



## 研究报告

## 模拟失重对白假丝酵母菌增殖和毒性的影响

赵光显<sup>1</sup> 王佳平<sup>1</sup> 刘宇<sup>1</sup> 刘军莲<sup>1</sup> 李正超<sup>2</sup> 王言吉<sup>1</sup> 韩延平<sup>2</sup> 李勇枝<sup>\*1</sup><sup>1</sup> 中国航天员科研训练中心 北京 100094<sup>2</sup> 军事医学科学院微生物所病原微生物生物安全国家重点实验室 北京 100071

**摘要:**【背景】近年来研究发现,失重条件可对一些致病微生物的增殖和毒性产生影响,白假丝酵母菌(*Candida albicans*)是典型的条件性致病真菌,在太空环境和人体中普遍存在,研究失重条件下白假丝酵母菌的增殖和毒性意义重大。【目的】利用旋转细胞培养系统(Rotary cell culture system, RCCS)模拟失重环境对白假丝酵母菌进行连续传代培养,检测模拟失重环境对白假丝酵母菌增殖情况、毒性以及基因表达的变化。【方法】将白假丝酵母菌接种在旋转生物反应器(High aspect rotating vessel, HARV)中,利用旋转细胞培养系统连续传代培养 14 d,然后对菌株进行增殖速率测定、不同 pH 条件下增殖能力测定、生物膜相对形成能力测定和细胞毒性和动物毒力测定;利用转录组测序技术找出差异表达基因,结合性状分析模拟失重可能对白假丝酵母菌增殖和毒力的影响。【结果】与对照组相比,模拟失重组白假丝酵母菌对数期提前,增殖速率加快,在适宜 pH 条件下的增殖能力普遍提高,但其生物膜形成能力相对减弱,对 LoVo 细胞和小鼠的毒性减弱;转录组测序发现,模拟失重组共有 280 个基因表达差异达 1.5 倍以上( $P<0.05$ ),其中 248 个上调、32 个下调。差异基因经基因功能注释(Gene ontology, GO)和京都基因及基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析发现,相关胞膜形成及细胞分裂基因表达上调,生物膜形成、细胞黏附及共生粘连宿主基因表达下调。【结论】模拟失重环境可引起白假丝酵母菌增殖和毒性水平发生变化,相关改变可为研究失重环境对微生物的影响提供参考。

**关键词:** 模拟失重, 白假丝酵母菌, 增殖, 毒力

## Effects of simulated microgravity on proliferation and toxicity of *Candida albicans*

ZHAO Guang-Xian<sup>1</sup> WANG Jia-Ping<sup>1</sup> LIU Yu<sup>1</sup> LIU Jun-Lian<sup>1</sup> LI Zheng-Chao<sup>2</sup>  
WANG Yan-Ji<sup>1</sup> HAN Yan-Ping<sup>2</sup> LI Yong-Zhi<sup>\*1</sup><sup>1</sup> Astronaut Center of China, Beijing 100094, China<sup>2</sup> State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China

**Abstract:** [Background] Recent studies have found that microgravity conditions can affect the

**Foundation items:** National Science and Technology Major Projects for “Major New Drugs Innovation and Development” (2015ZX09J15102); “1226” Major Project (AWS16J018)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-10-66362380; E-mail: liyongzhi666@sina.com

**Received:** 24-12-2018; **Accepted:** 28-04-2019; **Published online:** 16-05-2019

**基金项目:** “重大新药创制”科技重大专项(2015ZX09J15102); 1226 工程卫生专业重大项目(AWS16J018)

**\*通信作者:** Tel: 010-66362380; E-mail: liyongzhi666@sina.com

**收稿日期:** 2018-12-24; **接受日期:** 2019-04-28; **网络首发日期:** 2019-05-16

proliferation and toxicity of some pathogenic microorganisms. *Candida albicans* is a typical conditional pathogenic fungus, which is ubiquitous in space environment and human body. It is of great significance to study the proliferation and toxicity of *C. albicans* under microgravity conditions. **[Objective]** Rotating cell culture system (RCCS) was used to simulate the microgravity environment for continuous subculture of *C. albicans*. The changes of proliferation, toxicity and gene expression of *C. albicans* in simulated microgravity environment were detected. **[Methods]** *C. albicans* were inoculated in high aspect rotating vessel (HARV) and cultured in RCCS for 14 days. After the culture completed, the proliferation rates of *C. albicans* were measured. The proliferation abilities were detected under different pH conditions, and the cytotoxicity and animal toxicity were determined. The differentially expressed genes were identified by RNA-seq. **[Results]** In the simulated microgravity group, the logarithmic phase of *C. albicans* was earlier and the proliferation rate was faster, the proliferation ability was generally improved under suitable pH conditions, but its relative biofilm formation and toxicity to LoVo cells and mice was weakened. RNA-seq revealed that 280 genes expressed differentially more than 1.5 times ( $P < 0.05$ ), of which 248 were up-regulated and 32 were down-regulated in simulated microgravity environment. The differential genes were enriched by GO and KEGG, and the gene expressions of cell membrane formation and cell division were up-regulated in simulated microgravity environment, while the gene expressions of biofilm, cell adhesion and symbiotic adhesion host were down-regulated. **[Conclusion]** Simulated microgravity environment can change the proliferation and toxicity of *C. albicans*, and the related changes can provide reference for studying on the influence of microgravity environment on microorganisms.

