

光滑念珠菌 *MSH2* 基因突变与氟康唑耐药的研究

刘赞蕾, 宫婷婷, 王中新

摘要 目的 分析临床分离 157 株光滑念珠菌对 5 种抗真菌药物的耐药率, 探讨临床分离的光滑念珠菌 *MSH2* 基因突变与氟康唑耐药的关系。方法 ① 收集自真菌感染患者中分离的光滑念珠菌 157 株, 统计对 5 种抗真菌药物的耐药情况。② 从上述菌株中随机挑取 19 株氟康唑耐药菌株、15 株剂量依赖性敏感 (S-DD) 菌株以及 23 株敏感菌株, 用微量稀释法对药物敏感性进行验证, 对 *MSH2* 基因进行 Sanger 测序检测, 并将测序结果与 Genbank 中已发表的序列进行比对, 分析每组 *MSH2* 基因突变频率及相关突变位点。结果 ① 157 株光滑念珠菌对伊曲康唑耐药率最高, 为 27.4%, 对氟康唑耐药率为 22.9%, 对伏立康唑、两性霉素 B 耐药率分别为 5.7%、2.5%, 所有菌株对 5-氟胞嘧啶不耐药。② 与敏感组比较, 耐药组、S-DD 组 *MSH2* 基因突变频率显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.0167$)。检测到 *MSH2* 基因存在 G622A/A2669T、G715T 这 3 个突变位点, 对应 P208S/N890I、V239L 3 个氨基酸置换位点; 且 P208S/N890I 仅出现在耐药菌株中。结论 临床分离的光滑念珠菌对唑类耐药率比两性霉素 B、5-氟胞嘧啶高; 光滑念珠菌 *MSH2* 基因突变与氟康唑耐药有一定关系。

关键词 光滑念珠菌; 耐药机制; DNA 错配修复; 氟康唑
中图分类号 R 379.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)04-0622-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.04.024

近年来, 侵袭性光滑念珠菌感染发病率不断上升, 光滑念珠菌对常规抗真菌药物的耐药情况愈加严重, 且多重耐药光滑念珠菌检出率也明显升高, 给临床抗真菌感染治疗带来巨大挑战。研究^[1]表明, 真菌耐药性的产生归因于基因突变, 从点突变到整个染色体缺失、插入、重排等。DNA 错配修复 (mismatch repair, MMR) 系统维持 DNA 复制的保真性, 其广泛存在于生物体中, 该系统缺陷与基因突变率增加有关^[2]。在人类基因组中, 该系统缺陷与某些癌症 (如非息肉型结直肠癌) 相关^[2-3]; 在细菌中,

MMR 系统缺陷是细菌获得性耐药性的重要机制^[4]; 在白色念珠菌中, MMR 系统缺陷导致基因不稳定性增加, 更快获得对氟康唑耐药性^[5]。*MSH2* 基因为核 MMR 基因 (属 MMR 系统基因的一种), 相关研究^[1]表明 *MSH2* 基因突变为光滑念珠菌获得多重耐药性的驱动因素, 且具有特定错义突变的菌株在体外表现出更高的耐药性。该实验通过分析氟康唑敏感型、剂量依赖性敏感型 (susceptible-dose dependent S-DD) 及耐药型光滑念珠菌中 *MSH2* 基因突变情况, 旨在探讨光滑念珠菌 *MSH2* 基因突变与氟康唑耐药的关系。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集安徽医科大学第一附属医院检验科 2017 年 7 月~2018 年 7 月的门诊及住院患者的痰、尿、血液或分泌物等标本中分离获得的光滑念珠菌, 标本源自同一患者同一住院时间段同一部位的重复菌株只纳入一株分析, 菌株保存在 -80°C 菌株库。选取光滑念珠菌 ATCC MYA-2950 作为真菌鉴定的质控菌株, 白色念珠菌 ATCC 10231 作为真菌药敏的质控菌株, 使用大肠杆菌 ATCC 8739 作为质谱仪器的校准菌株。

1.2 仪器和试剂 酵母基因组 DNA 提取试剂盒 (上海生工生物工程有限公司); DL 5 000 DNA Marker 和 Premix Ex Taq 酶体系 (日本 TaKaRa 公司); RPMI1640 液体培养基 (美国 GIBCO 公司); MOPS (北京索莱宝技术有限公司); ATBFUNGUS3 试剂盒、VITEK MS IVD (V2.0) 质谱仪 (法国 Biomérieux 公司); PCR 仪 (德国 Biometra 公司); 电泳仪 (北京六一仪器厂); 全自动凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司) 等。

