

• 综 述 •

光滑念珠菌三唑类药物耐药机制*

张博筠 综述,王中新[△] 审校

(安徽医科大学第一附属医院检验科,合肥 230022)

关键词:光滑念珠菌; EGR11; ABC 转运蛋白; MDR

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.11.027

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)11-1517-03

由于 HIV 感染、器官移植和肿瘤等免疫力减弱患者的增加和抗真菌药物的不恰当使用,侵袭性真菌感染人数逐年增加,已经对临床各类疾病的治疗造成巨大威胁。临床标本中光滑念珠菌在非白色念珠菌中分离率最高。临床分离出的所有假丝酵母菌中,光滑念珠菌三唑类耐药率最高。我国约 14.3% 的光滑念珠菌对氟康唑耐药;11.6% 的氟康唑与伏立康唑交叉耐药;2.3% 的菌株对所有抗真菌药物不敏感;没有发现三唑类与棘白菌素交叉耐药的菌株^[1]。本文就光滑念珠菌三唑类耐药机制综述如下。

1 形成生物被膜

使用植入性材料,如导管、中心静脉插管大大增加了院内感染的概率,且多引起耐药微生物感染。大多数微生物是以生物被膜的形式黏附在其他物体表面。继而定植、产生细胞外基质、生物膜逐渐成熟和扩散。生物膜的形成有 3 个阶段:(1)菌体黏附于表面支撑物,形成微菌落,微菌落融合并形成生物膜的基底层;(2)产生和释放基质;(3)形成三级致密网状结构,发育为成熟生物膜。人类 65% 的感染是生物被膜引起的。最近的研究证实,从生物膜中游离出的细胞比单个浮游酵母菌致死率更大^[2]。多种因素参与生物膜耐药:(1)pH,酸性环境中光滑念珠菌对三唑类敏感率更高^[3];(2)生物膜内细胞密度高;(3)生物膜基质对耐药性的影响;(4)养分限制,膜内细胞增长率低;(5)耐药基因的表达,尤其是编码外排泵的基因;(6)存在耐药细胞株。对三唑类药物而言,细胞密度对耐药性影响很大。当细胞密度较低时($\leq 10^3$ /mL),浮游酵母菌和生物膜内酵母菌细胞对三唑类药物都敏感,随着细胞密度的增高,耐药性也增高。在细胞密度较高的生物膜内,细胞间通过“群体感应”作用分泌信号分子,感知浓度变化从而检测菌群密度、调控菌群生理功能,并且反馈性抑制菌群复制,使定植群落达到最适大小,以适应周围环境,形成成熟的生物膜。生物膜结构是微生物为适应生存环境而形成的与浮游细胞相对应的存在方式,这种方式增强了自身防御系统,提高了其抗真菌药物的耐药性,导致药物耐受性增加。血清可促进光滑念珠菌黏附于生物材料表面。血清中胆固醇可以促进 AUS1 表达,同时血清清蛋白与预后有关^[4-5]。在侵袭性感染中,血清及组织液是体内生物膜形成的基础。生物膜的细胞外基质可以通过离子交换、与带电荷的抗菌药物结合起来降低药物的穿透力。单个细胞可以通过不可逆的基因突变产生耐药表型,生物膜耐药表型的产生依赖于自身的生理变化,而不依赖基因突变。对白色假丝酵母菌的试验结果表明,在成熟生物膜内的酵母菌对三唑类仍有耐药性,但是比生物膜耐药性弱。所以,在混合生物膜系统内,细胞外基质造成的药物低渗透力并不

是耐药产生的唯一原因。生物膜形成能力与感染能力紧密相关,影响菌株毒力。一些学者用基因芯片技术和蛋白质组学技术分析生物膜时发现了一些基因,如:过氧化物酶 CTA1、酪氨酸生物合成及降解因子 ARO、肌酸激酶 MSK、热休克蛋白 90、神经鞘脂类 SKN1、KRE1、SIR、RIF、锌调节基因 ZAP1、细胞表面疏水性相关的 CSH1、醇脱氢酶 ADH5,它们在生物膜形成过程中起不同作用^[6]。

