

• 基础实验研究论著 •

白色念珠菌体外生物膜形成与基因分型关系的研究

阳 隽¹, 张天托², 朱家馨²

(1. 广州医学院第二附属医院呼吸内科, 广州 510260; 2. 中山大学第三附属医院呼吸内科, 广州 510630)

摘要: 目的 探讨白色念珠菌临床分离株体外生物膜形成与基因分型的可能关系。方法 选取 52 株呼吸道白色念珠菌分离株体外黏附生长 24 h, 用 XTT 减低法测定其增殖情况。采用重复序列 PCR 指纹技术分析白色念珠菌菌株基因类型, 并进行聚类分析。结果 根据黏附生长的白色念珠菌增殖情况, 有 26 株临床株形成生物膜能力“高”, 其余菌株形成生物膜能力“低”。实验菌株的遗传相似系数为 0.79 ± 0.13 , 生物膜形成能力“高”及生物膜形成能力“低”的菌株间相似系数分别为 0.8 ± 0.14 和 0.81 ± 0.12 。结论 呼吸道白色念珠菌分离株的亲缘关系较近, 但生物膜形成能力形似的菌株间未出现基因型聚集。

关键词: 念珠菌, 白色; 生物膜; 聚合酶链反应; 基因型

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.13.002

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2012)13-1539-03

In vitro formation of biofilm by *Candida albicans* and its relationship with genotypeYang Jun¹, Zhang Tiantuo², Zhu Jiaxin²

(1. Department of Respiratory Medicine, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510260, China; 2. Department of Respiratory Medicine, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510630, China)

Abstract: Objective To study the relationship between in vitro formation of biofilm by *Candida albicans* (*C. albicans*) isolates and genotypes. **Methods** 52 strains of *C. albicans* isolated from respiratory tract were isolated and incubated for 24 h. The metabolic activities of cells within biofilm were measured by XTT-reduction assay. The genetic similarities of isolates were assessed by rep-polymerase chain reaction (rep-PCR) and analyzed by cluster analysis. **Results** 26 *C. albicans* isolates were with high performance of biofilm formation. Similarity coefficient of tested strains was 0.79 ± 0.13 . Similarity coefficient of isolates with high or low performance of biofilm formation were 0.8 ± 0.14 and 0.81 ± 0.12 respectively. **Conclusion** The relationship among *C. albicans* isolates from respiratory tract might be close. The isolates with similar ability to form biofilm might be without cluster of genotypes.

Key words: *Candida albicans*; biofilm; polymerase chain reaction; genotype

白色念珠菌是真菌感染最常见的病原体, 免疫功能受损的患者易出现下呼吸道白色念珠菌的定植感染, 白色念珠菌定植可致患者局部防御功能下降, 于机械通气的患者则发生铜绿假单胞菌感染的机会增加, 抗真菌治疗可有效减少此类感染的发生^[1]。生物膜形成是白色念珠菌定植感染的重要形式, 并具有对多种抗真菌药物高度耐药的特点, 是临床治疗的难点。不同白色念珠菌菌株形成生物膜的能力不一致, 而目前关于呼吸道白色念珠菌临床株生物膜形成、生物膜形成与菌株基因型关系的研究缺如。本研究选用从临床患者呼吸道标本分离的白色念珠菌 52 株, 探讨菌株来源、生物膜表型及其与基因分型的关系, 为临床防治呼吸道白色念珠菌相关感染提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 材料 白色念珠菌临床分离株均来自中山大学第三附属医院呼吸实验室收集的临床痰液标本, 实验共收集临床菌株 52 株, 来自不同的患者, 其中 45 株菌来源于呼吸内科病区, 余 7 株菌分别来源于肾内科、血液内科及外科等病区。

1.2 仪器与试剂 仪器: BIO-TEK 全自动酶标仪, 美国; AB GeneAmp System 2700 型 PCR 仪, 美国; ELX800GelDoc-200 凝胶成像系统, 美国 UVP 公司。试剂: 科玛嘉念珠菌显色培养板, 法国 CHROMagar 公司; RPMI1640 培养基, Gibco 公司; 3,3'-[1-(苯氨基)-3,4-四氮唑]-二(4-甲氧基-6-硝基)苯磺酸钠(XTT 钠盐), Sigma 公司; 甲萘醌, Sigma 公司; 酵母基因组

