

## 活性氧以 Cap1p 依赖的方式激活白念珠菌 CaMDR1 转录表达

ROS activates expression of drug resistance gene CaMDR1 in *Candida albicans* in a Cap1p-dependent manner

贾健辉<sup>2△</sup>, 王彦<sup>1△</sup>, 姜远英<sup>1,2\*</sup>

(1. 第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433; 2. 沈阳药科大学生命科学与生物制药学院药理学教研室, 沈阳 110016)

**[摘要]** 目的: 考察活性氧对白念珠菌多药耐药基因 CaMDR1 的转录和耐药表型的影响, 以及 Cap1p 在此过程中的作用。

**方法:** 应用 Northern 印迹方法考察了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对白念珠菌 SC5314、Y0109 的 CaMDR1 转录水平的影响; 采用白念珠菌 CAP1 基因正常表达菌 CAI4、CAF2-1, 及 CAP1 基因缺失菌 CJD21、XZY6, 用 Northern 印迹方法考察 Cap1p 在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 激活 CaMDR1 转录过程中的作用; 应用微量液基稀释法考察 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对白念珠菌耐药表型的影响。结果: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能够激活白念珠菌 SC5314、Y0109 中 CaMDR1 的转录表达; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激后, 白念珠菌 CAP1 基因正常表达菌 CAI4 和 CAF2-1 中 CaMDR1 的转录水平都有明显升高, 而 CAP1 基因缺失菌 CJD21 和 XZY6 中 CaMDR1 的转录水平未见升高; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可导致白念珠菌 SC5314 对氟康唑耐药性的产生, 而菌株 CJD21、XZY6 对氟康唑的耐药程度未见升高。结论: 活性氧以 Cap1p 依赖的方式激活白念珠菌 CaMDR1 转录, 并导致耐药表型的出现。

**[关键词]** 白念珠菌; Cap1p; 活性氧; CaMDR1; 抗药性; 真菌

**[中图分类号]** R 379.4 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2007)07-0737-03

白念珠菌是威胁人类健康和生命的主要机会致病真菌, 临床上, 真菌病常用氮唑类药物, 其中氟康唑生物利用度高, 疗效好, 在临床的应用最为普遍。氟康唑的长期广泛应用导致耐药菌株的大量出现, 临床发现 90% 的白念珠菌菌株呈现不同程度的耐药性<sup>[1-5]</sup>。目前有关白念珠菌耐药性的研究已取得了一些进展, 已知的与氟康唑耐药的相关机制中多药耐药基因的转录表达增加是最重要的耐药机制<sup>[6]</sup>。CaMDR1 (multi-drug resistance gene) 又称 BMR1, 是白念珠菌重要的多药耐药基因<sup>[7]</sup>。

Cap1p 是由白念珠菌 CAP1 基因编码的碱性亮氨酸拉链 (basic region-leucine zipper, bZip) 转录因子, 既和耐药性有关, 又在白念珠菌的氧化应激中发挥重要作用。装载有 CAP1 基因的高拷贝质粒在酿酒酵母中表达能导致菌株对氟康唑的高度耐药<sup>[8]</sup>。CAP1 基因缺失菌对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的刺激非常敏感, 已有的研究<sup>[9]</sup>提示 MDR1、GLR1 (glutathione reductase gene)、TRR1 (thioredoxin reductase gene) 等可能是 Cap1p 调控的靶基因。Zhang 等<sup>[10]</sup>的研究表明, Cap1p 调控靶基因转录的机制是核定位机制, 即在通常状态下 Cap1p 弥散在胞质和胞核, 经受氧化刺激后 Cap1p 发生定位转移, 聚积在细胞核, 激活某些靶基因的转录。已有研究<sup>[10]</sup>表明, 经受氧化刺激后聚集在细胞核的 Cap1p 能激活 GLR1 的转录, 那么氧化刺激能否通过 Cap1p 的介导导致多药耐药基因 CaMDR1 的转录呢? 氧化刺激与耐药表型之间是否存在联系呢? 目前尚无研究确定。本研究用 Northern 印迹方法研究了氧化刺激对 CaMDR1 转录表达的影响以及 Cap1p 在其中的作用, 并进一步探讨了氧化刺激后耐药表型的变化。

### 1 材料和方法

1.1 菌株 白念珠菌 SC5314、CAF2-1、CAI4 由 William

A. Fonzi (Department of Microbiology and Immunology, Georgetown University, Washington, USA) 惠赠; CJD21 (cap1Δ::hisG/cap1Δ::hisG, 通过敲除 CAI4 中 CAP1 的两个等位基因获得) 由 Martine Raymond (Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Québec, Canada) 惠赠; XZY6 (cap1Δ::hisG/cap1Δ::hisG, 通过敲除 CAF2-1 中 CAP1 的两个等位基因获得) 由 W. Scott Moye-Rowley (Program in Molecular Biology, Department of Physiology and Biophysics, University of Iowa, Iowa City, IA 52242 USA) 惠赠; Y0109 标准菌株由第二军医大学长征医院皮肤科惠赠。

