

[文章编号] 1000-1182(2007)04-0327-04

白假丝酵母菌药物流出泵基因在生物膜中表达的动态研究

亓庆国^{1,2}, 周学东², 杨德琴³, 肖晓蓉², 刘正¹

(1.上海交通大学医学院附属第九人民医院 口腔科, 上海 200025;

2.口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041;

3.遵义医学院附属口腔医院 口腔内科, 贵州 遵义 563003)

[摘要] 目的 动态观察白假丝酵母菌生物膜形成过程中耐药性产生相关的药物流出泵基因的表达和耐药性的变化情况, 并分析该类基因的表达与生物膜耐药性产生的相关性。方法 利用人工口腔恒化器形成白假丝酵母菌生物膜结构, 收集生物膜形成不同阶段的生物膜态菌细胞, 半定量RT-PCR技术分析菌细胞mRNA在生物膜成熟过程中的动态变化; 96孔板XTT减低法获得生物膜耐药性的变化情况。结果 耐药性随着生物膜的成熟不断增强; 与早期生物膜相比, 成熟生物膜菌株的药物流出泵基因CDR1表达上调, 而MDR1基因的表达在生物膜的整个成熟过程中基本维持不变。结论 生物膜成熟程度与耐药性增强有明显正相关性; 药物流出泵基因的表达上调与生物膜耐药性的产生有一定关系但改变不一致; 在生物膜成熟过程中, CDR1表达水平改变活跃, 而MDR1基因相对稳定。

[关键词] 白假丝酵母菌; 生物膜; 药物耐受性

[中图分类号] R781.4² **[文献标识码]** A

Dynamic study on *Saccharomyces albicans* drug efflux pumps gene expression during the biofilm formation
Qi Qing-guo^{1,2}, ZHOU Xue-dong², YANG De-qin³, XIAO Xiao-rong², LIU Zheng¹. (1. Dept. of Dentistry, The Ninth Hospital Medical College of Shanghai, Jiaotong University, Shanghai 200025, China; 2. Key. Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Dept. of Oral Medicine, Stomatological Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

[Abstract] Objective To observe the drug resistance and drug efflux pumps gene mRNA of *Saccharomyces albicans*, including CDR1 gene and MDR1 gene, at different stage of biofilm formation in chemostat, furthermore to analysis the relationship between the drug efflux pump gene expression and the biofilm related drug resistance. Methods To form the mature biofilm in vitro in chemostat, then collect the biofilm strains at different development stages(2, 12, 24, 48 h) to semi-quantified mRNA amount of CDR1 gene and MDR1 gene by one step RT-PCR method. Using XTT reduction method to test the dynamic change of *Saccharomyces albicans* drug resistance in biofilm. Results Antifungal resistance of biofilm-grown cells increased conjunction with the biofilm maturation. Compared with earth stage of biofilm strains, the amount of CDR1 mRNA gene in mature biofilm strains increased, while MDR1 gene did not. Conclusion There is positive correlation between drug resistance and biofilm maturation of *Saccharomyces albicans*. Biofilm related drug resistance appears to be partially associated with the upregulation of drug efflux pumps, although the variation is not shown coincidence. During the biofilm formation, CDR1 gene expression is actively up-regulated, but MDR1 gene expression is stable.

[Key words] *Saccharomyces albicans*; biofilm; drug resistance

越来越多的研究^[1]证明, 生物膜是微生物在自然状态下的生存方式, 浮游状态的微生物几乎只存在于实验室状态下。生物膜中的微生物拥有其浮游

状态根本不具备的生物学性状, 其中最引人注目的是生物膜微生物的耐药性。众多研究^[2]表明, 几乎所有的微生物在生物膜中对绝大多数抗生素都具有较强耐药性, 这种耐药性与临床上难以控制反复发作的感染有密切的关系。生物膜研究的成果主要来自细菌生物膜, 作为人类最常见条件致病真菌——

[收稿日期] 2007-02-28; [修回日期] 2007-05-16

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30400498)