2 药物外排作用增强

2.1 ABC 转运蛋白是跨膜整合蛋白,存在于细胞膜或细胞器膜上,利用 ATP 供能把药物泵出细胞外,主要介导脂溶性物质排出。有些 ABC 转运蛋白转运特异性配体,有些转运结构类似的一类蛋白,造成多药物耐药。它与易化扩散超载体家族(MFS)都是 MDR 蛋白。两种蛋白都有特异性区域:核苷酸结合域(NBDs)和高度疏水跨膜域(TMDs)。ABC 转运蛋白由 2 个位于细胞质的核苷酸结合域 NBD 和 2 个跨膜域 TMD。NBDs 与 ATP 结合并水解供能;TMDs 6 次跨膜,形成单环。不同的 ABC 转运蛋白 NBDs 和 TMDs 的空间位置不同。转运药物时,NBD 以头尾连接的方式结合 2 个 ATP,每个 ATP 结合在 NBD 上的模体之间,ATP 水解后,二聚体解离。对于外向运输的 ABC 蛋白,当底物结合位点在膜内侧时,蛋白质与底物的亲和力高,二者结合,构象变化,底物结合位点暴露在细胞膜外,底物与结合位点的亲和力降低,二者解离,释放底物至细胞外。内向运输的 ABC 转运蛋白机制复杂,当 ATP 供应不足或者转运蛋白表达减少时,酵母菌细胞对药物摄入减少。CgCDR1 是 ABC 转运蛋白之一,其表达上调可以引起三唑类耐药,敲除基因 CgCDR1 后,原耐药株转变为敏感株。yor1、Snq2、CgCDR16 和 CgPdh1(又作 CgCdr2)突变也可引起耐药^[7]。不同转运蛋白在耐药性形成中地位不同^[8]。CgCDR1 的表达水平高于 CgCDR2。敲除 CgCDR2 基因后光滑念珠菌对三唑类药物敏感度未增加,同时敲除 CgCDR1 和 CgCDR2 时,光滑念珠菌敏感度上升 50%。所以对于光滑念珠菌而言,CgCDR1 突变的作用更显著。

2.2 PDR 调节 ABC 转运蛋白家族的生物合成,Snq2p、CgRTA1p 和 Pdr5p 同属于 PDR 亚族,它们与启动子上游部位多向耐药应答片段(PDREs)作用,调节基因的表达。Pdr1、Pdr3p 正向调节;与之染色体同源的 STB5 负向调节^[9]。当敲除 STB5 时,PDR1 的过量表达引起 ABC 转运蛋白表达上调,光滑念珠菌耐药性小幅度增强^[10]。已发现 PDR1 的错意突变位点 57 个,主要位于转录活化区、中间同源区和抑制区。P927S 突变位于转录活化区,其突变株 CgCDR1 和 CgCDR2 基因表达上调,外排作用增强^[11]。部分 PDR1 突变株毒力增强,造成耐药^[12]。

* 基金项目:安徽省高校省级自然科学基金资助项目(KJ2015A337)。

[△] 通讯作者,E-mail:aywzhx87@163.com。

PDR1 突变可使另一种外排泵基因 PUP1 表达上调,同时 PUP1 基因也编码线粒体蛋白^[13],所以 PDR1 突变与线粒体缺陷是否有共同途径尚不清楚^[14]。CgRTA1 也参与正向调节,它与 PDREs 的 5'UTR 区域结合,分别在含氟康唑培养基上同时培养敏感株与耐药株,耐药株 CgRTA1 的表达量在一定范围内随氟康唑浓度升高而上升,敏感株 CgRTA1 表达没有增加^[15]。最近的研究显示,PDR1 点突变可造成黏附力增强,故 PDR1 还与菌株毒力有关^[12,16]。国外有学者证实,呼吸抑制作用可以促进光滑念珠菌 CgPDR1 作用,CgCDR1 表达上调^[17]。

2.3 MDR1 基因编码 MFS。MFS 是一种通过电化学势能进行被动转运的 MDR 蛋白,不依赖 ATP 供能,主要介导水溶性物质泵出。MDR1 基因过度表达可造成氟康唑耐药。Mdr1P 具有底物特异性,通过抑制药物摄入,降低细胞内药物浓度造成耐药,但是仍然有药物不被抑制。

