

5-氟胞嘧啶耐药白色念珠菌的 DNA 与 RNA 的随机扩增多态性分析

江秀秀, 吕时铭

(浙江大学医学院 附属妇产科医院, 浙江 杭州 310006)

[摘要] 目的: 比较对 5-氟胞嘧啶耐药与敏感的白色念珠菌 DNA 基因组与 RNA 表达, 探讨复发性念珠菌阴道炎的耐药机理。方法: 选择临床诊断为复发性念珠菌阴道炎的病例 16 例, 取阴道分泌物培养, 提取菌株 DNA 基因组, 应用随机扩增多态性 DNA 法分析菌株的 DNA 基因组的多态性, 对分离菌株进一步做药敏试验, 获得白色念珠菌耐药菌株与敏感菌株各 8 株; 提取菌株 RNA, 利用随机扩增多态性 RNA 方法检测基因组的 RNA 表达。结果: 临床耐药菌株与敏感菌株的 DNA 基因组指纹图无明显差异, 但基因组的 RNA 表达存在差异, 与敏感菌株比较, 耐药菌株基因组的 RNA 出现条带数目的缺失或位置的改变。结论: 复发性念珠菌阴道炎耐药的原因之一是表型耐药, 而非基因型耐药, 敏感菌株与耐药菌株共有一套基因组, 在致病环境发生改变时, 基因组 RNA 的表达转换, 导致临床上表现出可逆耐药而非稳定耐药。

[关键词] 白色念珠菌; 药物耐受性/遗传学; 基因组; 基因表达; 多态现象(遗传学)

[中图分类号] R 379 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2005)01-0069-04

DNA and RNA random amplification polymorphism in 5-fluorocytosine-resistant strains of *Candida albicans* from revul-vaginal candidiasis

JIANG Xiu-xiu, LU Shi-ming (*The Affiliated Obstetrics and Gynecology Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate the DNA genome and RNA expression in 5-fluorocytosine-resistant strains of *Candida albicans* from vaginal candidiasis. **Methods:** Sixteen strains of *Candida albicans* were selected from clinically diagnosed revul-vaginal candidiasis. Eight 5-fluorocytosine-sensitive isolates and 8 resistant isolates were examined by France Media FUNGUS sensitive test. DNA genome was detected with random amplification polymorph DNA. RNA expression was detected with random amplification polymorph RNA method. **Results:** There were no distinct differences between 5-fluorocytosine-sensitive and resistant *Candida albicans* in DNA genome, while RNA expression showed significant differences between 5-fluorocytosine-resistant and sensitive strains. **Conclusion:** Clinical 5-fluorocytosine-resistant strains of *Candida albicans* from revul-vaginal candidiasis may be related to phenotype changes.

[Key words] *Candida albicans*; Drug tolerance/genetics; Genome; Gene expression; Polymorphism (genetics)

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2005, 34(1): 69-72.]

复发性念珠菌阴道炎是指念珠菌阴道炎经过治疗, 临床症状和体征消失, 真菌学检查连续 3 个周期均为阴性后症状重现, 真菌学检查又呈阳性, 而且 1 年中复发 4 次。随着抗真菌药物的普遍应用, 耐药病例不断增多, 不仅使念珠菌阴道炎难治, 也对一些念珠菌易感人群的深部

感染的治疗提出了挑战。本研究选择临床耐药菌株进行药敏实验, 获得耐药与敏感念珠菌, 比

收稿日期: 2003-05-08 修回日期: 2004-06-02

基金项目: 浙江省自然科学基金资助(301546)。

作者简介: 江秀秀(1976—), 女, 硕士, 主要从事妇产科基础与临床研究。

较两者的 DNA 基因组与基因组的 RNA 随机扩增多态性,研究复发性念珠菌阴道炎临床耐药的机理,为改善临床各组织器官念珠菌感染的治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源 取自 2002 年 3 月至 6 月间,浙江大学医学院附属妇产科医院临床诊断为复发性念珠菌阴道炎的病例,诊断标准参照七年制妇产科学第一版。选择方法:年龄 18~49 岁的女性,有性生活史,有外阴瘙痒、灼痛或坐卧不安、尿频、尿痛、性交痛,白带增多且黄,有任何 1 项或 1 项以上临床症状者,在月经干净后第 3~7 d,取阴道后穹隆分泌物涂片找念珠菌。剔除念珠菌复发易感因素者,如糖尿病、HIV 阳性、使用免疫抑制剂、患有免疫缺陷性疾病及使用激素类药物者;排除孕妇,就诊前 24 h 使用抗真菌药者,以及 6 个月内服用抗生素或胃蛋白抑制剂者(例如雷尼替叮、奥美拉唑)。应用法国梅里埃真菌鉴定系统 Vitek-32 鉴定白色念珠菌,法国梅里埃 ATB-FUNGUS 药敏实验板确定实验室耐药或敏感。

