

白念珠菌肌醇多磷酸激酶 Kcs1 的功能

李晓灵 喻其林 张冰 刘哲 李明春*

(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)

摘要:【目的】鉴定白念珠菌肌醇多磷酸激酶 Kcs1 蛋白,并探索 Kcs1 在该病原菌细胞自噬、菌丝发育及致病过程中的功能。【方法】采用二步 PCR 介导的同源重组方法,构建白念珠菌 *KCSI* 基因缺失菌株 *kcs1Δ/Δ* 及回补菌株 *KCS1c*;采用氮饥饿敏感性测定及 GFP-Atg8 自噬报告系统,测定 *KCSI* 缺失对白念珠菌自噬过程的影响;采用菌丝诱导培养,测定 *KCSI* 缺失对白念珠菌菌丝发育能力的影响;采用巨噬细胞模型及小鼠系统性感染模型,分析 *KCSI* 缺失对白念珠菌感染宿主能力的影响。【结果】*KCSI* 缺失造成白念珠菌氮饥饿耐受能力降低,氮饥饿条件下自噬相关蛋白 Atg8 的降解及转运水平下降,菌丝发育变缓,对巨噬细胞耐受及损伤能力减弱,但不影响菌株的小鼠系统性感染能力。【结论】白念珠菌肌醇多磷酸激酶 Kcs1 在细胞自噬、菌丝发育、与巨噬细胞相互作用等方面发挥重要作用。

关键词: 白念珠菌, 肌醇多磷酸激酶, Kcs1, 自噬, 菌丝发育, 毒力

Function of the inositol polyphosphate kinase Kcs1 in *Candida albicans*

LI Xiao-Ling YU Qi-Lin ZHANG Bing LIU Zhe LI Ming-Chun*

(Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: [Objective] To identify the inositol polyphosphate kinase Kcs1 in *Candida albicans* and study the role of Kcs1 in autophagy, hyphal growth and virulence. [Methods] The mutant *kcs1Δ/Δ* and the reconstituted strain *KCS1c* were constructed by homologous recombination. Transport and degradation capability of the autophagy-related protein Atg8 were determined by fluorescence microscopy and Western blotting under nitrogen starvation. Hyphal development ability was assayed using hypha-inducing medium. The virulence of *C. albicans* was determined using the macrophage model and the mouse systemic infection model. [Results] Nitrogen starvation experiment and GFP-Atg8 analysis revealed that deletion of *KCSI* caused defect in transport of Atg8 to vacuole and

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31670146, 81471923, 31400132); Natural Science Foundation of Tianjin (No. 17JCZDJC33300, 15JCQJJC09300)

*Corresponding author: Tel: 86-22-23508506; E-mail: nklimingchun@163.com

Received: April 07, 2017; Accepted: July 10, 2017; Published online (www.cnki.net): August 08, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31670146, 81471923, 31400132); 天津市自然科学基金项目(No. 17JCZDJC33300, 15JCQJJC09300)

*通讯作者: Tel: 86-22-23508506; E-mail: nklimingchun@163.com

收稿日期: 2017-04-07; 接受日期: 2017-07-10; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-08-08

degradation of Atg8 in the vacuole. Moreover, the *kcs1Δ/Δ* mutant attenuated the ability of hyphal development. In addition, the *kcs1Δ/Δ* mutant decreased the ability of fighting against microphage attacks. However, the ability of systemic infection was not impaired by deletion of *KCS1*. [Conclusion] The inositol polyphosphate kinase Kcs1 played an important role in various physiological processes in *C. albicans*, including autophagy, hyphal development and macrophage sensitivity.

Keywords: *Candida albicans*, Inositol polyphosphate kinase, Kcs1, Autophagy, Hyphal development, Virulence

白念珠菌(*Candida albicans*)是临床常见的条件致病真菌之一,有 81 个亚种,其中 11 个亚种对人体存在致病性^[1]。该真菌在正常情况下以共生形式广泛存在于人体口腔、肠道、呼吸道及阴道之中,不会引起疾病。但近年来随着大剂量抗生素、激素、免疫抑制剂的使用,以及临床大型手术病例的逐渐增多,白念珠菌的感染已经成为人类面临的一大健康问题。根据医学临床统计,其致死率可达 38%–49%^[2-3]。在白念珠菌感染的治疗过程中,最严重的问题就是菌株对各类药物,尤其唑类药物产生的抗药性^[4]。仅 1997–2003 年间,临床分离的抗氟康唑白念菌株数量已上升 0.6%^[5-6]。

肌醇多磷酸(Inositol polyphosphate)是由肌醇三磷酸(IP₃)衍生而来的一类小分子化合物,在真核细胞诸多生理代谢过程中发挥重要的调节作用。这些化合物主要包括:肌醇四磷酸(IP₄)、肌醇五磷酸(IP₅)、肌醇六磷酸(IP₆)、肌醇七磷酸(IP₇)及肌醇八磷酸(IP₈)。在模式生物酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中,存在数种重要的参与肌醇多磷酸合成的激酶,称为肌醇多磷酸激酶,包括:催化 IP₃ 磷酸化生成 IP₄ 与 IP₅ 的 Ipk2、催化 IP₅ 磷酸化生成 IP₆ 的 Ipk1、催化 IP₆ 磷酸化生成 IP₇ 及 IP₈ 的 Kcs1。