DNA 提取试剂盒, 北京天根生化科技有限公司; SYBR Green I 荧光定量试剂盒, TaKaRa 公司。白色念珠菌标准株为中山大学第三附属医院呼吸实验室保存的 ATCC 90028 及 ATCC 64550。

1.3 方法

1.3.1 受试菌株的鉴定与保存 常规分离的临床标本接种于 5% 羊血培养基分纯, 经科玛嘉念珠菌显色培养基鉴定, 挑取分纯的白色念珠菌单个菌落接种于酵母浸出粉胨葡萄糖培养基 (YPD 培养基) 中震荡培养过夜, 取菌液 800 μ L 与灭菌甘油 200 μ L 充分混匀, 放置于 -70°C 冰箱保存备用。

1.3.2 白色念珠菌体外生物膜形成及增殖活性测定 取出冻存的白色念珠菌菌株接种于 SD 琼脂平板 37°C 培养 24 h, 挑取白色念珠菌单个菌落接种于 YPD 培养基, 30°C 150 r/min 震荡培养 24 h, 离心收集菌体, PBS 缓冲液漂洗 2 次, 加入 RPMI1640 培养基(内含三氮吗啡啉丙磺酸 34.53 g/L, pH7.0), 调节菌液浓度为 1×10^6 /L。按 100 微升/孔接种于 96 孔细胞培养板, 每株菌设置 4 复孔。置于 CO_2 恒温培养箱中 37°C 培养 24 h, PBS 漂洗 2 次, 洗去未黏附菌细胞, 采用 XTT 减低法测定菌细胞增殖, 每孔加入四唑氮衍生物 XTT(0.5/L)/甲萘醌(1 μ mol/L) 100 μ L, 37°C 避光孵育 2 h, 酶标仪 490 nm 测定各孔的吸光度, 以上实验均重复 3 次。

1.3.3 白色念珠菌基因组 DNA 提取及 PCR 扩增 挑取白色

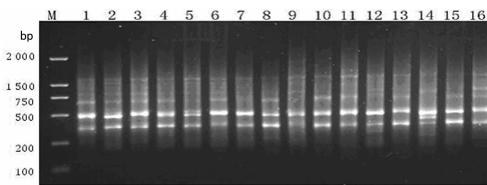
念珠菌菌株于 YPD 培养基中 30 ℃,150 r/min 震荡培养 24 h, 取 0.5 mL 菌液 12 000 r/min 离心 1 min, 收集菌体, 吸出 YPD 培养液, 采用酵母基因组 DNA 提取试剂盒, 操作按说明书进行, 提取的白色念珠菌基因组 DNA, 稀释后置于紫外光分光光度计 260 nm 比色鉴定其纯度及浓度。参照文献[2]选用¹²⁵I 作为重复序列 PCR(rep-PCR)的引物, 引物¹²⁵I 为一重复核苷酸序列 5'-TGG GTG TGT GGG TGT GTG GGG TGT G-3', 由上海英骏生物技术有限公司合成。PCR 反应体系: PCR Premix 25 μL, 白色念珠菌 DNA 模板 5 μL, 引物 2.5 μL, 双蒸水 17.5 μL, PCR 反应终体积 50 μL, PCR 反应参数: 94 ℃ 预变性 3 min, 94 ℃ 变性 1 min, 52 ℃ 退火 2 min, 72 ℃ 延伸 3 min, 共 40 循环, 最后 72 ℃ 延伸 10 min。

1.3.4 结果分析 取 PCR 产物 10 μL 在含 0.5 μg/mL 溴乙啶的 1.2% 琼脂糖中电泳后, 用 GelDoc-200 凝胶成像系统紫外拍照并分析电泳条带, 根据 54 株白色念珠菌电泳图谱条带的有无分别赋值 1 和 0, 条带有计为“1”, 条带无计为“0”, 并转换为数据矩阵。