3 Erg11 基因突变与表达上调

Erg11 基因编码真菌 14 α -DM,该酶属于细胞色素 P-450 家族,是三唑类药物作用于真菌细胞的靶向酶,三唑类药物与 Erg11p 结合,干扰真菌细胞膜麦角固醇的合成。麦角固醇合成过程复杂,参与合成的酶有 Erg1-Erg27 基因编码,其中 Erg11 编码的 Erg11P 是关键酶。三唑类药物与之结合后,真菌细胞内正常的麦角固醇逐渐耗竭,甲基化固醇在细胞内聚集,从而改变了细胞膜成分,影响细胞膜稳定性,抑制真菌生长,并最终导致细胞死亡。

Erg11 基因突变改变了蛋白质氨基酸序列,若改变发生在酶与唑类药物的结合位点,则药物的结合率降低,未结合的酶仍然可以参与正常的生化反应,使麦角固醇合成量正常,有效降低药物对细胞膜稳定性的影响。国内有研究扩增了光滑念珠菌耐药株与敏感株 Erg11 基因,再将基因克隆至 pUC57-T 载体,利用此载体上通用引物进行基因测序,并与 gene-bank 上的基因进行比对,发现了 10 个突变位点,点突变包括转换和颠换两种形式^[18]。5 种突变在敏感株和耐药株中均出现;两种突变只在敏感株中出现;C2101G、C1073T、G1478A 只在耐药株中出现。Samaranayake 等^[19]对氟康唑耐药菌株测序,未发现 Erg11 有意义突变。Erg11 突变是否为光滑念珠菌耐药产生的机制仍需试验证明。

细胞内 Erg11P 水平取决于其编码基因的表达。当基因表达上调时,合成的蛋白质产物增多,而药物浓度是定量的,过多的蛋白质产物可以中和药物,降低或抵消药物对真菌细胞的药理作用,维持真菌细胞膜的稳定性,表现出对药物的耐药性。基于此,有试验通过荧光定量聚合酶链反应技术,分别测得光滑念珠菌三唑类药物敏感株、药物依赖性敏感株和耐药株的 mRNA 水平,结果显示 3 组真菌 mRNA 水平差异有统计学意义($P < 0.05$)^[8]。Erg11 基因表达上调可以造成光滑念珠菌对三唑类药物耐药。UPC2A 调节 Erg11 基因转录,UPC2A 突变株 14 α -DM 合成减少,对氟康唑敏感度升高^[20];Erg11 基因拷贝数增加,菌株耐药性增强^[21]。

光滑念珠菌合成麦角固醇需要铁元素的参与。Aus1p 是 ATP 转运蛋白之一,向细胞内转运固醇。在缺铁环境下,Aus1p 向细胞内转运固醇增加,抵消了环境对细胞生长的抑制作用^[22-23]。

4 线粒体相关因素

线粒体功能障碍也是耐药机制之一。线粒体内基因缺失会使 ABC 转运蛋白表达上调,但参与三唑类耐药的具体机制仍未

明确。

在 Peng 等^[14]的试验中,所有的耐药菌株呼吸均受到抑制。氟康唑作用于光滑念珠菌时,耐药株线粒体膜电位、活性氧水平 ROS 和细胞周期没有发生变化;而敏感菌株线粒体内膜电位随药物浓度升高而升高,ROS 升高,呈剂量依赖关系。敏感菌株细胞周期多阻滞在 G2/M 期。细胞在 G2/M 期内修复错误的 DNA 复制,在氟康唑长期作用下,细胞周期长期阻滞,DNA 复制错误不断累积,最终导致细胞凋亡。ROS 的产生受线粒体膜电位控制,当细胞内自由基水平增高时,过多的自由基与线粒体膜上的还原位点结合,导致线粒体氧化性损伤。ROS 还能与 A-paf-1、caspase-9 前体、ATP/dATP 形成凋亡小体,通过级联反应引起细胞凋亡。同时,线粒体内的锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD)等清除氧自由基的能力下降,聚积更多的 ROS,影响线粒体膜电位,造成线粒体膜电位崩溃,引发细胞凋亡。当细胞缺乏 SODs 时(Zn-SOD、Mn-SOD),染色体自然突变率升高,呼吸缺陷株更容易突变为耐药菌株^[24]。

