

[文章编号 1000-1182(2005)03-0233-04

· 专栏论著 ·

# 附着状态对口腔白色念珠菌 ALS 基因 mRNA 的影响

亓庆国, 胡 涛, 傅春华, 周学东

(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)

[摘要] 目的 比较生物膜和游离状态下, 白色念珠菌 ALS 基因在 mRNA 水平上的表达差异。方法 一步法 RT-PCR 观察白色念珠菌临床分离株和标准菌株, 在游离状态和生物膜状态下 ALS1 和 ALS4 的 mRNA 的丰度差异。结果 白色念珠菌临床分离株在生物膜状态下, ALS1 和 ALS4 的 mRNA 丰度明显强于游离状态, 而标准株在游离状态和生物膜状态下, ALS1 和 ALS4 的 mRNA 丰度没有显著性差异。结论 生物膜状态下的白色念珠菌, ALS 基因在转录水平的表达有增强, 提示该基因在生物膜形成发展中可能有一定的作用, 但其增强的程度在菌株之间可能有较大的差别。

[关键词] 白色念珠菌; 生物膜; ALS 基因

[中图分类号] R 781.5<sup>+</sup>4 [文献标识码] A

**Comparison of ALS Gene mRNA between Sessile and Planktonic *Candida albicans* of Oral Cavities** QI Qing-guo, HU Tao, FU Chun-hua, ZHOU Xue-dong. (Key. Laboratory of Oral Biomedical Engineering Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To observe the different mRNA levels of *Candida albicans* ALS gene family between planktonic and biofilm-grown cells. **Methods** ATCC 90038 and a wild strain of *Candida albicans*, biofilm models *in vitro* were formed on glass slides. After 48 hours incubation, the biofilm-grown cells were harvested. Half-quantification of ALS1 and ALS4 mRNA was based on the amplification by one-step RT-PCR. **Results** The amounts of ALS1 and ALS4 mRNA of the wild strain in biofilm increased comparing with planktonic cells, while ATCC 90038 didn't. **Conclusion** The members of ALS gene family may play important roles in the course of *Candida albicans* biofilm formation.

[Key words] *Candida albicans*; biofilm; ALS gene

白色念珠菌现称为白假丝酵母菌 (*Saccharomyces albicans*) ,是口腔正常微生物群的成员,同时也是口腔重要的条件致病真菌和院内感染致病菌<sup>1</sup>。随着临床抗生素的滥用和恶性肿瘤患者的增多,白色念珠菌引起感染的问题越来越受到重视。目前认为<sup>2</sup>,微生物在自然状态下以生物膜的形式生存,在口腔的定植和致病过程都与生物膜有密切的关系。研究白色念珠菌在内的微生物在生物膜状态下的基因表达调控,对研究生物膜的形成发展有重要的意义<sup>3</sup>。

在不同个体中,白色念珠菌的定植部位和数量有很大的差别。定植与微生物的粘附能力密切相关,白色念珠菌和宿主细胞之间粘附机制的研究认为<sup>4</sup>,粘附的发生主要是与白色念珠菌细胞壁表面的糖蛋白

有关系,ALS 基因正是编码白色念珠菌细胞壁表面大分子糖蛋白的一组基因,与真菌细胞和宿主之间的相互粘附有关系,该基因为学者从基因水平深入了解真菌细胞的粘附定植提供了一个新的研究思路。相关研究表明<sup>5</sup>,生物膜状态下的白色念珠菌 ALS 基因的表达增强。由于 ALS 基因是由一组结构和功能相似的基因组成的<sup>4</sup>,具体是哪些成员出现了表达增强尚不清楚。本研究以白色念珠菌的模式株和临床分离株为研究对象,采用半定量的 RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) 技术,研究 ALS 中有代表性的两个成员 ALS1 和 ALS4 在生物膜中的表达情况,以期进一步了解 ALS 基因家族在生物膜的形成发展中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要实验材料及仪器

一步法 RT-PCR 试剂盒 (TAKARA 大连宝生物工程公司), RNA 提取纯化 TRIzol (Invitrogen 公司,美

[收稿日期 2004-12-29; 修回日期 2005-03-18

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30371541)

