

◇ 经验与体会 ◇

热带念珠菌对氟康唑耐药机制的初步研究

江雨璐, 王中新, 沈继录

摘要 25 株临床分离的热带念珠菌通过 ATB FUNGUS 3 试条分类为对氟康唑 (FCA) 敏感的菌株和耐药的菌株, 使用 ABI 7300 荧光定量分析仪扩增外排基因 CDR1、MDR1 和靶酶基因 ERG11, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算相对表达量, 应用 Fisher 确切概率法统计分析敏感菌株和耐药菌株的高表达率。结果显示 MDR1 和 ERG11 基因的高表达率差异有统计学意义 ($P < 0.05$), CDR1 基因的高表达率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。热带念珠菌对 FCA 耐药与外排基因 MDR1 和靶酶基因 ERG11 的高表达相关。

关键词 热带念珠菌; 氟康唑耐药; CDR1; MDR1; ERG11

中图分类号 R 379.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)04-0536-04

随着广谱抗生素、免疫抑制剂、糖皮质激素等的广泛使用, 医源性侵入性操作的增多, 念珠菌感染率日益升高, 虽然白色念珠菌仍然是念珠菌感染的主要病原菌, 但近些年来, 非白色念珠菌比例增多, 热带念珠菌已被认定为最流行的非白色念珠菌^[1]。由于唑类药物特别是氟康唑 (fluconazole, FCA) 的广泛应用, 耐药性日益突出。念珠菌对唑类药物的耐药机制主要有药物靶酶的变化和外排泵基因的过度表达 2 种^[2]。唑类药物的靶酶是 ERG11 基因编码的羊毛甾醇 14 α -去甲基化酶, CDR1 基因和 MDR1 基因编码的 CDR1p 和 MDR1p 是念珠菌最重要的 2 类药物外排蛋白。该实验采用实时荧光定量 PCR 法检测热带念珠菌 CDR1、MDR1、ERG11 基因的表达情况并比较耐药菌株和敏感菌株的表达差异, 并探讨其耐药机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株 收集 2010 年 1 月~2012 年 12 月安徽医科大学第一附属医院检验科分离的热带念

珠菌 25 株, 均经科玛嘉念珠菌显色培养基和法国生物梅里埃公司 ATB Expression 仪鉴定。质控菌株为热带念珠菌标准菌株 ATCC 750。

1.1.2 试剂与设备 ATB ID 32C 酵母菌鉴定试剂盒、ATB FUNGUS 3 酵母菌药敏试剂盒 (微量稀释法)、ATB Expression 仪均购自法国生物梅里埃公司; 柱式酵母总 RNA 抽提纯化试剂盒购自上海生工生物公司; Thermo nanodrop 浓度仪购自美国 Thermo Scientific 公司; 逆转录试剂盒购自加拿大 Fermentas 公司; 荧光定量试剂购自宝生物工程 (大连) 有限公司; ABI 7300 荧光定量分析仪购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.1.3 引物 根据 GenBank 序列, 委托宝生物工程 (大连) 有限公司设计、合成外排基因 CDR1 和 MDR1 荧光定量引物, 委托上海生工生物公司合成靶酶基因 ERG11 引物, 其引物序列参考文献^[3], 委托宝生物工程 (大连) 有限公司合成内参基因 ACT1 引物, 其引物序列参考文献^[4], 引物序列见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

基因	引物序列 (5'→3')
CDR1	F: TGGAAAGAGTTGGAGGGTATGTGA
	R: TCCCAAGGTTTCGCCATC
MDR1	F: TTGGCGTTAGAGGATTTACTTTGG
	R: GAATGAAACTTCTGGGAAACTGG
ERG11	F: CTACTCCCAAAAAAACCATA
	R: TAAACCTAATCCCAAGACATC
ACT1	F: GACCGAAGCTCCAATGAATC
	R: AATTGGGACAACGTGGGTAA

