

· 论 著 ·

# 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\*

邵俊国<sup>1</sup>, 魏媛媛<sup>1</sup>, 张金艳<sup>1△</sup>, 冯鑫<sup>1</sup>, 张洪涛<sup>2</sup>, 刘志广<sup>1</sup>, 李筱芳<sup>3</sup>

(1. 河北医科大学第四医院检验科, 石家庄 1050011; 2. 北京市结核病胸部肿瘤研究所中心实验室 101149; 3. 中国医学科学院北京协和医学院皮肤病研究所真菌科, 北京 100730)

**摘要:**目的 探讨对氟康唑耐药白念珠菌分离的耐药基因 CDR1、CDR2 和 MDR1 在敏感株和耐药株中表达水平。方法 从送检样本中分离并鉴定出白念珠菌, 选取其中 115 株采用微量稀释法测定对氟康唑耐药的白念珠菌最小抑菌浓度(MIC)值, 并采用 PCR 方法检测白念珠菌耐药基因在敏感株和耐药株中表达情况。结果 115 株白念珠菌对氟康唑的半数抑菌范围为 5 μg/mL, 90% 抑菌范围为 126 μg/mL; 其中 76 株敏感, 39 株耐药, 敏感率为 66.1%, 耐药率为 36.8%。CDR2 基因 ΔCT 值敏感株组为 9.33±3.21, 耐药株组为 7.49±2.54, 两组比较差异有统计学意义 ( $t=2.659, P<0.05$ ); CDR1 基因和 MDR1 基因的表达水平在敏感株和耐药株中比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。结论 白念珠菌耐药是个较为复杂的过程, 其中白念珠菌对氟康唑耐药与 CDR2 高表达有关, 与 CDR1 和 MDR1 表达无关。

**关键词:**念珠菌, 白色; 耐药基因; 氟康唑; 相关性

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.03.005

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)03-0270-03

## Analysis on correlation between *Candida albicans* clinical isolates resistance genes CDR1, CDR2, MDR1 expression with fluconazole resistance\*

Shao Junguo<sup>1</sup>, Wei Yuanyuan<sup>1</sup>, Zhang Jinyan<sup>1△</sup>, Feng Xin<sup>1</sup>, Zhang Hongtao<sup>2</sup>, Liu Zhiguang<sup>1</sup>, Li Xiaofang<sup>3</sup>

(1. Department of Laboratory, Fourth Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 1050011, China; 2. Central Laboratory, Beijing Municipal Research Institute of Tuberculosis and Thoracic Tumor, Beijing 101149, China; 3. Department of Fungi, Institute of Dermatology, Beijing Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China)

**Abstract:** Objective To explore the expression level of *Candida albicans* fluconazole resistance genes CDR1, CDR2 and MDR1 in susceptible and resistant strains. Methods *Candida albicans* was isolated from the detection samples and identified, 115 strains were selected and determined MIC of *Candida albicans* by the microdilution method. Then PCR was adopted to detect the expression level of *Candida albicans* resistance genes in susceptible and resistant strains. Results The half inhibitory range in 115 strains of *Candida albicans* to fluconazole was 5 μg/mL, 90% of antibacterial range was 126 μg/mL; among them, 76 strains were sensitive, 39 strains were resistant, the sensitivity rate was 66.1%, the resistant rate was 36.8%. The CDR2 gene ΔCT was 9.33±3.21 for the sensitive strains and 7.49±2.54 for the resistant strains, two groups had statistically significant difference ( $t=2.659, P<0.05$ ); the expression levels of CDR1 gene and MDR1 gene had no significant difference between the susceptible strains and the resistant strains ( $P>0.05$ ). Conclusion Drug resistance of *Candida albicans* is more complicated process, in which, its resistance to fluconazole is related with the high expression of CDR2 and has no relation with the expression of CDR1 and MDR1.