作为真核细胞用于自身防御的应激调控机制,自噬过程是真核细胞满足细胞代谢需要和某些细胞器更新过程的必要手段,对细胞正常生长和生理活动起着极为重要的作用^[7-8]。酿酒酵母中的研究报告,Kcs1 在自噬过程中扮演重要角色^[9-10],*KCS1* 基因缺失会导致菌株在氮饥饿条件下自噬体大小与数量明显下降,自噬流(Autophagic flux)显著减

弱。这种由 *KCS1* 缺失所引起的自噬缺陷与自噬体囊泡组装位点(Phagophore assembly site, PAS)的错误定位和 Atg18 蛋白从液泡膜中释放缺陷密切相关^[11]。

然而,在条件致病真菌白念珠菌中,目前尚未明确是否存在 Kcs1 的同源蛋白,以及该蛋白是否在细胞自噬过程中发挥功能,并且该蛋白是否是白念珠菌毒力相关因子均需进一步深入探讨。本研究首次对白念珠菌肌醇多磷酸激酶 Kcs1 的功能展开研究,初步探索了该蛋白在细胞自噬、菌丝发育及致病过程中的作用,为发掘新的抗真菌药物靶点和新型抗真菌药物的开发提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

白念珠菌野生型菌株 WT (*ura3Δ::limm434/ura3Δ::limm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG*)由美国明尼苏达大学 Dana Davis 教授馈赠,*KCS1* 基因敲除白念珠菌菌株 *kcs1Δ/Δ* (*ura3Δ::limm434/ura3Δ::limm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG kcs1::ARG4/kcs1::dpl200*)通过两步 PCR 介导的同源重组方法建立^[12]。白念珠菌 *KCS1* 基因回补菌株 *KCS1c* (*ura3Δ::limm434/ura3Δ::limm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG kcs1::ARG4/kcs1::dpl200 ,pDDB78-KCS1*)则将 *KCS1* 表达质粒 pDDB78-KCS1 转入 *kcs1Δ/Δ* 菌株而得。

1.2 主要试剂和仪器

限制性核酸内切酶,宝生物工程(大连)有限公司; *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、DNA Marker,

北京鼎国生物技术有限公司；LiAc 和 PEG3350，Sigma-Aldrich 公司；HRP 发光试剂盒，Millipore 公司。凝胶成像仪，UVP 公司；蛋白电泳仪，Bio-Rad 公司；PCR 仪，Gene Company Limited 公司；荧光显微镜，Olympus 公司。

1.3 培养基

白念珠菌培养采用 YPD 和 SC 培养基，均添加 0.1% 的 0.08 g/L 无菌尿苷(SC-Ura 除外)^[12]。大肠杆菌培养采用 LB 培养基^[12]，按需添加 0.1% 的 0.1 g/L 氨苄青霉素溶液。菌丝诱导培养采用 RPMI-1640 液体培养基和 YPD+FBS 液体培养基。RPMI-1640 液体培养基(g/L)：RPMI-1640 粉末 10.40，丙磺酸 4.18，碳酸钠 0.20，用 HCl 调 pH 值至 7.4，过滤除菌，使用前加入 0.1% 的 0.08 g/L 无菌尿苷。YPD+FBS 液体培养基：在 YPD 培养基基础上添加 10% 胎牛血清(FBS)。氮源饥饿培养基(g/L)：KCl 0.52，KH₂PO₄ 1.52，MgSO₄·7H₂O 0.52，葡萄糖 10.00，微量元素溶液 0.1%，维生素溶液 0.1%，调 pH 值为 6.5，1×10⁵ Pa 灭菌 30 min。含氮培养基(g/L)：在氮源饥饿培养基中补加(NH₄)₂SO₄ 0.5。巨噬细胞 RAW264.7 培养采用 RPMI-1640+10% FBS，即 RPMI-1640 中添加 10% 胎牛血清(FBS)，使用前加入 0.1% 的 0.08 g/L 无菌尿苷。

1.4 白念珠菌的转化

基因缺失菌株构建、回补菌株构建以及 pAU34M-GFP-Atg8 转入白念珠菌均涉及白念珠菌的转化试验，具体方法参见文献[12]。

1.5 白念珠菌 *KCS1* 回补质粒 pDDB78-KCS1 的构建

pDDB78-KCS1 的构建参见文献[12]。具体方法如下：采用 KCS1-5con 和 KCS1-3con 扩增包含开放阅读框及其上游的启动子和下游终止子在内的 DNA 片段，长度为 1.8 kb，该片段两端分别含有 *Xho* I 和 *Kpn* I 酶切位点，将该片段进行双酶切(*Xho* I、*Kpn* I)后，与同时进行双酶切后的 pDDB78 进行连接，从而构建 *KCS1* 回补质粒 pDDB78-KCS1。

1.6 氮饥饿耐受性的测定

将野生型菌株 WT、缺失菌株 *kcs1Δ/Δ* 及回补菌株 *KCS1c* 单菌落接种至液体 YPD 培养基中，于 30 °C 摇床中 180 r/min 振荡培养过夜，离心收集菌体(室温，4 000 r/min，2 min)，无菌水洗涤一遍，转入液体氮源饥饿培养基中，调整 OD₆₀₀ 为 0.5。将各菌株置于 30 °C 摇床中 180 r/min 培养 3 d，取 100 μL 培养菌液摇匀后，用无菌水梯度稀释至 10⁻⁴，涂布于 YPD 固体培养基。30 °C 培养 24–48 h 后，对平板上的菌落进行计数，计算菌落形成单位(Colony forming unit, CFU)。

