

阴道白假丝酵母菌的耐药性与MDR1基因表达关系研究*

谭皓妍,冯浩华,何艳屏 (广州市海珠区沙园街社区卫生服务中心,广州 510250)

摘要:目的 探讨白假丝酵母菌中MDR1基因表达水平与菌株对吡咯类药物敏感性下降的关系。方法 于2011年8月~2012年8月收集反复发作阴道炎患者白假丝酵母菌60株,用科玛嘉念珠菌显色培养基作菌种鉴定,纸片扩散法进行药敏试验;根据药敏结果把菌株分为4组菌株:全敏感组、氟康唑中度敏感或耐药组、酮康唑中度敏感或耐药组、咪康唑中度敏感或耐药组,每组随机选取12株菌株,运用荧光定量PCR技术检测菌株中MDR1基因的表达量,采用 t 检验方法把中度敏感或耐药组与敏感组的MDR1基因表达水平进行比较分析。结果 60株白假丝酵母菌中酮康唑中度敏感或耐药株有26株、氟康唑中度敏感或耐药株有12株、咪康唑中度敏感或耐药株有38株、全敏感株有22株;酮康唑中度敏感或耐药组、氟康唑中度敏感或耐药组、咪康唑中度敏感或耐药组和敏感组中MDR1基因相对表达量分别为 3.32 ± 4.46 , 2.27 ± 3.05 , 0.9 ± 0.81 和 0.41 ± 0.47 ;酮康唑、氟康唑、咪康唑的中度敏感或耐药组与敏感组比较, t 值分别为 -2.177 , -2.130 和 -2.094 ,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 MDR1基因的表达量与临床白假丝酵母菌对吡咯类药物的耐药性关系有待进一步研究。

关键词:MDR1基因;基因表达;白假丝酵母菌;吡咯类药物;耐药

中图分类号:R379.9;Q786 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2015)01-105-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.01.029

Research the Expression of MDR1 Genes in Vaginal *Candida Albicans* Resistance to Azole Agents

TAN Hao-yan, FENG Hao-hua, HE Yan-ping

(Shayuan Street Community Health Service of Haizhu District, Guangzhou 510250, China)

Abstract: Objective To investigate the expression levels of MDR1 gene from azole resistant strains in vaginal *Candida albicans*. Methods 60 strains of *Candida albicans* from recurrent vaginitis patients were collected and identified by CHROM agar from Aug. 2011 to Aug. 2012. The drug resistance was detected by disk diffusion method. According to the result of drug sensitivity test, the strains were divided into four groups: sensitive group moderately susceptible or resistant to fluconazole group moderately susceptible or resistant to detoconazole group and moderately susceptible or resistant to miconazole group. Each group was selected 12 strains randomly. The expression of the MDR1 gene in these 48 strains were detected by real-time RT-PCR and analysed the datas by t test statistics. Results There were 22 sensitive strains, 26 strains of moderately susceptible or resistant to detoconazole, 12 strains of moderately susceptible or resistant to fluconazole and 38 strains of moderately susceptible or resistant to miconazole in 60 strains of *Candida albicans*. The relative expression of MDR1 gene in sensitive group was 0.41 ± 0.47 , in moderately susceptible or resistant to detoconazole group fluconazole group and miconazole group were 3.32 ± 4.46 , 2.27 ± 3.05 and 0.9 ± 0.81 respectively. Compared with the sensitive group, t values of moderately susceptible or resistant to detoconazole group, fluconazole group and miconazole group were -2.177 , -2.130 and -2.094 . The expression level of MDR1 gene had no statistical significance between the sensitive strains and moderately susceptible or resistant strains ($P > 0.05$). Conclusion The relationship between MDR1 expression and the resistance to azole agents in vaginal *Candida albicans* requires further study.

