

白念珠菌基因多态性与耐药性关系

黄 静, 刘 慧, 朱家馨, 周宇麒, 谈淑卿, 张天托
(中山大学附属第三医院呼吸内科, 广东 广州 510630)

摘 要: 【目的】探讨耐氟康唑白念珠菌基因多态性与其耐药性是否相关。【方法】收集 48 株敏感白念珠菌和 10 株耐氟康唑白念珠菌, 其中包括 2 株体外诱导的耐氟康唑白念珠菌。选择 1 个随机引物(引物 1251), 采用任意引物 PCR 方法基因分型, 将电泳图谱扫描入计算机后采用 Labwork4.0 软件转化为数值图表, 利用 SPSS 11.5 进行聚类分析。【结果】引物 1251 的 PCR 指纹图带型稳定, 多态性丰富, 可以作为分型引物。聚类分析结果提示 8 株临床耐药菌的 PCR 指纹图相似系数为 71.7%, 而其中 7 株的耐药菌相似系数高达 86.7%, 远高于 58 株菌的平均相似系数(47.3%)。2 株体外诱导的耐药菌诱导前后基因型未发生变化。【结论】基因分型的结果未提示耐氟康唑白念珠菌存在一定的特殊电泳条带, 但提示了特定的 PCR 指纹图可能与耐药性有一定相关性。

关键词: 白念珠菌; 基因型; 氟康唑; 耐药性; 任意引物 PCR

中图分类号: R915

文献标识码: A

文章编号: 1672- 3554(2007)01- 0035- 05

Analysis of Relationship of *C. albicans* Gene Polymorphisms and Its Drugs Resistance

HUANG Jing, LIU Hui, ZHU Jia-xin, ZHOU Yu-qi, TAN Shu-qing, ZHANG Tian-tuo

(Department of Respiratory Internal Medicine, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-Sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objectives】 To investigate the possible relationship of *C. albicans* gene polymorphisms and its fluconazole- resistance. 【Method】 Forty- eight fluconazole- susceptible stains and 10 fluconazole- resistant stains of *C. albicans* were analyzed, with two resistant stains induced in vitro. All of them were genotyped by arbitrary primed polymerase chain reaction (AP- PCR) fingerprinting employing one interrepeat primes (1251 primers). The image was captured using computer- assisted system with Labwork 4.0 software to analyze the gel patterns of all isolates. The data were processed by SPSS 11.5 statistical software. 【Results】 Primer 1251 was suitable for fingerprinting analysis, and was found to generate the reproducible fingerprinting profiles, yielding well- resolved banding patterns. The AP- PCR profiles of 8 resistant stains isolated clinically were highly similar according to similarity coefficient (71.7%). Furthermore, the similarity coefficient of 7 resistant isolates (86.6%) was significantly higher than that of total 58 stains (47.3%). For two induced isolates, their genotypes did not change much after resistance- inducement in vitro. 【Conclusions】 No specific DNA profiles of *C.albicans* indicating fluconazole- resistance were identified. However, our results demonstrated a strong genetic correlation between fluconazole- resistant patterns and its AP- PCR profiles in *C.albicans*.

Key words: *C.albicans*; genotype; fluconazole; drug resistance; AP- PCR

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(1): 35- 39]

近年来随着免疫抑制剂、抗肿瘤药物、广谱抗生素的应用及艾滋病流行, 临床上因白念珠菌感染所致的深部真菌病逐年增多, 而过多、广泛的使用抗真菌药物所产生的选择压力, 使念珠菌的耐药现象有明显增多的趋势。白念珠菌的耐药表型与基因型的关系目前仍不清楚, 寻找一种恰当的

基因分型方法, 探讨其与耐药表型的关系, 对监测耐药株的分子流行病学, 以及深化耐药分子机制的研究有重要的临床意义^[1]。我们应用任意引物 PCR(Arbitrary primed - PCR)的方法对临床分离的白念珠菌进行了基因分型, 研究白念珠菌的耐药性与基因多态性的关系。

