

## *CCH1* 或 *MIDI* 基因缺失对白念珠菌药物耐受性及致病性的影响

王慧<sup>1,2\*</sup>, 芦广庆<sup>1\*</sup>, 杨宝鹏<sup>1</sup>, 王帆<sup>1</sup>, 喻其林<sup>1</sup>, 徐宁<sup>1</sup>, 程欣欣<sup>1</sup>, 邢来君<sup>1</sup>, 李明春<sup>1</sup>

1 南开大学微生物学系 分子微生物学与技术教育部重点实验室, 天津 300071

2 农业部环境保护科研监测所, 天津 300191

王慧, 芦广庆, 杨宝鹏, 等. *CCH1* 或 *MIDI* 基因缺失对白念珠菌药物耐受性及致病性的影响. 生物工程学报, 2012, 28(6): 726-736.

Wang H, Lu GQ, Yang BP, et al. Effect of *CCH1* or *MIDI* gene disruption on drug tolerance and pathogenesis of *Candida albicans*. Chin J Biotech, 2012, 28(6): 726-736.

**摘要:** *CCH1* 和 *MIDI* 基因编码的钙闸门是外源钙进入细胞内的重要通道,  $\text{Ca}^{2+}$  作为细胞内重要的第 2 信使分子, 其浓度的升高可激活相应的途径参与各种细胞反应过程。该研究将利用钙通路 *CCH1* 和 *MIDI* 基因的单缺失菌株, 并构建其相应的回补菌株, 研究 *CCH1* 或 *MIDI* 基因缺失后对白念珠菌药物耐受性和致病性的影响作用。通过药物平板敏感性试验和微量液基稀释法比较不同菌株对唑类药物敏感性的变化, 进一步添加钙通道阻滞剂和钙离子螯合剂来分析钙离子浓度变化对药物作用的影响, 结果发现 *CCH1* 或 *MIDI* 基因的缺失明显对氟康唑和伊曲康唑表现出敏感性, 且药物作用受到钙离子浓度变化的调节。最后建立小鼠感染模型分析不同菌株的毒力变化差异, 确定 *CCH1* 或 *MIDI* 基因的缺失显著减弱了白念珠菌的致病性。

**关键词:** 白念珠菌, *CCH1*, *MIDI*, 药物耐受性, 致病性

**Received:** November 17, 2011; **Accepted:** January 16, 2012

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 81171541, 31070126), Natural Science Foundation of Tianjin (No. 10JCYBJC09700), National Innovative Experiment Project to University Students (No. 101005524).

\*These authors contributed equally to this study.

**Corresponding author:** Mingchun Li. Tel: +86-22-23508506; Fax: +86-22-23508800; E-mail: nklimingchun@yahoo.com.cn

国家自然科学基金 (Nos. 81171541, 31070126), 天津市自然科学基金 (No. 10JCYBJC09700), 国家大学生创新性实验计划 (No. 101005524) 资助。

## Effect of *CCH1* or *MID1* gene disruption on drug tolerance and pathogenesis of *Candida albicans*

Hui Wang<sup>1,2\*</sup>, Guangqing Lu<sup>1\*</sup>, Baopeng Yang<sup>1</sup>, Fan Wang<sup>1</sup>, Qilin Yu<sup>1</sup>, Ning Xu<sup>1</sup>, Xinxin Cheng<sup>1</sup>, Laijun Xing<sup>1</sup>, and Mingchun Li<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071, China

<sup>2</sup> Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, China

**Abstract:** The calcium gate encoded by *CCH1* and *MID1* genes is the main channel for external calcium absorption. As one of the important secondary messengers, the elevation of calcium concentration could activate some pathways to take part in various cell processes. In this study, we used *CCH1* and *MID1* mutant strains and also constructed their complementary strains to study the effect of drug tolerance and virulence of *Candida albicans* after *CCH1* or *MID1* deletion. By drug plate sensitivity assay and the broth microdilution method, we compared the changes between different strains. Moreover, we added calcium channel blocker and inhibitors to analyze the effect of calcium concentration on drug action. After the deletion of *CCH1* or *MID1* gene, the strain exhibited an obvious sensitivity to FLUC and ITRA, and the drug action was regulated by the calcium concentration. In a mouse model of intravenous infection, we found that attenuated virulence of *cch1* $\Delta/\Delta$  or *mid1* $\Delta/\Delta$  strain is specifically due to a loss of *CCH1* or *MID1* gene.

**Keywords:** *Candida albicans*, *CCH1*, *MID1*, drug tolerance, pathogenesis

白念珠菌 *Candida albicans* 是医院获得性真菌病的主要感染源之一,也是深部真菌感染的首要病原菌,引起的致死率可达 38%~49%<sup>[1-2]</sup>。临床上,在白念珠菌感染的治疗过程中,凸显的严重问题就是菌株对各类药物产生的抗药性,尤其是对唑类药物<sup>[3]</sup>。在光滑念珠菌 *Candida glabrata* 和酿酒酵母中,对唑类药物的耐受性都是受到  $Ca^{2+}$  信号调控的<sup>[4-5]</sup>,当暴露于抗真菌药物下时,细胞膜的稳定性受到干扰,导致胞内  $Ca^{2+}$  浓度上升<sup>[6]</sup>。

