

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01038

• 论 著 •

ABC 转运蛋白与临床白念珠菌耐药

孙伟玮¹, 高平挥¹, 王 英², 姜远英^{1*}

- 1. 第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433
- 2. 第二军医大学长海医院皮肤科, 上海 200433

[摘要] 目的: 研究临床氟康唑耐药白念珠菌中 *CDR1* 和 *CDR2* 基因的表达情况与耐药性产生的关系, 探寻临床白念珠菌耐药的分子机制。方法: 微量液基稀释法测定氟康唑对白念珠菌临床分离株的最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC); 实时定量 PCR (RQ-PCR) 方法检测主动外排泵基因 *CDR1* 和 *CDR2* 的表达水平; 用罗丹明 6G (Rhodamine 6G) 外转运实验检测罗丹明 6G 在 *CDR1*、*CDR2* 高表达的白念珠菌中的外排情况。结果: 氟康唑耐药组菌株 *CDR1* 和 *CDR2* 高表达发生率显著高于敏感组菌株; 而在加入葡萄糖提供能量后, *CDR1* 和 *CDR2* 蛋白发生高表达的耐药菌株罗丹明 6G 外排能力显著增加。部分耐药菌株中未见 *CDR1* 和 *CDR2* 的高表达。结论: 白念珠菌临床分离株对氟康唑的耐药性与 ABC 转运蛋白过度表达相关; ABC 转运蛋白的高表达可以使药物外排能力增加, 从而导致耐药性产生。同时可能有其他机制参与临床白念珠菌耐药性的生成。

[关键词] 白念珠菌; 氟康唑; 真菌耐药性; ABC 转运蛋白; 罗丹明 6G

[中图分类号] R 379.4 [文献标志码] A [文章编号] 0258-879X(2008)09-1038-04

ATP-binding-cassette transporters and fluconazole-resistance of clinical *Candida albicans* strains

SUN Wei-wei¹, GAO Ping-hui¹, WANG Ying², JIANG Yuan-ying^{1*}

- 1. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
- 2. Department of Dermatology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To explore the relationship between *CDR1* and *CDR2* expression and fluconazole-resistance in clinical *Candida albicans* strains, so as to explore the mechanism of drug-resistance in *Candida albicans*. **Methods:** The minimal inhibitory concentrations (MICs) of clinical *Candida albicans* strains to fluconazole were determined by broth microdilution method. The total RNA of fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant *Candida albicans* strains were extracted, and the expression of the *CDR1* and *CDR2* genes was examined by real-time RT-PCR. The efflux of Rhodamine 6G was determined in the strains highly expressing *CDR1* and *CDR2* genes. **Results:** The incidences of *CDR1* and (or) *CDR2* overexpression in fluconazole-resistant strains were significantly higher than those in the fluconazole-sensitive stains. The efflux of Rhodamine 6G was significantly increased in the fluconazole-resistant strains when glucose was added, and overexpression of *CDR1* and *CDR2* were observed in theses strains. Some resistant strains showed no overexpression of *CDR1* and *CDR2*. **Conclusion:** Fluconazole-resistance in clinical *Candida albicans* strains is related to the overexpression of ABC transporter proteins. Overexpression of ABC transporters can increase the efflux of drugs and therefore lead to drug-resistance. Other mechanisms may also participate in the development of drug resistance in the clinical *Candida albicans* strains.

[KEY WORDS] *Candida albicans*; fluconazole; fungal drug resistance; ABC transporter proteins; Rohdamine 6G

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(9):1038-1041]

随着广谱抗生素和免疫抑制剂的广泛应用, 免疫功能受损患者 (艾滋病, 器官移植, 接受放、化疗的癌症患者) 的不断增多及生命维持技术和修复装置

的不断进步, 真菌尤其是深部真菌的感染日益增高。国内报道由真菌引起的院内感染病原菌以白念珠菌为主^[1]。唑类药物尤其是氟康唑是临床上预防和治

[收稿日期] 2008-04-10 [接受日期] 2008-06-03

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划 (“973 计划”, 2005CB523105). Supported by National Program on Key Basic Research Project of China (“973” Program, 2005CB523105).