1.7 菌丝诱导观察

将野生型菌株 WT、缺失菌株 *kcs1Δ/Δ* 及回补菌株 *KCS1c* 单菌落接种至液体 YPD 培养基中，于 30 °C、180 r/min 振荡培养过夜，离心收集菌体(室温，4 000 r/min，2 min)，用无菌水洗涤一遍，转入 YPD+FBS 或 RPMI-1640 液体培养基中，调整初始 OD₆₀₀ 至 0.1，37 °C、120 r/min 振荡培养，2 h 后离心收集菌体(室温，12 000 r/min，2 min)，于显微镜下观察菌丝发育情况。

1.8 巨噬细胞敏感性测定

巨噬细胞-白念珠菌混合体系的制备：巨噬细胞采用 RAW264.7 细胞株，首先将细胞培养于 24 孔板至良好生长状态；同时，将培养至对数初期的白念珠菌细胞收集后，用 RPMI-1640 培养基调整至 1×10⁶ 细胞/mL；将各菌株菌悬液 100 μL 与贴壁巨噬细胞共孵育形成巨噬细胞-白念珠菌相互作用混合体系。

巨噬细胞对白念珠菌损伤能力测定：将混合体系在 37 °C 培养箱中共孵育 1 h 后，加入 1 mL 无菌水裂解巨噬细胞，吸取裂解液，梯度稀释至 10⁻³ 后涂布 YPD 平板，30 °C 培养 1 d 后对白念珠菌菌落进行计数，计算被杀死的白念珠菌百分率。

白念珠菌对巨噬细胞损伤能力的测定：将混合体系在 37 °C 培养箱中共孵育 3 h 后，采用碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)对混合体系进行染色，

在显微镜下观察染色情况, PI 阳性细胞视为损伤的巨噬细胞, 统计并计算被损伤的巨噬细胞的百分率。

1.9 Western blotting 检测 Atg8 降解情况

将转入 pAU34M-GFP-Atg8 质粒的野生型菌株 WT、缺失菌株 *kcs1Δ/Δ* 及回补菌株 *KCS1c* 分别接种于含氮(Control)培养基及氮源饥饿(-N)培养基中, 30 °C、120 r/min 振荡培养 8 h, 离心收集菌体(室温, 4 000 r/min, 2 min)后, 提取总蛋白, 测定蛋白含量, 将各样品蛋白上样量进行统一。各蛋白样品经 SDS-PAGE 分离后, 转至 PVDF 膜上, 于含 5% 脱脂奶粉的 TBST 中封闭 1 h; 加入兔抗 GFP 一抗(1:3 000 稀释), 室温孵育 2 h; TBST 洗膜 5 次, 每次 10 min; 加入 HRP 标记的羊抗兔二抗(1:5 000 稀释), 室温孵育 1 h; TBST 洗膜 5 次, 每次 10 min; 利用 HRP 化学发光试剂盒进行显色分析。

1.10 小鼠系统性感染模型

将野生型菌株 WT、缺失菌株 *kcs1Δ/Δ* 及回补菌株 *KCS1c* 单菌落接种至液体 YPD 培养基中, 30 °C、180 r/min 振荡培养过夜, 离心收集菌体(室温, 4 000 r/min, 2 min)后重悬于 0.9% 的无菌生理盐水中, 调整最终浓度为 5×10^6 细胞/mL。将 30 只 4–6 周龄 ICR 雌性小鼠随机分为 3 组, 10 只为一组作为平行试验, 各组小鼠分别用作 WT 菌株、缺失菌株 *kcs1Δ/Δ* 及回补菌株 *KCS1c* 的侵染宿主。感染模型采用尾静脉注射方式, 每只注射 0.1 mL 菌液。从感染后第 1 天开始观察并记录小鼠死亡情况, 绘制生存曲线, 从而测定 *KCS1* 基因缺失对白念珠菌毒力的影响。

2 结果与分析

2.1 白念珠菌 Kcs1 蛋白的结构特征

在白念珠菌基因组数据库(www.candidagenome.org)进行检索发现, 白念珠菌的 Kcs1 蛋白由 orf19.1007 开放阅读框编码, 含有 352 个氨基酸残基, 与酿酒酵母 Kcs1 (ScKcs1) 蛋白的氨基酸序列有

50% 相似性。由 GenBank 数据库可知: *KCS1* 基因位于其 R 染色体上, 参考序列号 NC_032096.1; Kcs1 蛋白参考序列号为 XP_710272.1。通过 NCBI 在线结构域查询, 发现白念珠菌 Kcs1 具有肌醇多磷酸激酶结构域 (IPK domain), 含有保守的 DLNNNNNNPNNNDNKNGNR 基序(图 1A、B)。该保守基序均存在于酿酒酵母肌醇多磷酸激酶 Kcs1 (ScKcs1)、秀丽线虫肌醇三磷酸-3-激酶 1 (CeITP3K1)、拟南芥肌醇多磷酸激酶 2β (*AtIPPK2β*)、盘基网柄菌肌醇六磷酸激酶 (*DdIP6K*)、人肌醇三磷酸-3-激酶 A (*HsITP3KA*) 等诸多 IPK 超家族成员中(图 1B)。

2.2 KCS1 缺失菌株及回补菌株的验证

采用 PCR 介导的同源重组法进行缺失菌株 *kcs1Δ/Δ* 的构建, 进而采用检测引物对缺失菌株进行 PCR 验证。杂合子(*KCS1/kcs1*)菌株预期得到 2 541 bp 的 *ARG4* 片段和 1 541 bp 的野生型片段; 纯合子(*kcs1Δ/Δ*)预期得到 2 541 bp 的 *ARG4* 片段和 2 141 bp 的 *URA3* 片段。由图 2A 可知, 所得菌株符合预期, 即为正确的杂合子及纯合子菌株。采用 *KCS1* 内部检测引物进行回补菌株的验证, 预期得到 1 059 bp 的 *KCS1* 片段。由图 2B 可知, 所得菌株符合预期, 即为正确的回补菌株 *KCS1c*。