1.2 方法

1.2.1 药敏实验 采用法国生物梅里埃公司的 ATB FUNGUS 3 试条, 抗真菌药物包括 5-氟胞嘧啶 (5-fluorocytosine, 5-FC)、两性霉素 B (amphotericin B, AMB)、FCA、伊曲康唑 (itraconazole, ITR)、伏立康唑 (voriconazole, VRC)。按照说明书进行操作, 以最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) ≤ 8 mg/L 为敏感, 以 MIC ≥ 64 mg/L 为耐药, 分选出敏感菌株和耐药菌株。质控菌株按照说明书

2013-12-05 接收

基金项目: 安徽省教育厅基金 (编号: KJ2008B299)

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: 江雨璐, 女, 硕士研究生;

王中新, 男, 主任技师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: ay-

wzhx87@163.com

说明选择近平滑念珠菌 ATCC 22019 和克柔念珠菌 ATCC 6258。

1.2.2 总 RNA 提取及 cDNA 的合成 挑取科玛嘉念珠菌显色板培养的单个菌落接种于 3 ml YPD 液体培养基上, 37 °C 250 r/min 振荡培养 24 h, 使菌处于对数生长期。使用柱式酵母总 RNA 抽提纯化试剂盒抽提总 RNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳确定 RNA 质量, 用 Thermo nanoprop 浓度仪测定 RNA 的浓度与纯度, $A_{260}/A_{280} = 1.8 \sim 2.0$ 才可逆转录为 cDNA。使用 Fermentas 逆转录试剂盒把总 RNA 逆转录为 cDNA, 放入 -80 °C 保存。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 以 50 μ l 反应体系进行实时荧光定量 PCR, 反应体系包括 25 μ l SYBR® Premix Ex Taq™ II (2 \times), 10 μ mol/L 的上下游引物各 2 μ l, ROX Reference Dye (50 \times) 1 μ l, 无酶水 16 μ l, 4 μ l 1:10 稀释的 cDNA 模板。反应条件为 95 °C 30 s 预变性后 95 °C 5 s 60 °C 31 s, 共 40 个循环, 扩增完毕后进行熔解曲线分析。每个菌株有 2 个复孔, 同时设无模板对照。

1.3 统计学处理 运用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法, 计算出耐药菌株和敏感菌株目的基因相对于参照菌株的目的基因的表达倍数, 即相对表达量, 其中 $\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{实验菌株}) - \Delta CT(\text{参照菌株})$, $\Delta CT = CT(\text{目的基因}) - CT(\text{内参基因 ACT1})$ 。统计基因高表达菌株在耐药组与敏感组所占的比例, 采用 SPSS 17.0 统计软件分析, 耐药组与敏感组应用 Fisher 确切概率法。

2 结果

2.1 药敏实验 选择 25 株热带念珠菌 17 株对 FCA 敏感 ($MIC \leq 8$ mg/L) 8 株对 FCA 耐药 ($MIC \geq 64$ mg/L), 此 8 株耐 FCA 菌株对 ITR 和 VRC 存在交叉耐药现象。

2.2 CDR1、MDR1 和 ERG11 mRNA 表达水平 从熔解曲线中可以看出, 每个基因在熔解温度 T_m 处只存在一个峰, 说明样本的目的基因都获得了特异性扩增。见图 1、2。根据文献^[3], 相对表达量 ≥ 2.5 为高表达 8 株耐药株中有 4 株不止 1 种基因高表达, 有 1 株 3 种基因均不高表达。现统计基因高表达菌株在敏感组和耐药组所占百分率, 见图 3。在敏感组中有 1 株 CDR1 的高表达, 所占比例 5.88%, 耐药组有 2 株 CDR1 的高表达, 所占比例为 25%; 在敏感组中没有 MDR1 的高表达, 耐药组有 6 株 MDR1 的高表达, 所占比例 75%; 在敏感组中有 1

株 ERG11 的高表达, 所占比例为 5.88%, 耐药组有 4 株 ERG11 的高表达, 所占比例 50%。利用 Fisher 确切概率法显示敏感组和耐药组 CDR1 的高表达率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 耐药组 MDR1 和 ERG11 的高表达率显著高于敏感组的高表达率 ($P < 0.05$)。

