

· 论著 ·

# 反转录转座子 TCA4 与白念珠菌耐药性的研究

苗琦 张石群 曹永兵 姜远英

(中国人民解放军第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433)

**【摘要】** 目的 研究高温刺激下白念珠菌中反转录转座子的表达情况与耐药性产生的关系, 探寻白念珠菌耐药的分子机制。方法 微量液基稀释法测定氟康唑对高温诱导的白念珠菌的最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC); 斑点法 (spot assay) 考察诱导菌株对药物的耐受能力; 实时定量 PCR (RT-PCR) 方法检测诱导菌株中反转录转座子 TCA4 中开放阅读框的表达水平。结果 长期高温刺激能降低白念珠菌对氟康唑 (16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的耐受能力; 高温诱导菌株中反转录转座子 TCA4 中 Orf19.2668 和 Orf19.2669 的表达水平相比于亲本菌 ATCC10231 发生高表达。结论 高温刺激能使反转录转座子 TCA4 发生转座激活, 反转录转座子 TCA4 的转座激活与白念珠菌耐药性形成相关, 与此同时可能还有其他机制参与白念珠菌耐药性的形成。

**【关键词】** 白念珠菌; 温度; 反转录转座子; 耐药性

**【中图分类号】** R 379.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-3827(2012)07-0261-04

## Analysis of relationship of retrotransposon TCA4 and drug resistance of *Candida albicans*

MIAO Qi, ZHANG Shi-qun, CAO Yong-bing, JIANG Yuan-ying

(Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**【Abstract】 Objective** To study the relationship between expression of retrotransposon TCA4 stimulated by high temperature (37°C) and resistance in *Candida albicans* strains, to explore the molecular mechanisms of drug-resistance in *Candida albicans*.

**Methods** The minimal inhibitory concentrations (MICs) of stimulated *Candida albicans* strains to fluconazole were determined by broth microdilution method. Spot assay was performed to compare the resistance to miconazole and  $\text{H}_2\text{O}_2$  between wild type and derivative strains. The total RNA of wild type and derivative strains were extracted, and the expression of the retrotransposon TCA4's ORFs (Orf19.2668 and Orf19.2669) were examined by real-time RT-PCR. **Results** Long-term exposure to high temperature enhanced the susceptible of *Candida albicans* to miconazole (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5 mmol/L); The incidences of Orf19.2668 and Orf19.2669 overexpression in strains induced by high temperature were significantly higher than those in parental strains ATCC-10231. **Conclusion** Fluconazole-resistance in *Candida albicans* strains is related to the transposition of retrotransposons TCA4. At the same time there may be other mechanisms involved in the formation of drug resistance in *Candida albicans* strains.

**【Key words】** *Candida albicans*; miconazole; retrotransposon; fungal drug resistance

[Chin J Mycol 2012, 7(5): 261-264]

随着癌症放疗、化疗、器官移植、艾滋病患者的增加, 广谱抗生素、免疫抑制剂的长期广泛应用, 深部真菌感染已逐渐成为一种常见病、多发病, 并已成为这些免疫功能低下人群死亡的主要原因。在深部真菌感染中, 念珠菌是最常见的病原菌<sup>[1]</sup>, 而

且由于临床可用的抗真菌药物有限, 真菌耐药现象日益严重, 成为临床治疗失败的主要原因。

在玉米、小麦、小鼠、人类的基因组中, 反转录转座子分别占 78%、68%、52% 和 45%, 通常情况下被严格控制<sup>[2]</sup>。研究表明, 反转录转座子在很大程度上是侵略性的, 会导致基因的失活和基因组的不稳定因组的组分, 进化成启动子、增强子或者沉默子, 从而调节相关基因的表达<sup>[3]</sup>。所有的真核生物中的一个普遍生物学现象, 就是生物和非生物胁迫可激活反转录转座子的活性, 介导物种

基金项目: 国家自然科学基金 (81173100)