线粒体基因的非缺失性突变造成线粒体功能的损害是可逆的,当暴露于氟康唑时,光滑念珠菌的线粒体可以在感受态和非感受态转换,以此来逃避氟康唑的抑菌作用^[25]。

综上所述,多种机制共同参与光滑念珠菌对三唑类药物的耐药,临床分离出的耐药菌株可能有一种耐药机制,也可能有多种。外排泵作用增强是造成耐药的明确因素,Erg11 基因突变、外排泵基因调控序列的突变及线粒体基因突变在光滑念珠菌对三唑类耐药药物中的作用仍需进一步探究。

参考文献

- [1] Xiao M, Fan X, Chen SC, et al. Antifungal susceptibilities of *Candida glabrata* species complex, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* species complex and *Candida tropicalis* causing invasive candidiasis in China: 3 year national surveillance[J]. J Antimicrob Chemother, 2015, 70(3): 802-810.
- [2] Uppuluri P, Chaturvedi AK, Srinivasan A, et al. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle[J]. PLoS Pathog, 2010, 6(3): e1000828.
- [3] Mota S, Alves R, Carneiro C, et al. *Candida glabrata* susceptibility to antifungals and phagocytosis is modulated by acetate[J]. Front Microbiol, 2015, 4(6): 919-925.
- [4] Nagi M, Tanabe K, Nakayama H, et al. Serum cholesterol promotes the growth of *Candida glabrata* in the presence of fluconazole[J]. J Infect Chemother, 2013, 19(1): 138-143.
- [5] 刘蓉, 乔莉, 张劲松. 念珠菌血流感染病原学及影响预后的危险因素分析[J]. 临床急诊杂志, 2015, 16(1): 5-8.
- [6] Bandara HM, Lam OL, Watt RM, et al. Bacterial lipopolysaccharides variably modulate in vitro biofilm formation of *Candida* species[J]. J Med Microbiol, 2010, 59 (Pt 10): 1225-1234.
- [7] Culakova H, Dzugasova V, Perzelova J, et al. Mutation of the CgPDR16 gene attenuates azole tolerance and biofilm production in pathogenic *Candida glabrata*[J]. Yeast, 2013, 30(10): 403-414.
- [8] 张炜, 应春妹. 耐氟康唑光滑念珠菌耐药机制研究[J]. 检验医学, 2013, 28(9): 780-783.
- [9] Noble JA, Tsai HF, Suffis SD, et al. STB5 is a negative regu-

