

· 综 述 ·

克柔念珠菌对抗真菌药物耐药的机制和新药开发研究进展*

宫婷婷 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: 克柔念珠菌; 耐药机制; 新药

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.13.027

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)13-1801-03

近年来,随着 HIV 感染的增加、广泛使用免疫抑制剂治疗、长期使用广谱抗生素以及侵入性的临床检查如实体器官或骨髓移植^[1],使得非白色念珠菌已超过白色念珠菌,非白色念珠菌如光滑念珠菌、克柔念珠菌等所致的侵袭性真菌的发病率和病死率呈现上升的趋势^[2]。伴随着而来的是念珠菌的耐药现状也愈演愈烈,因此导致患者治疗的失败已成为临床的重要挑战。目前克柔念珠菌对三唑类、多烯类以及棘白菌素类药物均出现不同程度的耐药,尤其对唑类药物的耐药最严重。因此对克柔念珠菌耐药机制的深入研究要继续进行,新药的研究也在不断的开展,所以本文将从克柔念珠菌的耐药现状、耐药机制以及新药的研展几个方面进行阐述。

1 克柔念珠菌生物学形态及致病性

克柔念珠菌是一种致病性和毒力均低的一种共生菌,主要存在于热血动物体内与免疫力低下的患者中。克柔念珠菌在显色培养基中的颜色为粉红色,在沙保葡萄糖琼脂上生长的菌落有着暗淡、不光滑的扁平表面,而其他念珠菌菌种则均表现为凸起的菌落。体外发现克柔念珠菌的黏附力远小于白念珠菌,但相比其他的念珠菌有更强细胞表面疏水性,因此克柔念珠菌有着强大的寄居无生命物质表面如植入物和导管的能力,寄居在薄膜或生物膜的表面迅速繁殖,这是引起相关侵袭性操作感染的主要原因。念珠菌生物膜的形成特别是异物如导管,不仅作为传播念珠菌感染的主要来源,而且还可以使一线抗真菌剂产生抗性^[3],造成治疗失败,危及患者生命。另一方面由于生物膜的产生,使得必须开发抑制生物膜的药物,造成医疗成本的增加,造成患者经济负担。

2 克柔念珠菌的感染及耐药现状

20 世纪 80 年代之前,抗真菌药物的品种少及真菌感染率低,伴随着抗真菌药物的耐药情况也是罕见的。80 年代后,数记记载的真菌感染情况逐渐增加,用于真菌治疗的三唑类抗真菌剂诞生,尤其以氟康唑的产生以及其成本的廉价,被广泛用于念珠菌感染的预防及治疗,继而伴随着耐药率的升高。近些年,随着临床侵袭性操作如气管插管、导尿以及介入等,使得克柔念珠菌的感染及耐药情况均随之增加,新的抗真菌剂的研发也在不断地进行,包括后来的伊曲康唑、伏立康唑、卡泊芬净等一线药物。2014 年美国研究表明克柔念珠菌对棘白菌素类药物耐药率相比较 2008 年已从 4.2% 上升至 7.8%^[4];另据 Zhou 等^[5]统计,台湾地区 2014 年克柔念珠菌对氟康唑、伏立康唑耐药率相比较,2010 年显著升高(氟康唑 2.8% vs. 0.5%;伏立康唑 2.2% vs. 0.3%),并且发现对伏立康唑耐药的念珠菌也对氟康唑全部耐药,存在着交叉耐药的情况;而在我国上海调研发现在感染 HIV 患者中念珠菌对两性霉素 B、5-氟胞嘧啶、氟康唑、伊曲康唑、伏立康唑的药物耐药性依次

为 0%、8.33%、16.67%、19.17% 和 16.67%^[6]。可见,随着人群真菌感染发生情况的不断加重,克柔念珠菌的感染也在不断增加,其对常规真菌治疗药物的耐药情况也愈来愈严重,这就迫切需要不断开发更适用于治疗克柔念珠菌感染的新药。