**Keywords:** Simulated microgravity, *Candida albicans*, Proliferation, Toxicity

随着载人航天技术的不断发展,人类驻足太空的时间越来越长,然而与此同时也有大量的微生物随人类带入太空<sup>[1]</sup>。航天员体内除携带正常菌群以外,也不可避免携带一些机会性致病菌。近年来研究发现失重环境可导致航天员免疫力降低<sup>[2-4]</sup>,也可使一些致病微生物增殖水平提高,毒性及生物膜形成能力增强<sup>[5-9]</sup>,增大航天员罹患感染性疾病的可能。白假丝酵母菌(*Candida albicans*)是存在于人体体表、口腔、胃肠道及外生殖器的常见机会性致病菌,常引起浅表皮肤病,在免疫缺陷的病人中也可引起深部真菌感染危及生命<sup>[10]</sup>。因此,研究失重环境对白假丝酵母菌生物学性状的影响意义重大。

由于太空搭载微生物实验成本高、机会少、难度较大,通常在开展太空微生物实验之前先行在地面进行模拟实验。旋转细胞培养系统(Rotary cell culture system, RCCS)是由美国国家航空航天局(National aeronautics and space administration, NASA)在 20 世纪 90 年代发明的模拟失重条件的细胞培养器<sup>[11]</sup>,由控制器和旋转生物反应器(High

aspect rotating vessel, HARV)组成,控制器控制转向和转速,HARV 装入培养基进行细胞培养。此外,HARV 背面也有半透膜可与外界进行气体交换<sup>[12]</sup>。RCCS 目前已广泛用于模拟失重条件下的微生物培养<sup>[13]</sup>。本实验通过 RCCS 系统模拟失重环境培养白假丝酵母菌,然后对其进行增殖和毒力的研究,并结合转录组测序结果研究白假丝酵母菌基因表达与增殖和毒力之间的关系,以期为空间环境机会性致病菌的防控提供技术依据和理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

白假丝酵母菌[*Candida albicans*, CMCC(F) 98001]购自中国医学细菌保藏管理中心。

#### 1.1.2 培养基

沙氏液体培养基(g/L: 葡萄糖 20.0, 动物组织胃蛋白酶水解物 5.0, 胰酪胨 5.0), 购于 Oxoid 公司,用于白假丝酵母菌液体培养。沙氏葡萄糖琼脂培养基购于青岛日水生物技术有限公司,用于白假丝酵母菌固体培养。

### 1.1.3 实验用细胞和动物

细胞毒性实验使用大肠上皮癌细胞(LoVo 细胞), 来源于军事医学科学院微生物所; 动物毒性实验使用 7–8 周龄 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠, 购自北京维通利华公司, 许可证号: SCXK (京) 2016-0006。

### 1.1.4 主要试剂和仪器

RNA 提取试剂盒、SYBR Premix *ExTaq* 荧光定量试剂盒, TaKaRa 公司; 逆转录试剂盒, Thermo 公司; DMEM-F12 培养液, Oxoid 公司; 胎牛血清, Gibco 公司。

旋转细胞培养系统, Synthecon 公司; 实时细胞分析系统, Aceabio 公司; 全自动微生物分析鉴定仪, Merieux 公司。

### 1.2 菌株的模拟失重培养

白假丝酵母菌的模拟失重培养与 Wang 等<sup>[14]</sup>培养模拟失重肺炎克雷伯菌的方法相近, 利用 RCCS 创造失重条件培养菌株。首先取白假丝酵母菌甘油种 1  $\mu$ L 接种于沙氏葡萄糖琼脂培养基 30 °C 培养过夜活化, 活化后将菌在 30 °C、150 r/min 条件下振荡培养至对数生长期( $OD_{600}=1.0$ ); 其次将活化到对数生长期的菌液按 1:100 体积加入到 50 mL 旋转生物反应器中 30 °C 恒温培养, 生物反应器垂直放置时菌液呈悬浮培养, 为模拟失重组; 生物反应器水平放置时菌液受重力因素影响, 此为对照组; 每培养 24 h 进行一次传代, 重复上述步骤, 连续传代培养 14 d。

### 1.3 增殖速率测定

将培养 2 周的模拟失重和对照组白假丝酵母菌甘油种 1  $\mu$ L 接种于沙氏葡萄糖平板 30 °C 培养过夜, 活化后将菌接入灭菌沙氏液体培养基, 调整两组菌液浓度为  $5 \times 10^6$  个/mL; 取上述菌液各 500  $\mu$ L 加入到含 200 mL 沙氏液体培养基的锥形瓶中, 30 °C、150 r/min 振荡培养; 每间隔一定时间即时取菌液测定  $OD_{600}$  数值并记录, 最后根据时间以及菌液的光密度绘制生长曲线图。

### 1.4 不同 pH 条件下生存规律测定

30 °C、150 r/min 条件下培养白假丝酵母菌至对数生长中期( $OD_{600}=1.0$ )后, 按 1:100 体积加入不同 pH 值(2.0–11.0)的沙氏葡萄糖液体培养基中, 在 30 °C、250 r/min 继续培养, 当菌液生长至对数生长中期时停止培养, 立即测定不同 pH 值生长条件下的  $OD_{600}$  值。

### 1.5 菌落皱褶形成实验

取模拟失重及对照组甘油菌种 5  $\mu$ L 点接于沙氏葡萄糖平板表面, 30 °C 恒温培养 5 d, 拍正面照, 观察菌落皱褶形成情况。

### 1.6 生物膜相对形成量测定

将模拟失重和对照组甘油种以 1:100 体积接入装有 2 mL 沙氏液体培养基的试管, 30 °C、150 r/min 培养 36 h 至平台期, 培养完毕后摇匀菌液, 全部倒出测定菌液  $OD_{600}$  值, 倒出菌液的试管用无菌去离子水温和洗涤 2 次, 洗掉多余菌液, 然后将试管置干燥箱内于 60 °C 放置烘干, 加 5 mL 0.1% 结晶紫溶液充分染色 15 min; 用去离子水洗去多余结晶紫, 加 5 mL 二甲基亚砜室温放置 1 h, 期间吹打混匀, 使管壁染色的结晶紫充分洗脱, 测量溶液  $OD_{570}$  值, 计算生物膜相对形成量 =  $(OD_{570}/OD_{600}) \times 100$ 。