作者简介: 苗琦, 女 (汉族), 硕士研究生在读。E-mail: miaoqi1986@126.com

通讯作者: 姜远英, E-mail: jiangyy@smmu.edu.cn; 曹永兵, E-mail: ybcao@vip.sina.com

的快速适应。例如植物在环境胁迫情况下,可激活反转录转座子,从而调节植物抗逆相关基因的表达。因此转座是植物自我保护的一种反应<sup>[4]</sup>。细菌的反转录转座子可以介导耐药性的形成,并通过反转录转座子的水平转移和克隆播散方式传播多种耐药基因,是导致细菌耐药菌株增多的重要因素。例如转座子 Tn 除了携带与转座有关的基因外,还携带有耐药基因的一段可移动 DNA 序列。Tn 在同一细胞的染色体与质粒间跳跃移动,可使耐药基因大量增加,产生耐药。Tn916 样接合转座子就是散播 tetM 基因介导的四环素、米诺环素耐药的重要载体<sup>[5]</sup>;复合型转座子 Tn5385 则介导了链霉素、四环素、庆大霉素、红霉素等耐药性<sup>[6]</sup>。而酿酒酵母的反转录转座子 Ty1 在通常情况下也是沉默的,但在胁迫条件下可被激活并转座。这些胁迫包括:紫外照射、X-光辐射、氮饥饿、低温刺激<sup>[7]</sup>以及腺嘌呤饥饿<sup>[8]</sup>。

本研究目的在于研究高温诱导白念珠菌中反转录转座子 TCA4 的表达情况与其耐药性产生的关系。采用 spot assay 考察高温诱导菌株对药物的耐受能力,并用实时定量 PCR 方法检测诱导菌株中反转录转座子 TCA4 的表达水平与氟康唑耐药的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验菌株与药敏检测

白念珠菌 (*Candida albicans*) ATCC-10231 由第二军医大学长征医院菌种保存中心馈赠。参照美国临床实验室标准化协会 (CLSI) 推荐的 M27-A 微量液基稀释法测定实验菌株对氟康唑的敏感性。

### 1.2 培养基

沙堡葡萄糖琼脂培养基 (SDA): 蛋白胨 10 g, 葡萄糖 40 g, 琼脂 18 g, 加三蒸水 900 mL 溶解, 加入 2 mg/mL 氯霉素水溶液 50 mL, 调整 pH 至 7.0, 定容至 1 000 mL, 高压灭菌 4°C 保存。YEPD 培养液: 酵母浸膏 10 g, 蛋白胨 20 g, 葡萄糖 20 g, 加三蒸水 900 mL 溶解, 定容至 1 000 mL, 高压灭菌 4°C 保存。

### 1.3 主要试剂

30% 过氧化氢 (国药集团化学试剂有限公司) 咪康唑 (miconazole, MCZ, Sigma), 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 为国产分析纯, 用前重蒸。真菌 RNAout 试剂盒 (北京天恩泽基因科技

有限公司), 柱式 RNA clean 试剂盒 (北京天恩泽基因科技有限公司), 实时定量 PCR 所用试剂均购自 TaKaRa 公司: DNaseI (RNase Free) (CodeNo. D2215), Reverse Transcriptase XL (AMV) (CodeNo. D2620), Ribonuclease Inhibitor (CodeNo. D2310A), Random Primer (6mer) (CodeNo. D3801), dNTP Mixture (CodeNo. D4030A); SYBR-GreenI Premix Ex Taq (CodeNo. DRR041); 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.4 仪器与装置

T-gradient PCR 仪、荧光定量 real-time PCR 仪 (Bio-Rad); Multiskan MK3 型酶标检测仪 (Lab-systems); MJX 型智能霉菌培养箱 (宁波江南仪器厂制造); Eppendorf 5417R 高速冷冻离心机 (Eppendorf); 紫外分光光度计 (Unico UV-2000 Spectrophotometer)。

### 1.5 高温诱导子代的获取

在 YEPD 固体培养基中平行选取亲本菌株 ATCC-10231 中的三个单克隆, 分别转移到 1 mL 新鲜的 YEPD 培养液中于 37°C 培养 16 h, 以后每次传代均从上代培养液中取 10  $\mu$ L 转移到 1 mL 新鲜的 YEPD 培养液中 37°C 培养得到子代, 共传 24 代得到子代 ATCC-10231-37°C。

