

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00211

基因芯片在白念珠菌耐药基因研究中的应用

麻志萍¹, 原永芳¹, 贾鑫明², 王彦², 曹永兵², 付守廷³, 姜远英^{2*}

1. 上海交通大学医学院附属第三人民医院药剂科, 上海 201900

2. 第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433

3. 沈阳药科大学药理教研室, 沈阳 010016

[摘要] 近年来, 临床上白念珠菌耐药现象日趋增多, 利用基因芯片来绘制基因表达图谱是目前研究白念珠菌耐药基因最常用的手段。通过基因芯片对菌株在不同药物处理或经不同途径产生耐药表型后大量差异表达基因进行分析, 可用来寻找耐药相关基因, 并阐明其功能, 更有助于多基因协同作用机制的深入研究。

[关键词] 白念珠菌; 耐药相关基因; 寡核苷酸序列分析

[中图分类号] R 379.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)02-0211-04

Application of gene chip technique in studying drug resistance genes in *Candida albicans*

MA Zhi-ping¹, YUAN Yong-fang¹, JIA Xin-ming², WANG Yan², CAO Yong-bing², FU Shou-ting³, JIANG Yuan-ying^{2*}

1. Department of Pharmacy, the Third People's Hospital of Shanghai, Medical College, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201900, China

2. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433

3. Department of Pharmacology, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 010016

[ABSTRACT] In recent years, drug resistance of *Candida albicans* is on a rise in clinical practice. Gene chip technique is the most commonly used means to map gene expression profile in drug resistant *Candida albicans*. Gene chip can be used to analyze the differentially expressed genes in drug resistant *Candida albicans* strains induced by various procedures. The drug resistant genes can be identified and their functions can be further studies. The results of gene chip study can also play a role in studying the mechanism of synergism of multiple drug resistance genes.

[KEY WORDS] *Candida albicans*; drug resistance-associated gene; oligonucleotide array sequence analysis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(2): 211-214]

白念珠菌作为威胁免疫缺陷患者生命的病原微生物之一, 其耐药现象日趋增多, 导致治疗的反复性和长期性, 并消耗了巨大的人力和财力。探明白念珠菌的耐药机制是从根本上解决其耐药现象的基础。白念珠菌出现耐药表型主要是因为基因发生了改变, 因此明确耐药基因是解决问题的关键。在寻找白念珠菌耐药基因的研究中, 用药物处理细胞, 将引起细胞外部形态及内部代谢过程的一系列变化, 而以上现象都可以归咎于基因表达的变化。通过比较药物处理前后细胞基因表达的变化有助于了解哪些基因与耐药相关。以往由于技术水平的限制, 此项研究一直缺乏高效快捷的方法, 然而近年来基因芯片技术的发展为此项研究提供了有利条件。利用基因芯片来绘制基因表达图谱逐渐成为目前研究白念珠菌耐药基因最常用的手段, 本文就近年来基因芯片技术在白念珠菌耐药机制中的应用及其研究进展作一综述。

1 基因芯片

基因芯片 (gene chip) 是指通过微阵列 (microarray) 技术将高密度 DNA 片段阵列通过高速机器人或人工原位合成方式以一定的顺序或排列方式使其附着在玻璃片等固相支持物表面, 以荧光标记的 DNA 探针, 借助碱基互补杂交原理, 进行大量的基因表达及检测等方面研究的技术。基因芯片主要有寡核苷酸 (oligodeoxynucleotides, ODNs) 芯片和 cDNA (complementary DNA) 芯片。基因芯片的制备有两种思路: 其一是将靶 DNA 固定于支持物上, 对大量不同靶 DNA 进行分析; 其二是将大量探针分子固定于支持物上, 对同一靶 DNA 进行不同探针序列的分析。其中 cDNA 微点阵是以定量的方式同时监测大量基因相对表达的有效方法, 在基因表达分析中具有重要作用^[1]。该技术可以在杂交实验中对多个不同状态菌株 (不同药物刺激、不同诱导途径) 中数千