1.3 方法

1.3.1 菌株鉴定 将菌株从 -80°C 菌株库中取出, 接种于科玛嘉念珠菌显色培养基, 35°C 培养 48 h 初步鉴定, 再用 VITEK MS IVD (V2.0) 质谱仪进一步鉴定, 以光滑念珠菌 ATCC MYA-2950 作为鉴定质控菌株, 质谱仪器的校准菌株大肠杆菌 ATCC8739。

2018-11-27 接收

基金项目: 安徽省高校省级自然科学基金项目 (编号: KJ2015A337)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院检验科, 合肥 230022

作者简介: 刘赞蕾, 女, 硕士研究生;

王中新, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: ay-wzhx87@163.com

1.3.2 药敏试验 采用 ATBFUNGUS3 试剂盒进行体外药敏试验,药敏结果根据美国临床和实验室标准协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 推荐折点判读,以白色念珠菌 ATCC 10231 作为真菌药敏的质控菌株,随机选取 19 株氟康唑耐药菌株、15 株氟康唑中介菌株和 23 株敏感菌株, -80°C 保存备用。

1.3.3 制备 DNA 模板 将上述菌株从 -80°C 菌株库中取出,接种于沙保弱培养基 35°C 培养 48 h 传代 2 次进行复苏,挑取单个菌落于 5 ml RPMI1640 液体培养基 37°C 、250 r/min 震荡培养 16 h。取 1 ml 菌液离心收集菌体,按照酵母基因组 DNA 提取试剂盒说明书操作提取 DNA,产物放于 -20°C 冰箱备用。

1.3.4 扩增 *MSH2* 基因及测序 *MSH2* 基因引物设计参照已有文献^[6] 委托上海生工生物工程有限公司合成,使用 3 对引物 33F/1188R、1013F/2170R、1914F/2985R 对 *MSH2* 基因分段扩增,所得产物分别标记为 *MSH2* 基因片段 1、*MSH2* 基因片段 2、*MSH2* 基因片段 3,引物序列见表 1。50 μl PCR 反应体系为 5 $\times$ PrimeSTAR GXL Buffer 10 μl , Prime-STAR GXL DNA Polymerase 1 μl , dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 4 μl , 上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μl , DNA 模板 (25 ng/ μl) 2 μl , 灭菌双蒸水 31 μl 。PCR 反应条件为 95°C 预变性 10 min, 95°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 90 s, 循环 35 次,最后 72°C 延伸 7 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,采用全自动凝胶成像仪中观察拍照。将 PCR 产物送至上海生工公司测序,测序结果应用 BLST 软件,与标准序列 (KY110695.1 – KY110696.1) 进行比对分析。

表 1 *MSH2* 基因 PCR 引物序列

序号	引物名称	引物序列 (5' – 3')	预扩增片段长度 (bp)
1	33F	ACGTTTGTGCTATTTATTGTGG	1 155
	1188R	CGAGATTGTGACGAACCTGA	
2	1013F	CACTTCTTTACGCCAATGC	1 157
	2170R	CCACCTGCCTGATATATGT	
3	1914F	ATTGCGCACTTGATGTATT	1 071
	2985R	ACATTCCTCGTTATCAACAGT	

1.4 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行分析,3 组实验菌株出现 *MSH2* 基因突变频率比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;3 组之间的两两比较以 $P < 0.0167$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 光滑念珠菌药敏试验结果 经鉴定,共 157 株光滑念珠菌,对氟康唑等 5 种抗真菌药物的药敏分析结果见表 2,同时存在唑类交叉耐药及多药耐药现象。

表 2 157 株光滑念珠菌体外药敏结果情况 (%)

药物	敏感	S-DD	耐药
氟康唑	48.4	28.7	22.9
伊曲康唑	26.2	46.4	27.4
伏立康唑	89.9	4.4	5.7
两性霉素 B	97.5	0.0	2.5
5-氟胞嘧啶	93.0	7.0	0.0

2.2 *MSH2* 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果 以随机选取的 57 株研究菌株的 DNA 为模板,对 *MSH2* 基因分段行 PCR 扩增,每株均获得预期大小的片段。部分菌株 PCR 产物电泳结果见图 1。

