

白色念珠菌氟康唑耐药相关基因的差异显示研究

朱宇宁 吕时铭*

(浙江大学医学院附属妇产科医院 杭州 310006)

摘 要 采用差异显示 PCR 技术(Differential Display-PCR, DD-PCR)寻找白色念珠菌的氟康唑耐药相关基因。体外用含氟康唑的酵母培养基(YEPD)诱导培养临床白色念珠菌氟康唑敏感株 435(对咪康唑耐药),诱导 80d 后得到氟康唑耐药子代 435-2(MIC = 128 μ g/mL)。DD-PCR 比较 435-2、435 分别在含氟康唑、不含药的 YEPD 液基中的基因表达,找到 3 个明显差异片段,分别与数据库中白色念珠菌的醇脱氢酶基因 ADH1、多药耐药基因 CDR1 及拓扑异构酶基因 TOP2 有高度同源性。半定量 RT-PCR 中证实了 ADH1、CDR1 在氟康唑耐药株中的差异表达;对已知氟康唑耐药基因 MDR1 作半定量 RT-PCR 时发现 MDR1 在氟康唑耐药株 435-2 中无表达,而在氟康唑敏感株 435 中有表达。结果表明,ADH1、CDR1 基因的高表达与白色念珠菌氟康唑耐药性形成相关,ADH1 可能是新的耐药基因;MDR1 的表达可能在氟康唑敏感株或其它唑类耐药株中也存在。

关键词 白色念珠菌,氟康唑,耐药,差异显示

中图分类号:Q933 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2004)04-0469-05

广谱抗生素的普遍应用以及免疫缺陷人群的增加,使得机会性致病菌念珠菌的感染日益增多。三唑类代表药物氟康唑干扰念珠菌细胞膜的重要成分-麦角固醇的合成而发挥抗真菌作用,是既能治疗严重真菌感染又不会产生明显副作用的少数抗真菌药之一。氟康唑的广泛使用取得良好治疗效果,但也导致耐药菌株的发生率增加而使临床治疗失败,这在 AIDS 病人慢性反复发作的粘膜白色念珠菌感染治疗中尤为突出^[1]。

从基因组整体水平来看,白色念珠菌(*Candida albicans*)氟康唑敏感株与耐药株的基因型无明显差异,耐药发生主要是由于基因的表达差异,其中多药耐药基因 CDR1、CDR2、MDR1 的表达增加是三唑类耐药的主要机制^[2]。有研究发现 CDR1、CDR2、MDR1 的过度表达与转录调控因子有关^[3,4],这提示有可能是因为同时激活了其它基因(包括编码未知排出泵的基因)而导致的耐药发生^[4]。随着美国斯坦福大学白色念珠菌测序工作的深入及白色念珠菌基因数据库的丰富,使不同临床背景下基于全基因组表达谱的潜在耐药机制的寻找成为热点^[5]。

妇科念珠菌阴道炎治疗中唑类药物应用较多,且常用药物如达克宁(咪康唑)等均属于非处方药物

(OTC)。随着唑类药物接触率的增加,非免疫缺陷人群的阴道白色念珠菌对唑类药物的耐药发生已成为突出现象,对常用唑类药物的耐药率分别达到:咪康唑 20%,酮康唑 9.23%,益康唑 12.31%^[6]。这不仅导致阴道炎治疗困难,菌株获得的唑类耐药遗传学基础有可能使得氟康唑耐药性更易诱导而成为深部念珠菌感染治疗的潜在隐患^[7]。因此,有必要对具有其他唑类耐药性的氟康唑敏感白色念珠菌研究其发展氟康唑耐药性的相关机制。本研究选取一再发性念珠菌阴道炎患者的咪康唑耐药/氟康唑敏感的白色念珠菌菌株为研究对象,采用基于全基因组表达分析的差异显示 PCR 技术,以期发现表达差异与氟康唑耐药表型有关的基因。

1 材料和方法

1.1 实验菌株

菌株 435(435 为本室保存菌株编号)采自一再发性念珠菌阴道炎患者的阴道分泌物,镜检及 Vittek-32 微生物自动生化鉴定系统(法国生物梅里埃公司)鉴定为白色念珠菌,该菌株在科玛嘉培养基上形成淡绿色菌落,在 42℃ 孵箱内可生长^[8];ATB FUNGUS 药敏测定板(法国生物梅里埃公司)确定该

