

香莲外洗液逆转白念珠菌耐药的转录组学研究

王 平¹ 樊志奇² 范瑞强³

摘要 目的 对香莲外洗液诱导白念珠菌标准耐药菌株恢复对氟康唑敏感前后的差异基因进行转录组学研究。**方法** 采用微量肉汤稀释法测定白念珠菌标准耐药菌株最低抑菌浓度值(minimal inhibitory concentration, MIC), 观察香莲外洗液诱导下白念珠菌标准耐药菌株恢复对氟康唑敏感所需的代数; 通过转录组测序(RNA-Seq)测定和比较原代耐药株、香莲外洗液诱导下恢复敏感株的转录组情况; 应用基因本体(gene ontology, GO)方法分析香莲外洗液诱导下恢复敏感菌株的差异表达基因。**结果** 香莲外洗液诱导下的耐药白念珠菌转种至第 6 代时恢复对氟康唑的敏感性。转录组测序表明, 对比原代耐药株, 香莲外洗液诱导下恢复敏感株有 165 个基因 RPKM(reads per kilo bases per million reads)指标表达上调, 144 个基因 RPKM 指标表达下调。GO 分析发现: 上下调基因主要归类于 GO:0015903(fluconazole transport)。**结论** 香莲外洗液可诱导耐药白念珠菌恢复对氟康唑的敏感性, 推测可能与开启氟康唑转运通路有关。

关键词 香莲外洗液; 白念珠菌; 氟康唑; 转录组测序; 基因本体分析

Xianglian External Lotion Restored the Sensitivity of Drug-resistant *Candida albicans* Strains to Fluconazole: a Transcriptomics Study WANG Ping¹, FAN Zhi-qi², and FAN Rui-qiang³ 1 Medical College of Shanxi Datong University, Shanxi (037000); 2 Department of Acupuncture and Massage, Fudan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangdong (518034); 3 Department of Dermatology, Guangdong Provincial Hospital of TCM, Guangzhou (510120)

ABSTRACT Objective To perform a transcriptomics study in differential genes after Xianglian External Lotion (XEL) induced the recovery of drug-resistant *Candida albicans* strains sensitive to Fluconazole. **Methods** Broth microdilution antifungal susceptibility test was used to detect minimal inhibitory concentration (MIC) of drug-resistant *Candida albicans* strains induced by XEL. Transcriptome sequencing (RNA-Seq) was used to determine and compare the transcription of primary drug-resistant *Candida albicans* strains and sensitive strains induced by XEL. High expressed genes and signaling pathways strains were analyzed by gene ontology (GO) method. **Results** XEL could induce drug-resistant strains of the 6th generations to recover sensitivity. Transcriptome sequencing showed that, as compared with primary drug-resistant strains, there were 165 genes with up-regulated RPKM index and 144 genes with down-regulated RPKM index after XEL induction. GO analyses found that all genes were mainly classified as GO:0015903 (fluconazole transport). **Conclusions** XEL could induce the recovery of drug-resistant *Candida albicans* strains sensitive to Fluconazole. By analyzing transcriptomes, authors speculated that XEL could recover strain sensitivity to fluconazole by opening fluconazole transport pathway.

KEYWORDS Xianglian External Lotion; *Candida albicans*; Fluconazole; Gene Ontology

氟康唑作为一种主要的抗真菌药物, 临床上常被用于真菌性疾病的治疗, 然而氟康唑的长期大量使用

使真菌尤其是白念珠菌对唑类药物的耐药性问题日益突出^[1]。由广东省中医院皮肤科范瑞强教授的经验方香莲方配制的香莲外洗液在治疗真菌感染性皮肤黏膜疾病方面取得了较好的临床疗效^[2-4]。张文等^[5]通过实验研究发现, 香莲外洗液可诱导耐药白念珠菌标准株恢复对氟康唑的敏感性。香莲外洗液组成为: 丁香、黄连、龙胆草、藿香、百部、明矾、冰片及薄荷脑。本研究对氟康唑耐药标准株及经香莲外洗液诱导后, 恢复对氟康唑敏感性的菌株分别进行转录组测序, 并

基金项目: 国家科技部“十一五”国家科技支撑计划资助项目(No. 2008BAI53B041)