[作者简介] 亓庆国(1972-), 男, 山东人, 副教授, 博士

[通讯作者] 刘正, Tel: 021-63135412

白假丝酵母菌(*Saccharomyces albicans*)(以前称白色念珠菌),可单菌种形成成熟生物膜结构,是最常见的院内感染病原菌和条件致病真菌之一,因此关于白假丝酵母菌生物膜的结构、耐药性及机制研究广受重视^[3]。

白假丝酵母菌与哺乳类细胞及原核生物一样,其胞膜上存在主动外排系统,在耐药机制中起着重要作用,而这些外排系统是由流出泵基因来控制的。药物流出泵基因主要包括ATP结合盒转运子的耐药基因家族CDR1和主要易化子基因MDR1,有确切证据表明药物流出泵基因的过度表达与浮游状态菌株的耐药性密切相关^[4],而生物膜状态下其相关性和相关程度的研究却是报道不一^[5-6]。

本研究利用人工口腔恒化器形成生物膜,半定量RT-PCR观察生物膜形成过程中药物流出泵基因的动态表达情况,分析生物膜耐药性与药物流出泵基因表达之间的关系,为白假丝酵母菌的耐药机制及其机会感染防治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 菌株、培养基及药物

白假丝酵母菌模式株ATCC90038(四川大学华西口腔医学院黏膜病研究室陈谦明教授惠赠,前期实验鉴定确认^[7])。

YPD液体培养基(体积分数为2%蛋白胨,体积分数为1%的酵母提取物,体积分数为2%的葡萄糖)和RPMI 1640培养基(Gibco公司,美国),氟康唑(美国辉瑞公司)。

1.2 试剂

Trizol Reagent(Invitrogen公司,美国),Deoxyribonuclease Rnase free(MBI Fermentas公司,美国),一步法RT-PCR试剂盒(大连宝生物工程公司)。

1.3 仪器和设备

UV-265型紫外分光光度计(日本岛津公司),MR1812低温高速离心机(Jouan公司,法国),梯度PCR仪Gradient Thermal Cycle(Eppendorf公司,德国),Bio-Rad凝胶成像及分析系统(gel-Doc2000公司,美国),Quantity One图像分析软件(Bio-Rad公司,美国)。

1.4 体外生物膜模型

人工口腔恒化器由口腔生物医学工程教育部重点实验室(四川大学)龋病研究室构建,经多次实验证实运行稳定^[8]。

1.5 浮游状态及生物膜耐药性的标准检测

采用标准的NCCLS微量稀释法,以系列稀释(质

量浓度0.125~128.000 $\mu\text{g/mL}$)氟康唑行浮游状态下白假丝酵母菌的抗真菌药物敏感性实验。

生物膜耐药性实验采用标准的96孔板XTT减低法^[9]:菌株接种于YPD培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜培养,收集菌体以RPMI 1640培养基稀释,调整菌液为每毫升 1×10^6 个;取100 μL 菌悬液接种于96孔培养皿中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养2、12、24、48 h,形成不同阶段的生物膜结构。弃去培养基及悬浮的念珠菌,PBS冲洗,将2倍药物质量浓度以倍比稀释的方法加到各孔中继续37 $^{\circ}\text{C}$ 培养48 h。XTT减低法在490 nm波长下分光光度吸收值确定抑制生物膜念珠菌生长80%的药物质量浓度,每个药物质量浓度均有8个孔作为重复,取平均值。

1.6 恒化器生物膜的菌细胞制备

1.6.1 形成不同阶段生物膜 对黄正蔚等^[9]构建的口腔生物膜体外模型进行适当改建,将恒流培养室去掉,菌株接种到发酵罐中进行培养,当废液管中排出的培养液菌液浓度达到稳定时,罐内插入4根玻璃棒,每一根玻璃棒上附着有1.5 cm \times 2.0 cm的玻璃片4张(玻璃片经血清预处理),以提供菌株形成生物膜的载体表面,在生物膜培养2、12、24、48 h时将4根玻璃棒依次分别取出。