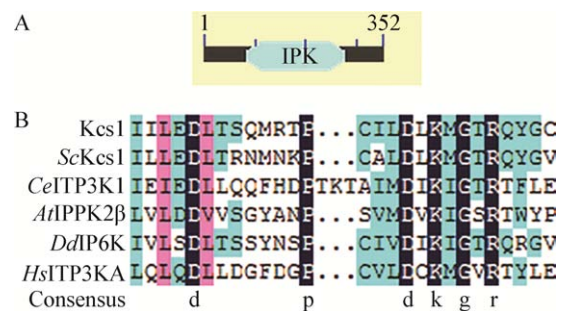


图 1 白念珠菌 Kcs1 的保守结构域

Figure 1 The conserved domain in *C. albicans* Kcs1

注: A: 通过 NCBI 在线分析白念珠菌 IPK 结构域; B: 多种生物细胞中 IPK 家族保守结构域分析。

Note: A: IPK domain identified by NCBI-online conserved domain architecture retrieval tool (CDART); B: Conserved sequences among the IPK superfamily members.

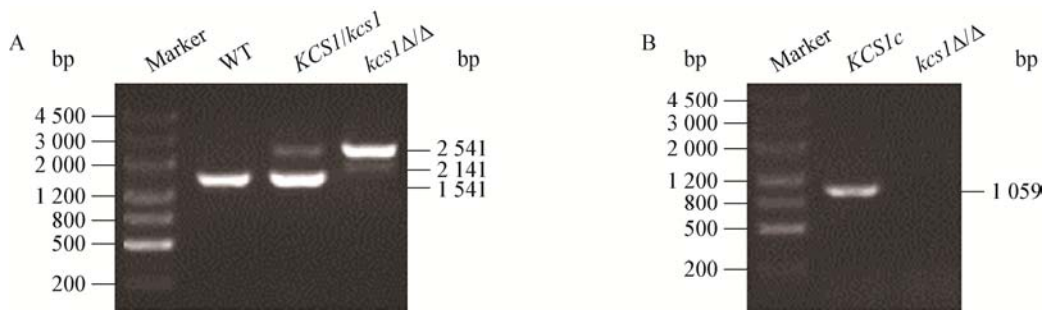


图2 白念珠菌 *KCS1* 基因缺失菌株及回补菌株的验证

Figure 2 PCR confirmation of *KCS1* deletion strain and reconstituted strain

注：A：*KCS1* 基因缺失菌株的验证，WT 代表野生型菌株，*KCS1/kcs1* 代表杂合子菌株，*kcs1Δ/Δ* 代表纯合子菌株。B：回补菌株 *KCS1c* 的验证，*KCS1c* 代表回补菌株，*kcs1Δ/Δ* 代表纯合子菌株。

Note: A: Confirmation of *KCS1* deletion strains. *KCS1/kcs1* indicates the heterozygous strain and *kcs1Δ/Δ* indicates the homozygous strain. B: Confirmation of the reconstituted strain *KCS1c*. *KCS1c* indicates the reconstituted strain and *kcs1Δ/Δ* indicates the homozygous strain.

2.3 *KCS1* 缺失对氮饥饿耐受能力的影响

氮源饥饿是触发白念珠菌自噬反应的重要因素之一，自噬功能缺陷会导致菌株氮饥饿耐受能力下降^[13]。为探索 Kcs1 在白念珠菌自噬过程中的作用，采用氮源饥饿培养基测定野生型菌株 WT、缺失菌株 *kcs1Δ/Δ* 及回补菌株 *KCS1c* 的氮饥饿耐受能力，以测定 Kcs1 是否参与白念珠菌自噬过程。在氮饥饿培养 3 d 后，对各菌株菌落形成单位 (CFU) 进行统计，CFU 下降说明氮饥饿耐受能力的降低，提示自噬过程的削弱。对各菌株的 CFU 进行统计学分析发现(图 3)，缺失菌株 *kcs1Δ/Δ* 表现为 CFU 数量显著下降，而野生型菌株 WT 及回补菌株 *KCS1c* 并无显著性差异，表明 *KCS1* 基因缺失导致氮饥饿耐受能力的明显降低，提示白念珠菌 Kcs1 在细胞自噬过程中扮演重要角色。

2.4 *KCS1* 缺失对自噬相关蛋白 Atg8 转运及降解的影响

Atg8 蛋白作为一种重要的自噬相关蛋白，在自噬体前体的形成及自噬体囊泡转运过程中发挥重要作用。当自噬激活后，该蛋白会从胞质转移至液泡，进而在液泡中实现降解^[14-15]。利用 GFP 标记 Atg8 蛋白，自噬发生时在液泡中能够观察到 GFP 荧光的积累。将自噬报告质粒 pAU34M-GFP-Atg8 转入 WT 菌株、缺失菌株 *kcs1Δ/Δ* 及回补菌株 *KCS1c* 中，测定 *KCS1* 缺失对 Atg8 转运及降解的