钙细胞存活 (Calcium cell survival, CCS)<sup>[7]</sup> 途径是 Bonilla 等首次在酿酒酵母中发现的一个钙信号转导途径,通过 Cch1-Mid1 钙通道引发  $Ca^{2+}$  内流,并借助钙信号的传递,激活钙调神经磷酸酶 (Calcineurin, CaN) 及其下游转录因子 Crz1p 来介导细胞参与多种外界压力下的存活。

通常情况下, Cch1 和 Mid1 组成蛋白复合体<sup>[8]</sup>, Cch1 是核心,作为复合体的催化亚基,而 Mid1 作为调节亚基辅助 Cch1 完成钙通道复合体的功能,二者缺一不可。在酿酒酵母中,内质网压力能够通过 Mpk1 途径激活 Cch1-Mid1 钙离子通道,引起胞内  $Ca^{2+}$  浓度的上升,变化的  $Ca^{2+}$  与 CaM 结合,进而激活 CaN<sup>[9]</sup>。因此, Cch1 和 Mid1 对 CaN 的激活具有调控作用,之后借助胞内  $Ca^{2+}$  的转运体,降低胞内的  $Ca^{2+}$  水平,同时也调控着这些胞内钙泵的活性。

CCS 途径中的 CaN 参与抗真菌药物的耐受性<sup>[10]</sup>,其催化亚基 Cna1 或调节亚基 Cnb1 任何一个的缺失都会对抗真菌药物表现出强烈的敏感性,同时对白念珠菌菌株毒力也具有减弱的作用,有研究表明,对唑类药物例如氟康唑 FLUC

呈现耐受性的菌株往往具有更强的致病性<sup>[11]</sup>,可见白念珠菌的药物耐受性与致病性之间有密切的关系。研究发现,作用于 CaN 的免疫抑制剂环孢菌素 (Cyclosporin A, CsA) 或他克莫司 (FK506) 与氟康唑 (FLUC) 的联合使用具有杀灭真菌的作用,而 FLUC 的单独使用仅仅具有抑制真菌的作用<sup>[12]</sup>。CCS 途径对于真菌在唑类药物压力下的存活发挥着重要作用,缺少 CCS 途径的酵母在仅仅能抑制细胞生长的唑类药物浓度下就死亡了<sup>[13]</sup>,CCS 途径中其他成员或是尚未鉴定出来的新成员也有可能参与到药物耐受性中。是否 Cch1-Mid1 也参与白念珠菌的药物耐受性?我们将利用微量液基稀释法和药物平板敏感性试验进行研究,并进一步通过建立小鼠系统感染模型的方法研究 *CCH1* 或 *MID1* 基因的缺失

对菌株毒力的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒和引物

实验使用的菌株和质粒见表 1,引物见表 2。

### 1.2 主要试剂

CIAP 碱性磷酸酶、各种限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶等购自宝生物大连有限责任公司; RPMI1640 培养基粉末购自 GBCO 公司; 5-氟乳清酸 (5-FOA) 购自北京鼎国生物技术有限责任公司; 氟康唑 (FLUC)、伊曲康唑 (ITRA) 等唑类药物购自 Sigma 公司; 盐酸维拉帕米 (Vpi)、盐酸特比萘芬 (TER) 等药物购自中国药品生物制品检定所; 其余有机试剂和药品均为国产分析纯,所有引物均由北京奥科公司合成。

表 1 本实验使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains/plasmids	Genotype	Reference and sources
DAY1	<i>ure3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 arg4::hisG/arg4::hisG</i>	<i>his1::hisG/his1::hisG</i> From Dr. Dana Davis
NKC73	<i>cch1::ARG4/cch1::URA3</i>	Conserved in the lab <sup>[14]</sup>
NKC68	<i>mid1::ARG4/mid1::URA3</i>	
NKC61	<i>cch1::ARG4/cch1::dpl200</i>	
NKC60	<i>mid1::ARG4/mid1::dpl200</i>	This work
NKC53	<i>cch1::ARG4/cch1::dpl200</i> pCR4- <i>CCH1</i>	This work
NKC55	<i>mid1::ARG4/mid1::dpl200</i> pCR4- <i>MID1</i>	This work
NKC43	azole-resistant clinical isolate of <i>Candida albicans</i>	Conserved in the lab
NKC46	azole-sensitive isolate of <i>Candida albicans</i>	Conserved in the lab
NKC52	ATCC22019, quality control strain	Conserved in the lab
pCR4	Expression plasmid, URA3 <sup>+</sup> , Amp <sup>r</sup>	Donated by Dr.L.H.Jiang
pCR4- <i>CCH1</i>	For <i>CCH1</i> gene complementary	This work
pCR4- <i>MID1</i>	For <i>MID1</i> gene complementary	This work

表 2 本实验所用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'-3')	Restriction enzyme
CCH1-5RC	CCCGGGGctgcagCCTCTGCCAATCTTGCTTTG	<i>Pst</i> I
CCH1-3RC	CCCGGGGctgcagTTGCTGCCACTTGTTCCTCA	<i>Pst</i> I
MIDI-5RC	CCCGGGggtaccTAGCTCGAGAAATCACAGG	<i>Kpn</i> I
MIDI-3RC	CCCGGGggtaccTCTTCAAGGCTATCAGGACG	<i>Bam</i> H I
CCH1-RC1	GGTGAATTCCCCCTTCGAAA	
CCH1-RC2	ACTGAACGACCGATTTGCCT	
MIDI-RC1	CCACCACCAACAATGATACC	
MIDI-RC2	TCGAGGTATAGTAACGGCAC	
CCH1-5det	TTGGCTATTCCTTTTTTTAA	
CCH1-3det	CAATACAACCATGGCTTCTG	
MIDI-5det	TATCCAGTAGCCACTCTCC	
MIDI-3det	GCGTGTCCCCAAGAACATAA	