3 常见抗真菌药物的耐药机制

3.1 三唑类抗真菌剂

3.1.1 氟康唑 虽然在念珠菌感染中克柔念珠菌的流行率很低(2%)^[7],但其内在的抗氟康唑却引起了流行病学和治疗的关注,且克柔念珠菌对氟康唑呈内在的耐药主要发生于血液恶性肿瘤及免疫缺陷的患者^[8],主要的机制是羊毛甾醇 14 α -去甲基酶对氟康唑抑制作用的敏感性降低所引起的。另一种机制发现克柔念珠菌有两种外排泵编码基因,即 ABC1 和 ABC2。ABC1 基因在克柔念珠菌天然氟康唑耐药机制中起主要作用,ABC2 很少表达甚至不表达。但是 Tavakoli 等^[9]认为克柔念珠菌的耐药与 ERG11 基因过度表达无关,而认为潜在的机制是启动子活性的水平,即等于麦角甾醇或固醇生物合成的速率。但由于氟康唑对克柔念珠菌的天然耐药使得氟康唑几乎没有临床应用价值。

3.1.2 伏立康唑 伏立康唑被认为是患有侵袭性念珠菌感染的非内源性和中性粒细胞减少患者的治疗选择之一,且伏立康唑最近被建议用于预防侵入性真菌感染^[10]。Lamping 等^[11]在唑类敏感的克柔念珠菌的参考菌株 ATCC6258 和在对伏立康唑的剂量依赖敏感性的菌株中发现了位于 C-末端 ERG11p 中的非同义突变 G1470A(G524R)。之后 Ricardo 等^[12]研究发现在伏立康唑抗真菌性及耐药克柔念珠菌临床分离株中 ERG11 基因测序显示两种不同类型的突变:一个同义突变和一个错义突变,导致酪氨酸变为组氨酸的突变,使得克柔念珠菌临床分离株耐药,这项研究也强调 ATP 依赖的相关性外排泵活性,即 Abc1p。而 Silva 等^[13]发现两个新的非同义突变的克柔念珠菌 A497C(Y166S)和 G1570A(G524R)的分离株。使用进化保守评分预测这些非同义突变的功能结果,结果显示 G524R 突变不影响 14 α -脱甲基酶功能,而发现 Y166S 突变影响该酶。因此,Y166S 突变对伏立康唑具有剂量依赖性敏感性可能是其对唑类的敏感性降低的原因。虽然 Y166S 在分离株克氏念珠菌中观察到的降低唑类药物敏感性的表型的存在需要调查,它可能有助于寻找新的治疗剂来抵抗耐药的克柔念珠菌。且在伏立康唑耐药菌株中发现伏立康唑敏感性的下降能使剂量依赖敏感组的伏立康唑抑制两性霉素 B 对克柔念珠菌的活性,即证明了伏立康唑的耐药对两性霉素 B 也存在活性的抑制^[14]。

3.1.3 伊曲康唑 目前随着抗真菌药物的预防性使用,使得伊曲康唑的耐药情况也逐渐的升高,早期研究发现克柔念珠菌耐伊曲康唑是由于此药的蓄积比敏感株中的少,但对伊曲康唑

* 基金项目:安徽省高校省级自然科学基金项目(KJ2015A337)。

[△] 通信作者, E-mail: aywzhx87@163.com。

敏感性不同的两株克柔念珠菌对氟康唑均有高浓度的耐药,提示克柔念珠菌对氟康唑和伊曲康唑耐药的机制可能有所不同,认为克柔念珠菌对伊曲康唑耐药是由于减少药物在真菌细胞内蓄积,其机制可能是由于存在一个或多个药物外排泵。但 HE 等^[15]认为 ERG11 和 ABC2 基因的上调与克柔念珠菌的耐药机制相关,但却不能排除 ERG11 基因在此过程中突变引起的耐药。