1.2 实验分组 耐药组:5-氟胞嘧啶耐药,但

咪康唑、酮康唑、益康唑、制霉菌素和两性霉素 B 均敏感的菌株(8 株);敏感组:5-氟胞嘧啶和咪康唑、酮康唑、益康唑、制霉菌素及两性霉素 B 均敏感的菌株(8 株)。

1.3 随机引物的选择 参考文献^[1],根据扩增结果,即条带的有无、数量的多少、可重复性,筛选出引物 ERIC I (5'/CATGTAAGCTCCTGGGGATTACAC3'),ERIC II (5'/AAGTAAGTGACTGGGGGTGGAGCG3'),引物 III (5'/GTAA GCCCCT3')进入实验。

1.4 RAPD 和 RAP-PCR 参考文献^[1,2]方法。

1.5 扩增产物电泳分析 取 3 μ l 扩增产物,加上样缓冲液 5 μ l,8%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(300,2 h),AgNO₃ 染色,Na₂S₂O₃ 显色。胶片烘干,扫描、摄片并保存。

2 结 果

2.1 临床耐药菌株的 DNA 基因组多态性比较 16 株敏感与耐药菌株经 8%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,均出现 13 条条带,其中最大片段约 1 300 bp,条带分布呈现二联体形式,最小片段约 30 bp,在大部分菌株之间敏感菌株与耐药菌株条带分布无明显差异,见图 1。

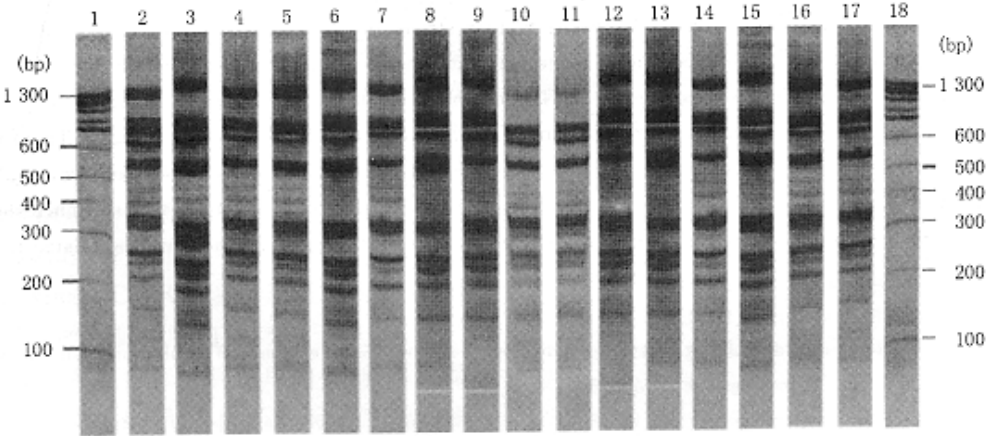


图 1 敏感菌株与耐药菌株的 DNA 多态性比较

Fig. 1 DNA random amplification polymorphy comparison between sensitive and resistant yeasts

1,18;marker 100 DNA ladder; resistant isolates:3,5,7,9,10,12,14,16; sensitive isolates:2,4,6,8,11,13,15,17

2.2 敏感菌株与耐药菌株基因组 RNA 表达的多态性比较 采用 RAP-PCR 扩增菌株 RNA 基因组指纹,经 8%的非变性聚丙烯酰胺

凝胶电泳分析,结果提示耐药菌株与敏感菌株的 DNA 基因组多态性相同,但菌株基因组的 RNA 表达多态性不同。敏感菌株与耐药菌株条

带数目有明显差异。差异片段为较大碱基位点,耐药菌株可有不同位点的条带增加,常见大片段的出现在1 300 bp 处、550 bp 处、200 bp 至 300 bp 之间,以及 100 bp 至 150 bp 之间也有