收稿日期: 2006-09-28

作者简介: 黄 静(1972-), 女, 广西桂林人, 博士生; 张天托, 教授, 博士生导师, 通讯作者. E-mail: zhtituli@163.com

1 材料与方法

1.1 受试菌株

8 株耐氟康唑白念珠菌 (MIC>64 $\mu\text{g/mL}$), 分别从近两年我院 8 名器官移植术后和骨髓移植术后患者的痰液中和深静脉导管黏附物中分离得到。同期选择了 47 株对氟康唑敏感的白念珠菌, 均从我院患者的痰液、血液、静脉导管拭子等分离培养得到。2 株为我们利用体外氟康唑诱导后产生耐药性白念珠菌 (m90028, m113) 另有 1 株标准的白念珠菌为 ATCC90028, 为我科实验室保存。

1.2 药物敏感性测定

氟康唑纸片扩散法初筛试验采用 2002 年美国国家临床实验室标准委员会 (NCCLS) 认可的酵母菌纸片扩散法敏感试验方法, 对 58 株白念珠菌进行了氟康唑初筛实验。采用 Etest 法测定耐药菌株对常用抗真菌药的最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC)。进行 MIC 测定的菌株为已经氟康唑纸片扩散法测定判为耐药菌株。E test 试纸条为瑞典 AB.Biodisk 公司出品, 包括氟康唑 (fluconazole) 0.016 ~256 $\mu\text{g/mL}$ 、二性霉素 B (amphotericin B) 0.002 ~32 $\mu\text{g/mL}$ 、5- 氟胞嘧啶 (5-Fu) 0.002 ~32 $\mu\text{g/mL}$ 、酮康唑 (ketoconazole) 0.002 ~32 $\mu\text{g/mL}$ 、伊曲康唑 (itraconazole) 0.002 ~32 $\mu\text{g/mL}$ 。将 5 种 E test 试纸条按不同角度紧贴于培养基上, 35 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 24 ~48 h, 根据抑菌环大小判读 MIC 值。质控标准: 以白念珠菌 ATCC90028 为质控株。对氟康唑 MIC>64 $\mu\text{g/mL}$ 为耐药株。

1.3 白念珠菌 DNA 的提取

取保存在牛奶管中的菌种, 分别划线转种至沙氏培养基上, 35 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h 后, 取分离开的新鲜单菌落溶于 YEPG 液体培养基中, 35 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 24 h。DNA 提取采用酶破壁和酚氯仿抽提方法。

1.4 AP-PCR 反应

根据文献[10]选择了 1 条寡核苷酸引物: 引物 1251 (被称之为真核细胞内重复序列) 作为 AP-PCR 分型的随机引物 (由上海生物工程公司合成), 序列为 5'-TGG GTG TGT GGG TGT GTG GGT GTG-3'。AP-PCR 反应体系: PCR Premix 25 μL (含 TaKaRa Taq 1.25 U, dNTPs 各 0.4 mmol/mL, Mg^{2+} 3 mmol/mL), 白念 DNA 模板 3 μL , Primer F 1 μL (20 $\mu\text{mol/L}$), Primer B 1 μL (20 $\mu\text{mol/L}$),

ddH₂O 20 μL , 反应终体积 50 μL 。AP-PCR 反应参数如下: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 前 5 个循环为 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 35 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min; 后 40 个循环为 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.5 PCR 产物电泳及分析

以 DNA 分子量 100 bp DNA ladder plus marker 为分子量标准, PCR 产物在含 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 溴乙啶的 2 g/L 琼脂糖中电泳后, 用凝胶成像系统观察结果并将其经荧光扫描处理后输入计算机, 根据电泳条带的位置, 荧光的强弱, 经 Labwork 4.0 软件处理后转化为数值图表, 以电泳图谱的条带数目、位置以及 PCR 产量的相对大小作为统计变量, 应用 SPSS11.5 软件对 58 株白念珠菌的 PCR 指纹图谱进行聚类分析。本研究利用相似系数评价菌株之间的关系。AP-PCR 实验重复 2 次。

