

白念珠菌耐药性与细胞周期及凋亡的关系

Relationship of drug resistance of *Candida albicans* with cell cycles and apoptosis

吴建华¹, 梁晓博², 温海³

(1. 第二军医大学长海医院皮肤科, 上海 200433; 2. 解放军第 301 医院 309 临床部皮肤科, 北京 100091; 3. 第二军医大学长征医院皮肤科, 上海 200003)

[关键词] 白念珠菌; 耐药性; 细胞周期; 凋亡

[中图分类号] R 379.4 [文献标识码] B [文章编号] 0258-879X(2006)02-0222-02

近年来,念珠菌的耐药问题日显突出,文献报道^[1]念珠菌耐药表型由相关基因控制。本研究对凋亡及耐药这两种基因调控的过程是否有某种相关性这一问题进行了初步探索,现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 白念珠菌氟康唑敏感标准株 Y01-09 和氟康唑耐药标准株 Y01-19 由中国医学科学院皮肤病研究所提供。YEPD 酵母培养基(1% 酵母提取物, 2% 蛋白胨, 2% 葡萄糖), 10×PBS 缓冲液(NaCl 8 g, KCl 0.2 g, KH₂PO₄ 0.2 g, Na₂HPO₄ 1.15 g, 加双蒸水 1 000 ml, 调 pH 至 7.4)。CH20BIMF 显微镜购自日本 Olympus Optical Co. Ltd。EP-ICS-XL 流式细胞仪(FCM)购自美国 Coulter 公司。

1.2 菌体计数 将冻存于 -20℃ 冰箱的菌株放入 4℃ 冰箱过夜复苏。在超净工作台内用接种环挑取复苏后的菌株接种于含 50 ml YEPD 培养基的三角烧瓶中, 置恒温摇床振荡培养(30℃, 250 r/min), 过夜。将培养过夜的培养物移至 50 ml 离心管中, 离心沉淀(4 000 r/min, 2 min), 用灭菌双蒸水漂洗 2 次。加 5 ml 灭菌双蒸水, 振荡混悬, 移入 5 ml 离心管中。用血细胞计数板统计收集物的菌体数目, 并用灭菌双蒸水调整菌体浓度为 1×10⁴ CFU/ml, 上封 2 ml 灭菌石蜡油, 放入 4℃ 冰箱备用。用微量加样器分别吸取 10 μl(计 1×10⁵ CFU) 接种菌液加入含 50 ml YEPD 培养基的三角烧瓶中, 置恒温摇床振荡培养(30℃, 250 r/min)。在培养 12 h 后每隔 2 h 取一只培养烧瓶, 用血细胞计数板进行菌体计数, 同一份培养物计数 3 次取平均数, 菌体总数除以初始接种菌量即为生长倍数。然后离心收集菌体, 先用灭菌双蒸水漂洗 2 次后, 再加入 5 ml -20℃ 预冷的 70% 乙醇溶液固定, 过夜后送 FCM 测定。

1.3 流式细胞仪测定 将待测菌液离心(4 000 r/min, 2 min), 用 PBS 洗 2 次, 加 0.1% Triton X-100 2 ml, 静置 3 min, 离心, 去上清。加 0.05% PI 液(终浓度 50 μg/ml), 暗环境放置 30 min。上机检测, 检测波长 620 nm, 分析软件为 mcy-clc 专用软件。

2 结果

2.1 时间-生长曲线 结果如图 1 所示, 2 菌株在 28 h 以前处于对数生长期, 而在这以后则处于稳定生长期。

2.2 细胞周期-时间曲线 白念珠菌在对数生长期细胞以 S 期、G₂/M 期或 S-G₂/M 期为主, 在稳定生长期以 G₁ 期为主, 而细胞凋亡的比率不随培养时间或生长速率的变化而变化, 保持在一个相对稳定的值(图 2)。

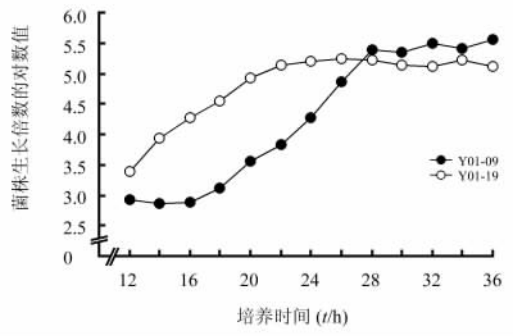


图 1 菌株 Y01-09、Y01-19 时间生长曲线

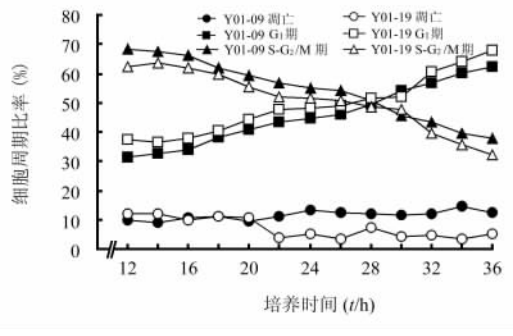


图 2 白念珠菌培养时间与细胞周期的关系

3 讨论

在理论上念珠菌接种在培养液中, 如果温度适宜、营养丰富, 可以一直保持在分裂增殖状态。但是接种在一定体积培养液内的念珠菌随着培养时间的延长, 营养成分不断消耗、代谢产物不断蓄积, 真菌的分裂增殖必然受到抑制, 其中也有“接触抑制”的因素, 振荡培养可以减轻接触抑制的影响。文献报道^[2], 酵母真菌对数生长期一般在 16~18 h 以

[作者简介] 吴建华, 博士, 副教授、副主任医师。

内,因此做菌种实验时都有“培养过夜(over night)”的做法,意图就是在对数生长期内真菌生长活跃,便于实验操作。本研究采用的两株白念珠菌的对数生长期延长到了28 h,可能与培养液的组成、菌株的营养要求以及培养液的体积相对于接种菌量的比例更高有关。本实验所用两株白念珠菌标准株,其中Y01-09为氟康唑敏感株,而Y01-19为氟康唑耐药株,但两者的时间-生长曲线及细胞周期规律基本一致,可见其耐药性与细胞分裂无关。

有文献报道^[3],白念珠菌感染宿主时可以诱导机体分泌相关细胞因子,也可以诱导中性粒细胞的凋亡,而抑制单核细胞凋亡。本研究发现体外培养的白念珠菌本身也存在细胞凋亡的现象,在FCM结果上白念珠菌凋亡细胞的比值并不随培养时间延长或增殖速率下降而变化,可能原因是营养减少、代谢产物蓄积以及接触抑制并不能促进凋亡相关基因的表达。而氟康唑敏感株和耐药株的凋亡比率接近,表明其耐药性与凋亡不相关,这与有关文献报道一致^[4],即某些抗真菌药物并不是通过诱导细胞凋亡发挥作用,而可能是通过

直接抑制真菌的新陈代谢发挥抗真菌作用。

[参考文献]

- [1] White TC, Holleman S, Dy F, et al. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46:1704-1713.
- [2] 周德庆 著. 微生物学教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993. 188.
- [3] Gasparoto TH, Gaziri LC, Burger E, et al. Apoptosis of phagocytic cells induced by *Candida albicans* and production of IL-10[J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2004, 42:219-224.
- [4] Wunder D, Dong J, Baev D, et al. Human salivary histatin 5 fungicidal action does not induce programmed cell death pathways in *Candida albicans*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48:110-115.

[收稿日期] 2005-11-10

[修回日期] 2006-01-06

[本文编辑] 孙岩