### 1.3 培养基

白念珠菌培养使用的所有培养基 (SC-ura 除外) 均添加终浓度为 80 mg/L 的尿苷。YPD 培养基: 1% 酵母浸出粉, 2% 蛋白胨, 2% 葡萄糖。SC 培养基: 0.67% 无氨基酵母氮源, 0.2% 氨基酸混合物粉末, 2% 葡萄糖。5-氟乳清酸 (5-FOA) 培养基 (1 L): 6.7 g 无氨基酵母碳源, 20 g 葡萄糖, 0.8 g 尿苷, 2 g 无氨基酸混合粉末, 20 g 琼脂粉, 1 g 5-氟乳清酸 (5-FOA)。RPMI 1640 培养基: 2.080 g RPMI 1640 粉末, 6.906 g 苯磺酸 (MOPS), 40 mL 10% 葡萄糖溶液, 加蒸馏水定容到 200 mL, 混匀后用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 7.0, 使用前进行抽滤除菌。

### 1.4 白念珠菌 *CCH1* 和 *MIDI* 基因回补质粒的构建

设计一对带有 *Pst* I 酶切位点的引物 CCH1-5RC 和 CCH1-3RC, 以 NKC18 基因组 DNA 为

模板, 扩增获得一条 8.7 kb 的片段, 其中包括 1 kb 的启动子、*CCH1* 基因的 ORF 区和终止子区。将该片段用 *Pst* I 进行酶切, 纯化后与同样经过 *Pst* I 内切酶消化过, 并经碱性磷酸酶 CIAP 去磷酸化处理的白念珠菌表达质粒 pCR4 进行连接, 然后将连接产物转化大肠杆菌, 并在 LB+Amp 的固体培养基中筛选转化子, 获得正确的质粒 pCR4-*CCH1*。pCR4-*MIDI* 质粒的获得需要设计一对带有 *Bam*H I 和 *Kpn* I 酶切位点的 MIDI-5RC 和 MIDI-3RC 引物, 同样以 NKC18 基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 获得一条 3.1 kb 包含 *MIDI* 基因 1 kb 启动子、ORF 区和终止子区的片段。将该片段用 *Bam*H I 和 *Kpn* I 进行双酶切, 纯化后与同样经过 *Bam*H I /*Kpn* I 消化过的 pCR4 质粒进行连接, 转化大肠杆菌并获得正确的质粒 pCR4-*MIDI*。

### 1.5 药物平板敏感性试验

挑取不同实验菌株的单菌落，接种至 5 mL YPD 液体培养基中，30 °C 过夜培养，再转接至 30 mL YPD 液体培养基中使起始  $OD_{600}$  约为 0.1，30 °C 培养大约 4~5 h 到对数生长期，加入药物氟康唑或伊曲康唑至各预计的终浓度，在 37 °C 进行振荡培养。分别在预先设定的时间点：0、5、10、20、30、60、90 min 时取样，每次取 5  $\mu$ L 点在固体 YPD 平板上，点样后，37 °C 培养 24 h，观察并拍照。

### 1.6 微量液基稀释法

依照酵母菌敏感性测定 CLSI-M27-A2 方案<sup>[15]</sup>的微量液基稀释法对野生型菌株和其他各缺失菌株进行药物敏感性测定。

### 1.7 小鼠感染模型的建立

进行毒力分析建模的小鼠为 ICR 雌性小鼠，鼠龄为 6~8 周。注射用的各菌株在 SC 培养基中过夜培养并转接至新鲜培养基中再培养 3~4 h，然后取适量菌液离心后悬浮于 1 mL 0.9% 生理盐水中，用血球计数板计数。分别用生理盐水将各株注射用菌株的菌液浓度调至  $5 \times 10^6$  cells/mL。用 0.25 mL 注射器和 4 号针头注射小鼠尾静脉，每只小鼠注射 0.1 mL 菌液，每种菌株注射 10 只小鼠。随后每天对小鼠的死亡情况进行观察和记录，观察周期为 30 d。通过绘制小鼠的存活率曲线，利用 SPSS 软件进行 Kaplan-Meier Test 统计学分析，来判定不同菌株的毒力变化情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 白念珠菌 *CCH1* 和 *MIDI* 基因回补缺失菌株的构建