**Key words:** *Candida albicans*; drug resistance gene; fluconazole; relevance

近年来,随着治疗药物和方法不断增多,诸如激素、免疫抑制剂、抗菌药物以及放疗、化疗等,使得真菌的分布和种类发生变化,医院真菌感染发病率不断增加,严重感染时可造成血液和内脏器官感染,给患者的预后和生命安全带来很大的威胁。氟康唑因其不良作用小,生物利用度高,是真菌感染特别是白念珠菌感染的预防和治疗的的首选药物。但是由于氟康唑长期大剂量使用,其耐药性已经十分普遍,严重影响药物治疗效果。本文通过研究白念珠菌体外药敏试验和对白念珠菌 CDR1、CDR2、MDR1 耐药基因在耐药株和敏感株表达水平的差异分析,探讨耐药基因表达与氟康唑耐药的相关性,现报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集河北医科大学第四医院 2010 年 5 月至 2012 年 6 月各临床科室送检的尿液、痰液、血液、咽拭子和粪便标本,经念珠菌显色培养基鉴定为白念珠菌。选取 115 株白念珠菌采用微量稀释法对氟康唑的敏感性进行测定;选取药敏

实验证实的敏感株组和耐药株组各 35 株,采用 PCR 技术对比两组 CDR1、CDR2、MDR1 基因的表达情况。纳入标准:(1)均为本院检验科送检的样本;(2)经鉴定为白念珠菌;(3)所有操作均符合本院检验科操作标准。

### 1.2 方法

**1.2.1 白念珠菌对氟康唑最小抑菌浓度(MIC)值测定**采用微量稀释法<sup>[1]</sup> (1)将白念珠菌置于沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA 培养基)中活化后在 4℃ 条件下保存,备用。(2)取少量白念珠菌接种于 YEPD 培养液中,400 r/min 振荡培养,温度 28~30℃,活化 24 h,维持真菌在指数生长期后期。(3)在显微镜下使用血细胞计数板进行计数,调整浓度在  $2 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$  cfu/mL。(4)取 96 孔板,在每排的 1 号孔中加入 100 μL RPMI-1640 培养液作为空白对照,2~11 号孔加入浓度分别为 128.00、64.00、16.00、8.00、4.00、2.00、1.00、0.50、0.25 μg/

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81101203)。 作者简介:邵俊国(1963—),主管检验技师,本科,主要从事临床氟康唑耐药相关基因实验研究。 △ 通讯作者, Tel:13930188950; E-mail: sunnyjinyan@sohu.com。

mL 的氟康唑注射液,12 号孔作为阳性对照。(5)将药敏板培养 24 h 后,采用酶标仪测量各孔的 OD 值,并与阳性对照对比,其中 OD 值下降 80% 以上的浓度为 MIC 值。实验平行操作 2~3 次,当两次 MIC 值差一个浓度时,选取较高浓度作为 MIC 值。

**1.2.2 耐药基因的表达测定**<sup>[2]</sup> (1)总 RNA 的提取分离将 1.2.1 试验中处于指数生长后期的菌液离心,弃去上清液,无菌蒸馏水冲洗后用酵母菌总 RNA 抽提试剂盒提取白念珠菌总 RNA,再加入 1 U DNase I 温浴 2 h。(2)cDNA 合成取 1 μL RNA 于 PCR 管中,加入 1 μL RNase 抑制剂、5 μL 缓冲液、3 μL dNTP、30 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 3 μL、ddH<sub>2</sub>O 5.5 μL、随机引物 0.5 μL、逆转录酶 1 μL 组成 RT 反应体系,总体积 20 μL,置于 PCR 仪中,设定参数:30 ℃ 5 min,40 ℃ 10 min,98 ℃ 3 min,5 ℃ 4 min,结束反应后将产物于 -20 ℃ 条件下保存备用。(3)引物设计 18SrRNA 作为内参照的引物,上游为 5'-TCT TGT ACG GCA CAT ATC TCG T-3',下游为 5'-GTT TCG AGA GGA CCT TCA GTC-3',长度为 150 bp;CDR1 上游引物为 5'-CAA TCA TAT TTC GTC CGA TC-3';下游为 5'-CAT CGG CTC ATT TCC AGT AC-3',长度为 116 bp;CDR2 上游引物为 5'-TGA CCA GAT CTT ATT AGC A-3',下游引物为 5'-CCG TCC ATG TAG TCC CGT C-3',长度为 160 bp;MDR1 上游引物为 5'-CTC TCA TCG GGT TTC GCA TG-3';下游为 5'-AAT TGT GTG TTA GCT ACT AG-3',长度为 112 bp。(4)PCR 总反应体积 20 μL,含 ddH<sub>2</sub>O 8 μL,cDNA 2 μL,Taq 酶 8 μL,上下游引物均为 1 μL。PCR 中扩增和定量,参数设置为 95 ℃ 变性 30 s,90 ℃ 退火 1 min,70 ℃ 20 s,42 次循环。