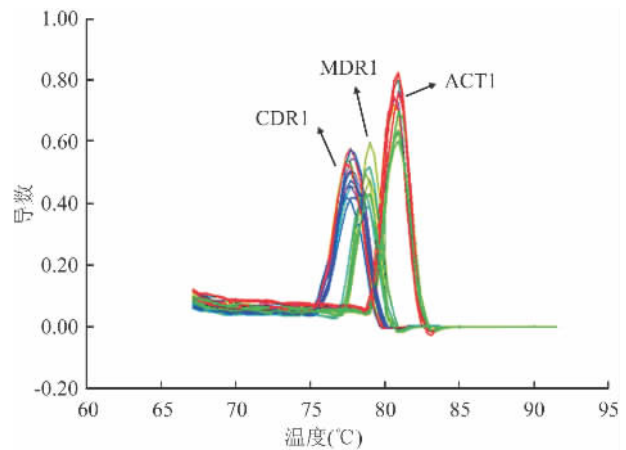


图1 ACT1、CDR1 和 MDR1 基因的熔解曲线

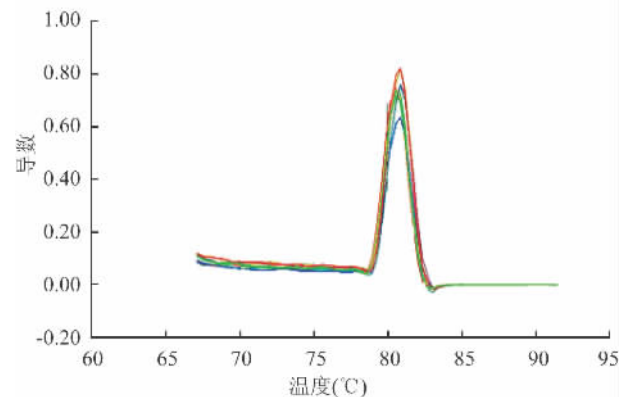


图2 ERG11 基因的熔解曲线

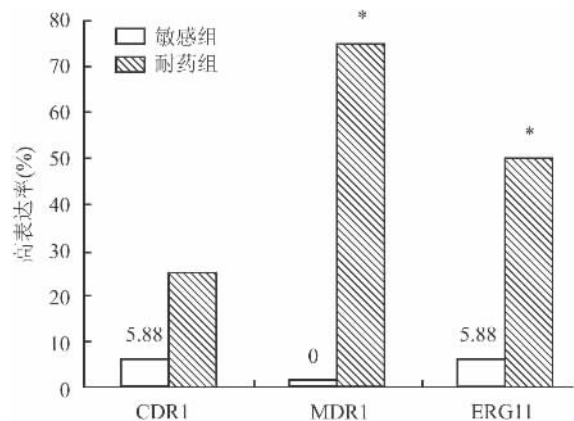


图3 基因高表达菌株在敏感组和耐药组中百分率与敏感组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

近年来,以热带念珠菌为代表的非白色念珠菌日益增多,美国的一项有关侵袭性真菌病的调查^[5]显示,热带念珠菌的临床分离率在1997年~2003年从4.6%上升到7.5%,以FCA为代表的唑类药物耐药问题也日益严重,引起临床的广泛关注,但国内外对热带念珠菌耐药机制的研究并不多,本文针对热带念珠菌的主要耐药基因CDR1、MDR1和ERG11在转录水平的表达情况进行研究。