质粒 pCR4 含有的选择标记为 URA3，缺失

菌株 *cch1* $\Delta/\Delta$  (*cch1::CCH1/cch1::URA3-dpl200*) 和 *mid1* $\Delta/\Delta$  (*mid1::MIDI1/mid1::URA3-dpl200*) 中的 URA3 标记必须被消除后，才能使用构建的 pCR4-*CCH1* 和 pCR4-*MIDI* 质粒用于相应基因的回补。分别将 *cch1* $\Delta/\Delta$  和 *mid1* $\Delta/\Delta$  缺失菌株涂布于含有 5-FOA 和尿苷的 SC 培养基中，用于标记的弹出。3 d 后挑取转化子，提取基因组并以 CCH1/MIDI-5det 和 CCH1/MIDI-3det 为引物，检测基因型。对于没有去除 URA3 标记的菌株，PCR 得到两条带，分别为 ARG4 和 URA3 标记带<sup>[14]</sup>；而对于去除 URA3 标记的菌株，ARG4 标记带保留，由于缺失菌株中的 *URA3-dpl200* 片段两端含有同源序列，在 5-FOA 选择压力下能够将自身环化，从基因组中弹出一部分，使检测带变短。如图 1 所示，对于 URA3 标记消除的 *cch1* $\Delta/\Delta$  菌株，PCR 检测正确的结果为 2.3 kb (ARG4) 和 1.0 kb (泳道 1,2)；对于 *mid1* $\Delta/\Delta$  菌株，PCR 检测正确的结果为 2.4 kb (ARG4) 和 750 bp

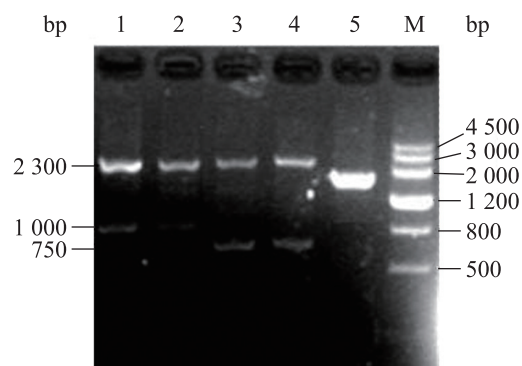


图 1 URA3 标记消除的 *cch1* $\Delta/\Delta$  和 *mid1* $\Delta/\Delta$  菌株的鉴定

Fig. 1 PCR analysis of URA3 dropping out in *cch1* $\Delta/\Delta$  and *mid1* $\Delta/\Delta$  strains. 1-4: genomic DNA from *cch1* $\Delta/\Delta$  and *mid1* $\Delta/\Delta$  strains were used as templates for PCR detection; 5: NKC18 was used as template with primers MIDI-5detect and MIDI-3detect (1.7 kb); M: DNA marker III.

(泳道 3,4), 表明我们获得了正确的 URA3 标记被消除的菌株 *cch1::ARG4/cch1::dpl200* 和 *mid1::ARG4/mid1::dpl200*, 分别命名为 NKC61 和 NKC60。

将 pCR4 和 pCR4-*CCH1* 分别转化 NKC61 菌株, 再将 pCR4 和 pCR4-*MID1* 分别转化 NKC60 菌株, 在 SC-Ura 选择性培养基中筛选转化子, 分别以 *CCH1/MID-RC1* 和 *CCH1/MID1-RC2* 为检测引物进行转化子的 PCR 验证, 该引物从 *CCH1* 和 *MID1* 基因所敲除的那部分序列中设计选取, 鉴定结果如图 2 所示: 对于 *cch1Δ/Δ+CCH1* 回补菌株, 扩增得到 1.0 kb 的片段; 对于 *mid1Δ/Δ+MID1* 回补菌株, 扩增得到 824 bp 的片段; 而转化空质粒的 *cch1Δ/Δ+pCR4* 和 *mid1Δ/Δ+pCR4* 菌株, PCR 扩增没有能够得到目的条带, 依此鉴定并获得了正确的回补缺失菌株 *cch1Δ/Δ+CCH1* 和 *mid1Δ/Δ+MID1*, 并将该菌株分别命名为 NKC53 和 NKC55。

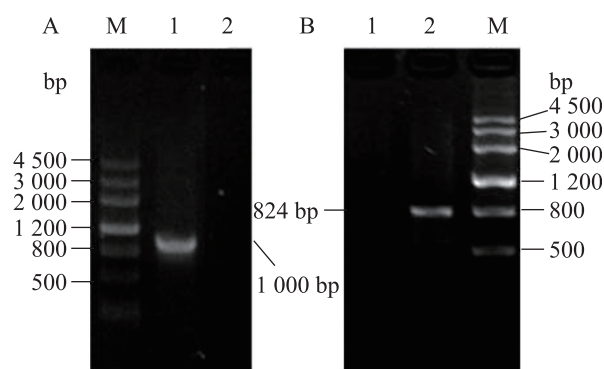


图 2 回补缺失菌株 *cch1Δ/Δ+CCH1* 和 *mid1Δ/Δ+MID1* 的鉴定

Fig. 2 PCR analysis of *cch1Δ/Δ* and *mid1Δ/Δ* recombination. M: marker III. (A) 1: *cch1Δ/Δ+CCH1* (1.0 kb); 2: *cch1Δ/Δ+pCR4*. (B) 1: *mid1Δ/Δ+MID1* (824 bp); 2: *mid1Δ/Δ+pCR4*. Genomic DNA from all strains was used as templates with primers *CCH1/MID-RC1* and *CCH1/MID1-RC2*.

