

• 论 著 •

生殖道白色念珠菌耐吡咯类药物的基因表达^{*}

罗妙玲¹, 徐韞健^{2△}, 李倩珺²

(1. 海珠区第一人民医院检验科, 广东广州 510220; 2. 广州医科大学附属第一医院检验科, 广东广州 510120)

摘要:目的 了解生殖道白色念珠菌耐吡咯类药物基因的表达情况。方法 收集真菌性阴道炎患者分泌物标本 93 份, 分离白色念珠菌后用纸片扩散法进行药敏试验, 裂解法提取白色念珠菌的吡咯类药物耐药株和敏感株的总 RNA, 逆转录为 cDNA, 采用实时荧光定量 PCR 技术检测白色念珠菌多药耐药基因 CDR1、CDR2、MDR1 的表达情况。结果 共培养出 59 株白色念珠菌, 18 株热带念珠菌, 10 株克柔念珠菌, 6 株光滑念珠菌; 白念珠菌中 37 株对氟康唑、酮康唑、咪康唑不同程度耐药, 耐药率分别为 16.7%、18.3%、51.7%; 白念珠菌耐药株 CDR1 基因的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 为 1.46 ± 0.24 , 敏感株为 1.09 ± 0.27 , 两组比较, 差异有统计学意义 ($t = -4.22, P = 0.001$); CDR2 及 MDR1 基因的表达差异均无统计学意义 ($P = 0.170, P = 0.800$)。结论 白色念珠菌耐药机制较为复杂, 可能与 CDR1 高表达有关, CDR2 和 MDR1 表达与耐药性的关系有待进一步研究。

关键词: 生殖道; 白色念珠菌; 基因表达; 吡咯类药物

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.06.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)06-0721-03

Expression of pyrrole drugs resistance genes in Candida albicans from genital tract^{*}

Luo Miaoling¹, Xu Yunjian^{2△}, Li Qianjun¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Haizhu District First People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 510220, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

Abstract: **Objective** To explore the expression of resistance genes in pyrrole resistant Candida albicans from genital tract. **Methods** The Candida albicans were isolated from the vaginal secretions of 93 vaginitis patients, and Kirby-Bauer method was performed for preliminary culture of strains resistant. The total RNA was extracted from pyrrole-resistant and susceptible Candida albicans isolated by pyrolysis method and cDNA was synthesized. The expression of CDR1, CDR2, MDR1 genes was then detected by Real-time quantitative PCR. **Results** A total of 59 strains of Candida albicans, 18 strains of Candida tropicalis, 10 strains of Candida krusei and 6 strains of Candida glabrata were cultured. 37 strains of Candida albicans were resistant to fluconazole, ketoconazole, and miconazole at different degrees, and the drug resistance rates were 16.7%, 18.3%, 51.7%; CDR1 gene's $2^{-\Delta\Delta Ct}$ in sensitive strains group was 1.09 ± 0.27 , while resistant strains group was 1.46 ± 0.24 , there was significant difference between two groups ($t = -4.22, P = 0.001$). There was no significant difference in the expression of CDR2 and MDR1 genes between the sensitive and resistant strains ($P = 0.170, P = 0.800$). **Conclusion** The drug resistance of Candida albicans mechanism is complicated, it might be associated with high CDR1 expression, the relationship between CDR2, MDR1 expression and multidrug resistance needs further study.