Keywords:MDR1 gene; expression; *Candida albicans*; azole agents; drug resistance

白假丝酵母菌为育龄妇女下生殖道感染的主要病原体^[1]。吡咯类药物是治疗白假丝酵母菌感染的常用药^[2]。近年来,由于反复感染或持续感染白假丝酵母菌的患者菌株对吡咯类药物的敏感性下降,治疗反复发作阴道炎成为临床难题。白假丝酵母菌的主动外排系统是导致白假丝酵母菌多重

耐药的主要原因,主要易化超家族(MFS)中由MDR1基因编码的MDR1p蛋白为主动外排系统的转运蛋白之一。本文利用实时定量PCR方法检测从反复发作阴道炎患者中分离的白假丝酵母菌中的MDR1基因的表达情况,探讨MDR1基因的表达水平与白假丝酵母菌对各种吡咯类药物敏感

* 基金项目:广州市海珠区2011年科技计划项目(2011-QY-06)。

作者简介:谭皓妍(1977-),女,医学硕士,主管技师,从事医学临床检验的研究和工作,Tel:13660063242,E-mail:13660063242@163.com。

性下降的相关性,从而积累研究白假丝酵母菌耐药机制的分子生物学资料,为寻找、防治和开发治疗药物提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验菌株 收集于2011年8月~2012年8月在广州市海珠区沙园街社区卫生服务中心就诊的白假丝酵母菌持续感染或重复感染的患者菌株60株。

1.2 主要试剂和仪器 SGC真菌培养基和真菌药敏培养基购自法国梅里埃生物公司;氟康唑(FLU 15 μ g)、酮康唑(KET 15 μ g)和咪康唑(MCZ 10 μ g)药敏纸片购自丹麦Rosco公司;科玛嘉(CHROMagar)酵母菌显色培养基购自郑州博赛生物科技有限公司;RNAiso Plus, RNase-free水和RT Master Mix 购自日本TaKaRa公司;SGExcel GoldStar TaqMan Mixture(With ROX)购自生工生物工程股份有限公司,所有引物、探针合成均由上海生工生物技术有限公司完成。VITEK-2细菌鉴定仪产自法国生物梅里埃公司,7500实时荧光定量PCR仪,2-16PK高速冷冻离心机产自德国SIGMA公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株的分离鉴定:把患者的阴道分泌物接种于沙氏平板培养24 h,挑取直径为0.5~1.5 mm的光滑、湿润、凸起的白色小菌落涂片镜检,如为酵母菌者,把菌落接种在CHROMagar酵母菌显色平板上,35℃培养24 h,观察结果。选取显色培养基上淡绿色菌落,用Vitek-2全自动细菌鉴定仪进行菌种鉴定。

1.3.2 药敏试验:把收集到的60株白假丝酵母菌的菌株进行KB法药敏实验,35℃孵育24 h,量取药敏环直径。药敏抑菌环直径 ≥ 20 mm为敏感株;药敏抑菌环直径在12 mm~19 mm之间为中度敏感株;药敏抑菌环直径 ≤ 11 mm则视为耐药。

1.3.3 白假丝酵母菌总RNA的抽提和逆转录:根据药敏结果把菌株分为4组菌株:全敏感组、氟康唑中度敏感或耐药组、酮康唑中度敏感或耐药组、咪康唑中度敏感或耐药组。每组随机选取12株菌株进行继续实验。严格按照总RNA抽提试剂盒说明书对处于对数生长期的4组实验菌株的菌液进行总RNA提取,用逆转录试剂盒进行CDNA合成,所获得的CDNA存于-20℃冻存备用。

1.3.4 引物设计与合成:应用引物合成软件primer5.0自行设计MDR1引物及内参引物各一对,见表1。

1.3.5 把逆转录产物用MDR1和内参的引物分别进行PCR及电泳,以确认片段长度的大小,核实

此产物含所需目的基因。

表1 PCR和荧光定量PCR检测所用引物及探针序列

基 因	序列(5'-3')	长度(bp)
MDR1 探针	TGCTTCAGTGTCCATTATTGGTGC	27
MDR1 引物	F: TGCTGCTACTACTGCTTCTGG R: GATGAAACCAACACGGAAC	223
ACT1(内参)探针	TCAAGGTATCATGGTTGGTATGGGTCAA	28
ACT1(内参)引物	F: GCCGGTGACGACGCTCCAAGAGCTG R: CCGTGTTCAATTGGGTATCTCAAGGTC	157

1.3.6 逆转录产物的基因扩增:按SGExcel GoldStar TaqMan Mixture(With ROX)试剂盒操作说明进行反应体系配制,PCR条件为:预变性95℃10 min,变性95℃15 s,退火/延伸60℃1 min,40个循环。全过程由PCR扩增仪自动完成,系统软件监测并计算荧光阈值(cycle threshold, Ct)。