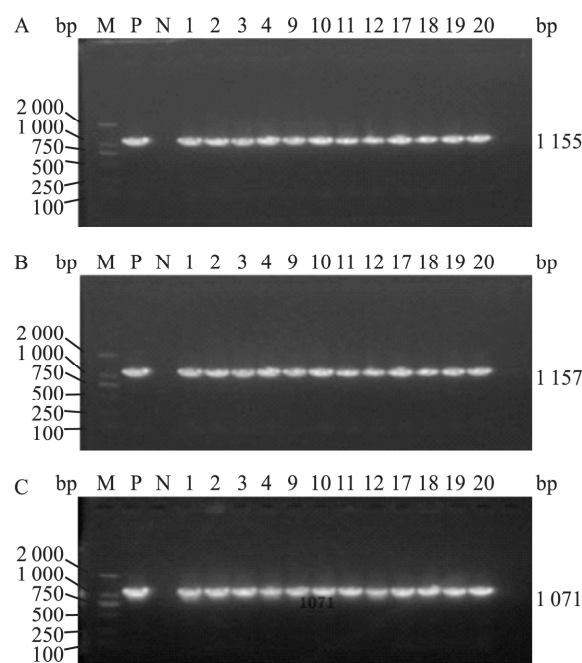


图 1 *MSH2* 基因分段 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

A: *MSH2* 基因片段 1; B: *MSH2* 基因片段 2; C: *MSH2* 基因片段 3; M: DNA Marker; P: 阳性对照 (已经实验室检测确认为光滑念珠菌 *MSH2* 基因的 DNA); N: 阴性对照; 1~4: 部分氟康唑耐药菌株; 9~12: 部分 S-DD 菌株; 17~20: 部分敏感菌株

2.3 *MSH2* 基因测序结果 目的基因测序结果与 Genbank 中 *MSH2* 基因标准序列进行 Blast 分析比对 57 株光滑念珠菌共检测出 3 个非同义突变位点 C622T/A2669T/G715T, 分别对应氨基酸置换位点

为 P208S/N890I/V239L。19 株氟康唑耐药菌株有 17 株发生 *MSH2* 基因突变,其中涉及 C622T/A2669T 突变 2 株,涉及 G715T 突变 15 株,未发现 3 个非同义突变位点同时出现在同一菌株;15 株氟康唑 S-DD 菌株有 13 株发生 *MSH2* 基因突变,均只涉及 G715T 一个非同义突变位点;23 株敏感菌株有 10 株发生 *MSH2* 基因突变,也均只涉及 G715T 一个非同义突变位点。见表 3。

设 $\alpha = 0.05$ 为检验水准,氟康唑耐药组出现 *MSH2* 基因突变频率(89.5%)与 S-DD 组(86.7%)、敏感组(43.5%)比较,差异具有统计学意义($\chi^2 = 13.162, P = 0.002$)。两两比较,以 $\alpha' = 0.0167$ 为检验水准,结果提示:耐药组 *MSH2* 基因突变频率显著高于敏感组($\chi^2 = 9.587, P = 0.003$);耐药组与 S-DD 组比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.064, P = 1.000$);中介组与敏感组比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 7.088, P = 0.016$)。

表 3 3 组实验菌株出现 *MSH2* 基因突变情况

组别	菌株数(株)		合计
	出现 <i>MSH2</i> 基因突变	未出现 <i>MSH2</i> 基因突变	
氟康唑敏感	10	13	23
氟康唑 S-DD	13	2	15
氟康唑耐药	17	2	19
合计	40	17	57

3 讨论

近年来,光滑念珠菌已成为全球第二大引起侵袭性真菌感染的病原体^[7],目前可用于一线治疗的抗真菌剂有限,且考虑药物对人体副作用(如两性霉素 B 的肾毒性)及药品价格方面,临床较常使用唑类药物。研究^[8-9]表明,光滑念珠菌对氟康唑的耐药率逐年升高,Xiao et al^[8]通过对中国医院侵袭性真菌检测网研究显示 2009~2014 年间光滑念珠菌对氟康唑的耐药率从 12.9% 上升至 24.0%,国外也有类似报道^[9]。本研究显示 2017 年 7 月~2018 年 7 月从我院收集的光滑念珠菌对氟康唑耐药率达 22.9%,对伊曲康唑等其它 4 种抗真菌药有不同程度耐药,同时存在交叉耐药和多药耐药现象,这与文献^[8]报道基本一致。相关研究表明,光滑念珠菌易对唑类产生耐药^[10],通常与 ATP 结合转运蛋白和易化扩散载体超家族蛋白(如 CDR1、SNQ2 等)表达上调有关^[9],从而有效的将药物泵出细胞外,同时