[收稿日期] 2007-06-30 **[接受日期]** 2007-12-05

[作者简介] 麻志萍, 硕士生。

* 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: jiangyuanying@126.com

基因的表达差异进行定量检测,探针序列一般来自于已知基因的 cDNA 或表达序列标签(expressed sequence tags, EST)库。因其能一次对大量的 DNA 分子或 RNA 分子进行检测分析,从而解决了传统核酸印迹杂交技术复杂、自动化程度低、检测目的分子数量少、效率低等不足。通过基因芯片对菌株在不同药物处理或经不同途径产生耐药表型后大量差异表达基因进行分析,可用来寻找耐药相关基因,并阐明其功能,更有助于多基因协同作用机制的深入研究。

2 基因芯片筛选的白念珠菌耐药相关基因

目前治疗白念珠菌感染的药物主要有四类:唑类[氟康唑(fluconazole, FLC)],多烯类[两性霉素 B(amphotericin B, AmB)],棘球白素类[卡泊芬净(caspofungin, CPF)],嘧啶类[5-氟胞嘧啶(5-fluorocytosine, 5-FC)],但前两类较为常用,因此本文主要综述了对前两类药物产生耐药性的相关基因。这些基因的功能主要与脂质、脂肪酸和固醇的代谢、细胞应激、蛋白质合成、细胞壁维持、小分子转运及碳水化合物代谢有关。为了探明白念珠菌对不同药物产生耐药的机制,近年来许多研究者采用基因芯片技术分析了在耐药的真菌菌株中由不同药物及不同耐药途径所引起的基因表达差异。在这些耐药相关基因中,其中一部分基因的功能已经得到了明确的解释,而另一部分基因则将成为研究者关注的对象。

过去的几十年中,许多研究都揭示了真菌细胞膜上存在参与主动转运多种分子(如:蛋白、糖、离子、药物)的多起源膜蛋白超家族。其中,与药物转运有关的有 ATP 结合盒转运蛋白(ATP-binding cassette transporter, ABC 转运蛋白)超家族和主要易化扩散载体(major facilitator superfamily, MFs)超家族。ATP 结合盒转运蛋白超家族的特征是都含有保守的结合和水解 ATP 的一致序列,需要 ATP 提供能量。该家族已知的成员中,目前 *CDR1* (Candida drug resistance 1)和 *CDR2* 被认为与耐药产生相关,在它们的启动子中都含有 21 bp、序列为 5'-GGA(A/T)ATCGGATATTTTTTTT-3'的顺式药物反应元件(drug responsive element, DRE),其中 5'-CGG-3'的三联子是转录激活因子 TAC1 的识别位点^[2]。在实验室通过药物诱导和在临床长期使用药物都可以使菌株产生 *CDR1* 和 *CDR2* 高表达,可能是由于这两种途径都作用于启动子内的 DRE 序列并激活了相同的转录因子,促使 *cdr1p* (Candida drug resistance protein 1)和 *cdr2p* 表达量增高,结果导致细胞内 FLC 的浓度降低、阻止了药物与靶基因 *ERG11* 结合。在临床氟康唑耐药菌株中几乎都有编码 *Cdr1p* 和 *Cdr2p* 的 mRNA 的高表达。

除了 ATP 结合盒转运蛋白,主要易化扩散载体(major facilitator superfamily, MFs)超家族是存在于真菌细胞膜上的另一类外排泵,其中 *MDR1* (multidrug resistance 1)编码的蛋白 *Mdr1p* 以细胞膜两侧的质子梯度为能量来源,将细胞内的药物转运至细胞外,使细胞内药物浓度降低,导致抗真菌药物敏感性降低。目前,已知 *MDR1* 的表达主要是受锌簇转录因子——*MRR1* (multidrug resistance regulator)的调节。氟康唑耐药菌株中,在 *MRR1* 表达增高时,除 *MDR1* 外,还有 26 个靶基因也表达增高,并且其中大部分编码氧化

还原酶,这些基因的高表达可以保护细胞对抗氟康唑产生的毒性物质,而使菌株产生耐药性^[3]。

虽然多药耐药蛋白(multidrug resistance protein, Mdrp)基因高表达是导致白念珠菌最重要的耐药机制,但以下基因在耐药过程中发挥的作用也不容小觑。

2.1 唑类药物耐药相关基因

2.1.1 麦角固醇合成基因 Rogers 等^[4]利用 cDNA 微阵列技术将从 PCR 中扩增出的约 300 bp 长的 6 039 个开放阅读框加载入芯片内,最终微阵列内涵盖了白念珠菌 98% 的基因,并包括 27 个对照基因,比较氟康唑敏感菌株与氟康唑耐药菌株的基因表达图谱发现了许多的耐药相关基因。这种短时间内对全基因组进行筛选正是利用了基因芯片快速、高效的特点。