作者单位: 1. 山西大同大学医学院(山西 037000); 2. 广东省深圳市福田区中医院康复针灸推拿科(广东 518034); 3. 广东省中医院皮肤科(广州 510120)

通讯作者: 范瑞强, Tel: 18903526366, E-mail: 1610392611@qq.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2015. 12. 1505

加以分析,以明确差异基因,进而探讨香莲外洗液的作用机制。

材料与方法

1 菌株 白念珠菌标准耐药菌株 CA17 由暨南大学附属第一医院张宏教授赠予;质量控制菌株克柔念珠菌 ATCC6258 由第二军医大学赠予。

2 药物 香莲外洗液(120 mL/瓶),为广东省中医院院内制剂,含生药浓度 100%,批号:120308。使用前过滤除渣,其原液浓度为 1 000 mg/mL;氟康唑原药粉末(购自武汉圣天宇科技有限公司,批号:20110707,纯度 99.75%)^[6]。

3 试剂与仪器 RPMI-1640 培养液、萨保罗培养基、科玛嘉念珠菌显色培养基、96 孔 U 型塑料板(均购自广州迪景微生物科技有限公司),Ion Torrent PGM 测序仪(ABI 公司),Ion OneTouch 模板制备仪(ABI 公司),Quibit RNA/DNA 浓度测量仪(Invitrogen 公司),核酸电泳仪(北京六一仪器厂)。

4 原代白念珠菌标准耐药菌株最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)值测定 采用微量肉汤稀释法测定白念珠菌标准耐药菌株的 MIC 值, MIC > 128 μ g/mL 为对氟康唑耐药菌株。

5 香莲外洗液诱导体外耐药标准菌株恢复敏感性 将白念珠菌标准耐药菌株 CA17 在含香莲外洗液(浓度为 0.244 2 ~ 250 mg/mL)的 RPMI-1640 培养液中连续培养 48 h,之后转种至萨保罗培养基,转种下一代。按照美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)提出的标准 M27-A3 方案,采用微量肉汤稀释法^[6]测定原代及每一代转种菌株的 MIC 值,每一代的 MIC 值为下一代的诱导浓度。MIC $\leq$ 8 μ g/mL 为对氟康唑敏感菌株。

6 白念珠菌 RNA 的抽提的质控 经玻璃珠振荡法、lyticase 法去除真菌细胞壁后,采用 Ambion 的 RNA 抽提试剂盒抽提 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm 的样品的 RNA。采用紫外分光光度计测量抽提所得样品 RNA 在 260 nm 和 280 nm 处的 OD 值。经测量样品 A_{260}/A_{280} 值为 1.86,表明所得 RNA 纯度较高,无 DNA 及蛋白质污染。通过 Quibit 定量测定浓度,之后取 1 mg RNA,采用 Ambion 的 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA,并通过 Ion torrent RNA 文库构建试剂盒制备 200 bp 测序文库。

7 白念珠菌转录组测序及分析 应用 Ion Torrent PGM 测序仪进行高通量测序,并获得 fastq 格式的测序文件。采用 fastQC 软件对测序的 fastq 文件

进行质控和分析,应用 Tophat/Bowtie 软件将测序的文件比对到参考基因组,并计算 RPKM 值。RPKM 为每 1 百万个 map 上的 reads 中 map 到外显子的每 1K 个碱基上的 reads 个数,是转录组测序定量基因表达的指标。每个基因的表达均有对应的 RPKM 值。由于在细胞中基因有可能不表达,从而使得 RPKM 为 0。通过比较 RPKM + 1 值以确定基因的表达差异。不同样本间 RPKM + 1 比值 > 2 表示基因的特异高表达, < 0.5 表示基因的特异低表达。基因组测序文件来源 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Candida+albicans>。采用 Cufflinks 软件对转录组数据进行分析,提取 RPKM 差异表达的基因,将差异表达基因列表用 AmiGO 网站进行基因本体(gene ontology, GO)分析。利用 David 数据库(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)对差异表达基因进行信号通路 pathway 分析。