本实验采用实时荧光定量技术,应用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法检测临床分离的非配对的热带念珠菌CDR1、MDR1和ERG11基因的相对表达水平,本实验对耐药组和敏感组的高表达率进行分析而不是对其相对表达量直接进行分析,考虑到这些菌株不是来自于同一个患者,具有异质性,分析高表达率更能反映这些基因的表达与耐药的关系。结果显示耐药组MDR1和ERG11基因的高表达率显著高于敏感组的高表达率,而耐药组CDR1基因的高表达率与敏感组的高表达率差异无统计学意义,这说明热带念珠菌临床分离株的耐药性与主要易化载体超家族蛋白和羊毛甾醇14 α -去甲基化酶的高表达相关,前者与张月香等^[6]研究结论相符,后者与Jiang et al^[3]和Vandeputte et al^[7]研究结论相符。主要易化载体超家族蛋白利用离子梯度势能作为能量来源,将细胞内的药物转运到细胞外,导致耐药;羊毛甾醇14 α -去甲基化酶作为靶酶,表达增高意味着需要更高的胞内药物浓度来抑制靶酶的活力,同样导致了耐药。江岑等^[8]在研究中发现热带念珠菌耐药株中主动外排蛋白的底物罗丹明6G的外排作用不显著,这与本实验中耐药组CDR1的高表达率与敏感组的高表达率差异无统计学意义相符。

本研究显示耐药菌株存在交叉耐药现象,由于Sanglard et al^[9]将过度表达的MDR1基因转入酿酒酵母pdr5突变株,发现其只对FCA耐药,而对其他唑类药物不耐药,MDR1p底物具有特异性,因此交叉耐药现象可能是由于靶酶基因ERG11的高表达引起,而不是由MDR1基因的高表达造成。本实验

中有1株敏感株CDR1基因的高表达和1株敏感株ERG11基因的高表达,说明主动外排蛋白的高表达和靶酶的高表达不一定导致耐药。实验中8株耐药株中有4株都不止一种耐药基因的高表达,说明热带念珠菌的耐药可能是由多种基因共同作用的结果,这对研发新的抗真菌药物具有理论意义。实验中有一株耐药株3种基因均不高表达,说明此热带念珠菌存在其他的耐药机制。

热带念珠菌感染率和耐药率的升高给临床抗真菌治疗带来了严峻的挑战,本实验中对热带念珠菌外排蛋白和靶酶的研究对研发新的抗真菌药物具有重要意义,但热带念珠菌对FCA的耐药有多种耐药机制,过程复杂,需要不断深入和持续的研究。

参考文献

- [1] Kothavade R J, Kura M M, Valand A G, et al. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole [J]. J Med Microbiol 2010, 59(8): 873-80.
- [2] 顾迟, 陈功祥, 周宏伟. 念珠菌对唑类药物耐药性及耐药机制的研究进展 [J]. 临床药物治疗杂志 2010, 8(3): 44-8.
- [3] Jiang C, Dong D F, Yu B Q, et al. Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China [J]. J Antimicrob Chemother 2013, 68(4): 778-85.
- [4] Silva S, Hooper S J, Henriques M, et al. The role of secreted aspartyl proteinases in *Candida tropicalis* invasion and damage of oral mucosa [J]. Clin Microbiol Infect 2011, 17(2): 264-72.
- [5] Pfaller M A, Diekema D J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem [J]. Clin Microbiol Rev 2007, 20(1): 133-63.
- [6] 张月香, 杨淑华, 王建红. 热带念珠菌耐药基因的初步研究 [J]. 中国医学检验杂志 2009, 10(3): 122-3.
- [7] Vandeputte P, Larcher G, Bergès T, et al. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis* [J]. Antimicrob Agents Chemother 2005, 49(11): 4608-15.
- [8] 江岑, 董丹凤, 俞焰素, 等. 3种念珠菌对氟康唑耐药的易感性及耐药机制比较 [J]. 中国感染与化疗杂志 2013, 13(4): 296-301.
- [9] Sanglard D, Ischer F, Koymans L, et al. Amino acid substitutions the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents [J]. Antimicrob Agents Chemother 1998, 42(2): 241-53.