药物外排泵上调通常伴随转录因子 PDR1 获得性突变^[11],但目前尚不清楚光滑念珠菌为何能快速获得对多种药物的耐药性。

MMR 系缺陷的菌株可增强基因水平转移的频率^[4]。相关研究^[12]显示,缺乏 DNA MMR 系统的细胞,可大大提高自发突变的速率。Legrand et al^[5]通过构建白色念珠菌 *MSH2*Δ 菌株,研究发现 *MSH2* 基因突变可致氟康唑耐药菌落的出现频率增加。同时,Healey et al^[1]通过研究 357 株光滑念珠菌 *MSH2* 基因突变情况及建立 *MSH2*Δ 光滑念珠菌胃肠定植小鼠模型,发现 DNA 修复系统缺陷可能是导致负责调控耐药性的各种基因变化加速的原因。本实验通过研究 57 株光滑念珠菌 *MSH2* 突变情况,结果显示氟康唑耐药组、S-DD 组 *MSH2* 基因突变频率明显高于敏感组,因此 *MSH2* 基因突变可能与氟康唑耐药有关。本次研究显示的 P208S/N890I/V239L 氨基酸置换位点与国外报道^[1,6]一致,但未发现 E231G、L269F 等国外报道的其他氨基酸置换位点,这可能与实验菌株数相对较少或地理差异有关。此外,本实验显示 P208S/N890I 氨基酸置换位点只出现在耐药组中,可能其与出现氟康唑耐药相关性较高,这有待进一步生物学验证。同时,本研究显示敏感组也出现相对较高的 *MSH2* 基因突变频率,且有文献^[13]报道 *MSH2* 基因突变出现在耐药性出现之前,这可能初步解释了光滑念珠菌为何能快速获得对氟康唑的耐药性,但仍需进一步深入研究;也可能与患者基础疾病较多、接触较多药物(如抗生素、抗肿瘤药物等)有关。此外,已有研究^[1]通过对连续临床光滑念珠菌分离株的分析,结果表明 *MSH2* 基因突变发生在耐药性出现之前。

虽然有研究表明 DNA MMR 基因 *MSH2* 基因突变与氟康唑耐药有关,但 Dellièrre et al^[6]研究提出光滑念珠菌对氟康唑的耐药性与抗真菌药物暴露相关,且相关性优于 *MSH2* 基因突变。由于病历资料不完善,本实验未考虑患者抗真菌药物的暴露情况。另外,Healey et al^[1]发现从部分医院获得的光滑念珠菌的 *MSH2* 基因突变频率在氟康唑敏感组与耐药组有相似水平,表明 *MSH2* 基因突变存在地理差异。

本研究为阐明光滑念珠菌 *MSH2* 基因突变与氟康唑耐药有一定关系,但 *MSH2* 突变是否导致 DNA MMR 蛋白表达下降,或功能活性降低,或参与调控其它耐药基因如药物外排泵等,有待进一步探讨。耐药机制的形成,复杂且多样性^[14],对其深入研究有助于临床治疗和指导用药。