结 果

1 质控及氟康唑对原代菌株的 MIC 值、香莲外洗液诱导下耐药菌株恢复对氟康唑敏感性的结果 质控菌株 ATCC6528 的 MIC 结果符合 CLSI 的标准,表明实验条件等在控;氟康唑对原代菌株的 MIC 值为 128 μ g/mL,表明原代菌株为氟康唑耐药菌株;在香莲外洗液的诱导下,原代耐药菌株转种至第 6 代恢复了对氟康唑的敏感性(MIC 为 8 μ g/mL)。

2 原代耐药菌株、香莲外洗液诱导下恢复敏感菌株的转录组测序比较(图 1) 图 1 坐标为 $\log_2$ (RPKM + 1)。通过数学变换,在黄线 $y = x + 1$ 上方的点代表特异高表达的基因,在绿线 $y = x - 1$ 下方的点代表特异低表达的基因。香莲外洗液作用下恢复敏感株有 165 个基因 RPKM 指标上调表达,144 个基因下调表达。

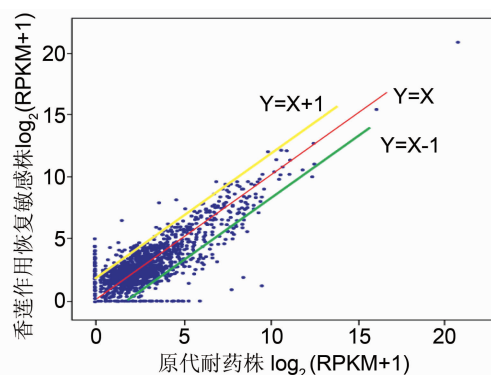


图 1 香莲外洗液诱导下恢复敏感株与原代耐药株转录组测序 Cufflinks 比较