[作者简介] 亓庆国 (1972-), 男, 山东人, 讲师, 博士, 现在山东大学口腔医学院工作

[通讯作者] 周学东, Tel: 028-85501480

国), 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-Doc 2000 公司, 美国), Quantity One 图像分析软件 (Bio-Rad 公司, 美国)。

### 1.2 生物膜的形成

采用标准菌株 ATCC 90038 和白色念珠菌临床分离株, 经过鉴定培养基和 PCR 鉴定, 其符合白色念珠菌特征<sup>6</sup>。菌株在装有人工唾液 BM-5 培养液 30 ml 的锥形瓶中, 37℃ 摇动过夜培养, 比浊法进行细菌计数, 用灭菌 PBS 调整到  $1 \times 10^{10}$  cells/L 备用。

生物膜形成方法参照<sup>7</sup>的方法, 稍作修改, 附着载体是 1.5 cm × 2 cm 的载玻片, 经过灭菌的玻片放置到 6 孔细胞培养板中, 用 10% 的小牛血清 4℃ 过夜处理, 然后用灭菌的 PBS 液冲洗 3 遍, 除去多余的 PBS, 玻片转移到新的 6 孔板中, 加入 3 ml 的标准菌悬液, 37℃ 培养 90 min, PBS 液冲洗 3 遍, 除去没有粘附的真菌细胞, 将粘附有真菌细胞的玻片转移到一个新的 6 孔板中, 每孔加入 3 ml BM-5 培养液 37℃ 培养 48 h。

### 1.3 生物膜和游离两种状态白色念珠菌的收获

生物膜培养 48 h 以后, 吸出 6 孔板中的培养液, 用灭菌的 PBS 液冲洗 3 遍, 除去浮游状态的真菌细胞, 将玻片转移到装有 8 ml PBS 的小烧杯中, VERTEX 振荡 30 s, 含有真菌细胞的 PBS 悬液转移到离心管中, 取 10 μl 涂片作菌落计数, 剩余的菌悬液 3 000 g 离心 5 min, 收获真菌细胞, 获得生物膜状态下白色念珠菌。采用增菌方法, 摇动培养 48 h, 收获浮游状态的白色念珠菌。

### 1.4 白色念珠菌总 RNA 的提取以及 RT-PCR 测试

游离状态和生物膜状态下的两种菌株, 按照试剂盒的要求调整到相同浓度的菌悬液  $5 \times 10^9$  个/升, 各取 1 ml 菌悬液, 按照 Trizol 总 RNA 提取纯化试剂盒说明书的方法, 提取白色念珠菌的总 RNA。分光光度计测定  $A_{260}/A_{280}$ , 测定其浓度和纯度, 比值超过 1.8 ~ 2.0, 认为纯度合格。

采用大连宝生物公司的 RT-PCR 一步法试剂盒进行半定量的 RT-PCR 测试。

ALS1<sup>8</sup> 引物 5-AAGCTTGATGTAAATCA GTTG-3', 5-TAAAGAGTGTCTAGATTGICC-3', 反应条件是 50℃ 30 min, 94℃ 2 min, 循环参数 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min, 确定循环 28 次, 最后总延伸 5 min。

ALS4<sup>9</sup> 的引物: 5-TCCGAGTCCATTCCAGTACTAA-3', 5-GTTACAGCATCACTAGAAGGAATATC-3', 反应条件是 50℃ 30 min, 94℃ 2 min 循环参数是 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 90 s, 循环 26 次, 最后延伸

5 min。

扩增以上两个基因时, 同时扩增内对照 ACT1<sup>10</sup>, 引物序列 5-GCCGGTGACGACGCTCCAAGAGCTG-3', 5-CCGTGTCAATTGGGATCTCAAAGGTC-3'。

循环次数都经过循环梯度测试, 确保 PCR 扩增反应在平台期以前终止反应, 防止过度扩增掩盖差异。PCR 反应结束以后, 2% 琼脂糖电泳, EB 显色, BIO-RAD 凝胶成像系统成像, 图像分析软件 QUANTITY ONES (4.2.2 版本) 分析扩增条带的产物含量强度, 用以下公式表示: 相对含量强度 = ALS1 或 ALS4 的密度/内对照 ACT1 的密度。

每个实验均重复 3 次, 最后取 3 次实验结果的平均值, 获得的数据用 SPSS 11.5 分析软件进行 *t* 检验,  $P < 0.05$  表示有显著意义。