### 1.6 spot assay 实验

首先浇铸含药的 SDA 平板: 将配置的 SDA 高压灭菌 (121°C, 15 min), 待培养基冷却至不烫手后加入药物, 使最终溶液的浓度达到咪康唑 (MCZ) 2  $\mu$ g/mL, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mmol/L, 彻底混匀后倒入无菌的平皿上, 静至冷却。将白念珠菌 ATCC-10231 和 ATCC-10231-37°C 在 YEPD 培养液中分别连续 2 次活化 16 h 达到对数生长期后期, 3 000  $\times$  g 离心 5 min 用 1 mol/L PBS 洗 2 次, 血细胞计数板计数, 用 YEPD 培养基调整菌液浓度为 1  $\times$  10<sup>7</sup> cells/mL, 10 倍倍比稀释得到 5 个密度梯度, 即 1  $\times$  10<sup>7</sup> cells/mL, 1  $\times$  10<sup>6</sup> cells/mL, 1  $\times$  10<sup>5</sup> cells/mL, 1  $\times$  10<sup>4</sup> cells/mL, 1  $\times$  10<sup>3</sup> cells/mL, 取 4  $\mu$ L 菌液点在含药平板上, 于 30°C 静置培养 48 h, 观察菌在平板上的生长情况并拍照记录实验结果。

### 1.7 生长曲线实验

将白念珠菌 ATCC-10231 和 ATCC-10231-37°C 以 1: 100 接种至 1 mL YEPD 培养液, 于 30°C 200 r/min 振荡培养 16 h, 活化两次, 使真菌处于指数生长期后期。取该菌液至 YEPD 培养液中, 用上述方

法再次活化 16 h 后,以紫外分光光度计 600 nm 测菌液 OD 值,以 YEPD 培养液稀释并调整菌液浓度至 OD 值为 0.1。分别于 100 mL 上述菌液中加入氟康唑 16 g/mL,空白对照加入相同体积的 DMSO,所有菌液中 DMSO 含量均低于 0.5%。于 30℃ 孵箱中,以 200 r/min 振荡培养,分别于 0、2、4、6、8、20、24 和 30 h,各样品分别取 100 μL 液体,以紫外分光光度计 600 nm 测菌液 OD 值,以 OD 值确定其菌生长浓度的变化。

### 1.8 实时定量 PCR 对反转录转座子 TCA4 中 ORF 表达水平的考察

采用真菌 RNAout 试剂盒(北京天恩泽基因科技有限公司)进行总 RNA 抽提,用 DNA 酶去除基因组 DNA 污染后利用紫外分光光度仪检测 RNA 的纯度和浓度,使其 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值应大于 1.8 小于 2.1,并对 RNA 进行定量。

RNA 反转录为 cDNA 按体系配制反转录混合反应液 5 × PrimeScript Buffer (4 μL)、Enzyme MixI (1 μL)、Oligo (dT) Primer (1 μL)、Random 6 mers (1 μL)、RNA (1 μg)、RNase Free dH<sub>2</sub>O (终体积为 20 μL)。混匀后按如下条件进行反转录合成 37℃ 15 min 85℃ 5 s 4℃ 暂存。反应液配制在冰上操作,所用枪头及 PCR 管均在实验前用焦碳酸二乙酯(DEPC 水)进行去 RNA 酶处理。

RT-PCR 反应 目的基因引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,其序列见表 1。按照以下体系冰上配置 RT-PCR 反应液: 2 × SYBR Premix Ex Taq II (10 μL)、Primer FWD (0.5 μL)、Primer RV (0.5 μL)、模板 cDNA (2 μL)、ddH<sub>2</sub>O (7 μL)。混匀后按如下条件进行 RT-PCR 反应: 95℃ 1 min; 95℃ 10 s 60℃ 20 s 72℃ 30 s 40 个循环。记录反应终止循环阈值(cycle threshold, Ct),

用内参 18SrRNA 的 Ct 值校正目的基因 Ct 值,得到 ΔCt,比较实验组和对照组的 ΔCt 得到 ΔΔCt,基因表达量比值(实验组/对照组) = 2<sup>-ΔΔCt</sup>。

### 1.9 统计学处理

实时定量 RT-PCR 获得的是每个基因的 Ct 值,通过 18SrRNA 内参校正获得 ΔCt [ΔCt = Ct (目的基因) - Ct (18SrRNA)],再通过与参照菌株 ATCC-10231 相比获得 ΔΔCt [ΔΔCt = ΔCt (实验菌株) - ΔCt (参照菌株)],用 Ratio 值(实验菌株与 ATCC-10231 菌株相比基因表达情况)表示基因表达水平,Ratio 值 = 2<sup>-ΔΔCt</sup>,以 Ratio 值 > 2 代表与 ATCC-10231 基因表达情况相比,基因发生高表达。实时定量 PCR 进行 3 次独立重复实验,所得 Ratio 以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,统计反转录转座子 TCA4 中 ORF 高表达。