## 2.2 *CCH1* 或 *MID1* 基因的缺失对药物敏感性的变化

为了方便地对药敏实验结果进行比较分析, 使用从临床分离的耐药型和敏感型的白念珠菌, 作为实验对照组。以 ATCC22019 作为质控菌株, 如表 3 所示, 质控菌株对 FLUC 的 MIC 值为 2 或 4 mg/L, 对 ITRA 的 MIC 值为 0.064 或 0.128 mg/L, 均在 CLSI M27-A2 规定的范围内<sup>[16]</sup>, 证明操作无误, 测定结果准确可靠。用微量液基稀释法测定菌株对药物的敏感性时, 通常用以下标准进行界限判定: 以 FLUC 对菌株的 MIC ≤ 8 mg/L 为敏感, 16~32 mg/L 为剂量依赖性敏感, MIC ≥ 64 mg/L 为耐药; 以 ITRA 对菌株的 MIC ≤ 0.12 mg/L 为敏感, 0.25~0.5 mg/L 为剂量依赖性敏感, ≥ 1 mg/L 为耐药。表 3 的结果显示: 1) 对照组 CA03997 和 CA90 菌株的 MIC 测定结果均符合以上判定标准, 分别为药物耐受菌和敏感菌, 保证了实验体系没有问题; 2) 野生型菌株对 FLUC 和 ITRA 药物的敏感性可以界定为剂量依赖性敏感; 3) *cch1Δ/Δ* 和 *mid1Δ/Δ* 缺失菌株对 FLUC 和 ITRA 均表现出药物敏感性, 并接近于敏感菌 CA90 的 MIC 值; 4) 回补缺失菌株 *cch1Δ/Δ+CCH1* 和 *mid1Δ/Δ+MID1* 对药物的敏感性也在接近剂量依赖性敏感的范围, 接近于野生型菌株的水平, 表明 Cch1-Mid1 参与了白念珠菌对唑类药物耐受性的调控。

我们同时也利用固体平板药物敏感性试验, 观察并分析了上述不同菌株对药物 FLUC 敏感性的变化。将处于对数生长期的细胞转移至添加有 8 mg/L FLUC 的 YPD 培养基中, 在 37 °C 振荡培养, 并且按图 3 所示的不同时间点进行取样, 分别取样 5 μL, 点种在 YPD 固体平板上。37 °C



表 3 各菌株对唑类药物的敏感性

Table 3 Susceptibility of *C. albicans* strains to azoles

Strains	MIC <sub>50</sub> <sup>a</sup> [median (range) ] (mg/L)	
	FLUC <sup>b</sup>	ITRA <sup>c</sup>
WT	8.000 (8.000–16.000)	0.256 (0.256–0.50 )
<i>cch1</i> Δ/Δ	0.500 (0.500–1.000)	0.016 (0.016–0.032)
<i>mid1</i> Δ/Δ	0.250 (0.250–0.500)	0.008 (0.008–0.016)
<i>cch1</i> Δ/Δ+ <i>CCHI</i>	16.000 (8.000–16.000)	0.128 (0.128–0.256)
<i>mid1</i> Δ/Δ+ <i>MIDI</i>	8.000 (8.000–16.000)	0.032 (0.032–0.064)
NKC46	0.250 (0.100–0.250)	0.008 (0.004–0.008)
NKC43	64.000 (64.000–128.000)	1.000 (1.000–2.000)
ATCC22019	2.000 (2.000–4.000)	0.064 (0.064–0.128)

Notes: MIC<sub>50</sub><sup>a</sup>: minimum inhibitory concentration of FLUC and ICZ, read by 50% growth inhibited. FLUC<sup>b</sup>: fluconazole; ITRA<sup>c</sup>: itraconazole. Clinical isolates CA90 and CA03997 were used as positive and negative controls respectively. CA90 was azole-sensitive strain with MIC 0.125 mg/L for fluconazole and 0.03 mg/L for itraconazole; CA03997 was azole-resistant clinical isolate with MIC 128 mg/L for fluconazole and 64 mg/L for itraconazole.

静置培养 16 h 后, 观察结果如图 3 所示: *cch1*Δ/Δ 和 *mid1*Δ/Δ 缺失菌株对 FLUC 表现出高度的敏感性, 菌体生长状况与敏感菌相似; *CCHI* 和 *MIDI* 基因的回补对这种敏感表型具有恢复作用, 但不能恢复至与野生型菌株相似的敏感表型; 以上结果再次表明 *CCHI* 和 *MIDI* 基因的缺失与 FLUC 药物敏感性有关。

### 2.3 *CCHI* 和 *MIDI* 基因参与药物耐受的机制推测

Cch1-Mid1 钙通道调控 Ca<sup>2+</sup>的内流, 而 *CCHI* 和 *MIDI* 基因的缺失对药物表现出敏感性, Ca<sup>2+</sup>的浓度调节很可能与药物耐受性有关, 所以我们在药物 FLUC、ITRA 和 TER 作用的基础上, 分别添加 0.05 mol/L 或 0.25 mol/L 的 Ca<sup>2+</sup>、0.5 mmol/L 钙螯合剂 EGTA 或 32 mg/L 钙通道阻滞剂维拉帕米 Vpi, 利用划线培养的方法, 对以上不同菌株的生长情况进行了比较, 来研究

*CCHI* 和 *MIDI* 基因参与药物耐受的机制。培养基放置于 30 °C 培养, 3 d 后观察结果, 如图 4 所示: 1) 在对照组所在列, 除野生型菌株和耐药