## 2 结果

### 2.1 白色念珠菌临床分离株鉴定

临床分离株经过鉴定, 符合白色念珠菌特征。提取的白色念珠菌总 RNA, 经过分光光度计  $A_{260}/A_{280}$  测定, 比值均在 1.8 以上, 符合实验要求。

### 2.2 ALS1 基因表达

白色念珠菌临床分离株和标准菌株 ALS1 基因在生物膜和游离状态下 mRNA 的表达结果见图 1, 2。统计学分析表明, 白色念珠菌模式株在两种状态下 ALS1 mRNA 的强度没有显著差别; 临床分离株则有显著差别 ( $P < 0.05$ ), 其在生物膜中状态下, ALS1 mRNA 丰度明显强于浮游状态。



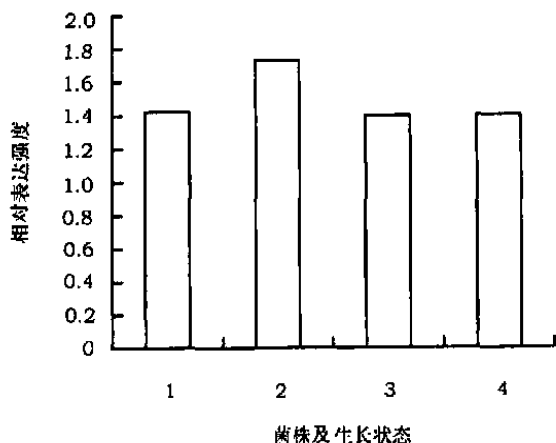
M: Marker; 1: 临床分离株游离状态; 2: 临床分离株生物膜状态; 3: 标准菌株游离状态; 4: 标准菌株生物膜状态

图1 白色念珠菌标准菌株和临床分离株 ALS1 在生物膜和游离状态下 mRNA RT-PCR 结果

Fig 1 *Candida albicans* ATCC 90038 and wild strain ALS1 gene mRNA between planktonic and biofilm-grown showed by RT-PCR

### 2.3 ALS4 基因表达

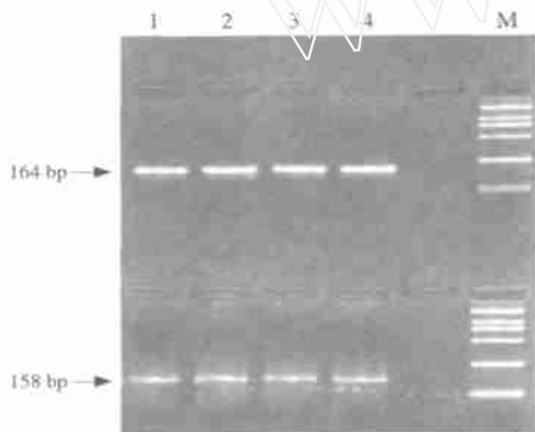
白色念珠菌临床分离株和标准菌株 ALS4 基因在生物膜和游离状态下 mRNA 的表达结果见图 3, 4。统计学分析表明, 白色念珠菌模式株两种状态下 ALS4 mRNA 的强度没有显著差别; 临床分离株则有显著差别 ( $P < 0.05$ ), 其在生物膜中状态下, ALS4 mRNA 丰度明显强于浮游状态。



1: 临床分离株游离状态; 2: 临床分离株生物膜状态;  
3: 标准菌株游离状态; 4: 标准菌株生物膜状态

图2 白色念珠菌标准菌株和临床分离株 ALS1 mRNA 的量与内参照 ACT1 mRNA 相比的相对强度

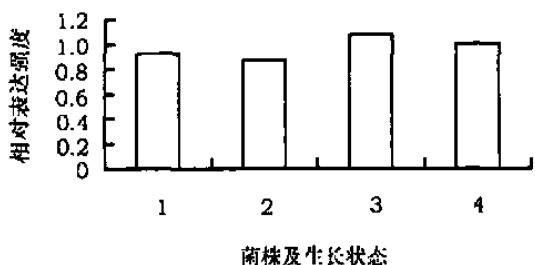
Fig 2 Amount of ALS1 mRNA of two strains relative to ACT1 mRNA