1.4 统计学处理 将数据矩阵输入 NTSYS-pc2.10e 分析软件, 计算菌株间遗传相似系数(SAB), SAB 值越大, 说明两者的亲缘关系越近, 采用 UPGMA 统计方法进行聚类分析, 并构建系统树状图。

2 结 果

2.1 体外生物膜形成菌细胞增殖测定结果 标准株 ATCC 90028、ATCC 64550 及 52 株白色念珠菌临床分离株体外形成生物膜, 采用 XTT 减低法检测菌细胞增殖, 于酶标仪 490 nm 测定各孔的吸光度, A490 值与黏附生长的活细胞数量呈正相关, 结果显示不同菌株 A490 值存在差异, 提示不同菌株黏附生长的菌细胞数量不一, 计算 54 株菌 A490 值的几何均数为 0.496, 以菌株 A490 值高于或低于几何均数为界, 区分白色念珠菌生物膜形成能力的高低^[3], 形成生物膜能力“高”的菌株有 26 株(菌株的编号为 ATCC 13822、ATCC 13860、ATCC 13874、ATCC 13879、ATCC 14129、ATCC 14199、ATCC 14215、ATCC 14263、ATCC 14985、ATCC 14361、ATCC 14371、ATCC 14533、ATCC 14638、ATCC 14811、ATCC 14813、ATCC 15007、ATCC 15086、ATCC 15157、ATCC 15375、ATCC 15538、ATCC 15694、ATCC 15738、ATCC 15860、ATCC 15863、ATCC 16288、ATCC 16335), 标准株 ATCC 90028、ATCC 64550 及其他临床分离株形成生物膜能力“低”。

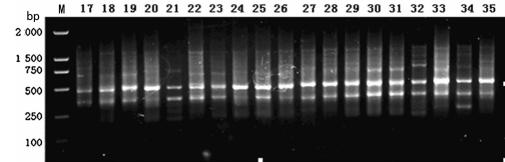


M: DNA 分子标志物; 1: ATCC 64550; 2: ATCC 15004; 3: ATCC 13822; 4: ATCC 13856; 5: ATCC 13860; 6: ATCC 13872; 7: ATCC 13879; 8: ATCC 14127; 9: ATCC 14129; 10: ATCC 14215; 11: ATCC 16029; 12: ATCC 14386; 13: ATCC 14361; 14: ATCC 14533; 15: ATCC 14577; 16: ATCC 14638。

图 1 16 株白色念珠菌 rep-PCR 指纹图谱

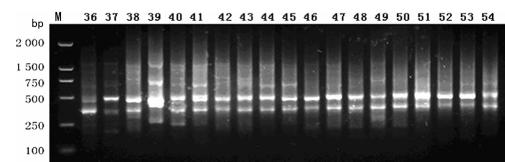
2.2 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图谱 琼脂糖凝胶电泳

可见用重复序列引物¹²⁵I 扩增白色念珠菌基因组 DNA, PCR 产物电泳带型稳定, 得到的 DNA 多态性丰富, 结果明确。扩增片段长度 200~1 600 bp, 多数菌株能扩增出 4~6 条带, 最多达 10 条带, 所有白色念珠菌菌株基因组均能扩增出 400、500 bp 附近的 2 条带, 见图 1~3。



M: DNA 分子标志物; 17: ATCC 15968; 18: ATCC 16614; 19: ATCC 15993; 20: ATCC 16007; 21: ATCC 15374; 22: ATCC 15346; 23: ATCC 15086; 24: ATCC 90028; 25: ATCC 14985; 26: ATCC 14117; 27: ATCC 14199; 28: ATCC 14263; 29: ATCC 14371; 30: ATCC 15538; 31: ATCC 16335; 32: ATCC 14813; 33: ATCC 14567; 34: ATCC 15148; 35: ATCC 13874。