3.2 多烯类药物 多烯类药物包括两性霉素 B、制霉菌素、那他霉素等药物,最常用使用的是两性霉素 B。50 多年来,两性霉素 B 一直是抗真菌化疗的“金标准”^[16]。两性霉素 B 有几种脂质制剂,但仍然可能与有些毒性相关,主要是由于对人的类固醇的交叉反应(结构上类似于麦角固醇)^[17]。因此两性霉素 B 很少用于临床,但是当三唑类及棘白菌素类药物均对克柔念珠菌耐药时,则两性霉素 B 作为首选。AmB 经典的作用机制是与细胞膜的麦角甾醇结合,随后的孔形成和离子泄漏,而起到杀菌作用。但最近研究表明 AmB 能够诱导胞内形成活性氧即 ROS,对真菌细胞膜产生损失而起到杀菌作用^[18]。可 Mesa-Arango^[19]等认为 AmB 抗真菌的机制既是在细胞膜的靶向麦角固醇中形成孔道,也能在细胞中诱导氧化损伤。但是 Mesa-Arango 等^[20]发现在克柔念珠菌中 AmB 产生 ROS 的比例较其他念珠菌是减少的,还认为 ROS 在 AmB 的耐药中起承上启下的地位,这可能是 AmB 耐药率低的原因,具体机制尚不清晰。并且生物膜被认为通过隔离细胞外基质中的药物而降低膜麦角甾醇水平,或形成对 AmB 的耐受性持续细胞^[21]。因此需要更多的研究来理解内在抗性的基础,并为这些感染的管理提供有效的策略。

3.3 5-氟胞嘧啶 5-氟胞嘧啶是核苷类似物,能选择性地进入真菌细胞内,在真菌胞嘧啶脱氨酶的作用下转化为氟尿嘧啶,后者再在尿嘧啶核酸糖转移酶作用下最终转变成磷酸核糖苷尿嘧啶(FUMP)。FUMP 干扰 RNA 分子的合成,破坏真菌 RNA 的结构和功能,从而发挥抗真菌作用。因极易引起继发性耐药而通常与其他抗真菌药联用,很少单独使用。但 5-氟胞嘧啶在某些特殊的部位则发挥重要的抗菌活性如中枢神经系统的感染。其耐药主要是特定的氨基酸被取代导致前体药物的吸收和修饰发生改变,致其突变而产生耐药^[22]。因此建议 5-氟胞嘧啶与两性霉素 B 联合应用可减少获得性耐药的产生。

3.4 棘白菌素类药物 棘白菌素是通过抑制真菌细胞壁上的 FKS1P 的靶酶 1,3-D-葡聚糖合酶,从而发挥抗真菌作用。随着深部侵袭性真菌的感染,棘白菌素类抗真菌剂在侵袭性念珠菌病的预防和治疗中起中心作用^[23],继而棘白菌素类药物迅速产生耐药。Hakki 等^[24]最近报道了由卡泊芬净使用(CFG)后造成对克柔念珠菌敏感度降低而引起的侵袭性和口咽念珠菌病的病例,初步研究没有表明在易感性降低的分离株中 FKS1 基因序列的任何修饰,表明在此菌株中可能有不同的耐药机制。但 Kahn 等^[25]通过研究由于长期使用棘白菌素类药物导致其敏感性降低的一例感染克柔念珠菌的急性髓系白血病的患者,发现 FKS1 基因中的 T2080K 杂合突变,结果导致 Phe6553-Cys 的取代,改变了葡聚糖合酶对棘白菌素药物的敏感性,从而使得克柔念珠菌耐药,且克柔念珠菌 FKS1P 氨基酸的被置换的位置位于高度保守区“hot spot1”蛋白,即 Hs1。Desnos 等^[26]研究 Hs1 突变位置除 641-649 外,还出现了如 L658W、L701M 突变。因此 Forastiero 等^[27]使用两种不同的分型方法研究分离物的分子流行病学:基于 PCR 的物种特异性重复多态性 CKRS-1 序列的扩增和多位点序列分型。所有