1.6.2 生物膜态白假丝酵母菌获取 从不同时间段取出的玻璃棒上取下玻片放入含灭菌PBS的六孔板中冲洗以除去浮游态细胞,PBS中振荡玻片30 s得到真菌细胞悬液,取10 μL 涂片作菌落计数,剩余菌悬液3 000 g离心5 min,收获不同时间段的生物膜态真菌细胞。

1.7 生物膜态菌细胞的基因表达测定

1.7.1 总RNA抽提 调整各阶段菌悬液至相同浓度(每升 5×10^9 个),各取1 mL按照Trizol提取纯化说明书提取白假丝酵母菌的总RNA。分光光度计测定其浓度和纯度, $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 比值超过1.8~2.0为纯度合格。

1.7.2 RT-PCR引物设计 primer 5.0软件以CDR1的mRNA序列(Genebank:XM717969)设计并合成CDR1引物,引物序列为:5'-GTTATGTCCCATTTGTT-TAG-3',5'-ACCTCTTTGAACCCATAA-3';合成MDR1基因引物,引物序列为:5'-GGAGTTTAG-GTGCTGT-3',5'-CGGTGATGGCTCTCAA-3'^[10];合成内参照基因ACT1引物,引物序列为:5'-GCCG-GTGACGACGCTCCAAGAGCTG-3',5'-CCGTGTT-CAATTGGGTATCTCAAGGTC-3'^[7]。

1.7.3 RT-PCR半定量基因的表达 CDR1基因RT-PCR反应条件:50 $^{\circ}\text{C}$ 30 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,循环参数94 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 90 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,确定循环35

次,最后总延伸5 min,扩增片段长度预计390 bp;MDR1基因RT-PCR反应条件:50 30 min,94 2 min,循环参数94 10 s,62 15 s,72 10 s,确定循环次数为35次,最后总延伸5 min,扩增片段的长度预计为201 bp;内对照扩增片段预计158 bp。

RT-PCR循环次数经过梯度测试,确保PCR扩增反应在平台期前终止反应,以防止过度扩增掩盖差异。反应结束后质量分数为2%琼脂糖电泳、EB显色,Bio-Rad凝胶成像系统及Quantity ones软件(4.2.2版本)分析扩增产物含量强度,用以下公式表示^[7]:相对含量强度=CDR1或MDR1的密度/内对照ACT1密度。每个实验重复3次,取3次实验结果的平均值。用SPSS 11.5分析软件进行方差分析,P<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生物膜耐药性检测结果

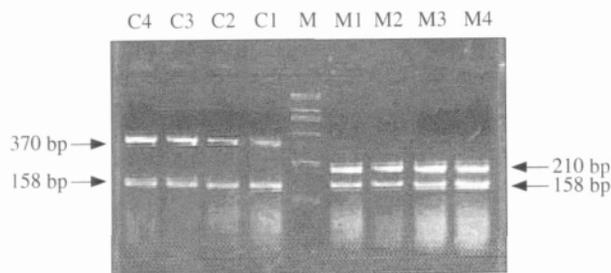
浮游状态菌株的最小抑菌浓度为0.5 μg/mL;2、12、24、48 h生物膜的抑制生物膜念珠菌生长80%的药物质量浓度分别是1、8、64、64 μg/mL。

2.2 菌株总RNA提取

提取的白假丝酵母菌总RNA的A_{260nm}/A_{280nm}比值均在1.8以上,符合实验要求。

2.3 生物膜形成过程中CDR1和MDR1基因动态表达

生物膜形成不同阶段CDR1和MDR1基因表达情况见图1,相对表达强度见图2和图3。统计学分析表明,生物膜成熟期(24、48 h)菌株CDR1基因的表达与生物膜形成早期(2、12 h)相比有明显上调(P<0.05),而24 h和48 h之间以及2 h和12 h之间的表达差异没有统计学意义。MDR1基因在生物膜形成过程中的不同阶段,其表达一直处于稳定状态,4个时间段的表达没有显著性差(P>0.05)。



CDR1基因, C1: 2 h, C2: 12 h, C3: 24 h, C4: 48 h; MDR1基因, M1: 2 h, M2: 12 h, M3: 24 h, M4: 48 h; M: DL 2000 Marker, 条带自上而下分别为2 000、1 000、750、500、250、100 bp