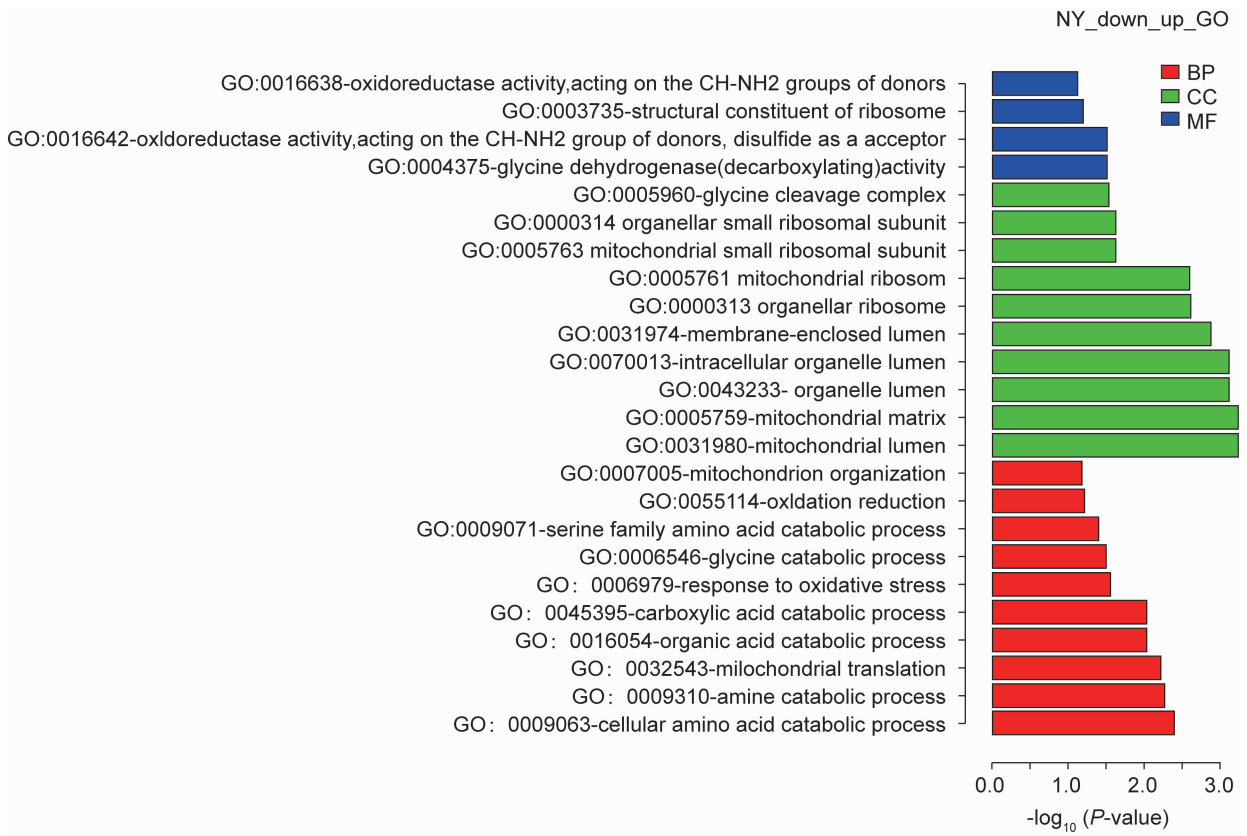


图2 香莲外洗液诱导下恢复敏感株与原代耐药株转录组测序高表达基因的 GO 分析

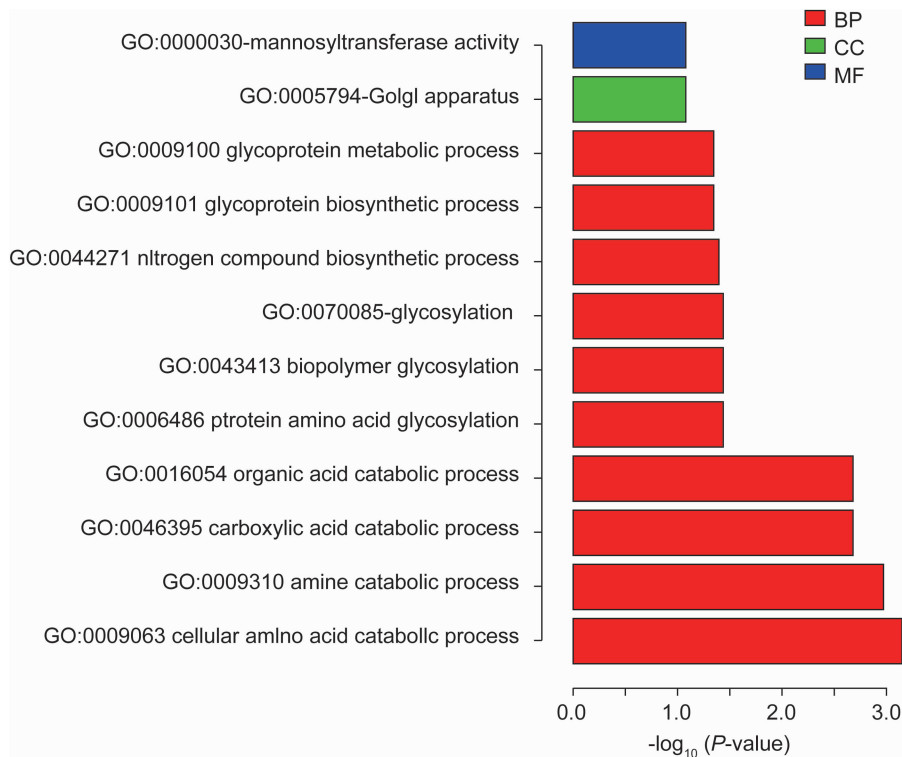


图3 香莲外洗液诱导下恢复敏感株与原代耐药株转录组测序低表达基因的 GO 分析

3 香莲外洗液诱导下恢复对氟康唑敏感白念珠菌与原代耐药株特异性高表达基因的 GO 分析(图 2) 在香莲外洗液恢复氟康唑敏感性白念珠菌的特异高表达基因集合中,生物过程(biological process,BP)方面主要集中在氨基酸代谢、氨基分解、线粒体翻译、有机酸代谢、羧酸代谢、甘氨酸催化过程及氧化还原反应等过程;这些基因的细胞组分(cellular component,CC)主要富集在线粒体的内腔、线粒体基质、细胞器内腔、包膜内腔、细胞器核糖体、线粒体核糖体、线粒体的小核糖体亚基、细胞器的小核糖体亚基等;这些差异基因的分子功能(molecular function,MF)主要集中在甘氨酸脱氢酶的活性及氧化还原酶活性方面。