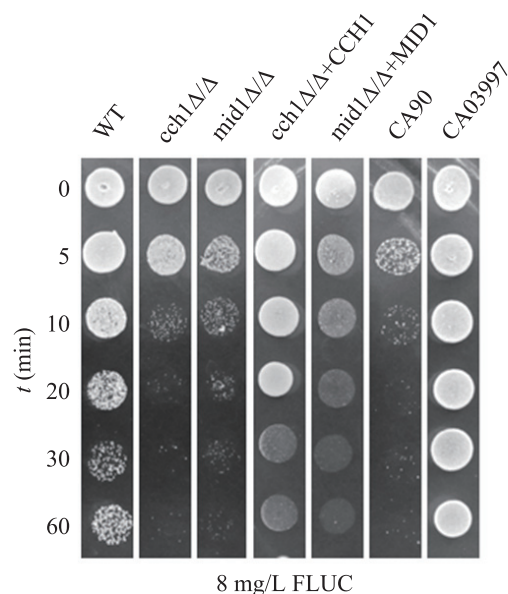


图 3 FLUC 药物平板敏感性试验  
Fig. 3 Susceptibility assay to FLUC.

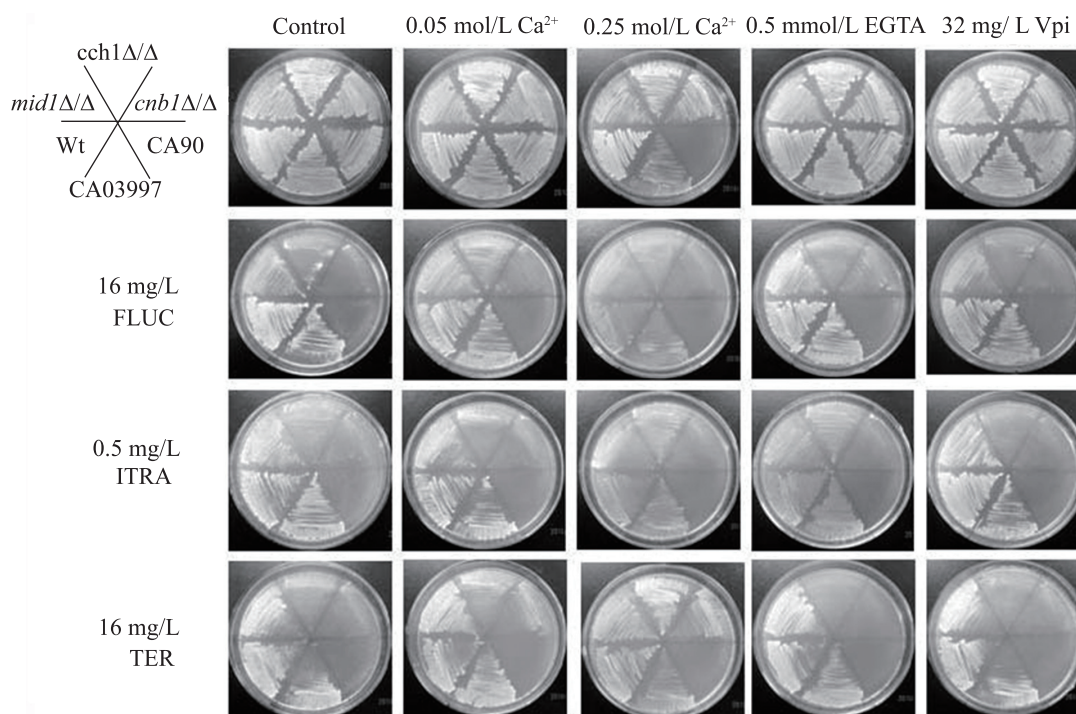


图 4  $\text{Ca}^{2+}$ 对药物抗真菌活性的调节作用

Fig. 4 Calcium modulation of antifungal drug activity.

菌 CA03997 外, 其他各缺失菌株和敏感菌 CA90 对唑类药物都表现出不同程度的敏感性; 2) 低浓度  $0.05 \text{ mol/L Ca}^{2+}$  的添加抑制了唑类药物对白念珠菌的抗真菌活性, 与对照组相比, 所有菌株的生长状况有所好转, 表明少量  $\text{Ca}^{2+}$  的存在帮助细胞获得了一定程度的对唑类药物的耐受性; 3) 高浓度  $0.25 \text{ mol/L Ca}^{2+}$ 、EGTA 或 Vpi 的添加, 与对照组相比, 都增强了唑类药物对各菌株的抑制作用, 使菌株的生长状况变得更差了; 4) 然而, 低浓度和高浓度  $\text{Ca}^{2+}$  的添加都抑制了丙烯酰胺类药物 TER 的作用活性, 但 EGTA 或 Vpi 的添加却同样也对 TER 活性有增强作用, 菌株表现出对药物更加敏感。综合以上结果表明: 不同的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度能够通过改善或抑制药物的抗真菌

活性, 来间接调节白念珠菌对药物的耐受性, 虽然对唑类药物和丙烯酰胺类药物耐受的调控方式不同, 但可以确定的是 *CCHI* 和 *MIDI* 基因参与药物耐受性的调控, 也是通过对  $\text{Ca}^{2+}$  浓度变化的间接调节来实现的。

#### 2.4 *CCHI* 或 *MIDI* 基因的缺失对白念珠菌毒力的影响

白念珠菌的药物耐受性和致病性之间有密切关系, 所以我们通过建立小鼠系统感染模型的方法来进一步分析 *CCHI* 和 *MIDI* 基因在影响菌株毒力方面的作用。在实验中, 共饲养 50 只小鼠, 将这些小鼠随机平均分成 1~5 组, 各组小鼠通过尾静脉分别注射野生型菌株、*cch1Δ/Δ*+*CCHI* 和 *mid1Δ/Δ*+*MIDI* 回补菌株以及 *cch1Δ/Δ*



