共培养液中，在炎症反应和细胞生长中起主导作用的IL-1 α 和bFGF的含量，结果发现共同培养液中二者显著上升^[20]。而罗东辉等^[21]仅测得IL-1 α 增加。考虑到有活性

的 IL-1 的增加常常伴随 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、TNF、IFN 等的增加，而实验中并未测得 IL-2、IL-4、IL-10、TNF- α 、IFN- γ 的含量有显著增加，该实验结果与 Walters^[22] 等人的测定结果一致，支持了 Walters 等人的假说即：IL-1 α 是无活性的，糠秕马拉色菌的致病机制并不是通过刺激角质形成细胞产生一系列具有生物活性的细胞因子来介导。

同样的结果也被 Watanabe^[23] 等证实，他们应用 ELISA 法分别检测四种马拉色菌：糠秕马拉色菌、厚皮马拉色菌、斯洛菲马拉色菌、合轴马拉色菌与角质形成细胞共培养后，上清中细胞因子 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 和 MCP-1 的水平，发现糠秕马拉色菌不引起上述细胞因子的含量升高。而厚皮马拉色菌、斯洛菲马拉色菌、合轴马拉色菌则能引起上述细胞因子的含量升高，其中厚皮马拉色菌最显著。厚皮马拉色菌常引起狗和猫等动物的外耳炎和脂溢性皮炎，人的皮肤上通常只有嗜脂性马拉色菌生长，极少有厚皮马拉色菌。厚皮马拉色菌的非嗜脂性和促进细胞因子分泌的特性提示厚皮马拉色菌的致病机制可能与嗜脂性马拉色菌不同，与刺激角质形成细胞分泌大量细胞因子引起炎症反应相关。而以糠秕马拉色菌为代表的嗜脂性马拉色菌的致病机制可能与其侵袭性酶及菌体对角质形成细胞的损伤和破坏相关。

2.3 马拉色菌与角质形成细胞凋亡

罗东辉等人用流式细胞计数仪及 TUNEL 原位染色检测糠秕马拉色菌与角质形成细胞共培养液中角质形成细胞的凋亡情况，示 12h、24h 实验组凋亡细胞百分数比对照组有显著增加，实验组凋亡细胞百分数与时间成正相关^[24]。进一步用免疫组化的方法研究糠秕马拉色菌对培养角质形成

细胞表达 p53, p21, p185 的影响, 结果显示与糠秕马拉色菌共培养的角质形成细胞 p53 和 p185 蛋白表达增多, 说明糠秕马拉色菌与角质形成细胞共同培养也可促使角质形成细胞增殖、分化。糠秕马拉色菌引起银屑病、假乳头瘤病等表皮增殖性皮肤病可能与该机制有关^[25]

3 小结

马拉色菌作为人类和温血动物皮肤的常驻菌, 在什么条件下转化为致病真菌, 其致病物质与致病机制一直是人们所关心的问题。目前发现侵袭性酶活性的增高、马拉色菌作用于细胞引起细胞因子分泌增高等因素, 都可能是马拉色菌的致病机制。皮损区马拉色菌的粘附密度和菌种的分布及马拉色菌从酵母相向菌丝相转化都与致病性相关, 需要更进一步研究其致病的分子机制。

参考文献

1. Gueho E, Boekhout E, Ashbee HR, et al. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens (J). *Medical Mycology* 1998, 36:220
2. Ashbee HR, Glyn E, Evans V. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species (J). *Clinical Microbiology Reviews* 2002, 15, 21-57
3. Gueho E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species (J). *Antonie van Leeuwenhoek*, 1996, 69:337
4. Ran Y, Yoshike T, and Ogawa H. Lipase of *M. furfur*: some properties and their relationship to cell growth (J). *J Med Vet Mycol* 1993, 31:77 - 85.
5. Plotkin LI, Squierra L, Mathov I, et al. Characterization of the lipase activity of *Malassezia furfur* (J). *J Med Vet Mycol* 1996, 34:43 - 48
6. Coutinho SD, Paula CR. Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphatase production by *Malassezia pachydermatis* (J). *Med Mycol* 2000, 38: 73-76
7. Ruchel R, De Bernardidis F, Ray TL, et al. Candida acid proteinase