1.4 统计学分析 实时定量RT-PCR获得了每个基因的Ct值,通过与ACT1内参相比获得 ΔCt [$\Delta Ct = Ct_{(目的基因)} - Ct_{(ACT1)}$], ΔCt 值越小,相对基因表达量越高,反之则越低。用Ratio值表示基因相对表达水平,Ratio值 = $2^{-\Delta Ct}$,表示实验菌株与内参基因相比基因的表达情况。实时定量PCR 3次独立重复实验,数据采用SPSS19.0统计软件分析处理,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。把4组结果进行组间t检验,分别统计敏感组菌株MDR1基因表达量与各种吡咯类药物耐药组MDR1基因表达量相比有否差异。两组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学显著性意义。

2 结果

2.1 药物敏感试验结果 见表2。60株菌经鉴定均为白假丝酵母菌;药敏试验后,筛选出中度敏感株和耐药菌株38株。

表2 60株白假丝酵母菌药敏试验结果(株)

药 物	耐药	中度敏感	敏感
氟康唑(15 μ g)	2	10	48
酮康唑(15 μ g)	1	25	34
咪康唑(10 μ g)	32	6	22

2.2 PCR结果

2.2.1 逆转录产物经电泳后,凝胶成像结果为:MDR1长度约为223 kb, ACT1长度约为157 kb,大小与预期一致,核实此产物含所需目的基因。

2.2.2 MDR1表达水平测定:各组数据均为正态分布($P > 0.05$)。敏感组MDR1基因表达量与各组药物中度敏感株或耐药株组表达量相比均无统计学意义($P > 0.05$),统计结果见表3。

表3 白假丝酵母菌敏感组与中度敏感或耐药组的MDR1基因 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值比较($n=12$)

组别	$\bar{x} \pm s(2^{-\Delta\Delta Ct})$	t值	P值
敏感组	0.41±0.47		
酮康唑中度敏感或耐药组	3.32±4.46	-2.177	0.052
咪康唑中度敏感或耐药组	0.90±0.81	-2.130	0.057
氟康唑中度敏感或耐药组	2.27±3.05	-2.094	0.06

3 讨论 MFS家族是存在于真菌细胞膜上的外排泵,通常通过膜融合蛋白与外膜蛋白组成一个三联复合体,形成一个连续的通道,排除包括抗真菌药物在内的各种有毒化合物^[3],其中MDR1p蛋白以细胞膜两侧的质子梯度为能量来源,将细胞内的药物转运至细胞外,当MDR1基因过度表达,MDR1p蛋白增多,细胞内的药物浓度不断降低,导致细菌对抗真菌药物敏感性降低^[4]或耐药。MDR1基因的过度表达是白假丝酵母菌对吡咯类药物耐药的重要机制之一^[5~7]。

本文采用实时定量PCR方法检测反复发作阴道炎患者中分离的白假丝酵母菌MDR1基因的表达水平。统计分析结果显示,MDR1基因表达量水平在吡咯类药物的敏感株和中度敏感或耐药株中的差异均无统计学意义,提示MDR1基因表达量与菌株对吡咯类药物敏感性下降无关,邵俊国等^[8]报道,MDR1基因表达水平在氟康唑敏感株和耐药株中无统计学意义,Wirsching等^[9]报道,酮康唑与MDR1基因的过度表达无关,都与本文报道一致。但是,在对氟康唑耐药株研究中,国内外学者均有报道MDR1基因的表达水平与菌株对氟康唑耐药密切相关^[6,10],Wirsching等^[11]发现,氟康唑高耐药与MDR1基因的过度表达有关,MDR1耐药基因只有在药物的诱导下才出现高表达,其表达是反式作用因子调控所致。从本文药敏结果中,我们可看到,本文选取的菌株多为对氟康唑呈中度敏感,不是氟康唑高耐药株,可能未能诱导产生MDR1基因的高表达,导致在敏感株和中度敏感或耐药株中的MDR1基因表达量比较差异无统计学意义。MDR1基因是否只特异外排氟康唑,与其它吡咯类药物耐药不相关,还需继续搜集氟康唑高耐药菌株进行MDR1基因表达量检测来作进一步研究。

真菌的耐药机制复杂多样,除了与外排基因表达量有关外,也与ERG11基因的点突变^[12]、生物膜的形成等机制有关^[13],而且,宿主的免疫机能、有无易滋生感染、菌株的分布部位也影响菌株对药物的敏感程度,研究白假丝酵母菌耐药分子机制,尚待继续进行深入细致的研究工作。