条带的增加现象,增加条带多为单体形式,二联体形式少见,一个菌株可有不同位点以及不同数目的条带增加。不同的耐药菌株的条带变异情况可以不同,见图 2。

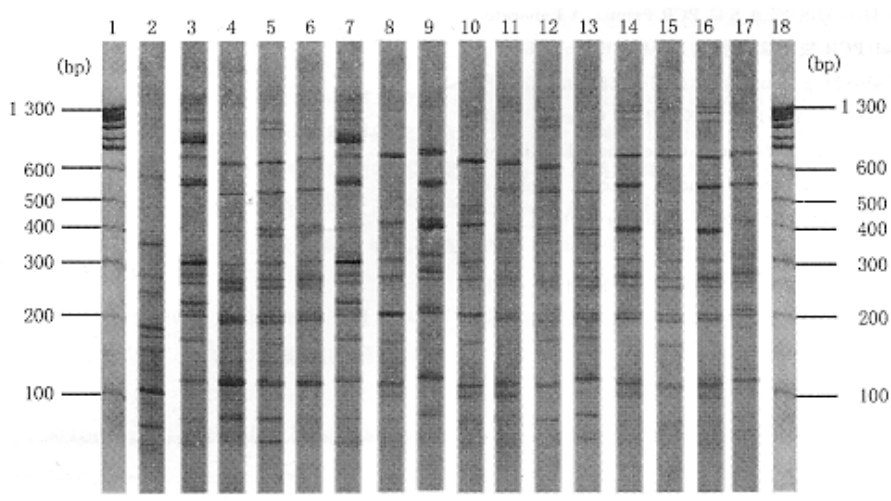


图 2 耐药与敏感菌株的 RNA 多态性比较

Fig. 2 RNA random amplification polymorphy comparison between resistant and sensitive yeasts

1, 18: marker 100 bp RNA ladder; resistant isolates: 3, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 16; sensitive isolates: 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17

3 讨 论

3.1 临床耐药菌株的 DNA 基因组与药敏结果不一致 已知真菌通常可以在菌丝和酵母两种形态之间进行表型转换,在临床上表现出耐药与敏感两种表型,对于念珠菌的耐药现象,通常用基因突变加以解释^[3]。本实验将临床诊断为耐药的病例进一步进行药敏实验,结果测定出耐药与敏感两种表型,经 RAPD 分析其 DNA 基因组的多态性结果一致。本实验结果提示多数临床耐药与敏感的白色念珠菌的 DNA 基因组一致,但在药敏实验中可表现为敏感或耐药。这可能由于菌株环境的改变(包括药物的作用、微生态环境的改变以及宿主免疫力的降低)影响了菌株致病的动力学过程,在药敏中表现出表型转换的特征。由于 DNA 基因组内部并未有突变基因的产生,所以产生的敏感或耐药表型可能只是一种对环境的适应表型。

3.2 药敏测定耐药与敏感菌株的基因组的 RNA 表达有差异 念珠菌具有表型转换的特

性,在临床上表现出可逆耐药,与治疗细菌感染相反,交替用药可以避免或减少白色念珠菌耐药株的产生。但对此产生的机理却知之甚少^[4]。从本实验结果看,念珠菌可逆耐药的机理极可能是 mRNA 表达的差异。推测在致病菌对抗真菌药物产生耐药前的短时间内,致病菌株产生敏感型 RNA 表达,临床上呈现敏感表型;临床复发耐药病例,可能是由于白色念珠菌长期处于 5-氟胞嘧啶的微生态环境中,菌株的 RNA 表达为耐药型,菌株产生耐药。本组部分临床耐药病例其病原菌在体外培养时敏感,这可能是耐药菌株在体外药敏实验中,由于培养环境因素的改变,菌株 RNA 表达发生改变,部分恢复敏感表型^[5]。本研究结果虽然显示了耐药菌株的 RNA 随机扩增多态性显著不同于敏感菌株,但对差异表达部分的基因则需要克隆测序等进一步研究,方能对 RNA 表达与耐药的关系作进一步的阐明。不过本实验结果仍然提示对复发或耐药病例交替用药可以增加药物的利用度^[6]。

References:

[1] TAKASUKA T, BAILY G, BIRCH M, et al. Variation in morphotype, karyotype and DNA type of fluconazole resistant candida albicans from an AIDS patient [J]. **J Infect**, 1998, 36: 57—62.