M: Marker; 1: 临床分离株游离状态; 2: 临床分离株生物膜状态;  
3: 标准菌株游离状态; 4: 标准菌株生物膜状态

图3 白色念珠菌标准菌株和临床分离株 ALS4 在生物膜和游离状态下 mRNA RT-PCR 结果

Fig 3 *Candida albicans* ATCC 90038 and wild strain ALS4 gene mRNA different expression between planktonic and biofilm-grown showed by RT-PCR



1: 临床分离株游离状态; 2: 临床分离株生物膜状态;  
3: 标准菌株游离状态; 4: 标准菌株生物膜状态

图4 白色念珠菌标准菌株和临床分离株 ALS4 mRNA 的量与内参照 ACT4 mRNA 相比的相对强度

Fig 4 Amount of ALS4 mRNA of two strains relative to ACT4 mRNA

### 3 讨论

越来越多的研究证实,微生物在自然状态下以生

物膜的形式存在,研究生物膜中的微生物特征具有重要意义。相对于细菌生物膜的研究,真菌生物膜的研究还处于起始阶段<sup>5</sup>,但是真菌感染越来越常见,目前真菌特别是白色念珠菌生物膜研究成为热点。

体外建立真菌生物膜模型的方法有多种<sup>1</sup>,从培养条件上,有稳定培养,摇动培养和恒化器连续培养等几种;从附着载体上,有玻片,义齿材料甲基丙烯酸甲酯,体内导管内材料硅橡胶等。本研究使用的是目前常用的血清预处理玻片加摇动培养的方法,培养液采用的是人工唾液 BM-5,该培养基与其他常用真菌培养基相比,更适合用于体外人工口腔环境的模拟。本研究首先将这种培养液用于研究口腔白色念珠菌,研究中发现在该培养基中白色念珠菌生长良好,并在镜下观察到了菌丝相和孢子相,表明该培养基能够为白色念珠菌提供良好营养条件,为下一步建立更好的模拟口腔真实环境提供了基础。

生物膜的形成,首先是微生物与粘附表面的相互作用,通过一些机制如粘附素-受体机制,使得微生物与粘附表面结合,微生物粘附在附着载体的表面,开始生物膜的形成<sup>3</sup>。大量的研究表明<sup>4</sup>,白色念珠菌表面的 ALS 基因编码的糖蛋白和宿主细胞表面的粘附有关系,ALS 基因编码的大分子糖蛋白可能就是一种粘附素,与宿主细胞表面的受体特异性的结合,因此,ALS 基因在生物膜状态下表达可能会增强,这是白色念珠菌为适应新的生存环境而发生的基因水平调控。Xiao 等<sup>11</sup>利用大鼠口腔黏膜念珠菌病模型,寻找体内外环境中白色念珠菌基因表达的差异,结果发现两组基因,其中一组是 ALS 基因。Jyotsna 等<sup>5</sup>通过杂交实验研究表明,体外生物膜模型中 ALS 基因的表达明显增强,因为使用的是 ALS1 的中央区段的重复序列作为探针来研究的,这个区段序列在 ALS 家族有高度的同源性,因此认为整个 ALS 基因家族在生物膜中有明显上调,具体是哪些基因出现上调,还没有相关研究。

ALS 基因家族,目前发现的有 9 个成员,他们共同的特点是三段式的结构,5 末端同源性非常高,可以到达 55%~90%以上,中间由数目不等的 108 bp 大小的重复片段组成,3 末端的同源性差一些,但是编码比较多的丝氨酸和苏氨酸,序列在一些成员之间有高度的同源性,比如 ALS2 和 ALS4 3 末端的同源性可以达到 95%以上<sup>4,8</sup>。ALS4 在真菌细胞生长过程中,从对数生长期的中期开始表达强度不断增强,直到 33 h 表达强度仍有加强。因为 ALS4 和 ALS2 在 3 末端有高达 95%的同源性,本研究中使用的这对引物实际上可以获得 ALS2 和 ALS4 的表达情况,但是目前没有发现有 ALS2 的体外表达,因此认为该引物

扩增获得的信息是 ALS4 的情况<sup>9</sup>。以前关于 ALS 基因表达的研究主要是采用 Northern blot 杂交,本研究使用半定量 RT-PCR 方法,优点主要是:灵敏度高,杂交难以发现的表达差别,可以通过 PCR 的放大作用而得以发现;一般杂交方法要求 RNA 的数量比较大,而本研究中,从附着载体表面获得的真菌细胞数量有限,RT-PCR 需要 RNA 的数量小。