麦角固醇是真菌细胞膜的重要成分,可以影响膜通透性和膜结合酶的活性,同时也是分泌小泡的重要组成部分,并在线粒体呼吸和氧化磷酸化过程中发挥重要作用^[5]。唑类药物发挥抗真菌作用主要是由于抑制了与麦角固醇合成有关的细胞色素 P450 酶,如:由 *ERG11* 编码的固醇-14 α -去甲基化酶和由 *ERG5* 编码的 Δ^2 -去饱和酶^[6]。当 *ERG11* 发生点突变引起酶构象改变,导致酶不能与药物有效结合,或 *ERG11* 过表达引起麦角固醇合成过多时都可以导致真菌对唑类药物产生耐药性。其他参与麦角固醇合成的差异表达的基因中,*ERG2* 的表达变化较为突出,该基因编码 C-8 固醇异构酶,在麦角固醇合成的末期负责将粪甾醇转化为表甾醇,并与酿酒酵母中 *Pdr5p* (pleiotropic drug resistance protein 5)的活性密切相关^[7]。其上调可以提供使 *Cdr1p* 和 *Cdr2p* 的活性达到最佳的细胞膜状态,还可以部分抵消唑类药物对羊毛固醇脱甲基酶的抑制作用,因此被认为是耐药性产生的原因之一。

2.1.2 细胞壁维持基因 在细胞壁维持基因中,*GPI1* 和 *CWH8* 被认为与耐药有关。糖-磷脂酰肌醇锚定蛋白主要负责维持细胞壁的正常状态和完整性。*GPI1* 编码产物与糖基磷脂酰肌醇的合成密切相关。而 *CWH8* 编码一种长醇基焦磷酸盐(dolichyl pyrophosphate, Dol-P-P)磷酸酶,在酵母菌中内质网的内膜面上将 Dol-P-P 催化转化为长醇基一磷酸(dolichyl phosphate, Dol-P)和磷酸,此过程为生成脂质中间代谢物提供了长醇基。*GPI1* 下调及伴随的 *CWH8* 上调会改变细胞壁成分,这可能是导致真菌细胞对唑类抗真菌药的敏感性改变的原因。

2.1.3 氧化应激基因 近年来,越来越多的文献提示氧化应激基因在白念珠菌的耐药机制中发挥着重要作用。Kan 等^[8]在研究中发现:*ERG11* 基因的缺乏使光滑念珠菌对中性粒细胞和过氧化氢(H₂O₂)更敏感,并且用唑类抗真菌药抑制 *ERG11* 基因的产物——羊毛固醇脱甲基酶可以产生相似的效果。这提示:氧化损伤是唑类药物发挥作用的机制之一。此外,表达增加的其他氧化应激相关基因如柠檬酸合酶编码基因,此酶有两种亚型;其中之一由 *LYS21* 编码,在赖氨酸生物合成时催化 α -氨基苯甲醚合成的第一步反应;另一种由 *LYS7* 编码,催化 α -氨基苯甲醚合成的第二步反应,使高柠檬酸脱水转化为顺式柠檬酸。在酿酒酵母中,*LYS7* 基

因敲除菌株将对产生超氧化物的药物敏感性增加,这可能是由于 *LYS7* 基因的敲除破坏了超氧化物歧化酶的活性^[9],推测 *LYS7* 与保护细胞对抗氧化应激有关。

此外,在细胞内存在许多与呼吸、自由基损伤等生化反应相关的酶复合体,它们在药物杀灭真菌过程中起关键作用,但其中一些酶发挥活性时必须要有铜离子参与,而 *CRD2* 编码的铜-结合金属硫蛋白则可以降低氧化应激反应对细胞的损伤,因此,*CRD2* 的高表达被认为与白念珠菌产耐药有关。

2.1.4 其他基因 与耐药相关的基因还有 *FET34*、*FTR2* 和 *RTA3*。前两者为表达下调基因,它们的编码产物都与铁离子的吸收密切相关^[10-11]。*RTA3* 的功能尚未明了,只知道它是酿酒酵母 *RTA1* 的同源物(*RTA1* 的产物可使细胞对 7-氨基胆固醇产生抵抗力)^[12],该基因上调有利于对唑类耐药,但它们在耐药机制中发挥的具体作用还有待进一步证明。