**1.3 判断标准** 根据美国临床实验室标准化研究所(CLSI)标准<sup>[3]</sup>,敏感(S):MIC≤8 μg/mL,耐药(R):MIC≥64 μg/mL。采用 LightCycler 系统软件计算 CT 值,ΔCT 值=目的基因 CT 值-18SrRNA CT 值;其中ΔCT 值越小,相对基因表达量越高,反之则越低。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS19.0 统计学软件进行检验,计量资料均用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 *t* 检验,检验水准  $\alpha=0.05$ ,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 白念珠菌对氟康唑 MIC 测定结果** 115 株白念珠菌对氟康唑的半数抑菌范围为 5 μg/mL,90% 抑菌范围为 126 μg/mL;其中 76 株敏感,39 株耐药,敏感率为 66.1%,耐药率为 36.8%;对耐药菌株来源进行分析后发现,痰液的白念珠菌耐药率为 37.7%,尿液 22.2%,粪便 29.4%,咽拭子 36.8%,见表 1。

**表 1 115 株白念珠菌对氟康唑敏感性测定结果**

标本来源	株数(n)	敏感(S)	耐药(R)	敏感率(%)	耐药率(%)
痰液	61	38	23	62.3	37.7
尿液	18	14	4	77.8	22.2
粪便	17	12	5	70.6	29.4
咽拭子	19	12	7	63.2	36.8
总计	115	76	39	66.1	33.9

**2.2 耐药株组和敏感株组耐药基因ΔCT 值对比** 敏感株组 CDR1 基因ΔCT 值与耐药株比较差异无统计学意义( $t=0.725, P>0.05$ );敏感株组 CDR2 基因ΔCT 值明显高于耐药株组,两组比较差异有统计学意义( $t=2.659, P<0.05$ );敏感株组 MDR1 基因ΔCT 值与耐药株组比较差异无统计学意义( $t=0.805, P>0.05$ ),见表 2。

**表 2 耐药株组和敏感株组耐药基因ΔCT 值对比** ( $\bar{x} \pm s, n=35$ )

组别	ΔCT 值		
	CDR1	CDR2	MDR1
敏感株组	7.81±2.13	9.33±3.21	9.67±2.93
耐药株组	7.38±2.79	7.49±2.54	9.14±2.57
<i>t</i>	0.725	2.659	0.805
<i>P</i>	>0.05	<0.05	>0.05

**3 讨 论**

调查发现,约有 200 种真菌可以引起人体疾病。随着免疫抑制剂、激素和大量抗生素在临床的广泛使用,加之各种介入治疗不断增多,导致真菌感染的发病率逐年增加,其中白念珠菌感染最为多见<sup>[4]</sup>。白念珠菌感染后往往侵犯内脏器官、血液系统,给患者的治疗和预后带来极大的威胁。目前临床上治疗白念珠菌主要是三唑类抗真菌药,其主要通过对真菌细胞羊毛甾醇的去甲基反应,使真菌细胞膜完整性缺失,进而抑制真菌的繁殖和生长。氟康唑因生物利用度高、安全性好而成为临床上使用最广泛的三唑类抗真菌药,并且对真菌感染取得了满意疗效<sup>[5-6]</sup>。氟康唑与其他三唑类药物一样,对真菌的生长和繁殖起到抑制作用,但是对真菌无杀灭作用,因此在反复和长期给药过程中容易导致对氟康唑耐药菌株的出现。研究发现<sup>[7]</sup>,65%~75% 的真菌感染属于白念珠菌感染,其中 85% 以上的白念珠菌对氟康唑出现耐药性,甚至部分已经对两性霉素 B 产生耐药。因此需要对白念珠菌的耐药原因进行研究,为临床治疗提供指导。