### 1.7 LoVo 细胞毒性实验

LoVo 细胞毒性实时分析实验采用艾森生物公司的实时细胞分析系统 (Real-time cellular analysis, RTCA) 完成, 该系统目前已广泛应用于微生物对细胞的毒性检测<sup>[15]</sup>。首先将 LoVo 细胞接种于含 1/10 胎牛血清的 DMEM-F12 培养液中, 在 5% CO<sub>2</sub> 孵箱 37 °C 培养; 然后加胰酶液 2.5 mL 消化 1 min, 待贴壁 LoVo 细胞松动后倒掉液体, 再加入 5 mL 细胞培养液, 混匀后 1 000 r/min 离心 5 min, 再加入细胞培养液重悬, 调整重悬后细胞浓度为  $2 \times 10^5$  个/mL; 用上述细胞液将检测仪调零后再在每孔中加入 300  $\mu$ L 细胞培养液, 放于 CO<sub>2</sub> 孵箱 37 °C 培养 18 h; 最后拿出细胞培养板, 每孔吸出 100  $\mu$ L

细胞培养液, 加浓度为  $4.5 \times 10^7$  CFU/mL 模拟失重组和对照组对数中期菌液 100  $\mu$ L 于各组细胞孔, 无菌 100  $\mu$ L 细胞培养液加入空白对照组, 启动检测仪继续在 CO<sub>2</sub> 孵箱中 37  $^{\circ}$ C 孵育 10 h, 观察 LoVo 细胞贴壁生长情况。

1.8 动物毒性实验

将白假丝酵母菌过夜活化后培养至对数中期, 4 000 r/min 离心 5 min, PBS 洗涤菌体沉淀 3 次, 重悬菌悬液浓度为  $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$  CFU/mL, 选取 BALB/c 小鼠进行腹腔注射实验。设置空白组小鼠 10 只, 每只注射生理盐水 500  $\mu$ L; 80 只小鼠随机平均分成两组, 一组为模拟失重组, 一组为对照组, 每个浓度梯度 10 只小鼠。然后用配好的不同浓度梯度的菌悬液依次腹腔注射小鼠 500  $\mu$ L, 连续观察小鼠 14 d, 记录死亡数做生存曲线。

1.9 转录组测序分析

培养白假丝酵母菌至对数中期( $OD_{600}=1.0$ ), 按 RNA 试剂盒说明提取白假丝酵母菌总 RNA, 用带有多聚胸腺嘧啶(OligodT)的磁珠富集有 PolyA 尾巴的 mRNA, 用 DNA 探针杂交法去除 rRNA; 然后用 RNase H 选择性消化 DNA/RNA 杂交链, 再用 DNase I 消化掉 DNA 探针, 纯化后即得到所需 RNA; 再用打断 Buffer 把获得的 RNA 片段化, 随机六聚体引物进行反转录, 合成 cDNA 二链形成双链 DNA; 之后把合成的双链 DNA 末端补平并 5'端磷酸化, 3'端形成突出一个“A”的粘末端, 再连接一个 3'端有凸出“T”的鼓泡状的接头; 连接产物通过特异的引物进行 PCR 扩增, PCR 产物热变性成单链, 再用一段桥式引物将单链 DNA 环化得到单链环状 DNA 文库; 最后采用 Illumina HiSeq 测序平台的双端测序模式对多个样本进行高通量测序, 对表达差异的基因进行 GO 和 KEGG 富集分析, 确定其相关代谢通路和表达功能体系。

1.10 实时定量 PCR

提取白假丝酵母菌 RNA 后逆转录进行扩增。

20  $\mu$ L 的 PCR 体系: 逆转录合成的 cDNA 模板 (10 mg/L)取 2  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, SYBR Green Mixture 10  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ L。PCR 条件: 94  $^{\circ}$ C 1 min; 55  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min。使用转录组测序表达量相同的 *EFB1* 基因作为管家基因, 选取的基因和引物如表 1 所示。

2 结果与分析

2.1 增殖速率测定结果

测定增殖速率时, 初始迟滞期时每 2 h 测定一次  $OD_{600}$  值, 待生长至对数生长期每 1 h 测一次  $OD_{600}$  值。结果显示(图 1), 与对照组相比, 模拟失重组的迟滞期缩短, 在 8 h 左右提前进入对数期, 在对数期的增殖速率明显加快。

表 1 实时定量 PCR 引物  
Table 1 Primers used for quantitative real-time PCR analysis

Primers name	Primers sequence (5'→3')
<i>EFB1-F</i>	ATTGAACGAATTCTTGGCTGAC
<i>EFB1-R</i>	CATCTTCTTCAACAGCAGCTTG
<i>ALS1-F</i>	AAGCTTGATGTTAAATCAGTTG
<i>ALS1-R</i>	TAAAGAGTGTTCTAGATTGTCC
<i>ECE1-F</i>	ACGGTTAGAAGTCATTTGTAGG
<i>ECE1-R</i>	AGCATTAGCAACAAGATTAAGG
<i>DLH1-F</i>	CAAAACAGCAACCTTCAACTCITCAGC
<i>DLH1-R</i>	AACGTAGCATACATAGACACAGACG

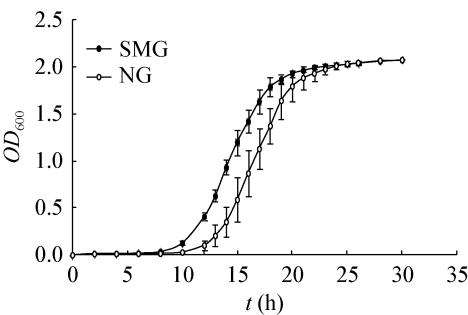


图 1 生长曲线

Figure 1 Growth curve

注: SMG: 模拟失重组; NG: 对照组。下同。

Note: SMG: Simulated microgravity; NG: Normal gravity. The same below.