基金项目 浙江省自然科学基金资助项目(301546)

* 通讯作者。Tel:86-571-87019106;Fax:86-571-87061878;E-mail:lvsm@sina.com.cn

作者简介 朱宇宁(1971-),女,湖北宜昌人,硕士研究生,主要从事念珠菌耐药机制研究。E-mail:zyn@zju.edu.cn

收稿日期 2003-12-09,修回日期 2004-03-08

菌株对咪康唑耐药,用 NCCLS 推荐的参照 M27-A 方案的微量液基稀释法^[9]测定其氟康唑最小抑菌浓度(MIC)为 $4\mu\text{g/mL}$ ($\text{MIC} < 8\mu\text{g/mL}$ 即为氟康唑敏感株)。白色念珠菌标准菌 ATCC90028(氟康唑 MIC = $0.25\mu\text{g/mL}$)作药敏质控。

1.2 诱导耐药株的获得

氟康唑耐药诱导按文献方法进行^[10],每诱导 7~10d 用微量稀释法监测菌株对氟康唑最小抑菌浓度(MIC)一次,并留样于 -70°C 保藏。经 80d 诱导培养获得耐药子代 435-2(MIC = $128\mu\text{g/mL}$, $\text{MIC} \geq 64\mu\text{g/mL}$ 为氟康唑耐药株),该耐药株在无药培养基上传代培养 24d 保持氟康唑耐药性稳定(其间 4 次测定 MIC 变化在一个稀释度内)。

1.3 实验分组

实验分 3 组,实验组(Research group):435-2 接种于含 $64\mu\text{g/mL}$ 氟康唑的 YEPD 液基;对照组 1(Control group 1):435-2 接种于无药的 YEPD 液基;对照组 2(Control group 2):435 接种于无药的 YEPD 液基。 30°C 摇床培养至各菌液 OD_{600} 值达 $0.6 \sim 0.8$ (对数生长早期),收集菌细胞,液氮速冻后于 -80°C 保存。

1.4 菌株总 RNA 提取

热酚法提取各组酵母菌的总 RNA^[11],DNase I (Promega 公司)去除痕量的 DNA。取适量纯化后的总 RNA 样品稀释后,测 A_{260} 、 A_{280} 光密度值,在 1.2% 普通琼脂糖凝胶上电泳,检查 RNA 的完整性及 DNA 污染情况。

1.5 差异显示 PCR

试剂盒采用 CLONTECH 公司的 DeltaTM Differential Display Kit。

1.5.1 cDNA 第一链合成:3 组菌细胞的总 RNA ($0.5 \sim 1.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$)各取 $2\mu\text{g}$ 逆转录合成 cDNA 第一链,将 cDNA 用超纯水分别作 10 倍、40 倍稀释。

1.5.2 PCR 扩增:反应体系:10 × 反应缓冲液 $2\mu\text{L}$, dNTP($5\mu\text{mol/L}$) $0.2\mu\text{L}$,试剂盒中锚定引物 T 及随机引物 P 各 $1\mu\text{L}$,ddH₂O $14.4\mu\text{L}$,1/10 或 1/40 浓度的 cDNA $1\mu\text{L}$, Advantage Klen Taq Polymerase Mix($50 \times$) $0.4\mu\text{L}$ 。反应条件: 94°C 4min, 94°C 1min, 40°C 1min, 68°C 1min, 5 个循环, 94°C 40s, 60°C 1min, 68°C 2min, 25 个循环, 68°C 7min。每组模板采用 1/10 及 1/40 两种浓度的 cDNA 水及总 RNA 作模板的阴性对照。

1.5.3 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Neutral PAGE)显示差异条带:常规配制 6% 聚丙烯酰胺凝胶液,取 PCR 产物 $5\mu\text{L}$,加等体积电泳上样缓冲液混匀上样,