- lator of azole resistance in *Candida glabrata*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(2):959-967.
- [10] Paul S, Bair TB, Moye-Rowley WS. Identification of genomic binding sites for *Candida glabrata* Pdr1 transcription factor in wild-type and rho0 cells[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(11):6904-6912.
- [11] 江岑,董丹凤,章黎华,等. PDR1 基因 P927S 突变调节光滑念珠菌对唑类药物耐药的机制[J]. *中华传染病杂志*, 2014, 32(6):325-329.
- [12] Ferrari S, Ischer F, Calabrese D, et al. Gain of function mutations in CgPDR1 of *Candida glabrata* not only mediate antifungal resistance but also enhance virulence [J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5(1):e1000268.
- [13] Dunkel N, Liu TT, Barker KS, et al. A gain-of-function mutation in the transcription factor Upe2p causes upregulation of ergosterol biosynthesis genes and increased fluconazole resistance in a clinical *Candida albicans* isolate[J]. *Eukaryot Cell*, 2008, 7(7):1180-1190.
- [14] Peng Y, Dong D, Jiang C, et al. Relationship between respiration deficiency and azole resistance in clinical *Candida glabrata* [J]. *FEMS Yeast Res*, 2012, 12(6):719-727.
- [15] Kolaczowska A, Dylag M, Kolaczowski M. Differential expression of the *Candida glabrata* CgRTA1 and CgRSB1 genes in response to various stress conditions[J]. *Biochem biophys Res Commun*, 2013, 432(1):169-174.
- [16] Ferrari S, Sanguinetti M, Torelli R, et al. Contribution of Cg-PDR1-regulated genes in enhanced virulence of azole-resistant *Candida glabrata*[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3):e17589.
- [17] Paul S, Schmidt JA, Moye-Rowley WS. Regulation of the Cg-Pdr1 transcription factor from the pathogen *Candida glabrata* [J]. *Eukaryot Cell*, 2011, 10(2):187-197.
- [18] 沈银忠,卢洪洲,张永信. 耐氟康唑光滑念珠菌 ERG11 基因突变分析[J]. *中华传染病杂志*, 2010, 28(6):331-335.
- [19] Samaranayake YH, Cheung BP, Wang Y, et al. Fluconazole resistance in *Candida glabrata* is associated with increased bud formation and metallothionein production[J]. *J Med Microbiol*, 2013, 62(Pt 2):303-318.
- [20] Whaley SG, Caudle KE, Vermitsky JP, et al. UPC2A is required for high-level azole antifungal resistance in *Candida glabrata*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(8):4543-4554.
- [21] Abbes S, Mary C, Sellami H, et al. Interactions between copy number and expression level of genes involved in fluconazole resistance in *Candida glabrata*[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2013, 11(3):74-79.
- [22] Hosogaya N, Miyazaki T, Nagi M, et al. The heme-binding protein Dap1 links iron homeostasis to azole resistance via the P450 protein Erg11 in *Candida glabrata* [J]. *FEMS Yeast Res*, 2013, 13(4):411-421.
- [23] Nagi M, Tanabe K, Ueno K, et al. The *Candida glabrata* sterol scavenging mechanism, mediated by the ATP-binding cassette transporter Aus1p, is regulated by iron limitation[J]. *Mol Microbiol*, 2013, 88(2):371-381.
- [24] Briones-Martin-del-Campo M, Orta-Zavalza E, Canas-Villamar I, et al. The superoxide dismutases of *Candida glabrata* protect against oxidative damage and are required for lysine biosynthesis, DNA integrity and chronological life survival [J]. *Microbiology*, 2015, 161(Pt 2):300-310.
- [25] Ferrari S, Sanguinetti M, De Bernardis F, et al. Loss of mitochondrial functions associated with azole resistance in *Candida glabrata* results in enhanced virulence in mice[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(5):1852-1860.

(收稿日期:2015-12-24 修回日期:2016-02-21)

结核感染 T 细胞斑点试验对结核病诊断的研究进展

贾文青 综述 刘莹[△] 审校

(郑州大学第一附属医院呼吸与重症医学科 450052)

关键词: 结核病; 结核感染 T 细胞斑点试验; 结核菌素试验; 诊断价值

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2016. 11. 028

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)11-1519-04

近年来全球结核病疫情呈明显上升趋势,据 WHO 估计全球有 1/3 的人口感染结核分枝杆菌,每年约 800 万新发结核病患者,200 万人死于结核病^[1]。我国是全球结核病高负担国家之一,2010 年全国第 5 次结核病流行病学调查显示,我国现有活动性结核患者 523 万,占全球发病的 14.3%^[2]。早期确诊可以有效控制结核,具有积极的临床意义。传统检测方法:(1)结核分枝杆菌培养法。结核分枝杆菌培养法特异性高,而染色阳性率低,培养需 4~8 周,可延误诊断,影响治疗。(2)痰涂片法。痰涂片法操作简单,但阳性率仅为 30%~60%,因此不利于临

床结核病的诊断和治疗^[3]。(3)组织病理学检查。组织病理学检查是有创性操作,患者依从性差,花费高。(4)结核菌素皮肤试验(TST)。TST 长期应用于结核感染的筛查,存在许多缺陷,因其使用的结核菌素纯蛋白衍生物(PPD)易与非 MTB 及卡介苗(BCG)发生交叉反应,导致其特异性及敏感度较低。Diel 等^[4]的 Meta 分析报道显示,TST 敏感度仅为 67%~72%。此外 TST 需要 72 h 后出结果,时间长,患者依从性差,且结果判读主观性较强,从而影响结果的准确性。(5)结核血清学检测。结核血清学检测操作简单,用时较少,但存在假阳性和假阴性的问

[△] 通讯作者, E-mail: Liuying03341237@126. com。