[作者简介] 孙伟玮, 硕士生, E-mail: caocao77@hotmail.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-25070371, E-mail: jiangyycn@yahoo.com.cn

疗念珠菌病应用最为广泛的药物,其耐药现象也最严重^[2]。目前有关白念珠菌耐药性的研究已经取得了一些进展,已知与氟康唑耐药相关的机制包括:氮唑类药物作用靶酶——羊毛甾醇 14 γ -去甲基化酶的高表达或变异;抗真菌药物在真菌细胞内聚集的减少;生物膜形成等^[3]。其中抗真菌药物在真菌细胞内聚集的减少是氟康唑耐药的最重要机制。其主要原因是白念珠菌细胞膜上存在着多种外排泵,由于白念珠菌对上述药物的外排,导致细胞内药物累积浓度的下降而使药物治疗失败并产生了多重耐药^[4]。目前已知与白念珠菌药物外排有关的跨膜转运蛋白中,含 ATP 结合区的转运蛋白,即 ABC 转运蛋白(ATP-binding cassette transporters, ABCT),是最常见而且最重要的外排泵。白念珠菌中约有 10 种白念珠菌耐药(CDR)蛋白,但只有 CDR1 和 CDR2 蛋白与唑类药物耐药有关^[5]。

本研究致力于观察临床分离的耐药白念珠菌中 ABC 转运的表达情况与其耐药性产生的关系。本研究采用实时定量 PCR 方法检测白念珠菌氟康唑耐药和敏感菌株的 *CDR1* 和 *CDR2* 基因的表达情况,以检测临床白念珠菌 *CDR1* 和 *CDR2* 基因的表达水平与氟康唑耐药的关系。并以罗丹明 6G 为示踪剂,对其在氟康唑耐药和敏感菌株的蓄积动力学进行研究,以进一步证实 ABC 转运蛋白高表达与药物外排的关系,明确所试菌株的耐药分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验菌株与药敏检测 白念珠菌标准株 ATCCMYA-286(SC5314)由 William A Fonzi 教授馈赠,实验菌株为长海医院临床分离株。参照美国国家临床试验标准委员会(NCCLS)推荐的 M27-A 微量液基稀释法测定实验菌株对氟康唑的敏感性。

1.2 主动外排泵基因 *CDR1* 和 *CDR2* 表达水平的测定

1.2.1 实验菌株总 RNA 的抽提 接种活化后的实验菌株于 YPD(yeast extract peptone dextrose)培养液,30℃ 过夜,离心收集菌细胞;采用小量酵母菌总 RNA 抽提试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)进行总 RNA 抽提。

1.2.2 逆转录 按 TaKaRa 公司出品的逆转录试剂盒(大连宝生物工程有限公司)的标准操作步骤进行逆转录,产物置于-20℃ 保存备用。

1.2.3 实时定量 RT-PCR 引物 见表 1。

1.2.4 逆转录产物的基因扩增 按 SYBR(R) Premix Ex TaqTM (Perfect Real-Time) 试剂盒(TaKaRa,大连宝生物工程有限公司)标准操作步骤进行。反应条件:94℃ 1 min 预变性,94℃ 10 s 变性,60℃ 20 s 退火,72℃ 15 s 延伸,读板,重复此循环 40 次,60~95℃ 每 0.2 s 读取一次熔解曲线。

表 1 所选引物的名称和序列
Tab 1 Primer sequences used in this study

No	Primer name	Sequence(5'-3')
1	CDR1-F	GAT TCT CAA ACT GCC TGG TC
	CDR1-R	CCA AAA TAA GCC GTT CTT CCA C
2	CDR2-F	ACT GCA AGT CAC AAC ATC C
	CDR2-R	GAA TGG ACT AAC ACC AGG TAT G
3	18S RNA-F	TCT TTC TTG ATT TTG TGG GTG G
	18S RNA-R	TCG ATA GTC CCT CTA AGA AGT G