参考文献:

- [1] 周晓玲,祝永佳,祝慧华. 1 003株阴道分泌物真菌培养与结果分析[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(34): 5673-5675.
Zhou XL, Zhu YJ, Zhu HH, et al. Fungal culture and result analysis of 1 003 vaginal discharge samples[J]. Maternal and Child Health Care of China, 2013, 28(34): 5673-5675.
- [2] Center for Disease Control & Prevention(2006). Sexually transmitted diseases treatment guidelines [J]. MMWR, 2006, 55(RP-11): 1-94.
- [3] TaNabe M, Szakonyi G, Brown KA, et al. The multi-drug resistance efflux complex, EmrAB from *Escherichia coli* forms a dimer in vitro[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 380(2): 338-342.
- [4] 麻志萍, 原永芳, 贾鑫明, 等. 基因芯片在白念珠菌耐药基因研究中的应用[J]. 第二军医大学学报, 2008, 29(2): 211-214.
Ma ZP, Yuan YF, Jia XM, et al. Application of gene chip technique in studying drug resistance genes in *Candida albicans* [J]. Academic Journal of Second Military Medical University, 2008, 29(2): 211-214.
- [5] Mandal A, Kumar A, Singh A, et al. A key structural domain of the *Candida albicans* Mdr1 protein [J]. Biochem J, 2012, 445(3): 313-322.
- [6] 方小龙, 资捷, 陈志芳, 等. 阴道白假丝酵母菌氟康唑耐药相关基因的表达[J]. 中国误诊学杂志, 2011, 11(31): 7619.
Fang XL, Zi J, Chen ZF, et al. Vaginal *Candida albicans* fluconazole resistance related gene expression [J]. Journal of China Misdiagnosis, 2011, 11(31): 7619.
- [7] Dunkel N, Blass J, Rogers PD, et al. Mutations in the multidrug resistance regulator MRR1, followed by loss of heterozygosity, are the main cause of MDR1 overexpress in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains[J]. Mol Microbiol, 2008, 69(4): 827-840.
- [8] 邵俊国, 魏媛媛, 张金艳, 等. 白念珠菌耐药基因CDR1, CDR2, MDR1表达与氟康唑耐药的相关性分析[J]. 重庆医学, 2014, 43(3): 270-272.
Shao JG, Wei YY, Zhang JY, et al. Analysis on correlation between *Candida albicans* clinical isolates resistance genes CDR1, CDR2, MDR1 expression with fluconazole resistance[J]. Chongqing Journal of Medicine, 2014, 43(3): 270-272.
- [9] Wirsching S, Moran GP, Sullivan DJ, et al. MDR1-mediated drug resistance in *Candida dubliniensis* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(12): 3416-3421.
- [10] Gao Y, Li H, Liu SY, et al. Synergistic effect of fluconazole and doxycycline against *Candida albicans* biofilms resulting from calcium (下转110页)

D-二聚体与 FDP 的相关性越好,当 D-二聚体 >5 mg/L FEU 时,D-二聚体与 FDP 的相关性最好,但是在 D-二聚体值 <5 mg/L FEU 时,D-二聚体与 FDP 的相关性则相对不佳,存在 D-二聚体明显上升而 FDP 上升不显著甚至正常的情况。另外,通过纵向比较,FDP 的阳性率基本随 D-二聚体含量的升高而升高,当 D-二聚体 >5 mg/L FEU 时,FDP 的阳性率可达 100%,但是在 D-二聚体结果落于 0.55~2 mg/L FEU 之间时,FDP 的阳性率反而较低,仅为 11.21%,与钟晓明等^[5]的研究结果基本相符。分析这两种情况出现的原因,可能是:①基于某些技术上的限制,使 FDP 的检出率不足,而 D-二聚体检测的灵敏度则较高^[6]所致;② 0.55~2 mg/L FEU 是否属于 D-二聚体检测的“灰区”,是否可能存在 D-二聚体结果假阳性的情况等还需要进一步探讨。

综上所述,与 Siemens DD Plus 试剂相比,使用 Siemens Innovance D-DIMER 试剂检测 D-二聚体值与 FDP 的相关性更为显著,灵敏度更高,能在疾病早期出现提示,对临床具有更好的指导价值。D-二聚体与 FDP 的联合检测在血栓性疾病、恶性肿瘤等的筛查与疗效监测中起重要作用^[7],选择合适的时机动态观察,可极大程度地了解病情的发展^[8],为有效干预提供依据^[9]。若将 D-二聚体与 FDP 两者结合,可提高检查的特异度和灵敏度^[10],同时,D-二聚体与 FDP 的检测在检验科简便、快速、无创^[11]、自动化易于操作等特点,值得推广使用。