## 2 结 果

### 2.1 药物敏感性实验

通过微量液基稀释法发现:亲本菌 ATCC-10231 对氟康唑的 MIC<sub>80</sub> = 0.5 μg/mL,高温诱导菌株 ATCC-10231-37℃ 的 MIC<sub>80</sub> ≤ 0.125 μg/mL。

### 2.2 spot assay 实验

经过高温连续诱导的白念珠菌对氟康唑的耐受能力明显降低。与亲本菌 ATCC-10231 相比,长期高温刺激后的 ATCC-10231-37℃ 对咪康唑(2 μg/mL)和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(5 mmol/L) 都更加敏感,而在空白 YEPD 培养基上生长状况没有差别(见图 1)。

### 2.3 YEPD 培养液中生长曲线实验

结果显示 16 μg/mL 氟康唑 24 h 内对 ATCC-10231-37℃ 的抑制作用明显高于对 ATCC-10231 的抑制作用。进一步证明与亲本菌 ATCC-10231 相比,长期高温刺激后的 ATCC-10231-37℃ 对药物变得更加敏感(见图 2)。

### 2.4 TCA4 中 Orf19.2668 和 Orf19.2669 的表达水平测定

根据实时定量 RT-PCR 实验获得 Ct 值和计算获得的 Ratio 值:高温诱导菌株 ATCC-10231-37℃ 中反转录转座子 TCA4 的开放阅读框 Orf19.2668 和 Orf19.2669 与亲本菌 ATCC-10231 相比均发生高表达(见图 3)。

## 3 讨 论

在深部真菌感染中,白念珠菌易于感染,难以

表 1 所用引物的名称和序列

Tab.1 Primer sequences used in this study

引物名称	引物序列 (5'→3')
1 18SrRNA-F	TCTTTCTTGATTTTGTGGGTGG
18SrRNA-R	TCGATAGTCCCTCTAAGAAGTG
2 Orf19.2668-F	TTCTCGTTAGCGGTGTCTC
Orf19.2668-R	TGTCATACTATCTGGCAAT
3 Orf19.2669-F	TCTCGGTTACGGCTCAG
Orf19.2669-R	GTCCGAATCATTGGGTG