1.2 仪器设备 Eppendorf 5417R 高速冷冻离心机 (Eppendorf), Biofuge stratos 高速冷冻离心机 (Heraeus), THZ-C 台式恒温振荡器 (江苏太仓实验设备厂), FR-180A 电泳槽 (上海复日生物实验技术研制所), FR-180A 电泳仪和 FR-200 凝胶成像仪 (上海复日科技), Tgradient PCR 仪 (Biometra), GeneQuant II 核酸定量分析仪 (Pharmacia Biotech), 可调电炉 (上海跃进医疗仪器厂), Cyclone 磷屏 (Packard Biochip Technologies, Inc.), 杂交管 (Robbins), 真空转印仪 (BIO-RAD), D2F-1 型真空恒温干燥箱 (上海医用恒温设备厂)。

1.3 试剂与培养液 20×SSC、5×甲醛凝胶电泳液、甲醛液、10% SDS、2×SSC、0.05% SDS、0.1×SSC、0.1% SDS、5×SSC、10×SSC、预杂交液、DNA 探针标记试剂盒 (Amersham Megaprime Pharmacia Biotech, St Albans, U. K.) 等。氟康唑 (fluconazole) 注射液 (规格: 2 mg/ml, 上

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (30500628)。Supported by National Natural Sciences Foundation of China (30500628)。

**[作者简介]** 贾健辉, 博士生, 讲师。王彦, 博士, 讲师。

△并列第一作者

\* Corresponding author. E-mail: jiangyy@smmu.edu.cn

海信谊金朱药业有限公司,批号:060301)。RPMI 1640 培养液:RPMI 1640(Gibco BRL)10 g, NaHCO<sub>3</sub> 2.0 g, 吗啡丙磺酸(morpholinepropanesulfonic acid, MOPS, Sigma)34.5 g (0.165 mol/L), 加三蒸水 900 ml 溶解, 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0 (25℃), 定容至 1 000 ml, 滤过消毒, 4℃ 保存。YPD 培养液:酵母浸膏 10 g, 蛋白胨 20 g, 葡萄糖 20 g, 加三蒸水定容至 1 000 ml, 高压灭菌后 4℃ 保存。

1.4 总 RNA 样品制备 从平板上挑取白念珠菌 SC5314、Y0109、CAI4、CAF2-1、CJD21、XZY6 的单克隆, 接种至 1 ml YPD 培养液, 活化两代后, 于 30℃, 200 r/min 振荡培养至指数生长期 ( $D_{600} = 0.5$ ), 各个菌株分别有一支菌液中加入 0.5 mmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 另一支作为对照不加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 菌液在 30℃ 继续振荡培养 15 min。离心收集菌体 (3 000 × g, 5 min, 4℃), PBS 洗涤除去培养基, 菌体在液氮中碾磨成极细的粉末, 总 RNA 的提取采用一步法<sup>[11]</sup>。检测  $D_{260}$  和  $D_{280}$ , 考察所提 RNA 的质量。取 2~5 μl 的 RNA 样品, 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳考察 RNA 的完整性和质量并对其进行定量。

1.5 探针的制备和 Northern 印迹杂交 参照文献<sup>[12]</sup>方法进行。RNA 5 μg 加入 14 μl 变性缓冲液, 混匀后离心, 置 65℃ 水浴 10 min, 迅速置冰浴 2 min, 加 2 μl 加样缓冲液, 混匀。将预处理的 RNA 加于 1.0% 琼脂糖甲醛变性电泳胶, 电泳 4 h。转印 RNA 到尼龙膜。用 PCR 的方法制备探针模板, PCR 扩增 MDR1 和 ACT1 片段 (内参照), 产物琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 在紫外灯下割胶回收, 纯化产物获得探针模板。MDR1 的上游引物: 5'-ACT CTT GCT GAT GAT ACA-3', 下游引物: 5'-TAT ATG GAT GTA CGA CCA-3'; ACT1 的上游引物: 5'-TTT CCA ACT GGG ACG ATA-3', 下游引物: 5'-TCT TGG ACA AAT GGT TGG-3'。扩增片段用作探针。以随机引物标记试剂盒, [<sup>α</sup>-<sup>32</sup>P]-dATP (Amersham Megaprime Pharmacia) 标记探针。进行 Northern 印迹杂交, 洗膜与检测, 压片后扫描自显影图像。