克柔念珠菌都是与遗传相关的,并且涉及降低棘白菌素敏感性为机制的特点。临床耐药与体外棘白菌素 MIC 的增加相关,并且与靶酶 Fks1p 的热点中的三种不同突变相关。通过 FKS1 中不同突变的快速获得抗性的分子证据突出显示需要监测用棘白菌素药物治疗的克柔念珠菌感染的抗性的发展。

4 新药研究的进展

4.1 嗜铬粒蛋白 A(CGA)-N46 CGA-N46 抑制所有测试的念珠菌属的生长,其中克柔念珠菌表现出最大的敏感性。CGA-N46 能够破坏磷脂单层的稳定性,而不损害克柔念珠菌细胞外膜的完整性和渗透性,并诱导细胞质空泡化和线粒体损伤。此外,用 CGA-N46 处理克柔念珠菌与细胞内活性氧类别的水平降低,线粒体膜电位的降低和 DNA 合成抑制相关。本研究的结果表明 CGA-N46 能够通过念珠菌属的细胞膜。通过暂时去稳定磷脂膜,又导致线粒体功能障碍和 DNA 合成的抑制。因此,CGA-N46 可以被认为是用于治疗克柔念珠菌感染的患者的新的抗真菌化合物^[28]。

4.2 银纳米颗粒(AgNP) AgNP 是目前由可用的微生物感染控制的纳米技术提供的一些非常有趣的产品,且 AgNPs 是通过环保方法,使用半胱氨酸作为还原剂合成的。有学者认为 AgNP 是开发新的抗真菌剂在成纤维细胞中具有最小的细胞毒性和针对对常规抗真菌化合物具有抗性的念珠菌属的致死作用的替代潜力^[29]。因此这也将成为新药研究的一股潜力。

4.3 羧甲基壳聚糖(CM-壳聚糖) Tan 等^[30]在研究中确定 CM-壳聚糖对单个和混合物种生物膜的非白色念珠菌,包括热带假丝酵母,近平滑假丝酵母,克柔假丝酵母和光滑念珠菌的有抑制作用。因为 CM-壳聚糖不仅能够抑制念珠菌细胞的代谢活性,而且在生物膜的建立和发展时也是有活性的,可以做新药物的研究。

5 小结

克柔念珠菌对氟康唑天然耐药,而对其他抗真菌剂是获得性耐药。近年来无生命物质如植入物和导管在临床上广泛的应用,使得克柔念珠菌的感染一直呈现上升的趋势,且在某些地区克柔念珠菌感染在念珠菌感染中已上升至第三位。而由于提倡预防性用药,使得克柔念珠菌的耐药率也在升高,这种趋势必须引起足够重视。因此,进一步完善克柔念珠菌的耐药机制势在必行,从而为新药研究的靶点提供理论依据。

参考文献

- [1] Williams DW, Kuriyama T, Silva S, et al. Candida biofilms and oral candidosis: treatment and prevention[J]. J Periodontol, 2011, 55(5): 250-265.
- [2] Silva S, Negri M, Henriques M, et al. Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance [J]. FEMS Microbiol Rev, 2012, 36(2): 288-305.
- [3] Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of Candida albicans biofilm development[J]. Nat Rev Microbiol, 2011, 9(2): 109-118.
- [4] Vallabhaneni S, Cleveland AA, Farley MM, et al. Epidemiology and risk factors for echinocandin nonsusceptible Candida glabrata bloodstream infections: data from a large multisite population-based Candidemia surveillance program, 2008-2014[J]. Open Forum Infect Dis, 2015, 2(1): 163-169.
- [5] Zhou ZL, Lin CC, Chu WL, et al. The distribution and