$10\text{V}/\text{cm}$ 恒压电泳至指示剂二甲苯青达胶底。银染显示差异条带。

1.5.4 差异片段回收及再扩增:从凝胶上切下差异片段,压碎后加入 $40\mu\text{L}$ ddH₂O,沸水浴 15min, $12000\text{r}/\text{min}$ 离心 10min,取 $7\mu\text{L}$ 上清为模板同前法行第二次扩增。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,PCR 产物纯化试剂盒(杭州维特洁公司)切胶回收。

1.6 PCR 再扩增产物克隆和鉴定

按试剂盒方法将 PCR 再扩增产物纯化片段与 T Vector (TaKaRa 公司)连接,转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 经蓝白斑筛选得到阳性克隆子。阳性克隆子用含氨苄的 LB 液体培养基培养过夜,提取质粒,用 EcoRI 及 HindIII 进行双酶切分析。

1.7 反式点杂交筛选差异 cDNA 片段

采用 Roche 公司的 DIG-High prime DNA Labeling and Detection Kit,取重回收的质粒酶切目标产物及阳性对照 β -actin 各 $10\mu\text{g}$,点样于尼龙膜上, 80°C 2h 干烤固定。取各组总 RNA $5\mu\text{g}$ 同前法合成 cDNA,纯化后溶于 $10\mu\text{L}$ DEPC 水中,按试剂盒方法作探针标记、杂交及化学发光法检测杂交信号。采用 Bio-Rad 的 Quantity One 软件分析各片段相对于看家基因 ACT1 的杂交信号强弱。

1.8 差异片段测序及同源性分析

测序在 ABI Prism 荧光自动测序仪上进行,由华大基因上海鼎安生物科技公司完成。在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)及斯坦福大学测序数据库(<http://www.-sequence.stanford.edu/group/candida>)中进行序列同源性比对。

1.9 半定量 RT-PCR

根据测序及同源性比对结果,得到 3 个明显差异片段,分别与数据库中白色念珠菌的醇脱氢酶基因 ADH1、多药耐药基因 CDR1 及拓扑异构酶基因 TOP2 有高度同源性。设计引物(表 1)作 ADH1、CDR1、MDR1(已知氟康唑耐药基因)、ACT1(看家基因)的半定量 RT-PCR 扩增。其中 ADH1 引物采用 Primer3 软件设计,CDR1、MDR1、ACT1 引物序列引自参考文献^[12]。

扩增分管进行,各作 25、28、32 个循环。反应模板除同时制备的实验组、对照组 1、对照组 2 的 cDNA 外,另加同样条件下制备的在无药 YEPD 液基中生长的白色念珠菌 ATCC90028(简称 90028 组, Group 90028)的 cDNA,各组 cDNA 合成方法同 1.5.1。 $50\mu\text{L}$ 反应体系:10 × buffer $5\mu\text{L}$, 5mmol/L dNTP $2\mu\text{L}$, $20\mu\text{mol/L}$ primer 各 $1\mu\text{L}$, $5\text{U}/\mu\text{L}$ Taq 酶 $0.25\mu\text{L}$, ddH₂O

显示:ADH1、CDR1 在实验组中的表达高于两个对照组及 90028 组;同时 ADH1、CDR1 在对照组 1 中的表达介于实验组与对照组 2 之间,与杂交结果相符;435 在无药 YEPD 液基中有 MDR1 表达,而 435-2 在含药及无药培养组均无明显表达,90028 在无药培养基中也未见表达 MDR1。所有半定量 RT 均重复两次以上。结果表明(图 4),其中 ADH1/ACT1 扫描信号相对值为 0.41(435) 0.60(435-2) 0.856(435-2') 0.42(90028);CDR1/ACT1:0.06(435) 0.09(435-2) 0.12(435-2') 0.017(90028);MDR1/ACT1 0.17(435)。