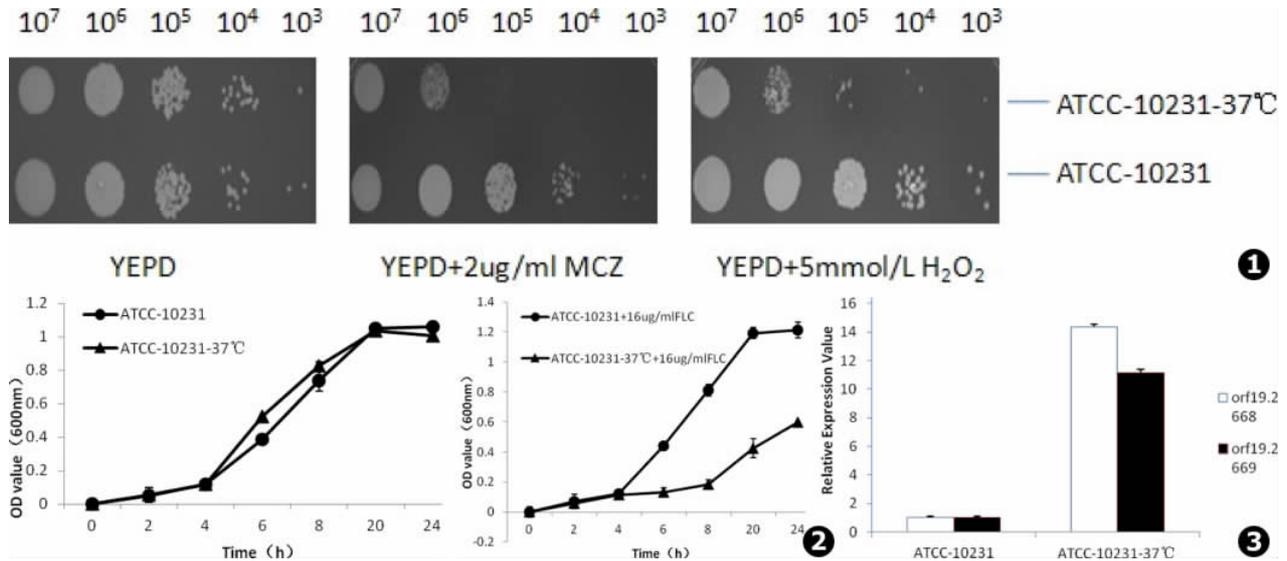


图 1 点板实验结果 图 2 生长曲线实验结果 图 3 ATCC-10231-37°C 与 ATCC-10231 中反转录转座子 TCA4 中两个 ORF 的表达情况  
**Fig. 1** Results of spot assay. Each strain was grown from D600 = 0.1 until D600 = 0.1 = 1.0  $\mu$ L of each dilution was spotted onto YEPD-agar plates supplemented with drugs. Plate were incubated for 48 h at 30°C **Fig. 2** Growth curves of fluconazole ( FLC) against *C. albicans* ATCC-10231 and ATCC-10231-37°C **Fig. 3** Relative expression values of retrotransposon TCA4 s ORFs ( Orf19. 2668 or Orf19. 2669) in the high temperature induced strains and the wild type strsin. 18S rRNA was used as the internal control.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

防治的关键原因是其具有高适应性的特点。所有真核生物中的一个普遍生物学现象就是生物和非生物胁迫可激活反转录转座子的活性,介导物种的快速适应。据文献报道,反转录转座子 TCA1<sup>[9]</sup>, TCA2<sup>[10]</sup>, TCA5<sup>[11]</sup> 以及非 LTR 反转录转座子 ZORRO 元件 (ZORRO2 和 ZORRO3)<sup>[12]</sup> 都是具有转座活性的反转录转座子。从生物进化角度来说,反转录转座子可以动态改变基因组结构及功能,会使细胞积累一些变异,从而改变细胞在新生存环境中的存活能力。

本研究通过微量液基稀释法、spot assay 实验以及对氟康唑的生长曲线实验均发现与亲本菌 ATCC-10231 相比,高温长期诱导菌株 ATCC-10231-37°C 对抗真菌药物敏感性明显降低,说明高温是调控白念珠菌对环境胁迫产生适应性,介导菌株对药物敏感性改变的原因之一。在此基础上,采用实时定量 RT-PCR 方法检测白念珠菌敏感株 ATCC-10231 及其诱导菌株 ATCC-10231-37°C 中反转录转座子 TCA4 中两个具有编码蛋白功能的开放阅读框 Orf19.2668 和 Orf19.2669 的表达水平,发现 ATCC-10231-37°C 中 TCA4 的两个开放阅读框表达量相对于亲本菌的有明显升高,说明高温刺激改变了白念珠菌反转录转座子 TCA4 的活性,其

RNA 拷贝数的显著性差异证明了 TCA4 是依赖于温度的反转录转座子。Holton 等<sup>[10]</sup> 的研究表明,反转录转座子 TCA2 在高温诱导的条件下转座发生率明显升高,表达量升高。而与此相反,TCA1<sup>[9]</sup> 却是在低温诱导的条件下转座发生率更高。由此我们推测,生存温度改变是导致 TCA4 转座激活,进而造成 ATCC-10231-37°C 较亲本菌对抗真菌药物敏感的因素之一。

因为白念珠菌耐药现象的产生是多机制共同作用的结果,包括外排泵蛋白高表达,药物作用靶酶高表达或变异,生物被膜产生等,反转录转座子转座激活也是白念珠菌耐药机制之一。本研究探讨反转录转座子对白念珠菌耐药性形成的调控作用及其机制,发现白念珠菌 ATCC-10231 在高温的刺激下通过改变反转录转座子 TCA4 的活性来调控白念珠菌对氟康唑的适应性。不仅有助于阐明白念珠菌耐药性形成新机制,也为进一步研究反转录转座子对白念珠菌其他适应性的调控作用,以及研究其在白念珠菌中更广泛的生物活性奠定工作基础。

参考文献

[1] 廖万清,顾菊林.深部真菌感染治疗的现状与对策[J].中国感染与化疗杂志,2007 9: 101-103. (下转第 283 页)