白念珠菌的耐药机制主要有以下几个方面与耐药基因表达增加有关<sup>[8-15]</sup>,目前已经被发现的耐药基因有 CDR1、CDR2 和 MDR1,这 3 种基因高表达可以诱发白念珠菌产生耐药。目前对白念珠菌耐药机制的研究主要是通过同一表型严格配对基础上,然而尚元元等<sup>[10]</sup>研究发现,白念珠菌敏感株和耐药株的耐药机制无法解释非配对耐药株的耐药机制,因此需要对非配对耐药株和敏感株表达情况进行研究,分析其可能的机制。本研究发现,115 株白念珠菌中有 76 株敏感,39 株耐药,敏感率为 66.1%,耐药率为 36.8%;这说明白念珠菌对氟康唑的耐药情况已经相当严重,这与氟康唑的临床大量使用有关,这就提示在临床治疗中,需要结合实验室药敏检查,选用其他抗真菌药或者根据患者的具体情况进行综合治疗,降低因不合理用药引起的药物耐药发生率。对耐药株组和敏感株组耐药基因进行研究后发现,CDR1 基因和 MDR1 基因的表达水平在敏感株和耐药株中差异无统计学意义( $P>0.05$ ),CDR2 基因在耐药株中的表达明显高于敏感株( $P<0.05$ )。这一结果提示,耐药基因表达增加可以引起白念珠菌耐药,但是并非所有白念珠菌耐药株均会同时出现上述 3 种基因表达增加。这也说明白念珠菌的耐药不是由几个基因作用导致的,而是在多种因素不同水平下调节和控制作用实现的。

综上,导致白念珠菌耐药的原因较复杂,目前发现 CDR2 基因在耐药株中的表达明显高于敏感株,而 CDR1 基因和 MDR1 基因的表达水平在敏感株和耐药株中差异无统计学意义。因此需要进一步研究更多的耐药机制,为临床治疗提供科学的依据。

**参考文献:**

[1] 肖静,牛文钰,滕伟.聚酰胺一胺对白色念珠菌和牙龈卟啉单胞菌的抗菌性研究[J].中华口腔医学杂志,2011,46

- (1):94-98.
- [2] 邵宜波,沈继宗,李旭. 质粒介导喹诺酮类耐药基因新亚型 qnrB24 的克隆表达[J]. 中国感染与化疗杂志,2013,13(2):124-127.
- [3] Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al. Results from the Artemis DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion[J]. *J Clin Microbiol*,2010,48(4):1366-1377.
- [4] 龙军,兰萌,钟慧,等. 神经外科重症监护室白色念珠菌基因分型和耐药性研究[J]. 中华神经医学杂志,2009,8(2):194-196.
- [5] Saad A, Fadli M, Bouaziz M, et al. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol[J]. *Phytomedicine*,2010,17(13):1057-1060.
- [6] 王惠平,孔繁荣,王斌,等. 滚环扩增技术检测耐氟康唑白念珠菌 TAC1 点突变[J]. 中华皮肤科杂志,2010,43(8):529-533.
- [7] 董碧麟,李东升,段逸群,等. Dectin-1 内在化表达介导氧依赖性方式杀伤白色念珠菌[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2012,32(7):577-584.
- [8] Laforet L, Moreno I, Sánchez-Fresneda R, et al. Pga26 mediates filamentation and biofilm formation and is required for virulence in *Candida albicans*[J]. *FEMS Yeast Res*,2011,11(5):389-397.
- [9] 樊尚荣,刘小平,严冬霞,等. 外阴阴道念珠菌病的临床特征和抗真菌药物敏感性研究[J]. 中国全科医学,2010,13(27):3068-3070.
- [10] 尚元元,喻楠,贾伟,等. 2007~2008 年医院真菌感染病原菌分布与耐药性分析[J]. 中国皮肤性病学期刊,2010,24(1):35-37.
- [11] Hajari Taheri F, Seyedolmohadesin M, Bayat M, et al. The effect of *Candida albicans* systemic infection on matrix metalloproteinases in breast Cancer bearing BALB/c mice[J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*,2013,12(1):81-85.
- [12] Ji HX, Zou YL, Duan JJ, et al. The synthetic melanocortin (CKPV)2 exerts anti-fungal and anti-inflammatory effects against *Candida albicans* vaginitis via inducing macrophage M2 polarization[J]. *PLoS One*,2013,8(2):e56004.
- [13] Kazempour ZB, Yazdi MH, Rafii F, et al. Sub-inhibitory concentration of biogenic selenium nanoparticles lacks post antifungal effect for *Aspergillus niger* and *Candida albicans* and stimulates the growth of *Aspergillus niger* [J]. *Iran J Microbiol*,2013,5(1):81-85.
- [14] Chen YL, Lehman VN, Averette AF, et al. Posaconazole exhibits in vitro and in vivo synergistic antifungal activity with caspofungin or FK506 against *Candida albicans*[J]. *PLoS One*,2013,8(3):e57672.
- [15] Yazdanparast SA, Nezarati SS, Heshmati F, et al. Comparison of cell wall proteins in putative *Candida albicans* & *Candida dubliniensis* by using modified staining method & SDS-PAGE[J]. *Med J Islam Repub Iran*,2012,26(2):45-49.