Key words: genital tract; Candida albicans; genes expression; pyrrole drugs

外阴阴道念珠菌病(VVC)是一种由念珠菌引起的阴道黏膜真菌性感染, 近年来发病率有明显上升的趋势^[1]。由于吡咯类药物, 如酮康唑、氟康唑、咪康唑等具有抗菌谱广、不良反应少等优点, 已成为临床治疗真菌感染的首选药物, 然而, 近年来吡咯类药物的大量应用导致耐药性越来越严重。念珠菌的耐药机制主要有麦角甾醇合成通路中关键靶酶的变化造成膜成分的改变, 生物被膜的形成, 编码药物外排泵的基因表达增加, 细胞膜对药物通透性改变等^[2]。其中外排基因 CDR1、CDR2、MDR1 过度表达是产生耐药的主要原因。因此, 本文就门诊患者阴道分泌物中分离的白色念珠菌对吡咯类药物相关耐药基因的表达进行研究, 从分子水平了解耐药机制, 以期为临床治疗提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2015 年 1~2 月广州市海珠区第一人民医院与广州医科大学附属第一医院妇科门诊就诊的真菌性阴道炎患者 93 例, 年龄 20~45 岁, 均有典型的豆腐渣样白带和外阴瘙痒等症状, 留取阴道分泌物标本, 直接革兰染色镜检发现菌丝或孢子。

1.2 仪器与试剂 Total RNA 提取试剂、PCR 检测试剂及 DNA 标记物均购自大连宝生物工程有限公司; 金星 TaqMan 预混体系试剂购自上海生工生物技术有限公司; 沙氏培养基和真菌药敏培养基购自法国梅里埃生物公司; 氟康唑(15 μg)、酮康唑(15 μg)和咪康唑(10 μg)药敏纸片购自丹麦 Rosco 公司; Vitek-2 Compact 细菌鉴定仪购自法国生物梅里埃公司; CFX

^{*} 基金项目: 广东省临床重点专科建设项目(2013)。 作者简介: 罗妙玲, 女, 主管技师, 主要从事临床检验技术研究。 △ 通讯作者, E-mail: vinkent@126.com。

96 荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 引物及探针设计 参考 GenBank 设计 CDR1、CDR2、MDR1 和内参基因的引物,由上海生工生物技术有限公司合成,引物及探针序列见表 1。

表 1 引物及探针序列		
基因	序列(5'~3')	长度 (bp)
MDR1	上游:TGC TGC TAC TAC TGC TTC TGG	223
	下游:GAT GAA ACC CAA CAC GGA AC	
	探针:TGC TTC AGT GTT CCC ATT ATT TGG TGC	27
CDR1	上游:TGC CAA GAA CTG CTC AAG AA	218
	下游:TCT CGC AAC ACC ATA CCT CA	
	探针:ACG ATC CAA CAC CAG GGA AAC TTA TCG T	28
CDR2	上游:TAT TTC CGA GGT GGA GCA CT	134
	下游:GCA GAT GGA CGA TAA AGA GCA	
	探针:TCG CTT TAT GAA GCT AGA CCA ATT GTG GA29	
内参	上游:GCC GGT GAC GAC GCT CCA AGA GCT G	157
	下游:CCG TGT TCA ATT GGG TAT CTC AAG GTC	
	探针:TCA AGG TAT CAT GGT TGG TAT GGG TCA A	28

1.4 方法

1.4.1 真菌培养和药敏试验 将分泌物转接到沙氏琼脂培养基平板上培养 72 h,有菌落生长者涂片做革兰染色,镜下观察为念珠菌者,接种至科马嘉念珠菌显色培养基上,48 h 后观察颜色,判别菌种,无法鉴定者通过 Vitek-2 Compact 细菌鉴定仪鉴定。对菌株进行纸片扩散(K-B)法药敏试验,置于温箱 37℃培养 24 h 后测量抑菌圈,依据表 2 标准判断药敏情况。

表 2 吡咯类药物抑菌环直径的判断标准(mm)			
抗菌药物	敏感	中介	耐药
酮康唑	≥30	23~29	≤22
氟康唑	≥21	15~21	≤14
咪康唑	≥20	13~19	≤12