A preliminary study on fluconazole resistance mechanism of *Candida tropicalis*

Jiang Yulu, Wang Zhongxin, Shen Jilu

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

Abstract Fluconazole (FCA)-susceptible and resistant isolates were classified by ATB FUNGUS 3 strip from 25

clinical *Candida tropicalis*, efflux gene CDR1, MDR1 and enzyme gene ERG11 were amplified by ABI 7300 Taq-Man analyzer, relative expression quantities were calculated by $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, overexpression rates of sensitive isolates and resistant isolates were statistically analyzed using Fisher exact probability method. There were statistically significant differences in the overexpression rates of MDR1 and ERG11 ($P < 0.05$), no statistically significant difference in the overexpression rate of CDR1 ($P > 0.05$). *Candida tropicalis* resistance to FCA was mediated by overexpression of efflux gene MDR1 and enzyme gene ERG11.

Key words *Candida tropicalis*; fluconazole resistance; CDR1; MDR1; ERG11

(上接第 535 页)

- [8] 倪朝民. 脑卒中的临床康复[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2013: 214-5.
- [9] Chen C Y, Hong P W, Chen C L, et al. Ground reaction force patterns in stroke patients with various degrees of motor recovery determined by plantar dynamic analysis[J]. *Chang Gung Med J* 2007, 30(1): 62-72.
- [10] Mickle K J, Munro B J, Lord S R, et al. Foot pain, plantar pressures and falls in older people: a prospective study[J]. *J Am Geriatr Soc* 2010, 58(10): 1936-40.
- [11] Menz H B, Fotoohabadi M R, Munteanu S E, et al. Plantar pressures and relative lesser metatarsal lengths in older people with and without forefoot pain[J]. *J Orthop Res*, 2013, 31(3): 427-33.
- [12] 王人成, 张美芹. 人体步态时相对对称性评价指标的对比研究[J]. *中国康复医学杂志* 2011, 26(10): 957-9.
- [13] 李华, 曹虹, 杨俊, 等. 脑卒中后简易步态分析与下肢功能评定的相关性研究[J]. *中华物理医学与康复杂志* 2001, 23(3): 176.
- [14] Hillier S, Lai M S. Insole plantar pressure measurement during quiet stance post stroke[J]. *Top Stroke Rehabil* 2009, 16(3): 189-95.
- [15] 谢财忠, 高润, 唐军凯. 早期康复对缺血性脑卒中患者足底压力分布的影响[J]. *中国康复医学杂志* 2011, 26(7): 644-8.

Correlation of plantar pressure and walking phase in post-stroke hemiplegic patients

Yang Jie, Ni Chaomin, Yin Aoran, et al

(Dept of Rehabilitation Medicine, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract **Objective** To analyze the correlation of plantar pressure and walking phase in post-stroke hemiplegic patients. **Methods** Thirty post-stroke hemiplegic patients were recruited for the experimental group. These patients were accorded with the criteria that the subjects could walk 10 m independently. Thirty healthy adults were selected as control group. Gait and balance function training evaluation system was used in time-space parameter and plantar pressure analysis. **Results** There was no significant difference ($P > 0.05$) in the peak of plantar pressure of left and right lower limbs of normal persons. There were significant differences ($P < 0.01$) in the peak of plantar pressure of affected and unaffected lower limbs of post-stroke hemiplegic patients. Compared to the control group, there were significant differences ($P < 0.05$) in the peak of plantar pressure, swing time ratio and stance time ratio of post-stroke hemiplegic patients. The swing time ratio and stance time ratio of post-stroke hemiplegic patients had a positive correlation with the peak of plantar pressure of unaffected lower limbs post-stroke hemiplegic patients in heel strike phase, stance phase and push-off phase ($P < 0.01$). The swing time ratio and stance time ratio of post-stroke hemiplegic patients had a negative correlation with the peak of plantar pressure of affected lower limbs post-stroke hemiplegic patients in heel strike phase, stance phase and push-off phase ($P < 0.01$). **Conclusion** Plantar pressure of unaffected and affected lower limbs post-stroke hemiplegic patients has a high correlation with walking phase.

Key words stroke; plantar pressure; swing phase time; stance phase time