4 香莲外洗液诱导下恢复对氟康唑敏感白念珠菌与原代耐药株特异性低表达基因的 GO 分析(图 3)

在原代耐药株中高表达,香莲作用下恢复敏感株中低表达的差异基因的 BP 主要富集在细胞氨基酸代谢、氨基分解、羧酸代谢、有机酸代谢、蛋白质氨基酸糖基化、生物高聚物糖基化、糖基化、氮类复合物合成过程,糖蛋白合成以及代谢等过程。这些基因的 CC 主要富集在高尔基体上。这些差异基因的 MF 主要集中在甘露糖转移酶上。

5 差异表达基因的 pathway 分析 原代耐药株低表达,香莲外洗液诱导下恢复敏感株高表达的差异基因主要与酪氨酸代谢、丁酸代谢有关的代谢通路有关;原代耐药株高表达,香莲外洗液诱导下恢复敏感株低表达的差异基因由于数量较少,David 数据库不能显示其相关的 pathway。

讨 论

白念珠菌是最重要的机会致病真菌,是许多真菌性疾病的主要致病菌。氟康唑是临床广泛使用的抗真菌药物,随着其在临床的广泛、大量使用,导致耐氟康唑白念珠菌不断检出,白念珠菌的耐药性问题越来越突出。寻找具有较好的抑菌或杀菌作用或可提高耐药真菌对抗真菌药物敏感性的天然化合物,是解决目前真菌耐药问题的可行之路^[7]。中草药及其成分良好的杀菌抑菌作用及对抗真菌药物的增效作用不断被现代研究证实^[8-10]。

本实验采用临床疗效已被证实的经验方香莲方作用于氟康唑耐药白念珠菌,在转种至第 6 代时,恢复了对氟康唑的敏感性,表明香莲外洗液能诱导耐药白念珠菌恢复对氟康唑的敏感性;氟康唑对质控菌株克柔念珠菌 ATCC6528 的 MIC 结果符合 CLSI 的标准,表

明实验条件等在控,实验结果可信。

唑类药物是临床最常用的抗真菌药物,白念珠菌对唑类药物耐药机制主要包括 3 个方面,如由 ERG11 基因介导的药物靶酶改变、由 MDR 和 CDR 基因介导的药物外排泵的过度表达以及生物被膜的存在^[11]等,这些因素均可以显著降低白念珠菌对唑类药物的敏感性。研究证明,白念珠菌耐药机制多样,Zhang L 等^[12]随机选择了 18 株来自外阴阴道念珠菌病患者的耐氟康唑白念珠菌进行评估,结果发现,与敏感株比较,CDR1 上升了 3.16 倍;在 G487T 和 T916C 发生点突变的耐药白念珠菌中,CDR1、CDR2 呈高表达^[13]。本研究对原代耐药株与香莲外洗液诱导下恢复敏感株进行转录组测序,并未发现既往文献中常见的耐药基因如 CDR1、CDR2、MDR1、FLU1 等的特异性高表达,进一步说明白念珠菌的耐药是多种机制共同作用的结果,也可能由于本实验的研究对象是标准菌株,且敏感菌株是经药物处理后的敏感菌株,而文献中的研究对象多为临床株,这一现象有待进一步的研究。

转录组测序可能是新一代高通量测序技术中最复杂的技术。特定基因的表达水平、差异剪接等内容均可被转录组测序技术准确检测,这一点是既往的测序技术所远不能及的^[14]。由于转录组测序不同于以往的基因芯片等技术,其可对未知序列进行测序。在本实验中,由于不清楚香莲外洗液的具体作用靶点,因此选用转录组测序的方法,全面获得待测样本的转录组,并加以比较和分析,最后获得差异基因。