## 2.2 不同 pH 条件下生存规律实验结果

实验测定了白假丝酵母菌在 pH 2.0–11.0 的沙氏液体培养基中生长至对数生长期的  $OD_{600}$  值, 结果表明模拟失重组白假丝酵母菌在 pH 4.0–8.0 环境下较对照组增殖速率要明显提高(图 2)。

## 2.3 菌落皱褶和生物膜相对形成量实验结果

模拟失重组白假丝酵母菌的细胞皱褶形成能力和生物膜相对形成能力较对照组明显减弱(图 3)。

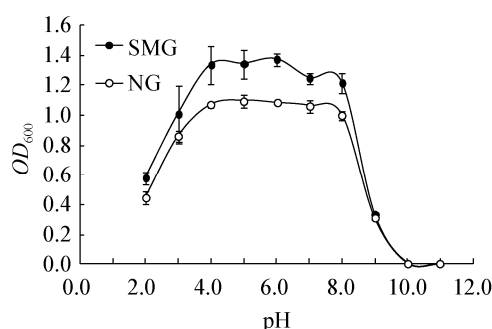


图 2 在不同 pH 条件下的生存曲线

Figure 2 Survival curve under different pH conditions

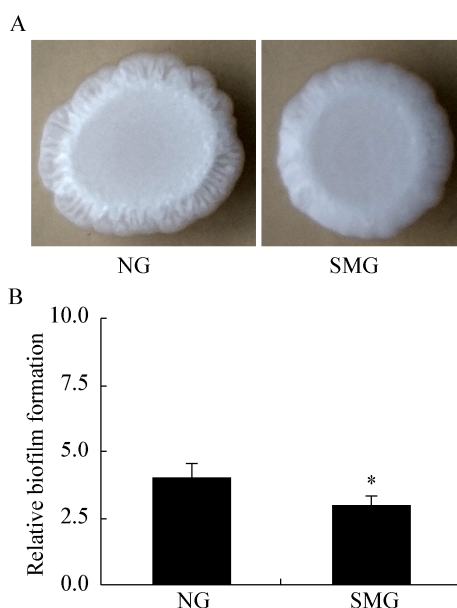


图 3 生物膜形成能力比较

Figure 3 Comparison of biofilm formation

注: A: 模拟失重组(SMG)和对照组(NG)菌落皱褶形成能力比较; B: 模拟失重组(SMG)和对照组(NG)生物膜相对形成能力比较。\*:  $P < 0.05$  (与对照组相比)。

Note: A: Comparison of colony morphology between SMG and NG; B: Relative biofilm formation between SMG and NG. \*:  $P < 0.05$  (compared with NG).

## 2.4 LoVo 细胞毒性实验结果

模拟失重组和对照组细胞培养孔在第 18 h 时以 1:75 数量比加入白假丝酵母菌, 空白组未加菌。结果(图 4)显示: 3 组标准化细胞指数(Normalized cell index, NCI)都在加液后出现了短暂下降又上升, 这可能是加菌后挪动细胞培养板所致。空白组因为未加菌侵染, 其 NCI 一直平稳上升; 对照组侵染 LoVo 细胞后最先出现 NCI 的下降, 而且下降幅度最大。模拟失重组 NCI 下降出现于对照组之后, 且其下降幅度小于对照组。这些结果表明模拟失重组白假丝酵母菌对 LoVo 细胞毒性小于对照组白假丝酵母菌。

## 2.5 小鼠毒性实验结果

小鼠毒性实验结果显示, 空白组小鼠在注射后的 14 d 内无一死亡; 注射菌液浓度为  $10^6$  CFU/mL 和  $10^7$  CFU/mL 时, 模拟失重组和对照组小鼠在 14 d 内全部存活, 无一死亡; 注射菌液浓度为  $10^9$  CFU/mL 时, 模拟失重组和水平对照组在 24 h 内全部死亡;

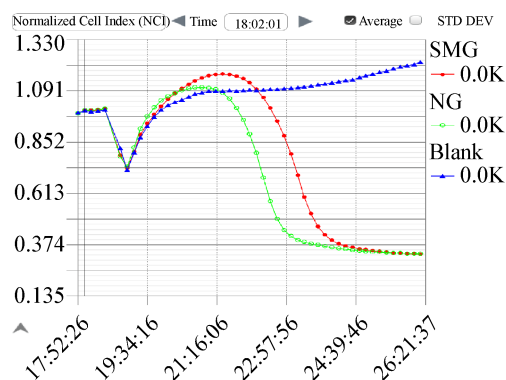


图 4 LoVo 细胞 NCI 实时曲线图

Figure 4 NCI real-time curve of LoVo cells

注: 红线代表模拟失重组(SMG), 绿线代表对照组(NG), 蓝线代表空白组(Blank); 横坐标为时间, 纵坐标为标准化细胞指数, 标准化细胞指数(Normalized cell index, NCI)可反映 LoVo 细胞贴壁生长的情况, NCI 指数越高, LoVo 细胞贴壁生长越好, 菌液对 LoVo 细胞的毒性就越弱。

Note: As shown in the figure, red line represents SMG, green line represents NG, blue line represents the blank group (Blank); the abscissa is time and the ordinate is normalized cell index (NCI), NCI can reflect the growth of LoVo cell adherence. The higher NCI index, the better growth of LoVo cell adherence, and the weaker toxicity of microorganisms to LoVo cell.