参考文献:

- [1] Wells PS. Pulmonary embolism: a clinician's perspective[J]. Semin Nucl Med, 2008, 38(6): 404-411.
- [2] Vall der Bom JG, Bots ML, Haverkate F, et al. Activation products of the haemostatic system in coronary, cerebrovascular and peripheral arterial disease[J]. Thromb Haemost, 2001, 85(2): 234-239.
- [3] 董芍芍, 章圣泽, 叶玲丽. 维持性血液透析患者凝血因子Ⅺ活性及 D-二聚体的变化研究[J]. 中国全科医学, 2011, 14(11): 1208-1210.
- [4] Dong SS, Zhang SZ, Ye LL. Changes in activity of plasma Coagulation Factor Ⅺ and D-dimer in maintenance hemodialysis[J]. Chinese General Practice, 2011, 14(11): 1208-1210.
- [5] Nagaoka K, Sadamatsu K, Yamawaki T, et al. Fibrinogen/fibrin degradation products in acute aortic dissection[J]. Internal Medicine, 2010, 49(18): 1943-1947.
- [6] 钟晓明. D-二聚体和 FDP 测定在血栓性疾病方面的应用[J]. 按摩与康复医学, 2012, 3(8): 46-47.
- [7] Zhong XM. D-dimer and FDP measurement applications in thrombotic diseases[J]. Chinese Manipulation and Rehabilitation Medicine, 2012, 3(8): 46-47.
- [8] Ay C, Pabinger I. Tests predictive of thrombosis in cancer[J]. Thromb Res, 2010, 125(suppl 2): s12-s15.
- [9] 周立红, 刘泽霖. D-二聚体检测临床研究的近况[J]. 血栓与止血学, 2002, 8(3): 121-122.
- [10] Zhou LH, Liu ZL. Recent clinical studies of D-dimer testing[J]. Chinese Journal Thrombosis and Hemostasis, 2002, 8(3): 121-122.
- [11] Gambhir RP. Another nail in the coffin for role of D-dimer in diagnosis of postoperative deep vein thrombosis[J]. Ann R Coll Surg Engl, 2009, 91(4): 355.
- [12] 詹前美. D-二聚体、FDP 检测的临床意义[J]. 中国厂矿医学, 2006, 19(4): 362.
- [13] Zhan QM. The clinical significance of D-dimer and FDP detection[J]. Chinese Medicine of Factory and Mine, 2006, 19(4): 362.
- [14] 门剑龙, 任静. D-二聚体临床应用及标准化分析进展[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(8): 793-796.
- [15] Men JL, Ren J. The progress of D-dimer clinical application and standardized analysis[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2010, 33(8): 793-796.
- [16] Mauriello A, Sangiorgi G, Palmieri G, et al. Hyperfibrinogenemia is associated with specific histocytological composition and complications of atherosclerotic carotid plaques in patients affected by transient ischemic attacks[J]. Circulation, 2000, 101(7): 744-750.

收稿日期: 2014-09-23

修回日期: 2014-10-02

(上接 107 页) fluctuation and downregulation of fluconazole-inducible efflux pump gene overexpression[J]. J Med Microbiol, 2014, 63(Pt 7): 956-961.

- [11] Wirsching S, Michel S, Köhler 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]. Bacteriol, 2000, 182(2): 400-404.
- [12] 徐韞健, 谭皓妍, 李倩璐, 等. 白假丝酵母菌耐吡咯类药物 ERG11 基因分析[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(4): 36-39, 42.
- [13] Xu YJ, Tan HY, Li QJ, et al. Genetic analysis of ERG11 in *Candida albicans* resistance to azole agents[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(4): 36-39, 42.

米热尼沙·热米吐拉, 甄雅惠, 张路漫. 临床分离白色念珠菌的生物膜形成与耐药关系研究[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(3): 134-135.

- [13] Mirenisha · RMTL, Zhen YH, Zhang LM. The resistance and the biofilm formation in *Candida albicans* isolates[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(3): 134-135.

收稿日期: 2014-10-02

修回日期: 2014-11-29