2.2 两性霉素 B 耐药相关基因 AmB 也作用于真菌的细胞膜,AmB 可以与细胞膜内的麦角固醇结合,在膜上形成孔,最终导致细胞内容物泄露,引起细胞死亡。白念珠菌对 AmB 耐药的同时常伴随着对唑类药物耐药,但其对两者产生耐药性的机制仍有差别。

2.2.1 小分子转运基因 分析由 AmB 引起的基因表达变化时发现:表达增高的基因主要是小分子转运基因。*IPF11550*、*IPF11560* (参与钙转运),*IPF9136* (参与钾转运),*ENA21* (参与钠转运),*ZRT2* (参与锌转运),*SUL1* (参与硫酸盐转运);与之相关的基因下调的有 *PHO88* (参与磷酸盐转运),*VMA2* (参与氢转运),*CTP1* (参与柠檬酸盐转运),*CTR1* (参与铜转运),*SIT1*、*FRE30*、*FRE31*、*FTR1*、*FTR2*、*CFL1*、*CFL2*、*FET33* (参与铁转运)。

2.2.2 氧化还原基因 AmB 除了作用于细胞膜,也可以对细胞产生氧化损伤,因此,在芯片中也可见与氧化应激相关的基因呈现高表达,如:*YHB1*、*AOX1*、*AOX2*、*CTA1*、*SOD2* 和 *GSH1*。在白念珠菌中,*YHB1* 编码产物可以保护细胞免受氮氧化物引起的损伤。*SOD2* 编码线粒体锰超氧化物歧化酶,该酶缺失后细胞将对氧化-还原循环物、热刺激、乙醇、高浓度的钾或钠高度敏感^[13]。

2.2.3 麦角固醇合成基因 既然 AmB 也作用于细胞膜,在芯片中固醇代谢相关的基因也出现了表达的改变。为了寻找哪些基因的改变可以导致白念珠菌对 AmB 和 FLC 同时产生耐药,Barker 等^[14]利用 AmB 诱导了对此二药产生耐药的实验菌株,并用基因芯片比较了耐药株和敏感株基因表达的差异。分析结果时,*ERG6* 和 *ERG25* 这两个基因尤其引起研究者的注意,它们的编码产物催化麦角固醇合成途径中的关键步骤,最终使反应向有利于麦角固醇生成的方向发展。在耐药菌株中,*ERG6* 和 *ERG25* 的高表达可增加羊毛甾醇向齿孔醇和 14-甲基粪甾醇的转化,而不转化为 4,4-二甲基-麦角固醇-8,14,24-三烯醇,此步骤将反应引入另一个分支,导致细胞对氟康唑和 AmB 产生耐药。此外,在对高浓度唑类和 AmB 耐药的 *erg11* 和 *erg11/erg3* 突变菌株中,上述中间产物积蓄现象已得到了证实^[15]。菌株对氟康唑和 AmB 耐药时常出现麦角甾醇-7,22-二烯醇积蓄,这是由 *ERG3* 编码的 C-5 去饱和酶活性降低引起的特征性表现。当

ERG3 基因突变或表达活性降低时,表甾醇向毒性代谢产物的转化率也降低^[16],而毒性代谢产物在真菌细胞膜内积蓄,则被认为是唑类药物发挥治疗作用的有效代谢产物^[15,17]。*ERG3* 在耐药产生过程中发挥的作用受到了越来越多研究者的重视。

综上所述,不同的药物发挥抗菌作用的机制既有相同点,又有差别,基因芯片不仅可以帮助我们找到与某种药物产生耐药性的相关基因,也可以帮助我们识别在对多种药物产生耐药过程中发挥关键作用的基因,这些基因很有可能成为我们研究的新靶点。