素治疗继发真菌感染的独立危险因素,这可能与本组研究病例数较少有关。有作者对 82 例初发的大疱性类天疱疮研究发现外周血嗜酸性粒细胞水平和糖皮质激素治疗的最大剂量线性相关 ( $r = 0.496, P < 0.001$ )<sup>[7]</sup>。该结果可作为确定大疱性类天疱疮患者糖皮质激素治疗剂量的参考依据。大疱性疾病患者早期应用免疫抑制剂有助于激素减量及减少激素不良反应,但免疫抑制剂本身可导致机体免疫低下而增加真菌感染机会。因此,对该类患者选择联合免疫抑制剂治疗应严格掌握指征,降低继发感染风险。血糖升高,尤其是糖尿病患者,也是糖皮质激素治疗继发真菌感染的重要危险因素。由于其自身免疫损伤与紊乱及机体内高糖环境均利于真菌繁殖,从而增加机会真菌感染机会。本组 105 例患者中血糖升高或糖尿病例数达 38 例,其真菌感染 23 例,感染率达 60.53%。因此,对于合并糖尿病的大疱性疾病患者,在使用激素治疗前应严格控制血糖水平,严格掌握激素使用剂量及时间。另外,其他慢性合并症及住院时间延长,机会性真菌感染升高<sup>[4]</sup>。

在大疱性皮肤病患者治疗过程中,糖皮质激素治疗诱发真菌感染已成为不容忽视的问题。在积极治疗原发病基础上应合理应用糖皮质激素、免疫抑制剂及抗生素,同时加强支持治疗,以提高机体

免疫功能,加强创面及口腔护理,如出现真菌感染需根据药敏试验选择合适的抗真菌药物治疗。这对防治医院真菌感染的发生、发展具有重要意义。

#### 参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 医院感染诊断标准(试行方案)[J]. 中华医学杂志, 2001, 81(5): 314-320.
- [2] Kirtsehig G, Khumalo NP. Management of bullous pemphigoid [J]. Am J Clin Dermatol, 2004, 5(5): 319-326.
- [3] 黄承乐, 班副植, 丁凯宏. 医院真菌感染现状分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(1): 188-189.
- [4] 冯文莉, 杨静, 奚志琴, 等. 住院患者侵袭性真菌感染的危险因素研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(10): 1393-1396.
- [5] Scott LJ, Simpson D. Voriconazole: a review of its use in the management of invasive fungal infections [J]. Drugs, 2007, 67(2): 269-298.
- [6] 曹美田. 2007-2009 年临床应用抗菌药物继发真菌感染调查分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(13): 2790-2791.
- [7] Ya-Gang Z, Bing L, Li L, et al. Correlation between blood eosinophil level and steroid doses in patients with bullous pemphigoid [J]. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao, 2012, 34(2): 130-133.

[收稿日期] 2012-05-26

[本文编辑] 卫凤莲

(上接第 264 页)

- [2] Moore JK, Haber JE. Capture of retrotransposon DNA at the sites of chromosomal double-strand breaks [J]. Nature, 1996, 383(6601): 644-646.
- [3] Brosius J. RNAs from all categories generate retrosequences that may be exapted as novel genes or regulatory elements [J]. Gene, 1999, 238(1): 115-134.
- [4] Kimura Y, Tosa Y, Shimada S, et al. OARE-1, a Ty1-copia retrotransposon in oat activated by abiotic and biotic stresses [J]. Plant Cell Physiol, 2001, 42(12): 1345-1354.
- [5] Rice LB. Tn916 family conjugative transposons and dissemination of antimicrobial resistance determinants [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42(8): 1871-1877.
- [6] Rice LB, Carias LL. Transfer of Tn5385, a composite, multiresistance chromosomal element from *Enterococcus faecalis* [J]. J Bacteriol, 1998, 180(3): 714-721.
- [7] Stamenova R, Dimitrov M, Stoycheva T, et al. Transposition of *Saccharomyces cerevisiae* Ty1 retrotransposon is activated by improper cryopreservation [J]. Cryobiology, 2008, 56(3): 241-247.
- [8] Todeschini AL, Morillon A, Springer M, et al. Severe adenine starvation activates Ty1 transcription and retrotransposition in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(17): 7459-7472.
- [9] Chen JY, Fonzi WA. A temperature-regulated, retrotransposon-like element from *Candida albicans* [J]. J Bacteriol, 1992, 174(17): 5624-5632.
- [10] Holton NJ, Goodwin TJ, Butler MI, et al. An active retrotransposon in *Candida albicans* [J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(19): 4014-4024.
- [11] Plant EP, Goodwin TJ, Poulter RT. Tca5, a Ty5-like retrotransposon from *Candida albicans* [J]. Yeast, 2000, 16(16): 1509-1518.
- [12] Goodwin TJ, Ormandy JE, Poulter RT. Ll1-like non-LTR retrotransposons in the yeast *Candida albicans* [J]. Curr Genet, 2001, 39(2): 83-91.

[收稿日期] 2012-06-11

[本文编辑] 王 飞