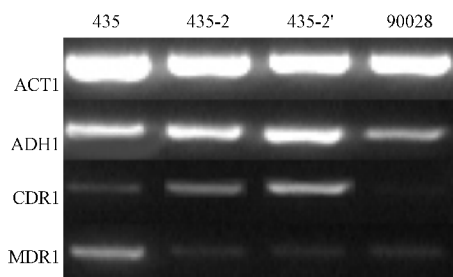


图 4 ADH1、CDR1、MDR1 半定量 RT-PCR 电泳图

Fig.4 Semi-quantitative RT-PCR analysis of ADH1、CDR1、MDR1

435. Control group 2 ;435-2. Control group 1 ; 435-2'. Research group ; 90028. Group 90028.

3 讨论

白色念珠菌是无性繁殖,研究耐药机制及相关生物学特性的可靠方法是配对比较同一遗传来源的敏感及耐药菌株。本实验采用差异显示 PCR 技术比较了白色念珠菌氟康唑敏感母本与其诱导产生的耐药子代在无药、含药培养条件下的基因表达差异,我们发现,多药耐药基因 CDR1、醇脱氢酶基因 ADH1 的表达增加与氟康唑耐药表型有关。

ADH1 是本研究首次报道的新的白色念珠菌氟康唑耐药相关基因,在国外耐药研究中也有短链醇脱氢酶基因 ADH4 与氟康唑耐药有相关性的报道^[5]。ADH1 编码的蛋白有 350 个氨基酸,属于脱氢酶/氧化还原酶大家族,这类蛋白在氧代谢应激中对细胞有保护作用。由于唑类药物作用于固醇合成途径中的靶酶的同时抑制细胞色素 P450,使得真菌细胞对氧代谢敏感,因而 ADH1 基因的表达增高可能有利于耐药的发生^[13]。本实验的结果提示该基因的表达增加可能是一新的耐药机制。另外,本研究显示 ADH1 的表达程度与药物存在有关,由此可以推测,念珠菌对环境药物信号可能存在一定的反应机制,可以作进一步研究。

CDR1 是一已知的多药耐药基因,其编码的跨

膜蛋白(Cdr1p)参与白色念珠菌细胞内三唑类药物的主动外排而导致菌株耐药。既往研究发现 CDR1 基因的表达水平与菌株对三唑类的耐药水平密切相关^[14]。其他研究者在 CDR1 的启动子区域发现一特殊的药物反应元件(Drug response element, DRE),认为耐药株的 CDR1 的高表达与转录调控因子有关^[3]。本研究证实了 CDR1 基因的高表达与氟康唑耐药的相关性,但也发现药物存在与否与 CDR1 表达程度有关,这涉及到耐药表型的稳定性^[15]。另外,由于 ADH1 的表达程度也与药物存在有关,因而提示 ADH1 与 CDR1 的表达可能存在某种共同的调节通路,已引起我们的关注。

MDR1 是另一已知的编码外排泵蛋白的多药耐药基因。既往研究显示 MDR1 在氟康唑耐药株中专一性表达,在氟康唑敏感株中不表达或微量表达^[16]。本研究特异增加了 MDR1 的半定量 RT-PCR 分析,结果发现氟康唑敏感株 435 在无药 YEPD 液基中有 MDR1 表达,而其耐药子代 435-2 在含药及无药培养组均无明显 MDR1 表达,提示 MDR1 的表达可能在氟康唑敏感株或其它唑类耐药株中也存在。

DD-PCR 技术属于“开放的”差异基因表达技术(DGE),在探索性的功能基因组前沿领域应用较多。本实验采用 DD-PCR 在白色念珠菌氟康唑耐药基因的研究不仅有念珠菌研究方法学的意义,新发现的可能的耐药机制的深入研究还将会对临床治疗、诊断及新药研制有一定启示。

参考文献

- [1] Fichtenbaum C J, Powderly W G. Refractory mucosal candidiasis in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis*, 1998, **26**(3): 556-565.
- [2] Lyons C N, White T C. Transcriptional analyses of antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, **44**(9): 2296-2303.
- [3] De Micheli M, Bille J, Schueller C, et al. A common drug-responsive element mediates the upregulation of the *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2, two genes involved in antifungal drug resistance. *Mol Microbiol*, 2002, **43**(5): 1197-1214.
- [4] Wirsching S, Michel S, Köhler G, et al. Activation of the multiple drug resistance gene MDR1 in fluconazole-resistant, clinical *Candida albicans* strains is caused by mutations in a trans-regulatory factor. *J Bacteriol*, 2000, **182**(2): 400-404.
- [5] Rogers P D, Barker K S. Genome-wide expression profile analysis reveals coordinately regulated genes associated with stepwise acquisition of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, **47**(4): 1220-1227.