图 2 19 株白色念珠菌 rep-PCR 指纹图谱



M: DNA 分子标志物; 36: ATCC 15007; 37: ATCC 15097; 38: ATCC 15101; 39: ATCC 15157; 40: ATCC 15222; 41: ATCC 15375; 42: ATCC 15545; 43: ATCC 15582; 44: ATCC 15694; 45: ATCC 15700; 46: ATCC 15729; 47: ATCC 15738; 48: ATCC 15860; 49: ATCC 15863; 50: ATCC 15887; 51: ATCC 15881; 52: ATCC 16288; 53: ATCC 14811; 54: ATCC 14908。

图 3 19 株白色念珠菌 rep-PCR 指纹图谱

2.3 聚类分析结果 54 株白色念珠菌的遗传相似系数为 0.79 ± 0.13 , 以相关系数 0.80 为阈值将白色念珠菌分为 7 个基因型, 其中 I 型有 36 株, II 型 9 株, IV 型 4 株, VI 型 2 株, III、V 及 VII 型各 1 株。52 株白色念珠菌临床分离株中 I 型基因型菌株为 34 株, 占 65.4%, 提示从患者痰液标本中分离的白色念珠菌临床株基因同源性较高。多数临床株来源于呼吸内科病区, 而从外科等其他病区来源的菌株基因型分别为 I、II、VI 型, 计算其相似系数为 0.81 ± 0.16 。比较白色念珠菌生物膜表型不同的菌株, 生物膜形成能力“高”的菌株相似系数为 0.80 ± 0.14 , 生物膜形成能力“低”的菌株相似系数为 0.81 ± 0.12 , 提示未出现基因多样性的减弱, 即未出现基因型聚集。

3 讨 论

近年来, 白色念珠菌感染患者呈逐年增加趋势^[4-5], 了解白色念珠菌临床株的表型特征如耐药性、致病性等的差异与基因分型的关系, 对白色念珠菌相关感染的防治具有重要意义。本研究选用 rep-PCR 指纹分析技术对 52 株白色念珠菌临床株进行了基因分型, rep-PCR 技术的原理基于真菌基因组中分布的一类短的基因外重复序列, 类似于细菌基因组中发现的基因间重复共有序列、插入序列等, rep-PCR 技术实验方法简单, 能产生重复性较好、具有种或菌株特异性的 DNA 指纹图谱^[6], 可对白色念珠菌进行种内分型^[7-8]。

实验结果显示,52 株白色念珠菌临床分离株及 2 株标准株的遗传为相似系数 0.79 ± 0.13 , 以相似系数大于或等于 0.8 为判定基因同源性阈值^[7], 临床株中有约 65.4% 的菌株基因型相同, 提示从患者呼吸道分离的白色念珠菌临床株基因同源性较高, 亲缘关系较近。既往研究也认为, 在人体定植感染的白色念珠菌有基因型聚集的现象, 考虑与特定基因型白色念珠菌黏附致病力强相关^[9-10]。而来源于外科等不同病区的 7 株白色念珠菌分离株相似系数为 0.81 ± 0.16 , 未出现基因多态性增高的现象, 考虑菌株来源并未影响菌株基因的多态性分布, 而本实验不同来源的菌株较少也可能影响实验结果。

生物膜是白色念珠菌的毒力因子之一, 能形成生物膜的菌株毒力更强, 实验所用的临床分离株生物膜表型存在差异, 其中有 26 株菌生物膜形成能力“高”, 结合基因分型的结果, 发现生物膜形成能力“高”的白色念珠菌菌株可为多种基因类型, 除 V 型外, 其他基因型均包含生物膜形成能力“高”的菌株。而同一基因型的菌株形成生物膜的表型存在差异, 如 I 型中有一半的菌株生物膜形成能力“高”, 而另一半菌株生物膜形成能力“低”。计算生物膜形成能力“高”的菌株相似系数为 0.8 ± 0.14 , 生物膜形成能力“低”的菌株相似系数为 0.81 ± 0.12 , 而所有菌株的相似系数为 0.79 ± 0.13 , 提示生物膜形成能力相似的菌株间未出现基因型聚集, 基因多样性减弱的现象, 即根据白色念珠菌分离株 rep-PCR 基因分型并不能预测其生物膜表型。Durán 等^[11]用 RAPD 的方法也未发现与生物膜形成相关的基因型, 但另有研究则显示特定基因型的白色念珠菌菌株生物膜形成能力“高”, 提示基因型与生物膜形成相关^[12], 考虑相关实验结果存在差异, 可能与实验方法及实验检测的基因位点不同有关。因此, 深入研究与生物膜形成相关的基因表达调控机制, 寻找可能预测生物膜形成的基因分型方法, 将有利于防治白色念珠菌生物膜形成所致的定植感染。