注射菌液浓度为  $10^8$  CFU/mL 时, 模拟失重组刚注射后有 1 只小鼠异常死亡, 分析时将此数据剔除, 此梯度下的小鼠生存曲线(图 5)显示, 模拟失重组 14 d 生存率为 77.8%, 对照组 14 d 生存率为 40%, 相对而言模拟失重组小鼠生存率较高, 说明模拟失重组白假丝酵母菌毒性较低, 结果经 Kaplan-Meier 生存分析检验差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

## 2.6 转录组测序及 GO 基因注释富集分析结果

通过对模拟失重组和对照组转录组测序发现。模拟失重组有  $4.229 \times 10^7$  个测序读段, 其中比对到基因的比例是 73.27%, 水平对照组有  $4.262 \times 10^7$  个测序读段, 其中比对到基因的比例是 73.57%。进一步分析这两组之间的差异基因显示, 模拟失重组与水平对照组相比, 在所有 6 057 个分析的基因中, 一共有 280 个基因表达差异达 1.5 倍以上( $P<0.05$ ), 其中 248 个上调、32 个下调(图 6), 模拟失重组基因表达整体呈上调趋势。差异表达基因经过 GO 注释功能分类(图 7), 在 280 个差异表达基因中, 有 235 个基因在 3 个类别的功能体系中富集, 分别是: 生物过程(Biological process)类 67 个基因分别对应到 9 条通路中; 分子功能(Molecular function)类 40 个基因对应到 7 条通路中; 细胞成分(Cellular component)类 128 个基因对应到 5 个细

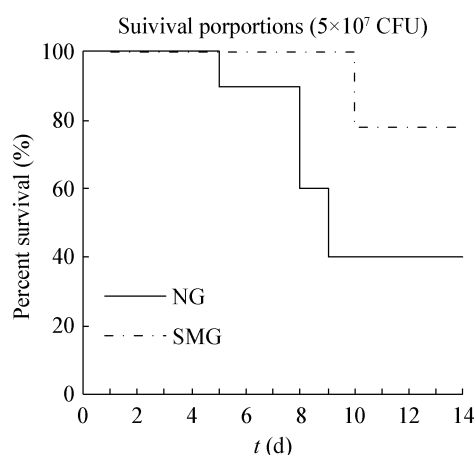


图 5 白假丝酵母菌攻毒后小鼠生存曲线  
Figure 5 Survival curve of mice infected with *Candida albicans*

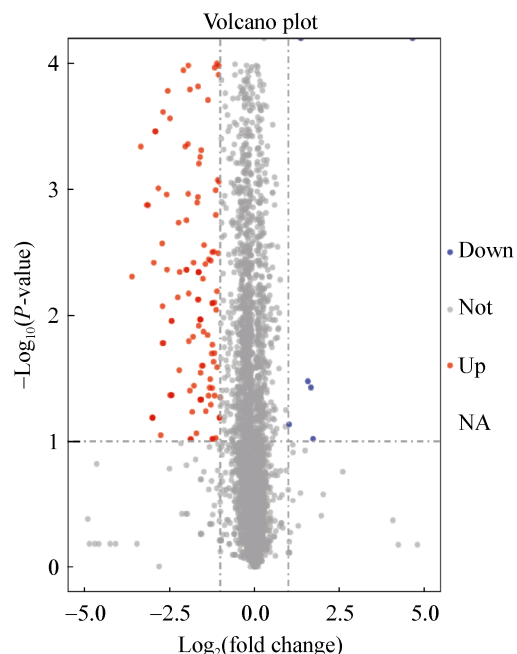


图 6 模拟失重诱导白假丝酵母菌基因差异表达结果  
Figure 6 Differential gene expression of *Candida albicans* between SMG and NG

注: 火山图显示的是白假丝酵母菌基因表达变化倍数的对数图, 与对照组相比, 左边红色的点代表模拟失重组白假丝酵母菌显著上调的表达基因, 右边蓝色的点代表其显著下调的表达基因( $P<0.05$ ), 从图中可以看出模拟失重环境下白假丝酵母菌整体基因表达呈上调趋势。

Note: The volcano plots show logarithmic maps of multiple gene expression changes between SMG and NG, Red dots on the left side represent significantly up-regulated gene expression and blue dots on the right side represent significantly down-regulated gene expression in SMG compared to NG ( $P<0.05$ ), it can be seen from the figure that the overall gene expression of *Candida albicans* showed an upward trend in SMG.

胞组分中。模拟失重组与对照组相比, 其中 GO 富集表达上调有膜组成相关基因(*GIT1*、*FRE10*、*JEN1*、*CFL11*、*NAG4*、*YOR1* 等), 浆膜相关基因(*FRE10*、*JEN1*、*PGA39*、*PGA22*、*PGA46*、*HST6* 等), 跨膜转运和膜转运相关基因(*FGR2*、*HXT5*、*NAG4*、*DAL52*、*QDR1*), 氧化还原酶活性相关基因(*FRE10*、*CFL11*、*CFL5*、*OYE23*、*YMX6*)等, 其中基因表达上调程度最大的基因有 *ALA1*、*PGA39*、*MRV3*、*PGA22* 和 *TAR1*, 这些基因与白假丝酵母菌的蛋白质合成代谢密切相关, 这些基因表达水平的高度提高结合 GO 富集上调的大多