1.4.2 总 RNA 的抽提 液氮裂解白色念珠菌的细胞壁,用氯仿和异丙醇提取总 RNA,用超微量紫外分光光度计测定总 RNA 样品纯度及浓度。

1.4.3 逆转录和实时荧光定量 PCR 扩增 逆转录体系:PrimeScript RT 标记混合液 2 μL,总 RNA(根据浓度确定加入量,10 μL 体系最大使用 500 ng),RNase Free dH₂O 加至 10 μL;反应条件:37℃ 15 min,85℃ 5 s。实时荧光定量 PCR 扩增体系:PCR mix 12.5 μL,上游引物 0.5 μL,下游引物 0.5 μL,RNase Free dH₂O 10 μL,探针 0.5 μL,cDNA 1 μL。发光基团为 5'-FAM,淬灭基团为 TAMRA。扩增程序:预变性 95℃ 10 min,变性 95℃ 15 s,退火/延伸 60℃ 1 min,40 个循环。计算方法如下:目的基因相对表达量=2^{-△△Ct},△△Ct=目的基因的 Ct 值-内参基因的 Ct 值。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据处理及统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养及鉴定结果 93 例女性的阴道分泌物均培养出念珠菌,其中 59 株为白色念珠菌,占 63.4%,18 株为热带念珠菌,10 株为克柔念珠菌,6 株为光滑念珠菌。

2.2 吡咯类药敏试验结果 59 株白色念珠菌菌株经过药敏试验后,其中 37 株对咪康唑、酮康唑、氟康唑中一种或以上药物耐药,耐药率分别为 51.7%、18.3%、16.7%,37 株纳入耐药组。从敏感株中选取 10 株纳入敏感组。

2.3 CDR1、CDR2 及 MDR1 的表达水平 实时荧光定量 PCR 检测到各基因的 Ct 值,经计算,耐药组 CDR1 基因 2^{-△△Ct} 值明显高于敏感株组,差异有统计学意义(*P*=0.001);而 CDR2 和 MDR1 基因 2^{-△△Ct} 值在耐药组与敏感组中的差异均无统计学意义(*P*=0.170,*P*=0.800),见表 3。

表 3 耐药组和敏感组基因 2 ^{-△△Ct} 比较($\bar{x} \pm s$)				
基因	耐药组(<i>n</i> =37)	敏感组(<i>n</i> =10)	<i>t</i>	<i>P</i>
CDR1	1.46±0.24	1.09±0.27	-4.22	0.001
CDR2	1.34±0.21	1.27±0.15	-1.41	0.170
MDR1	1.00±0.78	1.07±0.79	-0.25	0.800

3 讨论

白色念珠菌对吡咯类药物耐药主要有以下三条途径:药物作用靶位的变化;外排泵基因如 CDR1、CDR2、MDR1 的过度表达,细胞对药物的主动外排,减少了唑类抗真菌药物在胞体内的累积;细胞膜对药物通透性改变,使细胞摄取和积聚药物的量降低^[3-4]。其中,白色念珠菌的药物外排能力增强导致胞内药物浓度降低是主要的耐药机制。目前已知与吡咯类药物外排有关的跨膜转运蛋白有两类:一类是含 ATP 结合转运蛋白,是 ATP 能量依赖型多药转运载体,是细胞膜上的外排机能泵,其与耐药有关的主要有 CDR1 和 CDR2 基因编码的 Cdr1p 蛋白和 Cdr2p 蛋白;另一类是主要易化载体超家族蛋白,是非能量依赖型载体,其与耐药有关的主要是由 MDR1 基因编码的 Mdr1p 蛋白。相关文献报道 Cdr1p、Cdr2p 蛋白以降低胞内药物浓度的方式来增加药物的外排^[5],而 Mdr1p 蛋白则通过抑制药物摄入来实现。