经过对获得的差异基因进行统计,香莲外洗液作用下恢复敏感株较原代耐药株有 165 个基因 RP-KM 指标上调表达,144 个基因下调表达。对特异性高表达的基因进行 GO 分析,在香莲外洗液的作用下,菌株线粒体内反应活动加强,氧化还原反应加强,核糖体合成增多,大量合成蛋白质,表明在香莲外洗液的作用下,菌株出现了明显的应激性反应;糖基化是对蛋白的重要修饰作用,有调节蛋白质功能作用。对特异性低表达的基因进行 GO 分析表明,原代耐药白念珠菌高尔基体的蛋白糖基化活动活跃;甘露糖转移酶能从糖磷酸 DNA 链上识别与去除修饰碱基的酶,使 DNA 链留下空位,提示原代耐药白念珠菌的抗药性与基因有关,通过分析总结 pathway,发现香莲外洗液诱导下恢复对氟康唑敏感性的白念珠菌可能开启了氟康唑转运通路。综合氟康唑的药靶以及香莲外洗液诱导下恢复氟康唑敏感性白念珠菌活跃的线粒体相关基因和氧化还原相关基因表达,可以推测,香莲外洗液诱导耐药白念珠菌恢复

对氟康唑敏感性的机制可能为开启了线粒体通路和氟康唑的转运通路,使得氟康唑的药效获得了更好的发挥。

本研究采用临床治疗效果良好的香莲外洗液作为研究对象,通过转录组测序的方法,分别对香莲外洗液作用前后的氟康唑耐药菌株进行转录组测序,并进一步对差异基因进行 GO 分析和 pathway 分析,进而明确差异基因和哪些基因功能及细胞通路相关。通过上述内容试图为其在临床的进一步推广奠定基础,也为类似中医药的研究提供一个新思路 and 方向。

本研究的不足之处在于,香莲外洗液是一个复方,含多种药物成分,具体是一种药物成分起作用,还是某几种药物成分协同作用,有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Gulat S, Doluca Dereli M. Investigation of the expression levels of efflux pumps in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates [J]. Mikrobiyol Bull, 2014, 48(2): 325–334.
- [2] 王佳庆,钱彩文. 香莲外洗液对尿失禁的肥胖女性患者会阴部皮肤护理的效果观察[J]. 中国实用医药, 2013, 8(7): 229–231.
- [3] 廖列辉,梁海莹,范瑞强. 萘替芬酮康唑乳膏与两种中药制剂合用治疗角化过度型足癣临床观察[J]. 中国皮肤性病杂志, 2010, 24(4): 326–327.
- [4] 陈建宏,黄妙珠,何秀玉,等. 抗真菌颗粒剂内服配合香莲外洗液外用治疗足癣疗效观察[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(1): 111–113.
- [5] 张文,梁惠,周强,等. 香莲外洗液诱导白念珠菌耐药菌株恢复对氟康唑的敏感性[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(10): 1455.

- [6] 王平,谢婷,范瑞强. 香莲外洗液对白念珠菌阴道分离耐药株的实验研究[J]. 广州中医药大学报, 2013, 30(3): 383–385.
- [7] 姜远英,刘伟,曹永兵. 念珠菌的耐药机制及应对策略研究[J]. 中国真菌学杂志, 2011, 6(4): 193–197.
- [8] Wan JF, Tang CP, Shen ZB, et al. Research status of natural compounds combine with antifungal agents against drug-resistant *Candida albicans* [J]. Chin J Material Medica, 2014, 39(1): 28–33.
- [9] Zhao LX, Li DD, Hu DD, et al. Effect of tetrandrine against *Candida albicans* biofilms [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e79671.
- [10] Zheng Y, Huang W, Yoo JG, et al. Antibacterial compounds from *Siraitia grosvenorii* leaves [J]. Nat Prod Res, 2011, 25(9): 890–897.
- [11] Auler ME, Morreira D, Rodrigues FF, et al. Biofilm formation on intrauterine devices in patients with recurrent vulvo vaginal candidiasis [J]. Med Mycol, 2010, 48(1): 211–216.
- [12] Zhang L, Yang HF, Liu YY, et al. Reduced susceptibility of *Candida albicans* clinical isolates to azoles and detection of mutations in the ERG11 gene [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 77(4): 327–329.
- [13] Chen LM, Xu YH, Zhou CL, et al. Over-expression of CDR1 and CDR2 genes plays an important role in fluconazole resistance in *Candida albicans* with G487T and T916C mutations [J]. J Int Med Res, 2010, 38(2): 536–545.
- [14] Costa V, Angelini C, De Feis I, et al. Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-Seq [J]. J Biomed Biotechnol, 2010: 853916.

(收稿: 2014–12–29 修回: 2015–09–05)