影响。

荧光观察结果表明：在氮饥饿诱导 4 h 后，野生型菌株 WT 及回补菌株 *KCS1c* 中的 GFP 荧光全部聚集于液泡内，说明二者均能正常进行 Atg8 从胞质向液泡的转运，细胞自噬过程激活。与此相比，缺失菌株 *kcs1Δ/Δ* 中的 GFP 荧光在液泡和胞质中均有分布，液泡聚集现象较少(图 4A 左)，说明 *kcs1Δ/Δ* 自噬过程缺陷。对液泡积累 GFP 的细胞数进行统计发现，*kcs1Δ/Δ* 菌株的液泡积累 GFP 的细胞数显著低于野生型菌株 WT 及回补菌株 *KCS1c* (图 4A 右)。表明在氮饥饿条件下，*KCS1* 缺失导致 GFP-Atg8 向液泡转运缺陷，细胞自噬过程受阻。

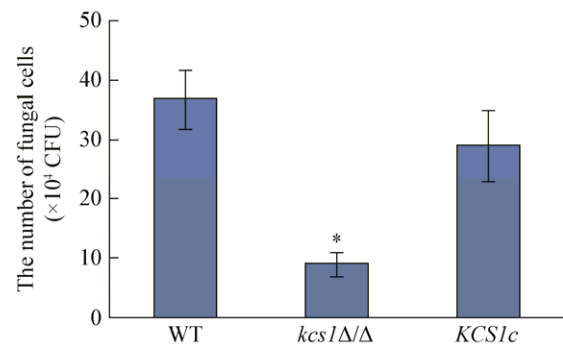


图3 *KCS1* 缺失对白念珠菌氮饥饿耐受能力的影响

Figure 3 Effect of *KCS1* deletion on tolerance of *C. albicans* to nitrogen starvation

注：*：与对照组相比较差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: *: There was significant different with control group ($P < 0.05$).

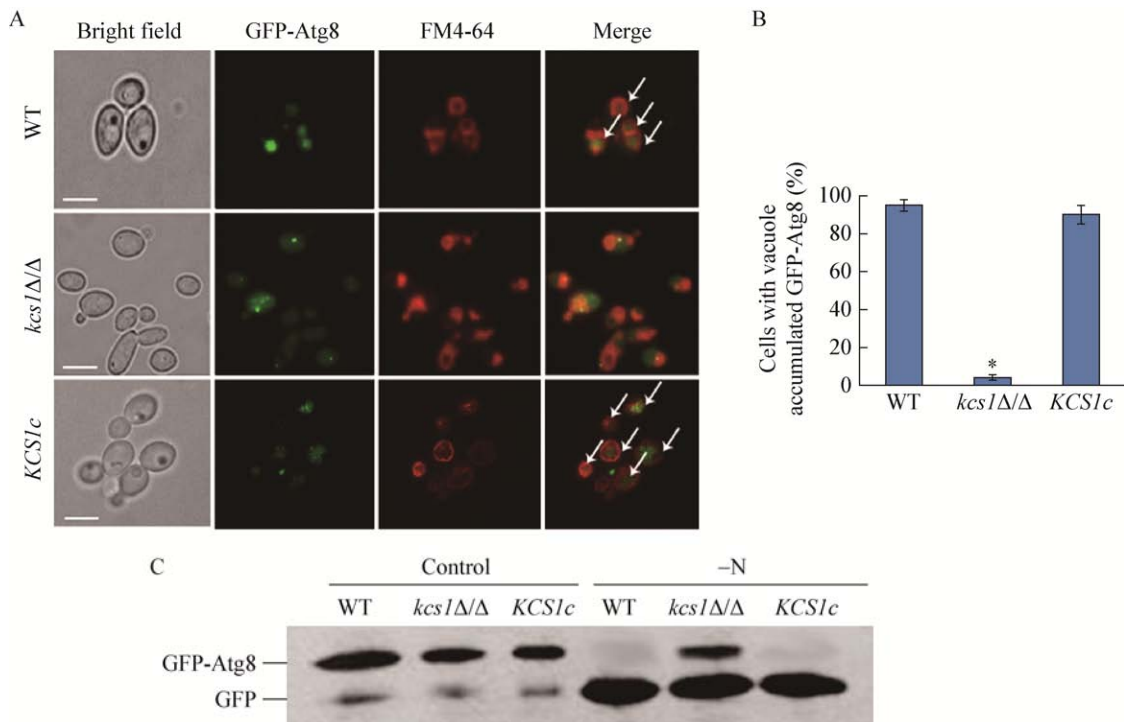


图 4 *KCS1* 缺失对氮饥饿条件下白念珠菌 Atg8 转运及降解的影响

Figure 4 Effect of *KCS1* deletion on cytoplasm-to-vacuole transport and degradation of Atg8

注：A：荧光观察 Atg8 从胞质向液泡的转运，箭头标注的为转运至液泡内的 GFP，比例尺为 5 μm；B：统计液泡中存在 GFP 积累的细胞比例，*表示与对照组相比较差异显著($P<0.05$)；C：Western blotting 检测 GFP-Atg8 降解情况。

Note: A: Cytoplasm-to-vacuole transport of Atg8. The white arrows (left images) indicate the cells with GFP-accumulating vacuoles; The statistic data of the cells with GFP-accumulating vacuoles are demonstrated in the right panel; *: There was significant different with control group ($P<0.05$); Bar=5 μm. B: Western blotting of GFP-Atg8 degradation; The intact GFP-Atg8 and the degraded GFP-Atg8 (GFP) were detected by GFP mono-antibody.