和 *mid1Δ/Δ* 缺失菌株, 每种菌株注射 10 只小鼠, 然后每天观察并记录小鼠的存活情况, 观察周期为 30 d。利用 Kaplan-Meier Test 进行统计学分析, 判定不同组小鼠之间的生存差异, 结果表明: 注射野生型菌株、*cch1Δ/Δ+CCHI* 和 *mid1Δ/Δ+MIDI* 小鼠的平均存活时间分别为 12.2、14.6、15 d, 统计学分析结果显示, 在野生型菌株和回补菌株之间没有统计学差异 ( $P=0.306$  或  $0.233$ ), 然而注射 *cch1Δ/Δ* 和 *mid1Δ/Δ* 缺失菌株小鼠的平均存活时间为 22.9 d 和 21.3 d, 与野生型菌株之间存在差异, 并且差异在极显著水平 ( $P<0.01$ ) (图 5)。实验结果表明, *CCHI* 和 *MIDI* 基因的缺失导致菌株的毒力大大降低。

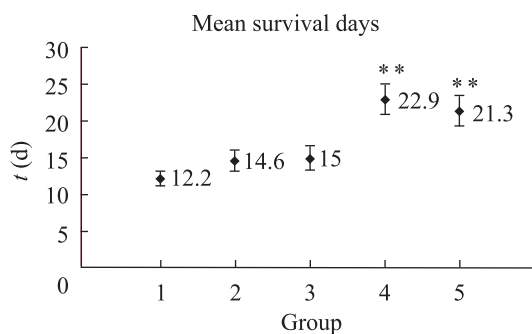


图 5 感染不同菌株的小鼠存活中位数分析

Fig. 5 Virulence assay of *C. albicans* strains.

### 3 讨论

CCS 途径在介导酵母细胞存活的过程中发挥着非常广泛的作用, 在这个途径中, 钙调神经磷酸酶的功能在许多真核细胞中已被证实, 并且有证据表明 Cch1-Mid1 钙通道能够通过调控  $Ca^{2+}$  的内流, 对钙调神经磷酸酶产生激活作用<sup>[7,13]</sup>。最初的  $Ca^{2+}$  波动引起一系列相关应答来帮助细胞在压力环境下存活, 说明 Cch1p 和 Mid1p 在保

证细胞存活方面发挥着最为基础的作用, 因此, 在我们的工作中, 重点对白念珠菌 CCS 途径中 *CCHI* 和 *MIDI* 基因缺失所引起的药物耐受性和菌株毒力的变化进行研究。

*CCHI* 和 *MIDI* 基因参与药物耐受性的调控, 可以理解为通过调节  $Ca^{2+}$  的作用, 参与介导细胞在药物压力下的存活。这在我们的实验中也得到证实, *CCHI* 和 *MIDI* 基因的缺失在药物作用下表现的更为敏感, 使用  $Ca^{2+}$  的螯合剂 EGTA 或钙通道阻滞剂 Vpi 联合抗真菌药物一起作用时, 能够改善药物作用。所以, 以此确定 CCS 途径通过对  $Ca^{2+}$  的调节, 间接参与了药物耐受性。小鼠感染模型实验证明 *cch1Δ/Δ* 和 *mid1Δ/Δ* 菌株的毒力明显比野生型菌株弱, 这与许多基因缺失突变对菌株毒力的影响非常相似。白念珠菌毒力的形成也是多种因素累积的效果, 比如蛋白酶的分泌<sup>[11]</sup>, 细胞表面黏附素的合成<sup>[17]</sup>等。当细胞在接受外界持续和难以预知的生物或物理因子干扰的时候, 包括温度、环境 pH、离子毒力、氧化胁迫压力和药物作用等, 白念珠菌在借助适当的途径来感知和应答这些环境信号的同时, 就会引起细胞自身的生理学、形态以及粘附特性的改变, 从而提高细胞对环境变化的适应性, 因此表现为菌株毒力发生变化。在我们的实验中同时也发现 *cch1Δ/Δ* 和 *mid1Δ/Δ* 菌株并不是完全毒力丧失, 只是毒力减弱了, 但仍然能够对小鼠产生致死性的感染。这表明小鼠体内的这种环境可能诱导了其他一种或几种途径促进了 *cch1Δ/Δ* 和 *mid1Δ/Δ* 菌株的菌丝形成, 或者与钙调神经磷酸酶的作用有关。总之, *CCHI* 和 *MIDI* 基因在参与白念珠菌药物耐受性和致病性调控方面发挥着重要作用。