1.3 罗丹明 6G 外排情况测定 30℃ YPD 培养液中培养 16 h 的 200 ml 菌液,1 088×g 离心 5min 收集菌体。预冷 PBS(phosphate buffered saline)缓冲液清洗 3 次,精确计数,用 PBS 缓冲液调整菌液密度达 1×10⁸/ml。将调整好密度的 PBS 菌液于 30℃,27×g,振摇 1 h,充分耗竭葡萄糖。然后加入罗丹明 6G,使终浓度达 10 μmol/L,27×g,30℃ 振摇 2 h。将菌液等体积一分为二,一份加葡萄糖,使终浓度达 2 mmol/L,另一份不作任何处理,30℃,27×g,振摇 1 h,1 h 内每 10 min 吸取每管各 1 ml 菌液,离心后将上清液 100 μl 加入 96 孔板中,每一时间点作 3 个复孔。同时作罗丹明 6G 标准曲线,即从 10 μmol/L 开始,2 倍倍比稀释。设置 PBS 空白对照 3 个复孔。测定荧光强度(激发波长 515 nm,吸收波长 555 nm)。根据制作出的标准曲线计算细胞外液中罗丹明 6G 的浓度。

1.4 统计学处理 实时定量 RT-PCR 获得的是每个基因的 C_T值,通过 18S rRNA 内参校正获得 ΔC_T[ΔC_T=C_T(目的基因)-C_T(18S rRNA)],再通过与参照菌株 SC5314 相比获得 ΔΔC_T[ΔΔC_T=ΔC_T(实验菌株)-ΔC_T(参照菌株)],用 Ratio 值(实验菌株与 SC5314 菌株相比基因表达情况)表示基因表达水平,Ratio 值=2^{-ΔΔC_T},以 Ratio 值>2 代表与 SC5314 基因表达情况相比,该基因发生高表达。实时定量 PCR 进行 3 次独立重复实验,所得 Ratio 以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计 *CDR1* 高表达、*CDR2* 高表达及 2 个基因同时高表达在耐药菌株和敏感菌株中所占百分比,耐药组和敏感组采用 χ^2 检验($P<0.05$)。

2 结 果

2.1 药物敏感试验结果 从 227 株临床分离株(由长海医院皮肤科赠送)中筛选获得 40 株白念珠菌,氟康唑敏感与耐药菌株各半。20 株氟康唑敏感菌株($MIC_{80} \leq 0.5 \mu g/ml$),20 株氟康唑耐药菌株($MIC_{80} \geq 64 \mu g/ml$)。

2.2 CDR1 和 CDR2 表达水平测定 根据实时定量 RT-PCR 实验获得的 C_T 值和计算获得的 Ratio 值(结果未显示),随后我们进一步统计了基因高表达菌株在敏感组和耐药组中所占百分率(图 1),CDR1 基因在实验敏感组菌株中未见高表达,而在耐药组菌株中有 9 株发生高表达,所占比例 45%;敏感组中发生 1 株菌株的 CDR2 高表达,而在耐药组中发生 12 株菌株的高表达,比例达 60%;CDR1 和 CDR2 共同高表达在敏感组中未发现,而在耐药组中有 6 株菌株存在 2 个基因的高表达。采用 χ^2 检验显示敏感组和耐药组 CDR1 和 CDR2 基因高表达存在显著差异。耐药组基因高表达率显著高于敏感组基因高表达率($P<0.05$)。

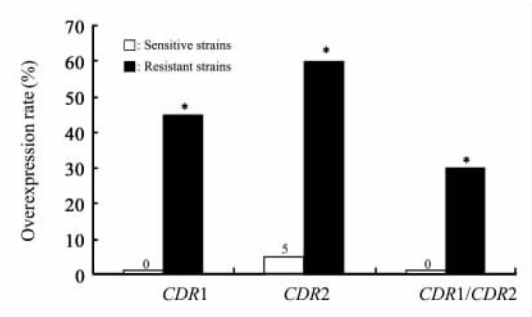


图 1 基因高表达菌株在敏感组和耐药组中百分率
Fig 1 Incidences of CDR1,CDR2 or both CDR1 and CDR2 overexpression in clinical resistant *Candida albicans* strains and sensitive strains
* $P<0.05$ vs sensitive strains