为了进一步证实 *KCS1* 缺失阻断 GFP-Atg8 向液泡转运的程度，采用 Western blotting 方法检测 GFP-Atg8 的降解情况。由图 4B 可知，在自噬并未发生激活的条件下(含氮培养基/Control)各菌株中 Atg8 仅发生较低程度的降解。在氮饥饿(-N)诱导 4 h 后，野生型菌株 WT 及回补菌株 *KCS1c* 中出现了 GFP 特异性条带积累，表明在氮饥饿条件下能够正常进行 Atg8 向液泡的转运并发生降解。然而，缺失菌株 *kcs1Δ/Δ* 同时存在特异性降解的 GFP 条带和未发生降解的 GFP-Atg8 条带，与荧光观察结果相符，表明氮饥饿条件下 *KCS1* 缺失导致了自噬过程在一定程度上的抑制。综上所述，自噬诱导条件下 *KCS1* 缺失部分抑制了自噬过程的发生，但并未导致自噬过程的完全阻断，说明 Kcs1 在白念珠菌自噬过程中发挥重要作用。

2.5 *KCS1* 缺失对白念珠菌菌丝发育能力的影响

白念珠菌具有两型性特征，即可在酵母型与菌丝型之间发生转换，其中菌丝型细胞与侵染宿主、逃避宿主免疫系统攻击等紧密相关，因而对于菌株毒力至关重要^[12]。为探究 *KCS1* 对白念珠菌菌丝形成能力的影响，采用 RPMI-1640 及 YPD+FBS 液体培养基测定野生型菌株 WT、缺失菌株 *kcs1Δ/Δ* 及回补菌株 *KCS1c* 的菌丝发育能力。如图 5 所示，在菌丝诱导培养 1 h 后，野生型菌株 WT 及回补菌株 *KCS1c* 均能形成正常的萌发管，而缺失菌株 *kcs1Δ/Δ* 则存在大量的酵母型细胞，仅有部分细胞形成萌发管并且明显较短。然而，随着菌丝诱导时间的延长 *kcs1Δ/Δ* 同样能够形成发育良好的菌丝。由此表明，*KCS1* 基因缺失导致菌丝发育迟缓，但并未引起菌丝发育能力的完全丧失。

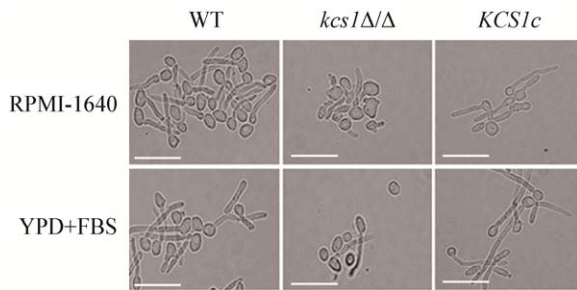


图5 *KCS1* 缺失对白念珠菌菌丝发育能力的影响
Figure 5 Effect of *KCS1* deletion on hyphal development in *C. albicans*
Note: Bar=20 μ m.

2.6 Kcs1 在白念珠菌与巨噬细胞相互作用中的功能

巨噬细胞是宿主体内一种重要的免疫细胞，能够通过吞噬作用进一步产生活性氧，抑制或杀死入侵的病原菌，参与先天性免疫和特异性免疫过程。将巨噬细胞与 WT、*kcs1* Δ/Δ 及 *KCS1c* 共同培养后，测定白念珠菌死亡情况及巨噬细胞损伤情况。白念珠菌死亡情况见图 6A，野生型菌株 WT 及回补菌株 *KCS1c* 仅有 10%–15% 细胞发生死亡，缺失菌株 *kcs1* Δ/Δ 约有 35% 的细胞死亡，死亡率明显上升。巨噬细胞损伤情况见图 6B，野生型菌株 WT 及回补菌株 *KCS1c* 引起 60% 以上的巨噬细胞损伤，而缺失菌株 *kcs1* Δ/Δ 仅引起 45% 左右的巨噬细胞受损。因此，*KCS1* 缺失导致白念珠菌对巨噬细胞的耐受能力及损伤巨噬细胞的能力下降。

2.7 Kcs1 在白念珠菌系统性感染过程中的作用

鉴于 Kcs1 在白念珠菌自噬、菌丝发育、压力耐受过程中均发挥重要作用，推测该蛋白可能与白念珠菌的系统性感染能力有关。采用小鼠系统性感染模型，测定各菌株的系统性感染能力(图 7)。野生型菌株 WT、回补菌株 *KCS1c* 与缺失菌株 *kcs1* Δ/Δ 感染小鼠能力并无差异，从感染第 2 天开始，陆续出现死亡现象，到第 16 天全部死亡。可见，*KCS1* 缺失并未导致菌株系统性感染能力下降，表明 Kcs1 并不是白念珠菌感染宿主所必需的蛋白。