白念珠菌的致病性与药物耐受性之间有密切的关系。分泌型天冬氨酸蛋白酶 (Sap) 目前被认为是白念珠菌主要的毒力因子之一<sup>[18]</sup>, 与白念珠菌的黏附力和组织侵袭有关。研究发现对药物呈现耐受性的菌株比药物敏感株具有更大的毒性, 而且耐药株在 FLUC 浓度逐渐增加的环境下生长会导致剂量依赖性的体外分泌型天冬氨酸蛋白酶产量增加<sup>[19]</sup>, 以及耐药基因 MDR1 的过度表达。Fekete-Forgacs 等将 FLUC 敏感型的野生型白念珠菌诱导为耐 FLUC 的实验变异株, 发现变异株的 Sap 分泌明显强于自然分离菌株<sup>[20]</sup>, 在临床白念珠菌耐药和致病性的研究中, 更多的是用蛋白酶活力作为反映耐药菌株毒力和致病性强弱的直接指标<sup>[21]</sup>。所以, 在我们的实验中, 是否在那些对药物呈现敏感性的 *cch1*Δ/Δ 和 *mid1*Δ/Δ 菌株中, 分泌型天冬氨酸蛋白酶的产量也会表现为降低, 还有待进一步研究证实。

**致谢:** 本实验中的部分菌株和质粒由明尼苏达大学 Dr. Dana Davis 教授和江南大学蒋伶活教授惠赠, 在此表示衷心感谢!

## REFERENCES

- [1] Koh AY, Köhler JR, Coggshall KT, et al. Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. *PLoS Pathog*, 2008, 4(2): e35.
- [2] Ruhnke M, Maschmeyer G. Management of mycoses in patients with hematologic disease and cancer—review of the literature. *Eur J Med Res*, 2002, 7(5): 227–235.
- [3] Andes D, Forrest A, Lepak A, et al. Impact of antimicrobial dosing regimen on evolution of drug resistance *in vivo*: fluconazole and *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(7): 2374–2383.
- [4] Edlind T, Smith L, Henry K, et al. Antifungal activity in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by calcium signalling. *Mol Microbiol*, 2002, 46(1): 257–268.
- [5] Kaur R, Castaño I, Cormack BP. Functional genomic analysis of fluconazole susceptibility in the pathogenic yeast *Candida glabrata*: roles of calcium signaling and mitochondria. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(5): 1600–1613.
- [6] Patterson RL, van Rossum DB, Gill DL. Store-operated  $Ca^{2+}$  entry: evidence for a secretion-like coupling model. *Cell*, 1999, 98(4): 487–499.
- [7] Bonilla M, Cunningham KW. Mitogen-activated protein kinase stimulation of  $Ca^{2+}$  signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Mol Biol Cell*, 2003, 14(10): 4296–4305.
- [8] Peiter E, Fischer M, Sidaway K, et al. The *Saccharomyces cerevisiae*  $Ca^{2+}$  channel Cch1pMid1p is essential for tolerance to cold stress and iron toxicity. *FEBS Lett*, 2005, 579(25): 5697–5703.
- [9] Aramburu J, Heitman J, Crabtree GR. Calcineurin: a central controller of signalling in eukaryotes. *EMBO Rep*, 2004, 5(4): 343–348.
- [10] Sanglard D, Ischer F, Marchetti O, et al. Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. *Mol Microbiol*, 2003, 48(4): 959–976.
- [11] Wu T, Wright K, Hurst SF, et al. Enhanced extracellular production of aspartyl proteinase, a virulence factor, by *Candida albicans* isolates following growth in subinhibitory concentrations of fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(5): 1200–1208.
- [12] Li Y, Sun SJ, Guo QJ, et al. *In vitro* interaction between azoles and cyclosporin A against clinical isolates of *Candida albicans* determined by the checkerboard method and time-kill curves. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 61(3): 577–585.
- [13] Bonilla M, Nastase KK, Cunningham KW.

- Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO J*, 2002, 21(10): 2343–2353.
- [14] Wang H, Xu N, Xing LJ, et al. Effect of *CCHI* and *MIDI* in calcium influx under alkaline pH and its regulation by Crz1p transcription factor in *Candida albicans*. *Chin J Biotech*, 2011, 27(6): 917–925.  
王慧, 徐宁, 邢来君, 等. 碱性 pH 条件下白念珠菌钙离子通道 *CCHI* 和 *MIDI* 基因对钙内流的影响及 Crz1p 转录因子对其的调控作用. *生物工程学报*, 2011, 27(6): 917–925.
- [15] CLSI/NCCLS, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.
- [16] Pfaller MA, Messer SA, Bolmström A, et al. Multisite reproducibility of the Etest MIC method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *J Clin Microbiol*, 1996, 34(7): 1691–1693.
- [17] Krasowska A, Murzyn A, Dyjankiewicz A, et al. The antagonistic effect of *Saccharomyces boulardii* on *Candida albicans* filamentation, adhesion and biofilm formation. *FEMS Yeast Res*, 2009, 9(8): 1312–1321.
- [18] Schaller M, Januschke E, Schackert C, et al. Different isoforms of secreted aspartyl proteinases (Sap) are expressed by *Candida albicans* during oral and cutaneous candidosis *in vivo*. *J Med Microbiol*, 2001, 50(8): 743–747.
- [19] Costa CR, Jesuino RSA, de Aquino Lemos J, et al. Effects of antifungal agents in sap activity of *Candida albicans* isolates. *Mycopathologia*, 2010, 169(2): 91–98.
- [20] Fekete-Forgács K, Gyüre L, Lenkey B. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Mycoses*, 2000, 43(7/8): 273–279.
- [21] Jayatilake JAMS, Samaranyake YH, Cheung LK, et al. Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and non-*albicans* *Candida* species in reconstituted human oral epithelium. *J Oral Pathol Med*, 2006, 35(8): 484–491.