图1 生物膜形成不同阶段白假丝酵母菌CDR1与MDR1基因在mRNA水平的表达

Fig 1 mRNA expression in CDR1 and MDR1 gene of *Saccharomyces albicans* during the biofilm formation

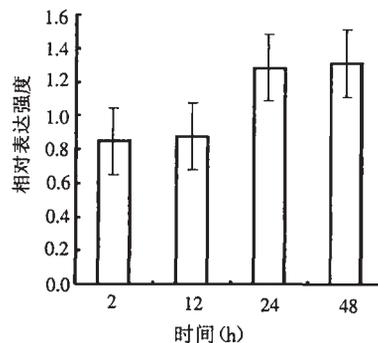


图2 不同时间段生物膜CDR1基因表达的相对强度

Fig 2 CDR1 mRNA of *Saccharomyces albicans* in different stage biofilm

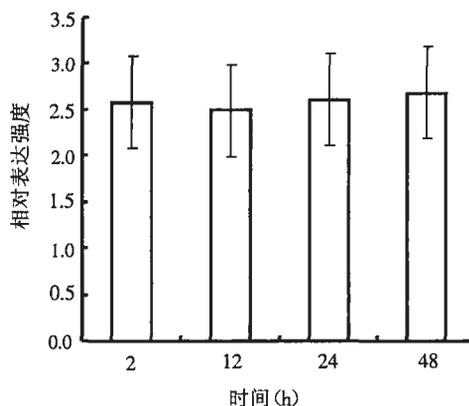


图3 生物膜成熟过程中不同阶段MDR1基因表达的相对强度

Fig 3 MDR1 mRNA of *Saccharomyces albicans* in different stage biofilm

3 讨论

美国的统计资料^[2]表明,假丝酵母菌已经是第4位造成院内感染的病原微生物,而且目前还没有一种解释能清楚阐述白假丝酵母菌生物膜的耐药性机制^[1-2]。由于微生物表现出的任何生物学特征都有一定的基因表达基础,研究生物膜状态下耐药性相关基因的表达与耐药性产生之间的关系将有助于认识和了解耐药的分子机制。

本课题组对常用的3种体外白假丝酵母菌生物膜体外模型(包括恒化器法、96孔板法、玻片6孔板法)^[2]形成的生物膜结构进行了比较,发现这3种方法形成的生物膜结构有高度的相似性,使用哪种方法要根据研究目的来选择。本研究的主要目的是研究白假丝酵母菌生物膜形成过程中耐药性基因的表达情况,环境因素对微生物基因表达有非常大的影响,与其他生物膜体外模型相比,口腔恒化器更好地模拟体内真实环境,因而能够更准确地了解菌株在生物膜中的表达情况。但是目前本课题组的恒化器系统还不能进行生物膜耐药性检测,因而采用了目前国际上通用的酵母菌耐药性检测方法——96孔板结合XTT减低法进行耐药性检测,这种方法标

准化程度高,操作方便,得到的耐药性结果可比性好。

Chandra等^[3]人为地将白假丝酵母菌生物膜形成过程分为三个阶段:早期(0~11 h)、中期(12~30 h)以及成熟期(31~72 h);本课题组采用的体外模型与Chandra不同,分期的时间也就稍有差异,根据本课题组对生物膜的形态学观察,确定了四个时间点,分别代表起始期、早期、中期以及成熟期。Chandra等^[3]研究发现白假丝酵母菌在这个过程中对两性霉素B、氟康唑和制霉菌素的最小抑菌浓度不断提高,而本课题组使用氟康唑所得的结果也显示,在生物膜形成早期(2 h)时,抑制生物膜念珠菌生长80%的药物质量浓度为1 $\mu\text{g/mL}$,比浮游状态稍有提高(0.5 $\mu\text{g/mL}$),12 h上升为8 $\mu\text{g/mL}$,而24 h和48 h的生物膜达到64 $\mu\text{g/mL}$ 。这些结果均提示生物膜成熟程度与耐药性增强有明显相关性。