2 结果

2.1 MIC 值

表 1 为 10 株耐药白念珠菌对 5 种常用抗真菌药的 MIC 值。

表 1 耐氟康唑白念珠菌对常用抗真菌药的 MIC 值
Table 1 MIC of five commonly used antifungal agents against ten resistant stains of *C.albicans* ($\mu\text{g/mL}$)

Stain	Fluconazole	Ketoconazole	Itraconazole	Amphotericin	5- Fu
ATCC90028	0.125	0.125	0.125	0.125	0.250
m90028	64.000	0.125	0.125	0.125	0.250
m113	126.000	0.125	0.125	0.060	1.000
64550	64.000	1.000	0.125	0.125	0.500
133	64.000	1.000	1.000	0.060	0.500
142	128.000	4.000	0.500	0.125	0.500
171	64.000	0.750	0.250	0.250	0.800
183	64.000	1.000	0.125	0.125	1.000
235	64.000	1.000	1.000	0.060	32.000
258	256.000	0.600	0.125	0.250	32.000
306	256.000	8.000	1.000	0.125	32.000

2.2 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果

8 株临床耐氟康唑白念珠菌、2 株诱导产生耐药株和 48 株敏感菌株的 DNA 模板经引物 1251 扩增, 所得 PCR 产物电泳带型稳定, 得到的 DNA 多态性丰富, 结果明确, 对其中 30 株菌的 AP-PCR 反应重复 3 次, 获得了较为稳定的 PCR 指纹

图谱(图 1-4)。条带数目多在 1~9 条之间,最小的片段约 250 bp, 最大的片段约 2 200 bp,95%以上的片段集中在 500~1 031 bp,90%的菌株有 600 和 800 bp,不同菌株之间的数量和扩增片段的大小存在差异,即使带型完全一致的菌株,有些片段的溴乙啶显色强度也有区别,而通过荧光扫描输入计算机转化为数值图表之后,菌株之间的差异更可以清晰的从数值的大小反应出来。



图 1 10 株耐氟康唑白念珠菌和 5 株敏感株 AP-PCR 指纹图谱

Fig.1 AP-PCR profiles of 10 resistant stains of *C. albicans* and 5 susceptible stains

Lanes M: 100 bp ladder; 90028 is ATCC90028; m90028 is the mutation of ATCC90028 in-vitro; m113 is the mutation of 113; Lanes 133,142,171,183,235,258,306,64550 are resistant to fluconazole; Lanes 90028,113, 1 to 3 are stains which are susceptible to fluconazole



图 2 14 株敏感白念珠菌 AP-PCR 指纹图

Fig.2 AP-PCR profiles of 14 susceptible stains of *C. albicans*

Lanes M: 100 bp ladder; lanes 4-17 are those clinical stains which are susceptible to fluconazole

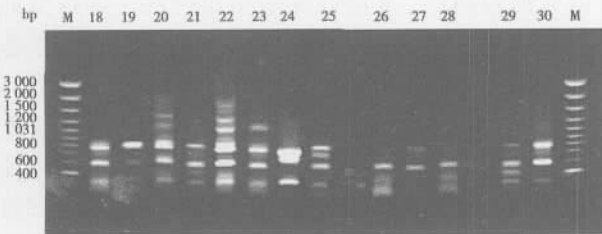


图 3 14 株敏感白念珠菌 AP-PCR 指纹图

Fig. 3 AP-PCR profiles of 14 susceptible stains of *C. albicans*

Lanes M: 100 bp ladder; lanes 18-30 are those clinical stains which are susceptible to fluconazole