- (J). *J Med Vet Mycol* 1992, 30(Suppl 1): 123-133
8. Riciputo RM, Oliveri S, Micali G, et al. Phospholipase activity in *Malassezia furfur* pathogenic strains (J). *Mycoses*, 1996, 39 (5-6): 233-235
9. Schmeil H, Miller L. Bacterial phospholipases and pathogenesis (J). *Microbes and infection* 1999, 1(13), 1103-1112
10. Plotkin LI, Mathov I, Squiquera L, et al. Arachidonic acid released from epithelial cells by *Malassezia furfur* phospholipase A(2): a potential pathophysiologic mechanism (J). *Mycologia* 1998, 90:163 - 169
11. Nazzaro-Porro M, Passi S, Picardo M, et al. Lipoxygenase activity of *Pityrosporum* *in vitro* and *in vivo* (J). *J Investig Dermatol* 1986, 87:108 - 112
12. Nakabayashi A, Sei Y, Guillot J. Identification of *malassezia* species isolation from patients with seborrhoeic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects (J) . *Med Mycol*, 2000, 38:337-341.
13. Crespo EV, Ojeda MA, Vera CA, et al. *Malassezia globosa* as the causative agent of pityriasis versicolor (J) . *Br J Dermatol*, 2000, 143(4): 799-803.
14. Aspiroz C, Ara M, Varea M, et al. Isolation of *Malassezia globosa* and *M. sympodialis* from patients with pityriasis versicolor in

- Spain (J) . *Mycopathologia*, 2002, 154(3):111-117.
15. Gupta AK, Kohli Y, Faergemann J, et al. Epidemiology of *malassezia* Yests associated with pityriasis versicolor in Ontario, Canada (J) . *Med mycol*, 2001, 39:199-206.
16. Gupta AK, Kohli Y, Summerbell RC, et al. Quantitative culture of *Malassezia* species from different body sites of individuals with or without dermatoses (J) . *Med mycol*, 2001, 39(3):243-251.
17. McGinley KJ, Lantis LR, Marples RR. Microbiology of tinea versicolor (J) . *Arch Dermatol*, 1970, 102:168-171.
18. Saadatzadeh MR, Ashbee HR, Cunliffe WJ, et al. Cell mediated immunity to the mycelial phase of *Malassezia* spp in patients with pityriasis versicolor and controls (J) . *Br J Dermatol*, 2001, 144:77-84.
19. Saadatzadeh MR, Ashbee HR, Holland KT, et al. Producyion of the Mycelial phase of *Mlassezia* in vitro (J) . *Med mycol*, 2001, 39(6):487-493.
20. 冉玉平, 周光平, 坪井良治, 等. 糜秕孢子菌与培养人角朊细胞的相互作用 (J). 中华皮肤科杂志 1997, 30:294-298
21. 罗东辉, 王侠生, 何芳德. 糜秕孢子菌对培养角质形成细胞产生细胞因子的影响及电镜观察 (J). 临床皮肤科杂志 2000, 29:1-3
22. Walters CE, Ingham E, Eady EA, et al. In vitro modulation of

- keratinocytes-derived interlekin-1 α (IL-1 α) and peripheral blood mononuclear cell-derived IL-1 β release in response to cutaneous commensal microorganisims (J). Infect Immun 1995, 63 (4): 1223-1228
23. Watanabe S, Kano R, Sato H, et al. The effect of *Malassezia* yeast on cytokine production by human karatinocytes (J). J Invest Dermatol 2001, 116 (5):769-773
24. 罗东辉, 王侠生. 糜秕孢子菌诱导培养角质形成细胞凋亡的研究(J). 临床皮肤科杂志 2000, 29:336-338
25. 罗东辉, 王侠生. 糜秕孢子菌对培养角质形成细胞影响的免疫组化观察 (J). 临床皮肤科杂志 2001, 30:7-9

致 谢

首先，感谢我的导师贾文祥教授给予我的帮助和指导。本课题的设计、实验和论文撰写都是在贾文祥教授的悉心指导下完成的。导师严谨的治学态度、勤奋的科学精神和诲人不倦的教师风范铭记我心，将成为我今后教学、科研生涯的榜样。

衷心感谢华西医院皮肤科冉玉平教授在我课题的实施中给予的无私的技术指导和帮助，冉教授惠赠标准菌株并帮助我在皮肤科收集菌种，使研究得以顺利开展。

感谢本教研室的李明远教授、李虹、李婉宜、张再蓉、邝玉、杨远老师在我攻读学位期间对我工作的关心和大力支持，感谢教研室全体老师和同学为我提供了一个温暖、和谐的学习、工作环境。

感谢华西医院皮肤科熊琳、代亚林老师，硕士研究生李志瑜、赵红海、郭晓莉、谢震对我课题的关心和支持。

最后，我要感谢我的家人，是他们的支持与关怀，使我顺利完成学业。
再一次衷心地感谢大家，谢谢！

声 明

本人所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，在文中除了加以标注和致谢的地方外，不包含其他人已经发表和撰写过的研究成果，也不包含为获得四川大学或其他教育机构的学位和证书而使用过的材料。与本人一起工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确地说明并表示致谢。

本学位论文成果是本人在四川大学读书期间在导师指导下取得的，论文成果归四川大学所有，特此声明。