参考文献

[1] Nseir S, Jozefowicz E, Cavestri B, et al. Impact of antifungal treatment on *Candida*-*Pseudomonas* interaction: a preliminary retrospective case-control study[J]. Intensive Care Med, 2007, 33(1): 137-142.

[2] Bartie KL, Williams DW, Wilson MJ, et al. PCR fingerprinting of *Candida* albicans associated with chronic hyperplastic candidosis and other oral conditions[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(11): 4066-4075.

[3] Jain N, Kohli R, Cook E, et al. Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(6): 1697-1703.

[4] 李洪利. 真菌感染临床分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(1): 87-88.

[5] 平竹仙, 李丰良. 临床真菌检测及耐药性动态变化特征及分析[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(12): 1380-1381.

[6] 项明洁, 刘锦燕, 倪培华, 等. 重复序列 PCR(rep-PCR)指纹分析技术在病原真菌鉴定和分型中的应用[J]. 中国真菌学杂志, 2010, 5(6): 376-380.

[7] Wise MG, Healy M, Reece K, et al. Species identification and strain differentiation of clinical *Candida* isolates using the diverse lab system of automated repetitive sequence-based PCR[J]. J Med Microbiol, 2007, 56(Pt 6): 778-787.

[8] Abaci O, Haliki-Uzhan A, Ozturk B, et al. Molecular typing of *Candida* albicans strains isolated from denture wearers by repetitive sequence-based PCR[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2011, 30(2): 141-149.

[9] Giblin L, Edelmann A, Zhang N, et al. A DNA polymorphism specific to *Candida* albicans strains exceptionally successful as human pathogens[J]. Gene, 2001, 272(1/2): 157-164.

[10] Schmid J, Tortorano AM, Jones G, et al. Increased mortality in young candidemia patients associated with presence of a *Candida* albicans general-purpose genotype[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(9): 3250-3256.

[11] Durán EL, Mujica MT, Jewtuchowicz VM, et al. Examination of the genetic variability among biofilm-forming *Candida* albicans clinical isolates[J]. Rev Iberoam Micol, 2007, 24(4): 268-271.

[12] Borecká-Melksová S, Bujdáková H. Variation of cell surface hydrophobicity and biofilm formation among genotypes of *Candida* albicans and *Candida* dubliniensis under antifungal treatment[J]. Can J Microbiol, 2008, 54(9): 718-724.

(收稿日期: 2012-01-12)

(上接第 1538 页)

[7] 赵龙华, 杨维青. 细菌群集运动与生物被膜和耐药性的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(1): 1986-1988.

[8] 刘忠泉, 佴静, 朱雪薇. 噬菌体变色法检测结核分枝杆菌[J]. 中国热带医学, 2010, 10(3): 367-388.

[9] 武英. 应对耐药菌的新方法——噬菌体制剂[J]. 国外医药抗生素分册, 2011, 32(5): 223-228.

[10] 毕波, 周慧敏, 杨平, 等. 微生态制剂局部给药加速残余创面愈合

临床研究[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2011, 25(3): 232-234.

[11] 马珍, 谢三星. 炭疽杆菌与类炭疽杆菌鉴别技术的研究进展[J]. 肉品卫生, 1994, 3: 27-28.

[12] Lyndsay R, Peter G, Agron, et al. Genome differences that distinguish *Bacillus* anthracis from *Bacillus* cereus and *Bacillus* thuringiensis[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(5): 2755-2764.

(收稿日期: 2011-10-20)