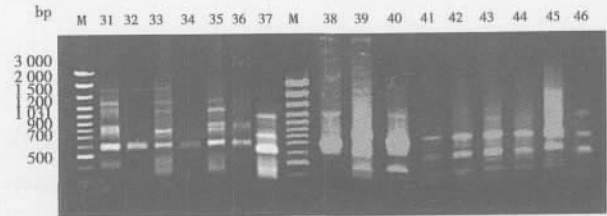


图 4 16 株敏感白念珠菌 AP-PCR 指纹图

Fig.4 AP-PCR profiles of 16 susceptible stains of *C. albicans*

Lanes M: 100 bp ladder; lanes 31-46 are those clinical stains which susceptible to fluconazole

2.3 不同菌株的基因型之间的关系

聚类分析的结果显示,2 株体外诱导的耐氟康唑白念珠菌诱导前后基因型未发生变化,相似系数为 100%。而 8 株临床耐氟康唑白念珠菌的 PCR 指纹图相似系数为 71.7%,其中 7 株耐药菌的相似系数高达 86.6%,而 58 株菌的平均相似系数为 47.3% (图 5 为 58 株白念珠菌基因型的聚类树状图)。

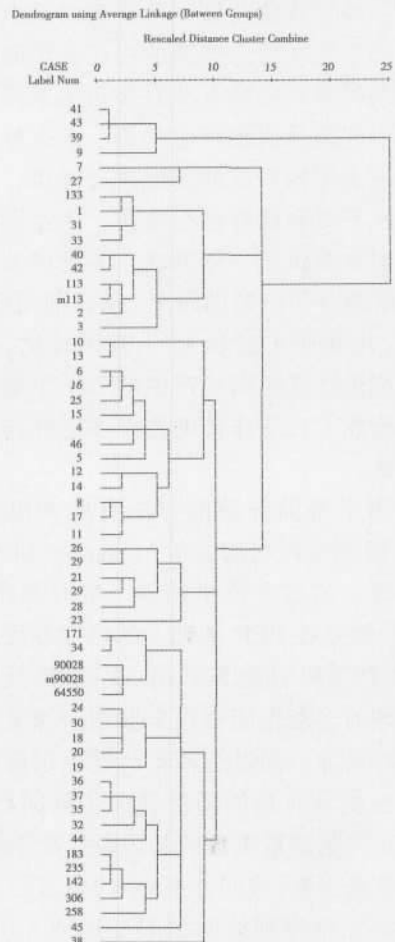


图 5 58 株白念珠菌 AP-PCR 基因分型的聚类树状图

Fig.5 Dendrograms based on AP-PCR analysis of 58 stains of *C. albicans*

3 讨 论

白念珠菌是目前临床上最常见的深部真菌病的病原体,近年来随着高危深部真菌患者的逐年增多,氟康唑在临床上得到广泛使用,其对氟康唑的耐药率也在逐年上升^[2,3]。我们收集了该院这3年多出现的8株耐药白念珠菌,另采用体外氟康唑诱导的方法,诱导了2株耐氟康唑白念珠菌。经E-test法检测,10株耐药菌中对氟康唑的MIC值最低为64 μg/mL,最高为256 μg/mL,有2株出现对5-Fu耐药,4株对酮康唑的MIC值较高,2株出现对酮康唑耐药(MIC=4 μg/mL),3株对伊曲康唑的敏感性较差,MIC值已达1.0 μg/mL,但都对二性霉素-B保持了较好的敏感性。我国目前缺乏对白念珠菌耐药情况的大规模流行病学调查结果,对真菌的耐药机制研究相对较少,迫切需要加强这方面的研究。

目前各种抗真菌药敏试验检测的是白念的耐药表型,如果能在白念珠菌的耐药表型和基因型之间找到某种客观的联系或直接运用基因分型的方法找出引起耐药表型产生的单一多态性,就有可能对该表型相对应的基因进行定位,从而可以在分子水平对耐药性进行检测,为监测耐药的分子流行病学提供了一种方法,并可以大大加快白念珠菌耐药分子机制的研究。从目前的研究看,碱基突变,片断插入或缺失^[4,5],基因转化,等位基因的缺失都是造成耐药性产生的分子生物学基础^[1,6],这就造成了白念珠菌的基因多态性与耐药性产生的关系。