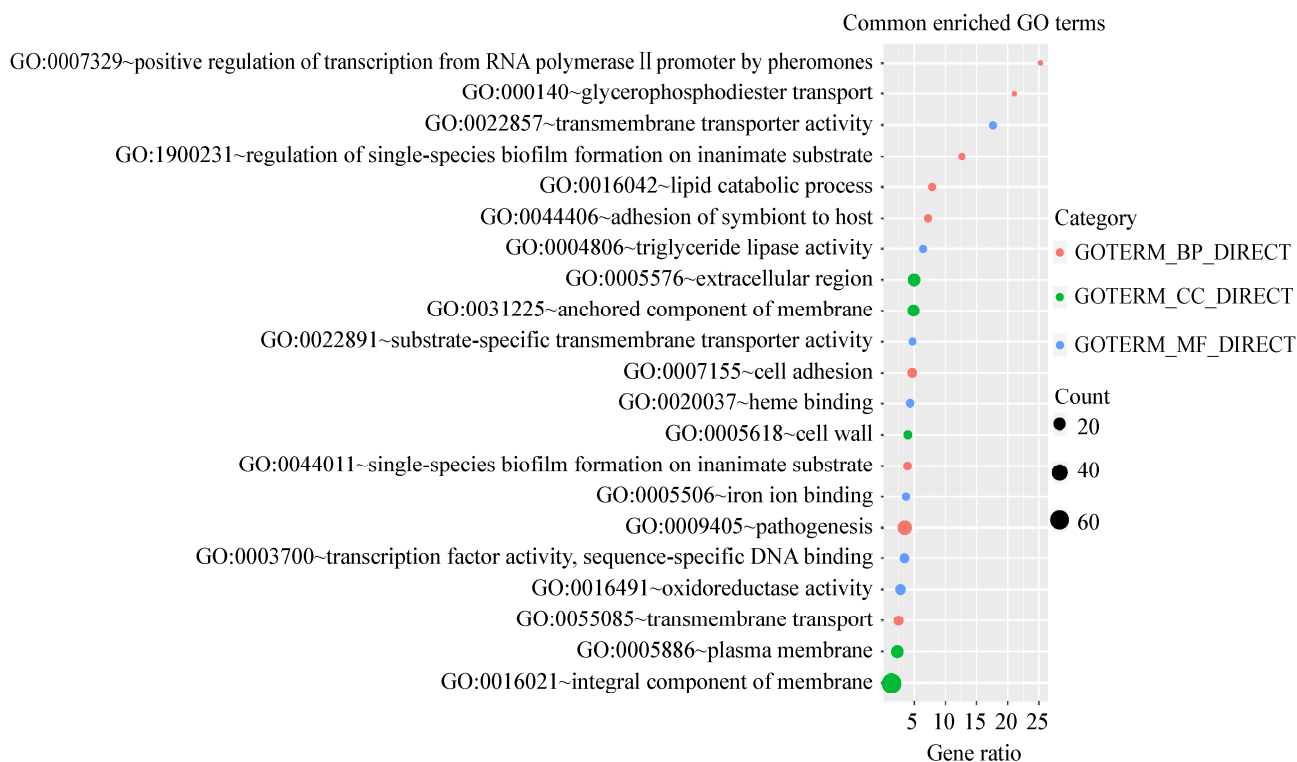


图7 GO显著富集气泡图

Figure 7 GO enrichment bubble diagram

注：图中蓝色气泡代表分子功能，绿色气泡代表细胞组分，红色气泡代表生物学过程。

Note: Blue bubbles represent molecular functions, green bubbles represent cellular components, and red bubbles represent biological processes.

数基因可印证搭载组白假丝酵母菌的增殖水平提高的结论。GO富集下调的基因主要有病原菌相关基因(*TEC1*、*ALS1*、*PRA1*、*IHD1*、*ECE1*、*RHR2*)，单物种生物膜形成相关基因(*TEC1*、*ECE1*、*RHR2*、*TRY6*)，细胞黏附相关基因(*TEC1*、*ALS1*、*TRY6*)，共生粘连宿主相关基因(*TEC1*、*ALS1*、*PRA1*)，胞外区相关基因(*ALS1*、*OP4*、*PRA1*、*IHD1*、*ECE1*)等。其中基因表达下调程度最大的基因有 *TRY6*、*PRA1*、*ECE1*、*RHR2* 和 *ALS1*，下调的这些基因与白假丝酵母菌的生物膜形成和毒性密切相关。

## 2.7 KEGG 差异表达基因通路富集分析

对差异表达基因进行 KEGG 富集分析，结果(图8)显示12个基因分布在3条通路中。苯丙氨酸代谢通路有3个基因(*CAALFM\_C404360WA*、

*CAALFM\_C206350CA*、*ARO10*)，MAPK 通路有4个基因(*STE2*、*TEC1*、*FAR1*、*CPH1*)，细胞有丝分裂有5个基因(*CAALFM\_CR09940WA*、*CAALFM\_C101180CA*、*CAALFM\_C104690CA*、*CAALFM\_CR04250WA*、*DLH1*)。其中细胞有丝分裂通路的5个基因和苯丙氨酸代谢通路的3个基因在模拟失重组全部表达上调。

## 2.8 转录组结果验证

应用实时定量 PCR 的方法选取了白假丝酵母菌不同通路的3个基因进行验证，分别是细胞分裂通路的 *DLH1* 基因，单物种生物膜形成通路的 *ECE1* 基因，共生粘连宿主通路的 *ALS1* 基因。验证结果(图9)显示，3个基因的相对表达水平改变趋势与转录组测序的结果相一致，证明转录组测序的实验结果可信。