本研究发现CDR1基因在生物膜形成早期表达稳定,12 h生物膜CDR1的mRNA表达量与2 h没有差别,但耐药性却有提高;而随着生物膜的成熟,表达出现了明显上调,24 h和48 h表达量比生物膜早期明显增加,而生物膜成熟后基因的表达再次趋于稳定,24 h和48 h表达量之间差异没有统计学意义,提示该基因的表达上调可能与生物膜耐药性的增强有一定的关系,但是耐药性的增强与基因表达上调并不完全一致。而另一种药物流出泵基因MDR1在生物膜的成熟过程中一直稳定表达,四个时间点的表达量差别没有统计学意义,提示该基因表达可能与生物膜成熟过程中不断提高的耐药性关系不大。

Ramage等^[11]研究认为与浮游状态相比,生物膜中药物流出泵两类基因的表达虽有上调,但药物流出泵与生物膜耐药性无关,由于该研究采用48 h成熟生物膜来研究药物流出泵基因表达与生物膜耐药性关系,这种单独使用某个时段的生物膜研究所得到的结果是不全面的,因为生物膜耐药性分析应该是动态研究。而Mukherjee等^[6]使用CDR1/CDR2基因双敲除和CDR1/CDR2/MDR1三基因敲除的变异株,研究生物膜耐药性与基因表达之间的关系,认为双敲除和三敲除的缺陷株与野生菌株相比,在生物膜早期耐药性下降,而生物膜成熟以后耐药性没有差别,提示药物流出泵基因与早期生物膜的耐药性产生有关,而与成熟生物膜的耐药性无关。本实验结果与以上研究都有差别,可能的原因包括:1)本研究利用人工口腔恒化器,较好地模拟了口腔环境,生物膜中的菌株基因表达模式比其他研究使用的装置更接近体内环境,但由于该系统还无法进行标准的耐药性实验,故生物膜耐药性实验仍然使用的是

标准方法,生物膜耐药性结果与基因表达情况可能会出现不一致;2)mRNA水平的表达还不能完全反映基因表达的真实情况。总之,白假丝酵母菌生物膜耐药性的产生机制可能是多因素的^[11-12],尚需进一步从多个角度多个水平进行动态原位的分析。

[参考文献]

- [1] Patel R. Biofilms and antimicrobial resistance[J]. Clin Orthop Relat Res, 2005, 437(1): 41-47.
- [2] Douglas LJ. Candida biofilms and their role in infection[J]. Trends Microbiol, 2003, 11(1): 30-36.
- [3] Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance[J]. J Bacteriol, 2001, 183(6): 5385-5394.
- [4] Cowen LE, Sanglard D, Calabrese D. Evolution of drug resistance in experimental populations of *Candida albicans*[J]. J Bacteriol, 2000, 182(2): 1515-1522.
- [5] Cardina M, Crow SA, Donald GA. Adherence of *Candida albicans* to silicone induces immediate enhanced tolerance to fluconazole[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(9): 3358-3366.
- [6] Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: Phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols[J]. Infect Immun, 2003, 71(8): 4333-4340.
- [7] 元庆国, 胡涛, 傅春华, 等. 附着状态对口腔白色念珠菌ALS基因mRNA的影响[J]. 华西口腔医学杂志, 2005, 23(3): 233-236.
- [8] 黄正蔚, 周学东, 李继遥, 等. 口腔生物膜体外模型的建立和应用评估[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2004, 14(9): 481-484.
- [9] Ramage G, Vande WK. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(5): 2475-2479.
- [10] Frade JP, Warnock DW, Arthington-Skaggs BA. Rapid quantification of drug resistance gene expression in *Candida albicans* by reverse transcriptase LightCycler PCR and fluorescent probe hybridization[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(5): 2085-2093.
- [11] Ramage GS, Bachmann TF, Patterson BL. Investigation of multi-drug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms[J]. J Antimicrob Chemother, 2002, 49(1): 973-980.
- [12] Lewis K. Riddle of biofilm resistance[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(4): 999-1007.