- drug susceptibilities of clinical *Candida* species in TSARY 2014[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2016, 86(4): 399-404.
- [6] 陈智瑾, 宰淑蓓, 曹宇硕, 等. 2010 年至 2014 年上海地区艾滋病患者深部真菌分离情况及药物敏感性分析[J]. *中华传染病杂志*, 2015, 33(9): 538-541.
- [7] Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ, et al. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009)[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2011, 38(1): 65-69.
- [8] Scorzoni L, Delucas MP, et al. Zaragoza antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e60047.
- [9] Tavakoli M, Zaini F, Kordbacheh M, et al. Upregulation of the ERG11 gene in *Candida krusei* by azoles[J]. *DARU J Pharm Sci*, 2010, 18(4): 276-280.
- [10] Delaloye J, Calandra T. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient[J]. *Virulence*, 2014, 5(1): 161-169.
- [11] Lamping E, Ranchod A, Nakamura K, et al. Abc1p is a multidrug efflux transporter that tips the balance in favor of innate azole resistance in *Candida krusei*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(2): 354-369.
- [12] Ricardo E, Miranda IM, Faria-Ramos IA, et al. In vivo and in vitro acquisition of resistance to voriconazole by *Candida krusei*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(8): 4604-4611.
- [13] Silva DB, Grisolia AB. Novel point mutations in the ERG11 gene in clinical isolates of azole resistant *Candida* species[J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2016, 111(3): 192-199.
- [14] Lignell A, Löwdin E, Cars O, et al. Voriconazole-induced inhibition of the fungicidal activity of amphotericin B in *Candida* strains with reduced susceptibility to voriconazole; an effect not predicted by the MIC value alone[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(4): 1629-1637.
- [15] He XY, Zhao MF, Chen JY, et al. Overexpression of both ERG11 and ABC2 genes might be responsible for itraconazole resistance in clinical isolates of *Candida krusei*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0136185.
- [16] Petrikos G, Skiada A. Recent advances in antifungal chemotherapy[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2007, 30(2): 108-117.
- [17] Gray KC, Palacios DS, Dailey I, et al. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(7): 2234-2239.
- [18] Sangalli-Leite F, Scorzoni L, Cecilia Mesa-Arango A, et al. Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst[J]. *Microbes and Infection*, 2011, 13(5): 457-467.
- [19] Mesa-Arango AC, Scorzoni L. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug[J]. *Front Microbiol*, 2012(1): 286.
- [20] Mesa-Arango A, Trevijano-Contador N, Roman E, et al. The production of reactive oxygen species is a Universal action mechanism of amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(11): 6627-6638.
- [21] Martins M, Henriques M, Lopez-Ribot JL. Addition of DNase improves the in vitro activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms[J]. *Mycoses*, 2012, 55(1): 80-85.
- [22] Steier Z, Vermitsky JP, Toner G, et al. Flucytosine antagonism of azole activity versus *Candida glabrata*; role of transcription factor Pdr1 and multidrug transporter Cdr1[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(11): 5543-5547.
- [23] Miyazaki T, Kohno S. Current recommendations and importance of antifungal stewardship for the management of invasive candidiasis[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2015, 13(9): 1171-1183.
- [24] Hakki M, Staab JA, Marr KA. Emergence of a *Candida krusei* isolate with reduced susceptibility to caspofungin during therapy[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(7): 2522-2524.
- [25] Kahn NJ, Garcia-Effron G. Acquired echinocandin resistance in a *Candida krusei* isolate due to modification of glucan synthase[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(5): 1876-1878.
- [26] Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Raoux DA, et al. Mutations in the *fkp1* gene in *Candida albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei* correlate with elevated caspofungin MICs uncovered in AM3 medium using the method of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(9): 3092-3098.
- [27] Forastiero A, Garcia-Gil V, Rivero-Menendez O, et al. Rapid development of *Candida krusei* echinocandin resistance during caspofungin therapy[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(11): 6975-6982.
- [28] Artunduaga BJ, Paredes GD, Sanchez SC, et al. In vitro antifungal activity of Silver nanoparticles against fluconazole-resistant *Candida* species[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2015, 31(11): 1801-1809.
- [29] Garcia-Hermoso D, Desnos-Ollivier M. Typing *Candida* species using microsatellite length polymorphism and multilocus sequence typing[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1356(1): 199-214.
- [30] Tan YL, Leonhard M, Moser DA. Antibiofilm activity of carboxymethyl chitosan on the biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species[J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 149(1): 77-82.