目前用于基因分型的方法有脉冲电泳技术(PFGE)、限制性内切酶分析与Southern blot杂交、基因芯片等,但这些技术烦琐、费时或昂贵,而AP-PCR是建立在PCR基础上的构建基因组图谱的方法,也称随机引物PCR,由AP-PCR反应产生的指纹图谱的多态性能够用来鉴别亲缘关系很近的个体间的差异。通过选择不与基因组匹配得很好的单个引物及有目的降低退火步骤的严谨度,可重复的获得信息量丰富的基因组指纹图谱,因此能检测近等基因系(或同类系)中的多态性。而且,经过设计可以将序列偏向的人工地加入引物中,使这些引物直接针对重复序列和基元序列,从而扩增出复杂的图谱并可检测多个多态性位点^[7]。有

学者曾采用RAPD(随机扩增的DNA多态性)进行基因型与耐药性的分析^[8],由于RAPD只采用一个人工合成的不大于10个碱基的短核苷酸链随机引物,极易产生假带而影响辨别。近来,由于计算机辅助分析软件的迅速发展,可以减少由于指纹图谱复杂的带型带来鉴别上的人为误差。Clemons等^[9]将电泳结果扫描并用计算机软件进行分析,提出了可以采用相似系数这一统计学概念评价菌株间的亲缘关系。

我们利用AP-PCR的方法,根据文献^[10]选择了1条寡核苷酸引物对10株耐氟康唑白念珠菌和48株敏感菌进行了基因分型,经过调整恰当的退火温度和退火步骤,产生的DNA多态性丰富,带型稳定性很好,可作为AP-PCR分型。与文献不同的是,本研究将退火温度降低,并设定了PCR反应首先进行5个低严谨度循环,然后再进行40个高严谨退火条件下的循环,由此产生了比文献更为丰富PCR指纹图。经过计算机荧光扫描指纹图准确的确定了电泳条带的大小,位置,产量大小等,最后将其电泳图像转化为数值图表进行聚类分析,结果发现8株临床耐药菌株的平均相似系数为71.7%,其中7株的相似系数高达86.1%,远高于58株菌的平均相似系数(47.3%)。这提示了耐氟康唑的白念珠菌耐药表型与其基因型可能相关。其中两株体外诱导的耐药株的基因型在该次AP-PCR反应中提示诱导前后基因未发生变化,一种可能是非基因突变的机制导致了耐药性的产生,另一种可能是发生了突变,但该引物未能反映出来。不同菌株即使扩增的产物相同,但同一PCR反应体系的产量之比可有明显不同,这说明不同菌株的等位基因可存在差异,本实验还未能判断耐药菌存在或缺失某一与耐药相关的特殊条带,但不能否定该种基因型的白念珠菌是否易于获得后天的耐药性。8株临床耐氟康唑的白念珠菌的电泳条带并不完全一致,而是表现出较高的多态性,这除与耐药性的产生有多种途径,还与AP-PCR实验也有一定的相关性,如较低的退火温度的产生了非特异的条带,这可以通过重复试验检测纠正,但不适宜大量样品的检测。AP-PCR可以使得基因分型更简单、自动、批量化,但必须要求PCR反应条件标准化,如采用相同的试剂和步骤,同时PCR产物的电泳条件也尽可能保持一致。进一步分析AP-PCR方法产生的DNA特殊标记还

需要进行大量的耐药分子流行病学调查数据, 由于白念珠菌存在高度的遗传多态性, 如果在了解不同白念珠菌基因图谱上设计更为恰当和有针对性的引物, 采用精心设计的退火温度, 就能准确的识别基因型与耐药性的关系, 从而大大加快耐药分子机制的研究。

参考文献:

- [1] WHITE T C, MARR K A, BOWDEN R A. Clinical, cellular, and molecular factor that contribute to antifungal drug resistance [J]. *Clin Microbiol Rev*, 1998, 11(2):382- 402.
- [2] PFALLER M A, MESSER S A, HOLLIS R J, et al. In vitro activities of ravuconazole and voriconazole compared with those of four approved systemic antifungal agents against 6970 clinical isolate of candida spp[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(6): 1723- 1727.
- [3] BARAN J Jr, KLAUBER E, BARCZAK J, et al. Trends in antifungal susceptibility among Candida sp. Urinary isolates from 1994 and 1998[J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(2):870- 871.
- [4] FAVRE B, DIOMON M, RYDER N S, et al. Multiple amino acid substitutions in lanosterol 14 - demethylase contribute to azole resistance in Candida albicans [J]. *Microbiology*, 1999, 145:2715- 2725.
- [5] ASAI K, TSUCHIMORI N, OKONOJI K, et al. Formation of azole-resistant Candida albicans by mutation of sterol 14- demethylase P450[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(5):1163- 1169.
- [6] WHITE T C, HOLLEMAN S, DY F, et al. Resistance mechanisms in clinical isolates of Candida albicans [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46 (6): 1704- 1713.
- [7] 穆里斯 KB, 费里 F, 吉布斯 R. 陈受宜, 朱立煌, 等译. 聚合酶链式反应[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 276- 279.
- [8] DASSANAYAKE R S, ELLEPOLA A N, SAMARANAYAKE Y H, et al. Molecular heterogeneity of fluconazole - resistant and - susceptible oral Candida albicans isolates within a single geographic locale [J]. *APMIS*, 2002, 110(4): 315- 324.
- [9] CLEMONS K V, FEROZE F, HOLMBERG K, et al. Comparative analysis of genetic variability among Candida albicans isolates from different geographic locales by three genotypic methods[J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(6):1332- 1336.
- [10] BARTIE K L, WILLIAMS D W, WILSON M J, et al. PCR fingerprinting of Candida albicans associated with chronic and other oral condition [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(11): 4066- 4075.
- (编辑 黄小延)
-
- (上接第 18 页 from page 18)
- inhibiting the p53- inducible and death- promoting Bax protein [J]. *Genes Dev*, 1996, 10(4):461- 477.
- [9] WONG H, ANDERSON WD, CHENG T, et al. Monitoring mRNA expression by polymerase chain reaction: the "primer - dropping" method [J]. *Anal Biochem*, 1994, 223(2):251- 258.
- [10] De FELICI M, KLINGER FG, FARINI D, et al. Establishment of oocyte population in the fetal ovary: primordial germ cell proliferation and oocyte programmed cell death [J]. *Reprod Biomed Online*, 2005, 10 (2):182- 191.
- [11] PARIS F, PEREZ GI, FUKS Z, et al. Sphingosine 1- phosphate preserves fertility in irradiated female mice without propagating genomic damage in offspring [J]. *Nat Med*, 2002, 8(9):901- 902.
- [12] HUSSEIN M R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms [J]. , 2005, 11(2):162- 177.
- [13] MORITA Y, PEREZ G I, MARAVEI D V, et al. Targeted expression of Bcl- 2 in mouse oocytes inhibits ovarian follicle atresia and prevents spontaneous and chemotherapy- induced oocyte apoptosis in vitro [J]. *Mol Endocrinol*, 1999, 13(6):841- 850.
- [14] TAKAI Y, CANNING J, PEREZ G I, et al. Bax, caspase- 2, and caspase- 3 are required for ovarian follicle loss caused by 4- vinylcyclohexene diepoxide exposure of female mice in vivo [J]. *Endocrinol*, 2003, 144(1): 69- 74.
- [15] PEREZ GI, ROBLES R, KNUDSON C M, et al. Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax- deficiency [J]. *Nat Genet*, 1999, 21 (2):200- 203.
- (编辑 张恩健)