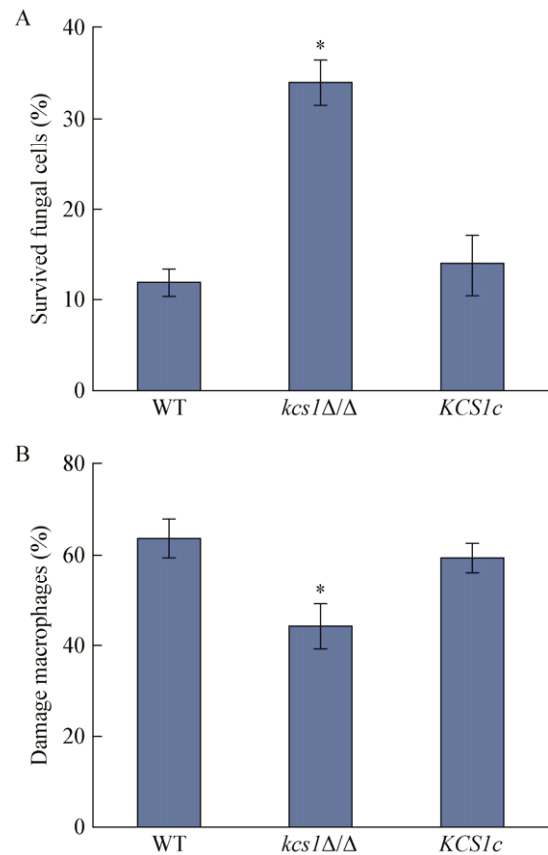


图6 *KCS1* 缺失对白念珠菌耐受巨噬细胞能力(A)及损伤巨噬细胞能力(B)的影响

Figure 6 Effect of *KCS1* deletion on the ability of *C. albicans* to tolerate macrophage attack (A) and to damage macrophages (B)

注：*：与对照组相比较差异显著($P < 0.05$)。

Note：*：There was significant different with control group ($P < 0.05$).

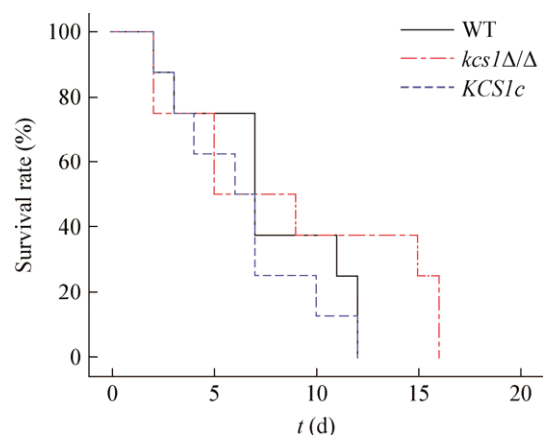


图7 *KCS1* 缺失对白念珠菌系统性感染能力的影响

Figure 7 Virulence assay of *C. albicans* strains *in vivo* experiments in mice

3 结论与讨论

当微生物细胞处于营养缺乏条件下时,为了给自己的生存提供必要的能量,会通过自噬过程消化分解自身体内无用或者有害的物质或者细胞器。氮饥饿被认为是自噬的触发条件之一。本研究结果显示,白念珠菌 *KCSI* 基因缺失后,白念珠菌对氮饥饿耐受能力显著降低,说明该基因缺失之后白念珠菌细胞不能正常发生自噬过程,导致其在氮饥饿情况下不能从自身获得足够的营养物质保证存活。在酿酒酵母中,作为编码肌醇多磷酸催化酶的基因,*KCSI* 基因缺失会减少自噬体的形成和自噬通量,而这两点又与细胞内吞噬泡装配位点(PAS)的数量减少和 PAS 的定位错误有关^[16]。本研究发现,氮饥饿情况下,*kcs1Δ/Δ* 菌株中 Atg8 蛋白由胞质向液泡的转运和降解受到阻碍,推测原因是 *KCSI* 基因的缺失导致 PAS 的数量减少和定位错误,进而影响 Atg 蛋白向液泡的转运和在 PAS 位点附近的聚集。Atg8 蛋白参与脂质膜的脂化过程,与磷脂酰乙醇胺(Phosphatidyl ethanolamine, PE)相结合时促进膜融合进而形成自噬体。在 *kcs1Δ/Δ* 菌株中,由于 Atg8 蛋白的异常定位,导致自噬前体无法提供足够的液泡曲率完成扩张,因而无法正常与自噬体囊泡融合,从而影响自噬的转运及降解过程。

酿酒酵母中的研究发现,*KCSI* 基因缺失会影响液泡延伸和营养物质运输。在本研究中,菌丝诱导实验发现,在菌丝诱导的前期阶段,*kcs1Δ/Δ* 菌株多为酵母型细胞,仅存在少量具萌发管的菌丝型细胞,但萌发管长度也明显短于野生型菌株,推测在 *KCSI* 基因缺失情况下白念珠菌液泡不能有序扩张,营养物质运输会部分阻断,导致了萌发管形成的迟滞,同时也说明肌醇多磷酸激酶与细胞的形态建成密切相关。

白念珠菌的毒力及侵袭性与菌株菌体形态、粘附力、磷脂酶活力、抗药性和表面抗体的抗吞噬作用均有密切关系^[17-18]。尽管 Kcs1 在细胞自噬、菌丝发育、巨噬细胞敏感性等方面发挥作用,但在系

统性感染小鼠实验中,我们发现 WT、*KCS1c* 与 *kcs1Δ/Δ* 菌株感染的小鼠具有相同的死亡速率,说明 *KCSI* 基因缺失并未影响白念珠菌系统性感染宿主的能力。造成这一现象的原因可能有以下几个方面:(1) 尽管体外试验证明 Kcs1 与细胞自噬有关,但白念珠菌进入宿主体内后并不需要承受极端的营养匮乏条件,因而自噬作用并非系统性感染的决定因素;(2) Kcs1 在菌丝发育的前期发挥作用,但并未阻断后续的菌丝发育过程,在系统性感染过程中,菌丝发育的滞后可能并不能对菌丝的侵染与定殖产生明显影响;(3) 虽然在与巨噬细胞的相互作用体外实验中,*KCSI* 基因缺失会减弱白念珠菌对巨噬细胞的侵染能力,但是当大量菌液直接注入宿主血液后,巨噬细胞所调控的免疫反应不足以抵抗系统性感染,即不足以改变宿主对外源真菌的感染速率,因而 *KCSI* 的敲除并未导致菌株系统性感染能力下降。