- [6] 李 季 梅卓贤. 生殖器官念珠菌病的菌种及药敏分析. 实用妇产科杂志 2000 ,16(4) :192 - 193 .
- [7] Mathema B , Cross E , Dun E , *et al* . Prevalence of vaginal colonization by drug-resistant *Candida* species in college-age women with previous exposure to over-the-counter azole antifungal. *Clin-Infect-Dis* , 2001 , 33(5) :23 - 27 .
- [8] Pinjon E , Derek S , Salkin I , *et al* . Simple , inexpensive reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* . *J Clin Microbiol* , 1998 , 36(7) :2093 - 2095 .
- [9] 孙长贵 张丽君 曾贤铭 , 等 . 微量稀释法测定抗真菌剂对酵母菌 MIC 的评价. 临床检验杂志 2000 ,18(6) :331 - 332 .
- [10] Barchiesi F , Calabrese D , Sanglard D , *et al* . Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC750. *Antimicrob Agents Chemother* , 2000 , 44(6) :1578 - 1584 .
- [11] Ausubel F M , Brent R , Kingston R E , *et al* . 精编分子生物学实验指南. 颜子颖 王海林 , 译. 北京 : 科学出版社 , 1998 :524 - 525 .
- [12] Henry K W , Nickels J T , Edlind T D . Upregulation of ERG genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2000 ,44(10) :2693 - 2700 .
- [13] Cowen L E , Nantel A , Whiteway M S , *et al* . Population genomics of drug resistance in *Candida albicans* . *PNAS* 2002 , 99(14) :9284 - 9289 .
- [14] Nakamura K , Niimi M , Niimi k , *et al* . Functional expression of *Candida albicans* drug efflux pump Cdr1p in *Saccharomyces cerevisiae* strain deficient in membrane transporters. *Antimicrob Agents Chemother* , 2001 , 45(12) :3366 - 3374 .
- [15] Schuetzer-Muehlbauer M , Willinger B , Egner R , *et al* . Reversal of antifungal resistance mediated by ABC efflux pumps from *Candida albicans* functionally expressed in yeast. *Int J Antimicrob Agents* , 2003 , 22(3) :291 - 300 .
- [16] Lyons C N , White T C . Transcriptional analyses of antifungal drug resistance in *Candida albicans* . *Antimicrob Agents Chemother* , 2000 , 44(9) :2296 - 2303 .

Identification of Genes Related to Fluconazole Resistance in *Candida albicans* by Differential Display-PCR

ZHU Yu-Ning LU Shi-Ming*

(Women 's Hospital , School of Medicine , Zhejiang University , Hangzhou 310006 , China)

Abstract : Differential Display-PCR technique(DD-PCR) was employed to identify genes related to fluconazole resistance in *Candida albicans* . One fluconazole susceptible *Candida albicans* isolate 435(resistant to miconazole) from vagina was inducted to resist the drug by culturing in YEPD broth with increasing fluconazole concentration in vitro . The resistant isolate 435-2(MIC = 128 μ g/mL) appeared after being incubated for 80 days . There were three groups in this experiment : 435-2 cultured in YEPD broth with 64 μ g/mL fluconazole as Research group ; 435-2 cultured in YEPD broth without fluconazole as Control group 1 ; 435 cultured in YEPD broth without fluconazole as Control group 2 . Comparisons were done with DD-PCR in gene expressions among the three groups . Three differentially displayed bands were found which showed high homogeneity to alcohol dehydrogenase 1 (ADH1) , TOP2 and CDR1 genes of *C. albicans* respectively . The up-regulated expression of ADH1 and CDR1 associated with fluconazole resistance was further confirmed by RT-PCR . MDR1 that was known for its expression in fluconazole resistant isolate was now found down-regulated in 435-2 cultured either in the presence or in the absence of fluconazole . These results indicated that the up-regulated expression of ADH1 and CDR1 was associated with fluconazole resistance . ADH1 was possibly a novel fluconazole resistant gene . The expression of MDR1 may exist either in fluconazole susceptible isolate or in other azoles resistant isolates .

Key words : *Candida albicans* , Fluconazole , Drug resistance , Differential display-PCR