[2] CARL W D, GABRIELA S D. **PCR Primer: A Laboratory Manual (PCR 技术实验指南)** [M]. Beijing: Beijing Science Publishing House, 1998: 145—158. (in Chinese)

[3] WIRSCHING S, MICHEL S, KAHLER G, et al. Activation of the multiple drug resistance gene MDR1 in fluconazole-resistant, clinical candida albicans strains is caused by mutations in a trans-regulatory factor [J]. **J Bacteriol**, 2000, 182(2): 400—404.

[4] ALEX VAN BELKUM, WILLEM M, BEM E, et al.

Genotypic characterization of sequential candida albicans isolates from fluconazole-treated neutropenic patient [J]. **J Infect Dis**, 1994, 169: 1 062—1 070.

[5] LI D, BERNHHARDT J, CALDERONE R, et al. Temporal expression of the candida albicans genes CHE1 and CSSK1, adherence and morphogenesis in a model of reconstituted human esophageal epithelial [J]. **Infect Immun**, 2002, 70(3): 1 558—1 565.

[6] YANG X, TALIBI D, WEBER S, et al. Functional isolation of the candida albicans FCR3 gene encoding a bZip transcription factor homologous to saccharomyces cerevisiae Yap3p [J]. **Yeast**, 2001, 18 (13): 1 217—1 225.

[责任编辑 黄晓花]

(上接第 68 页)

[5] ITOH T, SEKI N, SUZUKI S, et al. Membrane hyperpolarization inhibits agonist-induced synthesis of inositol 1, 4, 5-trisphosphate in rabbit mesenteric artery [J]. **J Physiol**, 1992, 451: 307—328.

[6] CHA Yi-zhong (查益中). Diphasic regulatory effect of *Astragalus membranaceus* on blood pressure [J]. **Journal of Traditional Chinese Medicine (中医杂志)**, 2000, 41(6): 329. (in Chinese)

[7] SONG Dai-jun, GU guan-De, ZHAO Zhuan-you, et al (宋代军, 顾官德, 赵专友, 等). Effect of *Astragalus membranaceus* on blood pressure and hydroxyproline of spontaneously hypertensive rats [J]. **Acta Universitatis Medicinalis Secundae Shanghai (上海第二医科大学学报)**, 1989, 9 (2): 183—184. (in Chinese)

[8] LEI Zheng-yi, WANG Shuo-ren (雷正一, 王硕仁). Effect of *Astragalus membranaceus* on cardiovascular system [J]. **Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine (中国中西医结合杂志)**, 1993, 13(7): 443—444. (in Chinese)

[9] GUO Zhao-gui, XUE Shu-wu (郭兆贵, 许树梧). Effect of *Astragalus membranaceus* on peripheral blood vessel compared with γ -aminobutyric acid [J]. **Journal of Traditional Chinese Medicine (中医杂志)**,

1980, 21(5): 73—75. (in Chinese)

[10] XIE Fei, HE Si-ping (谢飞, 何思平). Progress in pharmacology of *Astragalus Membranaceus* [J]. **Yunnan Medicine (云南医药)**, 1994, 15(2): 157—159. (in Chinese)

[11] GAO Yu-qi, SUN Bing-yong (高钰琪, 孙秉庸). Calcium dynamics of vascular smooth muscle cell [J]. **Progress in Physiological Sciences (生理科学进展)**, 1990, 21 (4): 305—309. (in Chinese)

[12] WU Qi-xia, YU Ying-nian, LU Jian (吴其夏, 余应年, 卢建). **New Pathophysiology (新编病理生理学)** [M]. Beijing: Peking Union Medical College Press, 1999, 136—142. (in Chinese)

[13] PUTNEY J W. Receptor-regulated calcium entry [J]. **Pharmacol Ther**, 1990, 48(3): 427—434.

[14] REMBOLD C M. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle [J]. **Hypertension**, 1992, 20(2): 129—137.

[15] DAVARE M A, AVDONIN V, HALL D D, et al. A β_2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca^{2+} Channel $\text{Ca}_v1.2$ [J]. **Science**, 2001, 293 (5527): 98—101.

[责任编辑 黄晓花]