(收稿日期:2013-08-17 修回日期:2013-09-30)

(上接第 269 页)

长等有密切关系,而纠正学生的不良用眼和行为习惯、减轻学业负担、促进户外活动和保证充足睡眠时间将有助于保护中小学生学习视力,降低视力低下患病率。

#### 参考文献:

- [1] 季成叶. 我国中小学生学习视力不良和疑似近视流行现状[J]. 中国学校卫生,2008,29(2):97-99.
- [2] 曹宜,廖孟. 视力低常的学龄前儿童屈光状态分析[J]. 重庆医学,2009,38(1):62-63.
- [3] 王悦,白真. 宁波市中小学生学习视力不良状况调查[J]. 宁波大学学报:理工版,2012,25(2):129-132.
- [4] 杨漾,洪扶园,彭宁宇,等. 上海市 7~22 岁学生学习视力状况及影响因素分析[J]. 中国学校卫生,2012,33(5):590-592.
- [5] 刘长俊,王静,郭怀兰,等. 中学生学习视力低下状况及其影响因素调查[J]. 现代预防医学,2010,37(16):3047-3048,3051.
- [6] 吕美霞,施倡元,鲁本麟,等. 武汉市重点中学学生学习视力低下影响因素分析[J]. 中华疾病控制杂志,2008,12(4):354-356.
- [7] 林国桢,陈清. 1991~2005 年广州市中小学生学习视力变化[J]. 中国预防医学杂志,2007,8(4):434-437.
- [8] 蒋伟蓉,黎逢保. 岳阳市城区高中毕业生学习视力与体质指数关系调查分析[J]. 吉林医学,2009,30(21):2663-2664.
- [9] Rose KA, Morgan IG, Smith W, et al. Myopia, lifestyle, and schooling in students of Chinese ethnicity in Singapore and Sydney[J]. *Arch Ophthalmol*,2008,126(4):527-530.
- [10] Yang RJ, Sheu JJ, Chen HS, et al. Morbidity at elementary school entry differs by sex and level of residence urbanization; a comparative cross-sectional study[J]. *BMC Public Health*,2007,7:358.
- [11] Lu Q, Zheng Y, Sun B, et al. A population-based study of visual impairment among pre-school children in Beijing: the Beijing study of visual impairment in children[J]. *Am J Ophthalmol*,2009,147(6):1075-1081.
- [12] 吕美霞,杨莉华,鲁本麟,等. 中小学生学习视力低下多种干预方法研究[J]. 中华疾病控制杂志,2010,14(9):878-881.
- [13] 张玉兰,胡喜梅,董冠生,等. 洛阳市中小学生学习视力低下变化规律及预防对策[J]. 中国预防医学杂志,2008,9(1):52-54.
- [14] He M, Zheng Y, Xiang F. Prevalence of myopia in urban and minichildren in mainland China[J]. *Optom Vis Sci*,2009,86(1):40-44.
- [15] Rose KA, Morgan IG, Ip J, et al. Outdoor activity reduces the prevalence of myopia in children[J]. *Ophthalmology*,2008,115(8):1279-1285.

(收稿日期:2013-08-15 修回日期:2013-10-25)