参考文献

- [1] Odds FC, Bernaerts RIA. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1994, 32(8): 1923-1929
- [2] Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2007, 20(1): 133-163
- [3] Perleth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment[J]. *Medical Mycology*, 2007, 45(4): 321-346
- [4] Koh AY, Köhler JR, Coggshall KT, et al. Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination[J]. *PLoS Pathogens*, 2008, 4: e35
- [5] Diekema DJ, Pfaller MA. Nosocomial candidemia: an ounce of prevention is better than a pound of cure[J]. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 2004, 25(8): 624-626
- [6] Munoz P, Burillo A, Bouza E. Criteria used when initiating antifungal therapy against *Candida* spp. in the intensive care unit[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2000, 15(2): 83-90
- [7] Saiardi A, Erdjument-Bromage H, Snowman AM, et al. Synthesis of diphosphoinositol pentakisphosphate by a newly identified family of higher inositol polyphosphate kinases[J]. *Current Biology*, 1999, 9(22): 1323-1326
- [8] Alcázar-Román AR, Tran EJ, Guo SG, et al. Inositol hexakisphosphate and Gle1 activate the DEAD-box protein Dbp5 for nuclear mRNA export[J]. *Nature Cell Biololgy* 2006, 8(7): 711-716

- [9] Wajszczuk CP, Dummer JS, Ho M, et al. Fungal infections in liver transplant recipients[J]. *Transplantation*, 1985, 40(4): 347-353
- [10] Niimi M, Nagai Y, Niimi K, et al. Identification of two proteins induced by exposure of the pathogenic fungus *Candida glabrata* to fluconazole[J]. *Journal of Chromatography B*, 2002, 782(1/2): 245-252
- [11] Taylor Jr R, Chen PH, Chou CC, et al. *KCSI* deletion in *Saccharomyces cerevisiae* leads to a defect in translocation of autophagic proteins and reduces autophagosome formation[J]. *Autophagy*, 2012, 8(9): 1300-1311
- [12] Yu Q, Wang H, Xu N, et al. Spf1 strongly influences calcium homeostasis, hyphal development, biofilm formation and virulence in *Candida albicans*[J]. *Microbiology*, 2012, 158(9): 2272-2282
- [13] Rabinowitz JD, White E. Autophagy and metabolism[J]. *Science*, 2010, 330(6009): 1344-1348
- [14] Xie ZP, Nair U, Klionsky DJ. Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2008, 19(8): 3290-3298
- [15] Shintani T, Klionsky DJ. Cargo proteins facilitate the formation of transport vesicles in the cytoplasm to vacuole targeting pathway[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(29): 29889-29894
- [16] He CC, Baba M, Cao Y, et al. Self-interaction is critical for Atg9 transport and function at the phagophore assembly site during autophagy[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2008, 19(12): 5506-5516
- [17] Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms[J]. *Virulence*, 2013, 4(2): 119-128
- [18] Höfs S, Mogavero S, Hube B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota[J]. *Journal of Microbiology*, 2016, 54(3): 149-169

书 讯

CNKI 推出《中国高被引图书年报》

中国知网(CNKI)中国科学文献计量评价研究中心推出了一套《中国高被引图书年报》,该报告基于中国大陆建国以来出版的 422 万余本图书被近 3 年国内期刊、博硕、会议论文的引用频次,分学科、分时段遴选高被引优秀学术图书予以发布。据研制方介绍,他们统计并分析了 2013-2015 年中国学术期刊 813 万余篇、中国博硕士学位论文 101 万余篇、中国重要会议论文 39 万余篇,累计引文达 1451 万条。根据统计数据,422 万本图书至少被引 1 次的图书达 72 万本。研制方根据中国图书馆分类法,将 72 万本图书划分为 105 个学科,分 1949-2009 年和 2010-2014 年两个时间段,分别遴选被引最高的 TOP 10% 图书,共计选出 70 911 本优秀图书收入《中国高被引图书年报》。统计数据显示,这 7 万本高被引优秀图书虽然只占全部图书的 1.68%,却获得 67.4% 的总被引频次,可见这些图书质量上乘,在同类图书中发挥了更加重要的作用。该报告还首次发布各学科“学科 h 指数”排名前 20 的出版单位的评价指标,对客观评价出版社的社会效益——特别是学术出版物的社会效益具有重要的参考价值。

该报告从图书被引用的角度出发,评价图书的学术影响力,弥补了以销量和借阅等指标无法准确评价学术图书的缺憾,科学、客观地评价了图书、图书作者以及出版单位对各学科发展的贡献。

《中国高被引图书年报》把建国以来出版图书全部纳入评价范围属国内首创,是全面、客观评价图书学术影响力的工具,定量评价图书学术水平,在帮助图书馆建设特色馆藏和提高服务水平、帮助出版管理部门了解我国学术出版物现状、帮助科研机构科研管理、帮助读者购买和阅读图书等方面,均具有较强的参考价值,也为出版社评估出版业绩、决策再版图书、策划学科选题提供有用的信息。

《中国高被引图书年报》由《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司出版。该产品的形式为光盘电子出版物,分为理学、工学、农学、医学、人文科学和社会科学 6 个分卷,随盘赠送图书,欢迎您咨询、订购。咨询电话:010-82710850/82895056 转 8599; E-mail: aspt@cnki.net