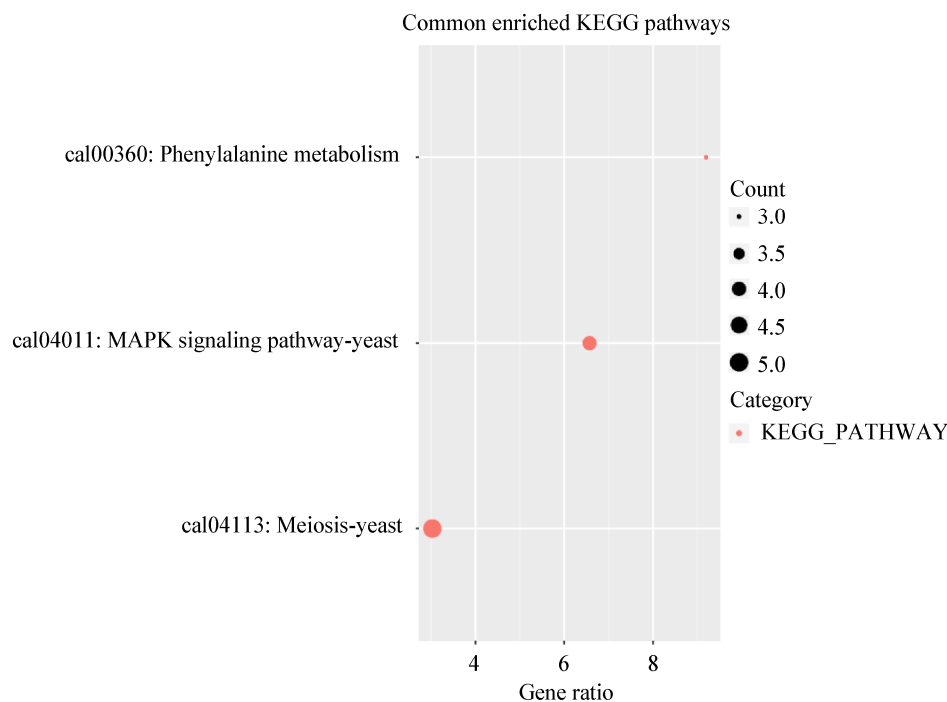


图 8 KEGG 基因富集分析  
Figure 8 KEGG enrichment analysis

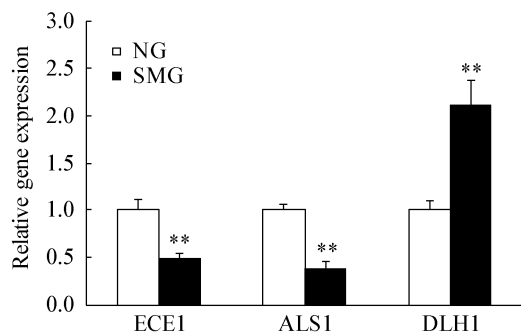


图 9 转录组测序结果验证  
Figure 9 Validation of RNA-Seq  
注: 黑色柱状图代表模拟失重组(SMG), 白色柱状图代表对照组(NG), 纵坐标代表基因相对表达量. \*\*:  $P<0.01$  (与对照组相比).  
Note: The black histogram represents SMG, the white histogram represents NG, and the ordinate represents the relative gene expression. \*\*:  $P<0.01$  (compared with NG).

### 3 讨论与结论

空间微生物安全一直是载人航天领域中一个不容忽视的重大课题, 在过去的 30 年中航天员浅表真菌感染并不少见。空间站及飞船舱内医疗条件

有限, 如出现侵袭性真菌感染则很有可能迫使飞行任务中止, 严重者甚至危及航天员生命。因此, 研究真菌在空间环境下的增殖水平和毒力有着极为重要的意义。

本实验通过旋转细胞培养系统模拟失重环境对白假丝酵母菌进行培养发现, 模拟失重环境下白假丝酵母菌在对数期增殖速率明显加快, 增殖水平的结果符合早前 RCCS 模拟失重环境下白假丝酵母菌增殖速率加快的相关研究结论<sup>[16-17]</sup>。出现上述结果的原因可能是模拟失重组白假丝酵母菌经 RCCS 系统培养时菌细胞呈悬浮培养状态, 有充足的营养进行代谢增殖, 而对照组由于有重力作用, 菌细胞基本呈沉淀生长, 菌体下层不能汲取充足营养导致其相关代谢通路增殖水平下调所致。转录组测序分析发现模拟失重组白假丝酵母菌有关蛋白质形成和苯丙氨酸通路基因表达上调, 结合细胞分裂的相关基因全部表达上调, 这些结果可更好地印证模拟失重组白假丝酵母菌增殖速率加快这一结论。



有研究表明,白假丝酵母菌菌落皱褶的形成与皱褶处菌丝相细胞数量的相对比例呈正相关<sup>[18-19]</sup>,而菌丝相细胞也与白假丝酵母菌生物膜形成能力呈正相关<sup>[20-21]</sup>。本研究发现模拟失重组白假丝酵母菌与对照组相比菌落皱褶形成能力下降,生物膜形成能力也下降,这可能与模拟失重组白假丝酵母菌菌丝相细胞数量的相对减少有关。此外,模拟失重组白假丝酵母菌的毒性无论是对细胞,还是对小鼠都出现了减弱的趋势。通过转录组测序发现,模拟失重组白假丝酵母菌在生物膜形成基因、病原菌相关基因、细胞黏附基因、共生粘连宿主基因表达也均呈下调趋势,基因检测结果与模拟失重组白假丝酵母菌生物膜形成能力和毒性下降的结论一致,Hammond等<sup>[22]</sup>也曾发现太空失重状态下白假丝酵母菌的毒力出现减弱,本课题组推测这种毒性下降一方面可能与培养条件有关,本实验水平旋转的对照组白假丝酵母菌在HARV中大部分黏附于容器底部呈沉淀生长,这样的生长条件可能有助于其黏附能力和生物膜形成能力的增强,而模拟失重组白假丝酵母菌基因基本呈悬浮生长,细胞间的相互作用和黏附性本身不如对照组强;另一方面可能由培养过程中白假丝酵母菌细胞中与毒性和生物膜形成相关的某些表型变异所致,譬如菌落皱褶实验显示模拟失重组较对照组的皱褶明显减少,表明白假丝酵母菌的某些表型可能发生了变异。

白假丝酵母菌虽然是常见的浅表感染真菌,但近期有研究表明酵母态的白假丝酵母菌细胞可轻易地通过血脑屏障引起大脑无症状感染,造成小鼠短暂记忆丧失<sup>[23]</sup>,而且真菌性脑脓肿最常见的病因也是白假丝酵母菌感染<sup>[24]</sup>。这些研究说明对白假丝酵母菌毒力和致病性的研究还有待进一步探索。本研究虽然得出同等菌量下模拟失重条件的白假丝酵母菌相对生物膜形成能力减弱,对LoVo细胞的毒力减弱,对小鼠的致死能力减弱,但尚不能认定模拟失重状态下的白假丝酵母菌对人体的危害性减小。相反地,鉴于其增殖能力显

著增强,所以该菌对航天员的威胁不容忽视。相信在失重状态下对白假丝酵母菌的进一步深入研究,特别是对失重状态下深部白假丝酵母菌感染的进一步研究,对于航天员在轨作业的健康保障具有非常重要的借鉴意义。