本研究发现,临床分离株生物膜状态下 ALS1 和 ALS4 在转录水平的表达增强,且有显著性意义,而标准株 ATCC 90038 的增强没有显著意义,这提示不同菌株 ALS 基因的表达有差异,这一结果与其他学者研究相一致<sup>4</sup>。提示白色念珠菌从浮游状态转变为生物膜状态,由于生存环境发生了很大变化,为适应这种变化,其基因表达也发生了较大变化,生物学特征可能也发生相应的变化。当然要准确的得出这样的结论,还需要对该基因家族的其他成员以及其他菌株的蛋白质水平作进一步的研究。在本研究中,标准株白色念珠菌的 mRNA 在生物膜和游离状态下没有发现显著变化,原因除了提示该基因的表达有菌株差异性以外,可能与标准株经过了若干次的传代,粘附能力下降有密切关系,以前的研究中有类似报道<sup>12</sup>。

绝大多数微生物在自然状态下以生物膜的形式存在,生物膜是微生物定植并进一步致病的前提和具体的生存环境,从基因水平了解生物膜的形成发展以及消散,有助于了解微生物生存状态以及致病机制,从而为有效控制生物膜微生物引起的各种疾病提供新的思路和方法。

## [参考文献]

- 1] Douglas LJ. Candida biofilm and their roles in infection J. TRENDS Microbiol, 2003, 11(1): 30-36.
- 2] Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans* J. Crit Rev Oral Biol Med, 1999, 10(2): 359-383.
- 3] Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. J Bacteriol, 2000, 182(10): 2675-2679.
- 4] Lois LL. The ALS gene family of *Candida albicans* J. TRENDS Microbiol, 2001, 9(4): 176-180.
- 5] Jyotsna C, Duncan M, Kuhn PK, et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance J. J Bacteriol, 2001, 183(18): 5385-5394.
- 6] 亓庆国, 周学东, 肖晓蓉, 等. 正常儿童口腔中白色念珠菌的分布及基因分型 J. 中华微生物学和免疫学杂志, 2003, 23(9): 674-677.
- 7] Chandra PK, Mukherjee SD, Faddoul FF, et al. Antifungal resistance of Candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro* J. J Dent Res, 2001, 80(3): 903-908.
- 8] 陈曦, 蒋云爱, 孙小俐, 等. MARK 和 cAMP 途径对白色念珠菌毒性与基因表达的影响 J. 科学通报, 2001, 46(2): 104-109.
- 9] Hoyer LL, Payne TL, Hecht JE. Identification of *Candida albicans* ALS2 and ALS4 and localization of als proteins to the fungal cell surface J. J Bacteriol, 1998, 180(20): 5334-5343.
- 10] Kan VL. Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia J. J Infect Dis, 1993, 168(3): 779-783.
- 11] Xiao JZ, Joseph TN, Ronald L C. Up-regulation of two *Candida albicans* genes in the rat model of oral candidiasis detected by differential display J. Microb Pathog, 1998, 25(1): 121-129.
- 12] Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms J. Clin Microbiol Rev, 2002, 15(2): 167-193.

(本文编辑 汤亚玲)

## 第一届全国口腔组织工程与再生医学会议征文通知

经中国生物医学工程学会组织工程分会同意,第一届全国口腔组织工程与再生医学会议拟定于 2006 年 4 月中旬在西安举行。本次会议将就与再生医学相关的种子细胞(包括干细胞)、支架材料、组织工程器官构建、培养与应用及相关发育学等研究内容进行广泛讨论。届时将邀请国内著名专家教授作专题报告,欢迎踊跃投稿并参加。会后授予 类继续教育学分。

投稿要求:论文以中文摘要形式(结构式)投递,500 字以内,请注明单位地址及邮编。

征文截稿日期:2005 年 11 月 30 日。来稿请寄:陕西省西安市康复路 7 号,第四军医大学口腔医学院组织工程中心,会务组收,邮编:710032。

欢迎通过电子邮件投稿。E-mail:te-rm@vip.sina.com。

联系人:姜玲、王新文,电话:029-83210585,83376151,传真:029-83218039。

欢迎访问组织工程与再生医学网(<http://www.te-rm.com>)查询详情。