2.3 唑类耐药的临床菌株和实验室菌株基因表达差异 在对白念珠菌耐药机制的研究中,不同的药物可引起不同差异基因表达一直是专家学者们研究的热点,但不同的途径导致菌株对同一种药物产生耐药时而引起的基因差异表达也需引起研究者的注意。白念珠菌主要通过两种途径对唑类药物产生耐药性:一种途径是实验室诱导,实验证明^[18-19]用盐酸氟奋乃静、雌二醇或特比萘芬诱导白念珠菌,可使诱导菌中 *CDR1* 和 *CDR2* 高表达;而苯菌灵、氨甲蝶呤和过氧化氢 (H_2O_2) 则可以诱导菌中 *MDR1* 表达增高;另一种途径是临床使用药物治疗,临床耐药株中有的高表达 *CDR* (被命名为 *CDR* 菌株),有的高表达 *MDR1* (被命名为 *MDR* 菌株)。Karababa 等^[20]利用基因芯片比较了实验室耐药株和临床耐药株基因表达的差异,以说明两种途径引起耐药机制的异同。上述研究主要有以下发现:

(1)比较由氟奋乃静诱导的和在临床治疗中衍生的高表达 *CDR* 的唑类耐药株基因图谱发现:有 9 个共同上调的基因,11 个氟奋乃静特异基因和 4 个 *CDR* 特异基因。在 9 个共同上调的基因中,四个基因 (*CDR1*、*CDR2*、*IFU5* 和 *RTA3*) 的启动子都包括与 DRE 类似的序列基元,此外,这 4 个基因的产物有共同的跨膜片段和膜位点,但 DRE 序列不存在于 *CDR* 特异上调的基因中,仅存在于 1 个氟奋乃静特异上调的基因 (*IPF6629*) 的启动子中。比较氟奋乃静特异基因和 *CDR* 特异基因功能发现:氟奋乃静特异基因主要参与不同的应激反应,如氧化应激 (*CFL2* 和 *IPF6629*),高渗应激 (*GRP2* 和 *IPF17282*) 或更广泛的应激反应 (*SAS3*);而 *CDR* 特异基因 (*ERG3*、*ERG6* 和 *RG251*) 主要与麦角固醇生物合成有关。

(2)比较由苯菌灵诱导的实验室耐药株和在临床治疗中衍生的高表达 *MDR1* 的唑类耐药株基因图谱发现:*MDR1* 是共同上调基因中的一个,其启动子中含有一个 Cap1p 结合位点 TTAG/CTAA^[21],Cap1p 早已被证明参与氧化应激反应和白念珠菌多药耐药性的产生^[22-23]。值得注意的是:70% 苯菌灵特异基因的启动子中都含有这种共同调控序列,而 *MDR* 特异基因中没有一个基因被发现含有该序列,这提示:此元件是苯菌灵特异的调控元件。而且,苯菌灵特异基因主要参与如:氧化应激、渗透应激和热休克应激等应激反应。

上述对芯片结果的分析说明:在利用基因芯片技术寻找耐药相关基因时,不同的药物和不同的耐药途径都是导致芯片中基因差异表达的因素。

3 结 语

白念珠菌耐药性的形成是多个基因通过不同的机制的共同作用的结果。在这个错综复杂的关系网中,要明确其中的每一位成员,并阐明它们在耐药过程中发挥的具体作用、解释不同基因之间的联系,这是一项长期而艰巨的工程。基因芯片是我们解决这一难题的有利工具,它的应用使白念珠菌耐药性的一些现象得到了解释,但仍有许多谜团困扰着我们。因此,我们期望基因芯片技术进一步完善,如:继续提高探针阵列的集成度,提高检测的灵敏度,研究更好的芯片检测系统及分析软件,降低成本等,以更好地用于科学研究,使白念珠菌耐药机制得到进一步阐明。

[参 考 文 献]