## REFERENCES

- [1] Yamaguchi N, Roberts M, Castro S, et al. Microbial monitoring of crewed habitats in space—current status and future perspectives[J]. *Microbes and Environments*, 2014, 29(3): 250-260
- [2] Sonnenfeld G, Butel JS, Shearer WT. Effects of the space flight environment on the immune system[J]. *Reviews on Environmental Health*, 2003, 18(1): 1-18
- [3] Guéguinou N, Huin-Schohn C, Bascove M, et al. Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth's orbit?[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2009, 86(5): 1027-1038
- [4] Crucian B, Stowe RP, Mehta S, et al. Alterations in adaptive immunity persist during long-duration spaceflight[J]. *Npj Microgravity*, 2015, 1: 15013
- [5] Wilson JW, Ott CM, Quick L, et al. Media ion composition controls regulatory and virulence response of *Salmonella* in spaceflight[J]. *PLoS One*, 2008, 3(12): e3923
- [6] Rosenzweig JA, Abogunde O, Thomas K, et al. Spaceflight and modeled microgravity effects on microbial growth and virulence[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(4): 885-891
- [7] Vukanti R, Model MA, Leff LG. Effect of modeled reduced gravity conditions on bacterial morphology and physiology[J]. *BMC Microbiology*, 2012, 12(1): 4
- [8] Kim W, Tengra FK, Young Z, et al. Spaceflight promotes biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62437
- [9] Knox BP, Blachowicz A, Palmer JM, et al. Characterization of *Aspergillus fumigatus* isolates from air and surfaces of the International Space Station[J]. *Mosphere*, 2016, 1(5): e00227-16
- [10] Dadar M, Tiwari R, Karthik K, et al. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control—an update[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 117: 128-138
- [11] Wang D, Liu W, Han B, et al. The Bioreactor: a powerful tool for large-scale culture of animal cells[J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2005, 6(5): 397-403
- [12] Nauman EA, Ott CM, Sander E, et al. Novel quantitative biosystem for modeling physiological fluid shear stress on cells[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(3): 699-705
- [13] Huang B, Li DG, Huang Y, et al. Effects of spaceflight and simulated microgravity on microbial growth and secondary metabolism[J]. *Military Medical Research*, 2018, 5(1): 18
- [14] Wang HL, Yan YF, Rong D, et al. Increased biofilm formation ability in *Klebsiella pneumoniae* after short-term exposure to a simulated microgravity environment[J]. *Microbiologyopen*, 2016, 5(5): 793-801
- [15] Huang B, Jin DZ, Zhang J, et al. Real-time cellular analysis coupled with a specimen enrichment accurately detects and

- quantifies *Clostridium difficile* toxins in stool[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2014, 52(4): 1105-1111
- [16] Wang JP, Wang J, Wu YL, et al. Effects of simulated microgravity with clinostat on pathogenicity of *Candida albicans*[J]. Space Medicine & Medical Engineering, 2012, 25(3): 162-167 (in Chinese)  
王佳平, 王静, 吴元亮, 等. 回转器模拟微重力对白色念珠菌致病性的影响[J]. 航天医学与医学工程, 2012, 25(3): 162-167
- [17] Jiang WJ, Xu BX, Yi Y, et al. Effects of simulated microgravity by RCCS on the biological features of *Candida albicans*[J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2014, 7(7): 3781-3790
- [18] Martinez JP, Gil ML, Casanova M, et al. Wall mannoproteins in cells from colonial phenotypic variants of *Candida albicans*[J]. Journal of General Microbiology, 1990, 136(12): 2421-2432
- [19] Slutsky B, Buffo J, Soll DR. High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*[J]. Science, 1985, 230(4726): 666-669
- [20] Mitchell AP. Microbiology: Fungus produces a toxic surprise[J]. Nature, 2016, 532(7597): 41-42
- [21] Gow NAR, van de Veerdonk FL, Brown AJP, et al. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization[J]. Nature Reviews Microbiology, 2012, 10(2): 112-122
- [22] Hammond TG, Stodieck L, Birdsall HH, et al. Effects of microgravity on the virulence of *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Astrobiology, 2013, 13(11): 1081-1090
- [23] Wu YF, Du SQ, Johnson JL, et al. Microglia and amyloid precursor protein coordinate control of transient *Candida* cerebritis with memory deficits[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 58
- [24] Pendlebury WW, Perl DP, Munoz DG. Multiple microabscesses in the central nervous system: a clinicopathologic study[J]. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 1989, 48(3): 290-300

## 征 稿 简 则

### 1 刊物简介与刊登内容

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。本刊为月刊,中文核心期刊,中国科技核心期刊, CSCD 核心期刊,曾获国家优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,并在新闻出版署设立的“中国期刊方阵”中被列为“双效”期刊。从 2012 年至今,本刊以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”,并入选 300 种“中国精品科技期刊”,成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

本刊刊登内容包括:工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展,以及微生物学教学研究改革等。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、专栏等。

### 2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>, 点击作者投稿区,第一次投稿请先注册,获得用户名和密码,然后依照提示提交稿件,详见主页“投稿须知”。

### 3 写作要求

3.1 来稿要求论点明确,数据可靠,简明通顺,重点突出。

3.2 英文摘要写作注意事项:(1) 建议使用第一人称,以此可区分研究结果是引用文献还是作者所得;(2) 建议用主动语态,被动语态表达拖拉模糊,尽量不用,这样可以避免长句,以求简单清晰;(3) 建议使用过去时态,要求语法正确,句子通顺;(4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致,但可比中文摘要更详尽,写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再投稿;(5) 摘要中不要使用缩写语,除非是人人皆知的,如:DNA、ATP 等;(6) 在英文摘要中不要使用中文字体标点符号。

3.3 关键词:应明确、具体,一些模糊、笼统的词语最好不用,如“基因”“表达”等。

3.4 脚注(正文首页下方):

Foundation items:

\*Corresponding author: Tel: 86-; E-mail:

Received: 01-01-20xx; Accepted: 01-03-20xx; Published online: 31-03-20xx

基金项目: 基金项目(编号)

\*通信作者: Tel: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 网络首发日期: 20xx-03-31

(下转 p.3075)