参考文献

- [1] Healey K R ,Zhao Y ,Perez W B ,et al. Prevalent mutator genotype identified in fungal pathogen *Candida glabrata* promotes multi-drug resistance [J]. *Nat Commun* 2016 ,7: 11128.
- [2] 刘 卓 ,吴建新. DNA 错配修复系统组成和功能的研究进展 [J]. *现代生物医学进展* 2008 ,8(6) : 1160 – 5.
- [3] Cuyle P J ,Prenen H. Current and future biomarkers in the treatment of colorectal cancer [J]. *Acta Clin Belg* 2017 ,72(2) : 103 – 15.
- [4] Chopra I ,O'Neill A J ,Miller K. The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria [J]. *Drug Resist Updat* , 2003 ,6(3) : 137 – 45.
- [5] Legrand M ,Chan C L ,Jauert P A ,et al. Role of DNA mismatch repair and double-strand break repair in genome stability and antifungal drug resistance in *Candida albicans* [J]. *Eukaryot Cell* , 2007 ,6(12) : 2194 – 205.
- [6] Dellière S ,Healey K ,Gits-Muselli M ,et al. Fluconazole and echinocandin resistance of *Candida glabrata* correlates better with antifungal drug exposure rather than with *MSH2* mutator genotype in a French cohort of patients harboring low rates of resistance [J]. *Front Microbiol* 2016 ,7: 2038.
- [7] Nishikawa J L ,Boeszoermyeni A ,Vale-Silva L A ,et al. Inhibiting fungal multidrug resistance by disrupting an activator-mediator interaction [J]. *Nature* ,2016 ,530(7591) : 485 – 9.
- [8] Xiao M ,Sun Z Y ,Kang M ,et al. Five-year national surveillance of invasive candidiasis: species distribution and azole susceptibility from the China hospital invasive fungal surveillance net (CHIF-NET) study [J]. *J Clin Microbiol* 2018 ,56(7) : e00577 – 18.
- [9] Kolaczowska A ,Kolaczowski M. Drug resistance mechanisms and their regulation in non-albicans *Candida* species [J]. *J Antimicrob Chemother* ,2016 ,71(6) : 1438 – 50.
- [10] Borst A ,Raimier M T ,Warnock D W ,et al. Rapid acquisition of stable azole resistance by *Candida glabrata* isolates obtained before the clinical introduction of fluconazole [J]. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 ,49(2) : 783 – 7.
- [11] Gohar A A ,Badali H ,Shokohi T ,et al. Expression patterns of ABC transporter genes in fluconazole-resistant *Candida glabrata* [J]. *Mycopathologia* 2017 ,182(3–4) : 273 – 84.
- [12] Drotschmann K ,Shcherbakova P V ,Kunkel T A. Mutator phenotype due to loss of heterozygosity in diploid yeast strains with mutations in *MSH2* and *MLH1* [J]. *Toxicol Lett* 2000 ,112 – 113: 239 – 44.
- [13] Healey K R ,Jimenez Ortigosa C ,Shor E. Genetic drivers of multi-drug resistance in *Candida glabrata* [J]. *Front Microbiol* 2016 ,7: 1995.
- [14] Redding S W ,Kirkpatrick W R ,Saville S ,et al. Multiple patterns of resistance to fluconazole in *Candida glabrata* isolates from a patient with oropharyngeal candidiasis receiving head and neck radiation [J]. *J Clin Microbiol* 2003 ,41(2) : 619 – 22.

Analysis of relationship between *MSH2* gene mutation and fluconazole resistance in *Candida glabrata*

Liu Yunlei ,Gong Tingting ,Wang Zhongxin

(Dept of Clinical Laboratory ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230022)

Abstract Objective To analyze the resistance rate of 157 *Candida glabrata* clinical strains to five antifungal drugs ,and to explore the relationship between *MSH2* gene mutation and fluconazole resistance in *Candida glabrata* clinical strains. **Methods** ① A total of 157 *Candida glabrata* strains from patients with fungal infections were collected. The resistance to five antifungal drugs was statistically analyzed. ② Fluconazole-resistant ($n = 19$) , dose-dependent sensitive (S-DD) ($n = 15$) and susceptible isolates ($n = 23$) were randomly collected from the above 157 strains ,and verified the drug sensitivity by microdilution method. Using Sanger method sequenced the *MSH2* gene ,and the sequencing results were compared with the published sequences in Genbank ,and analyze of the frequency of mutations and related mutation sites in *MSH2* gene. **Results** ① Of the 157 *Candida glabrata* strains ,27.4% , 22.9% ,5.7% ,2.5% were resistance rate to itraconazole , fluconazole , voriconazole and amphotericin B , respectively. All strains were sensitive to 5-fluorocytosine. ② Compared with susceptible isolates ($n = 23$) , the mutation frequency of *MSH2* gene in fluconazole-resistant isolates ($n = 19$) and S-DD isolates ($n = 15$) was significantly increased ,and the difference was statistically significant ($P < 0.0167$) . The three mutation sites of G622A/A2669T and G715T were detected in *MSH2* gene ,corresponding to three amino acid substitution sites of P208S/N890I and V239L; and P208S/N890I only appeared in drug-resistant strains. **Conclusion** 157 *Candida glabrata* clinical strains have higher resistance to azoles than amphotericin B and 5-fluorocytosine. The mutation of *MSH2* gene of *Candida glabrata* has a certain relationship with fluconazole resistance.

Key words *Candida glabrata*; drug resistance mechanism; DNA mismatch repair; fluconazole