- [1] 夏启中,张明菊. 基因芯片技术及其应用[J]. 襄樊职业技术学院学报,2005,4:1-7.
- [2] Coste A, Turner V, Ischer F, Morschhäuser J, Forche A, Selmecki A, et al. A mutation in Tac1p, a transcription factors regulating CDR1 and CDR2, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*[J]. Genetics,2006,172:2139-2156.
- [3] Morschhäuser J, Barker K S, Liu T T, BlaB-Warmuth J, Homayouni R, Rogers P D. The transcription factor Mrr1p controls expression of the MDR1 efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*[J]. PLoS Pathog,2007,3:e164.
- [4] Rogers P D, Barker K S. Evaluation of differential gene expression in fluconazole susceptible and resistant isolates of *Candida albicans* by cDNA microarray analysis[J]. Antimicrob Agents Chemother,2002,46:3412-3417.
- [5] Daum G, Lees N D, Bard M, Dickson R. Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Yeast,1998,14:1471-1510.
- [6] Martínez M, López-Ribot J L, Kirkpatrick W R, Bachmann S P, Perea S, Ruesga M T, et al. Heterogeneous mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from an HIV-infected patient on continuous fluconazole therapy for oropharyngeal candidosis[J]. J Antimicrob Chemother,2002,49:515-524.
- [7] Kaur R, Bachhawat A K. The yeast multidrug resistance pump, Pdr5p, confers reduced drug resistance in erg mutants of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbiology,1999,145:809-818.
- [8] Kan V L, Geber A, Bennett J E. Enhanced oxidative killing of azole-resistant *Candida glabrata* strains with ERG11 deletion [J]. Antimicrob Agents Chemother,1996,40:1717-1719.
- [9] Gamonet F, Lauquin G J. The *Saccharomyces cerevisiae* LYS7 gene is involved in oxidative stress protection[J]. Eur J Biochem,1998,251:716-723.
- [10] Lee R E, Liu T T, Barker K S, Lee R E, Rogers P D. Genome-wide expression profiling of the response to ciclopirox olamine in *Candida albicans* [J]. J Antimicrob Chemother,2005,55:655-662.
- [11] Rogers P D, Barker K S. Genome-wide expression profile analysis reveals coordinately regulated genes associated with stepwise acquisition of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates[J]. Antimicrob Agents Chemother,2003,47:1220-1227.
- [12] Soustre I, Letourneux Y, Karst F. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* RTA1 gene involved in 7-aminocholesterol resistance[J]. Current Genetics,1996,30:121-125.
- [13] Liu T T, Lee R E, Barker K S, Lee R E, Wei L, Homayouni R, et al. Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*[J]. Antimicrob Agents Chemother,2005,49:2226-2236.
- [14] Barker K S, Crisp S, Wiederhold N, Lewis R E, Bareither B, Eckstein J, et al. Genome-wide expression profiling reveals genes associated with amphotericin B and fluconazole resistance in experimentally induced antifungal resistant isolates of *Candida albicans*[J]. J Antimicrob Chemother,2004,54:376-385.
- [15] Sanglard D, Ischer F, Parkinson T, Falconer D, Bille J. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents[J]. Antimicrob Agents Chemother,2003,47:2404-2412.
- [16] Franz R, Ruhnke M, Morschhäuser J. Molecular aspects of fluconazole resistance development in *Candida albicans*[J]. Mycoses,1999,2:453-458.
- [17] Miyazaki T, Miyazaki Y, Izumikawa K, Kakeya H, Miyakoshi S, Bennett J E, et al. Fluconazole treatment is effective against a *Candida albicans* erg3/erg3 mutant *in vivo* despite *in vitro* resistance[J]. Antimicrob Agents Chemother,2006,50:580-586.
- [18] de Micheli M, Bille J, Schueller C, Sanglard D. A common drug-responsive element mediates the upregulation of the *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2, two genes involved in antifungal drug resistance[J]. Mol Microbiol,2002,43:1197-1214.
- [19] Gupta V, Kohli A, Krishnamurthy S, Puri N, Aalamgeer S A, Panwar S, et al. Identification of polymorphic mutant alleles of CaMDR1, a major facilitator of *Candida albicans* which confers multidrug resistance, and its *in vitro* transcriptional activation [J]. Curr Genet,1998,34:192-199.
- [20] Karababa M, Coste AT, Rognon B, Bille J, Sanglard D. Comparison of gene expression profiles of *Candida albicans* azole-resistant clinical isolates and laboratory strains exposed to drugs inducing multidrug transporters[J]. Antimicrob Agents Chemother,2004,48:3064-3079.
- [21] Fernandes L, Rodrigues-Pousada C, Struhl K, Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions [J]. Mol Cell Biol,1997,17:6982-6993.
- [22] Alarco A M, Raymond M. The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*[J]. Bacteriol,1999,181:700-708.
- [23] Zhang X, De Micheli M, Coleman S T, Sanglard D, Moye-Rowley W S. Analysis of the oxidative stress regulation of the *Candida albicans* transcription factor, Cap1p[J]. Mol Microbiol,2000,36:618-629.