2.3 罗丹明 6G 外排实验结果 测定 CDR1、CDR2 均高表达的菌株 SMMU00012 与 SMMU00271, CDR2 高表达的菌株 SMMU00372 与 SMMU00346, CDR1 高表达的菌株 SMMU00249 及敏感菌株 SC5314 与 SMMU835 的罗丹明 6G 外排情况,当体系中未加入葡萄糖时,7 株菌的外排均没有明显的改变。当体系中添加葡萄糖后,结果见图 2。SC5314 和 SMMU835 仍旧没有明显的罗丹明 6G 外排,而除此之外的耐药菌株均表现出罗丹明 6G 外转运能力。结果说明罗丹明 6G 的外转运

需要能量提供,而且依赖 CDR1 或 CDR2 蛋白的表达。罗丹明 6G 的外转运在能量供给下,随时间延长而外转运增加,50 min 后外转运趋于平衡或下降。

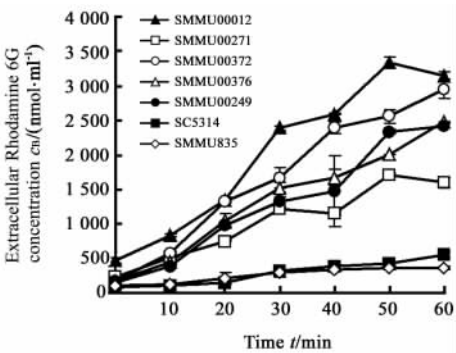


图 2 临床白念珠菌的罗丹明 6G 外排情况
Fig 2 Rhodamine 6G efflux from clinical *Candida albicans* strains

The Rhodamine 6G efflux was dependent on the presence of glucose. The values were the means±standard deviation (error bars) for 3 independent experiments

3 讨 论

白念珠菌耐药性是目前临床上治疗系统真菌感染失败的主要原因。因此,阐明白念珠菌耐药性形成机制,寻找克服白念珠菌耐药性的方法,已成为目前抗真菌药物研究领域亟待解决的首要问题。

在白念珠菌对唑类药物的耐药机制中,细胞的外排能力增强,即抗真菌药物在真菌细胞内减少是氟康唑耐药的最重要机制^[6]。白念珠菌细胞膜上存在着多种外排泵,对很多药物都具有外排功能,如唑类抗真菌药物^[7]。由于白念珠菌对上述药物的外排,导致细胞内药物累积浓度的下降而使药物治疗失败并产生了多重耐药^[8]。在白念珠菌的外排系统中,ABC 转运蛋白的高表达是其耐药性产生的重要原因^[2,9]。白念珠菌中存在 10 种 CDR 蛋白,但只有 CDR1 和 CDR2 蛋白与唑类药物耐药有关^[6],CDR1 和 CDR2 是编码这两个蛋白的基因。检测这两个基因在临床白念珠菌中的表达有助于了解临床耐药菌株的耐药性产生机制。

本研究采用实时定量 RT-PCR 方法检测敏感组与耐药组白念珠菌 CDR1 和 CDR2 基因的表达水平。该方法具有实时监测、快速、灵敏、精确等特点,能非常准确、高效地监测各基因的表达^[10]。本研究采用这种方法可以高效、灵敏地检测主动外排泵基因在临床菌株中的表达情况,有助于了解临床耐药

白念珠菌对唑类药物耐药的分子机制。

通过研究发现,耐药菌株与敏感菌株 *CDR1* 和 *CDR2* 基因表达水平存在显著差异,耐药菌株高表达率显著高于敏感菌株。*CDR1* 和 *CDR2* 基因高表达与唑类药物耐药性产生密切相关^[11],因此实验菌株对氟康唑产生耐药性的分子机制与 *CDR1*、*CDR2* 基因高表达密切相关。罗丹明 6G 外排实验显示 ABC 转运蛋白高表达的菌株其罗丹明 6G 外排也明显增加,罗丹明 6G 和氮唑类药物均为 ABC 转运蛋白的底物,用罗丹明 6G 外排示踪方法可以代表氮唑类药物的外排,所以 ABC 转运蛋白高表达菌株中罗丹明 6G 外排增加代表药物外排增加,从 ABC 转运蛋白功能上充分证明 ABC 转运蛋白是药物外排主要蛋白^[12],其基因高表达使蛋白表达量增加,使药物外排增加,是菌株产生耐药性的重要原因。因此检测临床菌株中 ABC 转运蛋白,即 *CDR1*、*CDR2* 蛋白的表达情况可以了解菌株耐药情况。