1.6 MIC<sub>80</sub> 的测定 从平板上挑取白念珠菌单克隆, 接种至 1 ml YPD 培养液中, 30℃, 200 r/min 振荡培养, 活化白念珠菌 SC5314 及 CAP1 基因缺失菌 CJD21、XZY6 培养 16 h 后, 用 2 mmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 30 min 后测定 MIC<sub>80</sub>。另外, 取在 30℃, 200 r/min 振荡培养的 YPD 培养液中的白念珠菌菌液 10 μl 接种至 1 ml 含 2 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 YPD 培养液中, 30℃, 200 r/min 振荡培养, 每 24 h 用上述含 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 YPD 培养液转种 1 次, 使白念珠菌长期在含 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的培养液中进行繁殖, 处理 2 个月后测定 MIC<sub>80</sub> 最低抑菌浓度。MIC<sub>80</sub> 的测定采用 NCCLS 推荐的微量液基稀释法<sup>[13]</sup> 进行。与阳性对照孔比, 以 D 值下降 80% 的药物浓度为药物对白念珠菌的 MIC<sub>80</sub>。

## 2 结果

2.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 CaMDR1 转录水平的影响 应用 Northern 印迹的方法对标准菌株 SC5314 和 Y0109 经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理前后

CaMDR1 转录水平的变化进行了考察。结果显示: 未经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理时, 在 SC5314 和 Y0109 中只能检测到微弱的 CaMDR1 的转录; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后 SC5314 和 Y0109 中 CaMDR1 的转录水平升高 (图 1)。

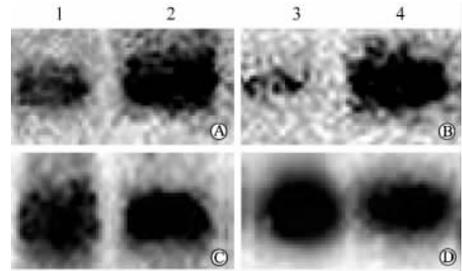


图 1 白念珠菌 SC5314 和 Y0109 的 CaMDR1 转录水平的 Northern 印迹分析

1: SC5314; 2: SC5314 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 3: Y0109; 4: Y0109 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A, B: MDR1; C, D: ACT1

2.2 Cap1p 在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 激活 CaMDR1 转录过程中的作用 Northern 印迹结果显示: 未经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理时, CAI4、CJD21、CAF2-1 以及 XZY6 中 CaMDR1 的转录都极其微弱或检测不到; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后, CAI4 和 CAF2-1 中 CaMDR1 的转录水平都明显升高; 对于 CAP1 基因缺失菌 CJD21 和 XZY6, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后 CaMDR1 的转录水平未见升高 (图 2)。

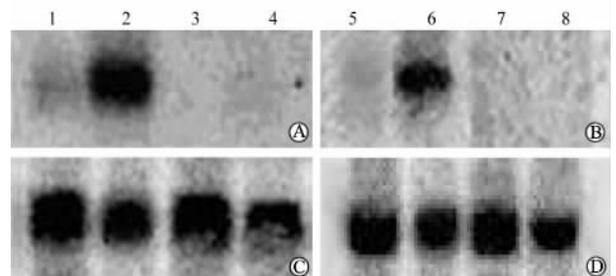


图 2 白念珠菌 CAI4、CJD21、CAF2-1 和 XZY6 的 CaMDR1 转录水平的 Northern 印迹分析

1: CAI4; 2: CAI4 中加入 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 15 min; 3: CJD21; 4: CJD21 中加入 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 15 min; 5: CAF2-1; 6: CAF2-1 中加入 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 15 min; 7: XZY6; 8: XZY6 中加入 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 15 min. A, B: MDR1; C, D: ACT1 (内参照)

2.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激对耐药表型的影响以及 Cap1p 的作用 利用白念珠菌 SC5314 及 CAP1 基因缺失菌 CJD21、XZY6, 通过 MIC<sub>80</sub> 的测定考察了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激对耐药表型的影响。由于 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的化学稳定性差, 容易分解, 为保证氧化刺激过程培养基中有一定的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度, 将 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 终浓度调整为 2 mmol/L, 此浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对正常菌株 SC5314 的生长无影响。用 2 mmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理菌株 SC5314 30 min 后测定 MIC<sub>80</sub>, SC5314 菌株对氟康唑的 MIC<sub>80</sub> 从 0.25 μg/ml 升高到 0.5 μg/ml。用 2 mmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 2 个月后测定 MIC<sub>80</sub>, SC5314 菌株对氟康唑的 MIC<sub>80</sub> 从 0.25 μg/ml 升高到 2 μg/ml。

ml。而 CAP1 基因缺失的菌株 CJD21、XZY6 经不同浓度和不同时间的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后对氟康唑的耐药程度未见升高。