荧光定量 PCR 是一种准确、有效的核酸定量分析技术,相对定量主要应用于 mRNA 表达量解析,先测定目的基因的相对表达量,再进行样品间相对量的比较。本研究通过采用相对定量 TaqMan 探针法,引入内参基因,将目的基因表达量进行归一化处理,以消除初始 RNA 的差异带来的表达差异。本研究结果显示耐药组与敏感组 CDR1 基因在 mRNA 表达水平上存在差异,表明耐药组 CDR1 基因的高表达可能与耐药形成有关。相关文献报道白色念珠菌耐药多以 CDR1 或 CDR2 表达上调为主^[6-7]。CDR1 和 CDR2 基因所编码的转运蛋白在氨基酸序列上有高度同源性,所转运的底物相似,结合本课题组前期的结果^[8-9],本研究认为 CDR1 外排能力更强,在耐药形成中发挥作用更大。但 CDR2 和 MDR1 表达差异无统计学意义(*P*>0.05),不能证明其与耐药无关,跨膜转运蛋白外排泵的两种类型编码基因的调节是相互独立的,在大多数吡咯类药物耐药株中仅过表达其中一种外排泵;白色念珠菌耐药性的形成是通过多因素的调节,体内长期演变实现的,基因表达增加只是引起耐药的原因之一。(下转第 725 页)

宁的 MIC 下降幅度最大。可见中药热毒宁与 SCF 对 XDR-AB 有很好的协同作用。

纸片扩散法是根据抑菌环直径和抗菌药物 MIC 的负相关性设定的定性试验,由于该方法简便可靠,实用性强,仍是目前常规实验室普遍采用的定性试验,本研究在判断产超广谱 β 内酰胺酶(ESBLs)的纸片协同法的基础上^[3],参照管仲莹等^[7]的金银花抑菌作用研究,尝试用 SCF 纸片扩散联合热毒宁打孔的方法观察协同作用。SCF 选用浓度为 75/30 μg SCF 作为药敏纸片,热毒宁使用原液。双纸片协同试验影响因素较多,掌握好两药之间的距离很关键,经过多次摸索,最好控制在大于两药抑菌环半径之和 2 mm,与微量肉汤棋盘稀释 MIC 法比对,结果一致。但在操作过程中应注意设置对照,选择最佳的纸片间距。

微量肉汤棋盘稀释法联用两种药物,以二维棋盘纵横两个方向分别进行倍比稀释。药物相互作用效应通过计算最小部分 FICI 来判断。 $\text{FICI} = (\text{联合用药时 SCF 的 MIC} / \text{单独用药时 SCF 的 MIC}) + (\text{联合用药时热毒宁的 MIC} / \text{单独用药时热毒宁的 MIC})$ 。 $\text{FICI} \leq 0.5$ 为协同作用, $0.5 < \text{FICI} \leq 1.0$ 为相加作用, $1.0 < \text{FICI} \leq 2.0$ 为无关作用, > 2.0 为拮抗作用^[8]。在采用 MIC 微量肉汤棋盘稀释法检测热毒宁联合 SCF 作用 XDR-AB 时,以无菌对照孔作为敏感的标准,以无药对照孔作为耐药的标准,分别记下两药单独和联合的 MIC,再计算 FICI。但由于热毒宁本身为棕褐色,敏感和耐药结果不是特别清晰,且操作繁琐,需要稀释不同浓度的 SCF 和热毒宁。热毒宁与 SCF 联合用药时的 FICI 均小于或等于 0.5,说明两者有协同作用,与纸片扩散法得到的结果一致。

综上所述,微量肉汤棋盘稀释法可以检测到 MIC,可以量

化观察两种药物对 XDR-AB 的联合作用,但很繁琐。而纸片扩散法简单易行,也可以直观地反映出两种药物的联合作用,结果判断带有主观性,需要有经验的人员操作。随着广泛耐药菌的出现,中西医结合治疗也是很好的治疗方案,笔者下一步将深入到分子生物学继续研究中西药联合应用的抗菌机制。