但是,白念珠菌耐药性的产生是多机制共同作用的结果,包括药物作用靶酶高表达或变异,外排泵蛋白高表达,生物被膜产生等机制。本研究仅着眼于检测临床耐药菌株中外排泵蛋白高表达与其对氟康唑耐药性的相关性。实验结果显示 75% 的耐药菌株发生 *CDR1* 或 *CDR2* 基因的高表达,说明 ABC 转运蛋白高表达是临床导致白念珠菌耐药性产生的重要原因。但是还有部分耐药菌株中未检测到 ABC 转运蛋白的高表达,其表型却显示对氟康唑高度耐药($MIC_{80} > 64 \mu g/ml$),因此应该还有其他耐药机制参与菌株对氟康唑耐药性的产生。本研究证实临床耐药菌株中 ABC 转运蛋白的高表达与其耐药性产生密切相关,但不是唯一机制。因此临床耐药菌株耐药性产生的多分子机制值得我们深入进行探讨和研究,为白念珠菌耐药性的防治奠定理论基础。

[参考文献]

[1] 廖万清,顾菊林. 深部真菌感染治疗的现状与对策[J]. 中国感染与化疗杂志,2007,9:101-103.
[2] White T C. Increased mRNA levels of *ERG16*, *CDR*, and *MDR1* correlate with increases in azole resistance in *Candida*

albicans isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 41: 1482-1487.
[3] Jha S, Karnani N, Dhar S K, Mukhopadhyay K, Shukla S, Saini P, et al. Purification, characterization of N-terminal nucleotide-binding domain of an ABC drug transporter of *Candida albicans*: uncommon cysteine 193 of Walker A is critical for ATP hydrolysis[J]. *Biochemistry*, 2003, 42: 10822-10832.
[4] Loeffler J, Einsele H, Hehart H, Schumacher U, Hrastnik C, Daum G. Phospholipid and sterol analysis of plasma membranes of azole-resistant *Candida albicans* strains[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, 185: 59-63.
[5] Mart K A, Lyons C N, Ha K, Rustad T R, White T C. Inducible azole resistance associated with a heterogeneous phenotype in *Candida albicans*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45: 52-59.
[6] Oliver B G, Silver P M, Marie C, Hoot S J, Leyde S E, White T C. Tetracycline alters drug susceptibility in *Candida albicans* and other pathogenic fungi [J]. *Microbiology*, 2008, 154: 960-970.
[7] Rai V, Gaur M, Kumar A, Shukla S, Komath S S, Prasad R. A novel catalytic mechanism for ATP hydrolysis employed by the N-terminal nucleotide-binding domain of *Cdr1p*, a multidrug ABC transporter of *Candida albicans*[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 34: 361-372.
[8] Wada S, Niimi M, Niimi K, Holmes A R, Monk B C, Cannon R D, et al. *Candida glabrata* ATP-binding cassette transporters *Cdr1p* and *Pdh1p* expressed in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deficient in membrane transporters show phosphorylation-dependent pumping properties[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 46809-46821.
[9] Mishra N N, Prasad T, Sharma N, Payasi A, Prasad R, Gupta D K, et al. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species [J]. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 2007, 54: 201-235.
[10] 林灼锋, 李校坤, 吴帆. 实时定量聚合酶链反应的研究及应用[J]. 暨南大学学报, 2002, 23: 116-122.
[11] Coste A, Selmecki A, Forche A, Diogo D, Bounoux M E, Berman J, et al. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates [J]. *Eukaryot Cell*, 2007, 6: 1889-1904.
[12] Tanabe K, Lamping E, Adachi K, Takano Y, Kawabata K, Shizuri Y, et al. Inhibition of fungal ABC transporters by unnarmicin A and unnarmicin C, novel cyclic peptides from marine bacterium[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 64: 990-995.

[本文编辑] 邓晓群