### 3 讨 论

本研究的 Northern 印迹结果显示, CAP1 基因正常表达的菌种(如菌株 SC5314、Y0109、CAI4 和 CAF2-1)经受氧化刺激后多药耐药基因 CaMDR1 的转录水平升高; CAP1 基因缺失菌经受氧化刺激后多药耐药基因 CaMDR1 的转录水平没有明显变化。这一结果提示活性氧能够激活 CaMDR1 的转录表达, 活性氧激活 CaMDR1 转录的过程是通过 Cap1p 介导的。

CaMDR1 是白念珠菌中重要的多药耐药基因, CaMDR1 的转录表达升高会导致白念珠菌耐药性产生。为进一步探讨氧化刺激对耐药表型的影响, 我们利用白念珠菌国际标准菌株 SC5314, 考察了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理前后菌株耐药表型的变化。虽然实验结果显示 MIC<sub>80</sub> 升高的幅度并不大, 但实验中我们严格遵循药理实验重复、对照的原则, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 30 min 后菌株对氟康唑的 MIC<sub>80</sub> 升高 2 倍的实验结果重现性较好。为考察 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 长期处理对耐药表型的影响, 用 2 mmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 SC5314 标准菌两个月之后测定氟康唑的 MIC<sub>80</sub>, 结果显示菌株对氟康唑的 MIC<sub>80</sub> 升高了 8 倍, 耐药程度明显升高。而 CAP1 基因缺失的菌株 CJD21、XZY6 经活性氧刺激后不产生耐药的表型。上述结果表明: 活性氧可导致氟康唑耐药性的产生, 该耐药表型的产生是 Cap1p 介导的。

### [参考文献]

[1] Boschman C R, Bodnar U R, Tornatore M A, et al. Thirteen-year evolution of azole resistance in yeast isolates and prevalence of resistant strains carried by cancer patients at a large medical center [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42: 734-738.

[2] Andes D, Lepak A, Nett J, et al. *In vivo* fluconazole pharmacodynamics and resistance development in a previously susceptible *Candida albicans* population examined by microbiologic and transcriptional profiling [J]. *Antimicrob Agents Chemother*,

2006, 50: 2384-2394.

- [3] Casalnuove I A, Di Rrancesco P, Garaci E, et al. Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2004, 8: 69-77.
- [4] Sheehan D J, Hitchcock C A, Sibley C M. Current and emerging azole antifungal agents [J]. *Clin Microbiol Rev*, 1999, 12: 40-79.
- [5] Yang Y L, Lo H J. Mechanisms of antifungal agent resistance [J]. *J Microbio Immunol Infect*, 2001, 34: 79-86.
- [6] Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, et al. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39: 2378-2386.
- [7] Goldway M, Teff D, Schmidt R, et al. Multidrug resistance in *Candida albicans*: disruption of the BENr gene [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39: 422-426.
- [8] Alarco A M, Balan I, Talibi D, et al. AP1-mediated multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae* requires FLR1 encoding a transporter of the major facilitator superfamily [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 19304-19313.
- [9] Alarco A M, Raymond M. The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans* [J]. *J Bacteriol*, 1999, 181: 700-708.
- [10] Zhang X, De Micheli M, Coleman S T, et al. Analysis of the oxidative stress regulation of the *Candida albicans* transcription factor, Cap1p [J]. *Mol Microbiol*, 2000, 36: 618-629.
- [11] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Anal Biochem*, 1987, 162: 156-159.
- [12] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 北京: 科学出版社, 2002: 532-552.
- [13] Nakamura K, Niimi M, Niimi K, et al. Functional expression of *Candida albicans* drug efflux pump Cdr1p in a *Saccharomys cerevisiae* strain deficient in membrane transporters [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45: 3366-3374.

[收稿日期] 2007-01-25

[修回日期] 2007-05-23

[本文编辑] 尹 茶

## 《常见儿科疾病诊治表解手册》已出版

《常见儿科疾病诊治表解手册》已由人民军医出版社于 2007 年 2 月出版, 32 开, 平装。

《常见儿科疾病诊治表解手册》ISBN: 978-7-5091-0688-4, 定价: 25.00 元。该书作者根据多年临床一线工作经验, 并参考有关文献, 将儿科常见疾病的病因、临床表现、诊断、治疗等内容以表格形式进行了高度概括与总结。附录用表格形式介绍了儿科常用诊疗及急救技术操作、儿童计划接种程度和小儿生长发育规律。本书内容简明扼要, 重点突出, 语言精练, 方便易查, 非常适合各级门诊医生、基层医师及实习医师阅读参考。

本书由人民军医出版社市场部发行。

通讯地址: 北京市 100036 信箱 188 分箱, 邮编: 100036

电话: 010-51927252; 010-51927300-8168

E-mail: wanglan@pmpm.com.cn