参考文献

- [1] 朱德妹,汪复,胡付品,等. 2010 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2011,11(5):321-329.
- [2] 曾春晖,杨柯,徐明光,等. 广西藤茶总黄酮与 B-内酰胺类抗菌药物合用的体外抗菌活性研究[J]. 医药导报,2013,32(3):292-297.
- [3] 徐英春,金岩,王澎,等. 三种方法检测超广谱 β 内酰胺酶敏感性比较[J]. 中华医学检验杂志,1999,22(6):355-357.
- [4] 周玉,丛玉隆,曲芬. 鲍曼不动杆菌耐药机制及治疗策略研究进展[J]. 传染病信息,2014,27(3):184-188.
- [5] 夏美玲,冯海英,刘野. 中西药联合体外抑菌试验的研究[J]. 医学研究杂志,2010,39(10):100-102.
- [6] 马冬梅,陶庆春,齐宏伟,等. 中药双黄连对广泛耐药鲍曼不动杆菌的体外抑菌实验研究[J]. 实用临床医药杂志,2014,18(16):109-111.
- [7] 管仲莹,赵金明,林巧智. 金银花提取物抑菌作用的实验研究[J]. 中医中药,2009,47(15):150-153.
- [8] Lin E, Stanek RJ, Mufson MA. Lack of synergy of erythromycin combined with penicillin or cefotaxime against *Sreptococcus pneumonia* in vitro[J]. *Antimicrob Agents Chem*, 2003, 47(3): 1151-1153.

(收稿日期:2015-12-28)

(上接第 722 页)

抗真菌药物的滥用导致吡咯类药物产生不同程度的耐药,应从分子水平、生物膜形成等方面进一步探究药物作用靶位,或探索更好的联合用药方案,如李丰霞等^[10]发现汉防己甲素对氟康唑抗菌活性有增强作用,Zhu 等^[11]发现氟康唑和小檗碱联合用药可通过阻断 CDR1 转录因子结合药物作用元件达到抗菌作用。主动外排泵蛋白基因过度表达在多药耐药产生中的作用已逐渐被重视,本文对生殖道白色念珠菌耐药分子机制的研究有助于发现新的作用靶位点和研制泵抑制性抗真菌药物。

参考文献

- [1] Ge SH, Wan Z, Li J, et al. Correlation between Azole susceptibilities, genotypes and ERG11 mutations in *Candida albicans* isolates associated with vulvovaginal candidiasis in China[J]. *Antimicrob Agents Chem*, 2010, 54(8):3126-3131.
- [2] Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, et al. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance[J]. *Antimicrob Agents Chem*, 2005, 49(2):668-679.
- [3] 赵辩. 临床皮肤病学[M]. 南京:江苏科学技术出版社,2001:123-124.
- [4] 温汪荣,戴庚孙. 念珠菌耐药性的研究进展[J]. 国外医学临床生

物化学与检验学分册,2001,22(1):38-39.

- [5] 陈乌娜,程金妹,陈贻锴,等. 呼吸道白色念珠菌耐药基因 CDR1、CAMDR1 的研究[J]. 中国人兽共患病学报,2008,24(10):951-955.
- [6] 邵俊国,魏媛媛,张金艳,等. 白念珠菌耐药基因 CDR1、CDR2、MDR1 表达与氟康唑耐药的相关性分析[J]. 重庆医学,2014,43(3):270-272.
- [7] 满旭,刘原君,李春莉,等. 白念珠菌锌簇转录因子编码基因表达与氟康唑耐药的关系[J]. 中国皮肤性病学杂志,2013,27(2):131-133.
- [8] 李倩璐,徐韞健,谭皓妍,等. 白假丝酵母菌吡咯类药物相关耐药基因的突变和表达[J]. 广东医学,2015,36(1):63-66.
- [9] 张丽梅,谭皓妍,徐韞健,等. 耐药基因 CDR1、CDR2、ERG11、CaMDR1 和 FLU1 在白假丝酵母菌株中的分布情况[J]. 山东医药,2013,53(25):20-22.
- [10] 李丰霞,张宏. 汉防己甲素对氟康唑抗白念珠菌活性的增效作用[J]. 中华皮肤科杂志,2006,39(8):454-456.
- [11] Zhu SL, Yan L, Zhang YX, et al. Berberine inhibits fluphenazine-induced up-regulation of CDR1 in *Candida albicans*[J]. *Biol Pharm Bull*, 2014, 37(2):268-273.

(收稿日期:2016-01-26)