

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.08.046

· 专论与综述 ·

白念珠菌基因分型的相关研究

明 迪^{1,2} 黄云丽^{1,2} 公丽红^{1,2} 许 雪^{1,2} 李红宾^{1,2△}

(1 昆明医科大学第一附属医院皮肤科 云南 昆明 650031; 2 云南省皮肤病性病研究所 云南 昆明 650031)

摘要:白色念珠菌定植于大多数人群的口腔中,在一定条件下可成为优势菌种而导致感染。基因分型是近年来白念分子生物学研究中的一个热点,随着医学科学技术的发展,由于深部真菌感染比例不断增加,分子生物学方法已经越来越广泛的应用于临床真菌病的研究中,从而为控制白念感染及为早期诊断、治疗提供基础。本文综述了限制性片段长度多态性、随机扩增多态性 DNA 分析、ITS 区域序列分析等分子生物学技术在白念珠菌基因分型方面的相关研究,比较了它们的优缺点,并且讨论了将基因分型研究应用于临床诊断、治疗及开发新型抗真菌药物的发展趋势和广阔前景。认为目前更倾向于多种分型方法联合应用,并借助计算机软件进行分析,但是仍需进一步探索。

关键词:白念珠菌;基因分型;抗真菌药物

中图分类号:R379.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)08-1569-03

Related Research of Candida Albicans Genotyping

MING Di^{1,2}, HUANG Yun-li^{1,2}, GONG Li-hong^{1,2}, XU Xue^{1,2}, LI Hong-bin^{1,2△}

(1 Department of Dermatology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan, 650031, China;

2 Institute of Dermatology and Venereology of Yun-nan province, Kunming, Yun, 650031, China)

ABSTRACT Candida albicans colonization in the mouth of the majority of the population, under certain conditions, can become the dominant strains and lead to infection. In recent years,geno typing is a hot topic in molecular biology researching of albicans, with the development of science and technology, because of deep fungal infection ratio increases unceasingly, molecular biology method has been more and more widely used in clinical fungal disease research, so as to control albicans infection and provide a basis for the early diagnosis and treatment. This paper reviews theRFLP, RAPD, ITS regional sequence analysis of molecular biology technology in c. albicans genotyping related research, compared their advantages and disadvantages, and discuss the genotyped research applied to clinical diagnosis, treatment and the development of new antifungal development trend and board prospects. We believe that it is more useful to a variety of typing methods in combination, and with the aid of computer software to carry on the analysis, but it still need further investigation.

Key words: Candida albicans; Genotyping; Antifungal drugs

Chinese Library Classification(CLC): R379.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)08-1569-03

白念珠菌是引起真菌感染的主要条件致病菌之一。近年来,由于临床免疫抑制、广谱抗生素、激素的大量使用和滥用,以白念为代表的念珠菌感染呈明显上升趋势。据统计,白念珠菌引起的深部真菌感染比例最高,感染致死率达 40%^[1,2],因此控制念珠菌感染是十分必要的,这就需要我们能够做到早诊断。同时通过对临床病例进行分析研究表明:念珠菌在种内和种间的致病性和耐药性方面也存在差异^[3]。因此,如果可以快速的对临床分离株进行准确的基因分型,便可以更好的指导临床诊断和治疗。要想对白念感染进行早期的诊断和早期预防,首先需要对菌种进行准确的分类,研究不同菌种间的基因型相关性对监测白念感染及相关流行病学调查具有十分重要的意义。在过去的几年里,分子学方法已经被证明成为研究菌种相互关

系、追溯爆发源头以及评估流行病学的一种非常有效的方法^[4]。

此外,侵袭性真菌感染发生率和死亡率逐渐增高,首先因为做不到早期诊断,其次,抗真菌药物也不能够达到预期的疗效。通过新的作用机制寻找新的抗真菌药物作用靶点,研发高效、低毒、广谱的抗真菌药物已成为近年来抗真菌药物研究的热点和趋势^[5]。

1 医院深部真菌检测及抗真菌药物使用的现状

医院深部真菌感染通常严重危及患者生命,白色念珠菌在院内感染中占有主要地位。但是,早期诊断深部真菌感染是相当困难的,因为一般的真菌培养会受到诸多主客观条件的影响,阳性率往往很低^[6],有时即使是阳性,也难以确定是污染、定植还是侵袭^[7]。而分子生物学技术较传统方法具有更高的敏感性和特异性。

因为深部真菌感染患者的增多,抗真菌药物在临床上也开始得到了大规模的应用,这就导致了念珠菌耐药菌株也日益增多。但是我国目前并没有对白念珠菌耐药情况进行大规模流行

作者简介:明迪(1988-),女,研究生,电话:15198788930,

E-mail:66681810@qq.com

△通讯作者:李红宾,E-mail:wangzhengxianlhb@yahoo.com.cn

(收稿日期:2013-07-05 接受日期:2013-07-28)

病学的调查研究。如果可以运用基因分型的方法找出引起耐药表型产生的单一多态性,就有可能对与该表型对应的基因进行定位,从而可以从分子水平上对耐药性进行检测^[8]。

2 白念珠菌基因分型的几种方法

关于白念珠菌的分型方法主要有传统的表型分型方法以及近些年出现的基因分型方法。表型分型主要有形态学法、血清学法、药物敏感性分型等,但是存在诸多缺点,例如结果不稳定、易受各种因素影响等;而基因分型是利用生物学检测方法测定个体基因型,进而通过不同的基因型表现来分型。

2.1 限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism RFLP) RFLP

技术是使用特定的方法将 DNA 提取出来,用限制性核酸内切酶消化以后直接或间接的得出酶切片段在长度和数量上的差异。因为白念珠菌的酶切位点一般各不相同,故而得到的片段都具有多态性,可据此对白念珠菌进行基因分型。RFLP 的优点是操作相对方便和快捷,重复性也较好,但是由于白念珠菌产生的条带较为复杂,故鉴别能力受到很大的限制,不能用于区分种间的基因型关系。

2.2 随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD) RAPD

又称随机引物 PCR,反应体系形成后,在一定的反应条件下,模板 DNA 得到扩增,因为引物和模板会在不同的地方结合,引物对之间也具有不同的长度,由此便可形成各种不同大小的 PCR 扩增产物,产生的 PCR 扩增产物在电泳凝胶上会呈现为不同形态的条带。菌株的 RAPD 带型越相似,说明基因具有更高的同源性,因此可以用于白念珠菌的分型研究。同样,依靠计算机系统能够提高分型的准确性^[9]。有学者用计算机软件对 RAPD 结果进行了一系列分析,提出了相似系数用以评价菌株间的关联性。相似系数(similarity coefficient, SAB)是通过对一张图片里不同条带的亮度、面积等方面综合分析所得出来的,若相似系数值大于 0.9,即可认定为同一种基因型。RAPD 是近年来一种新型的,同样被认为较为理想的分型方法,它同样具有简单、快捷的优点,而且无需对待测菌株进行测序,鉴别能力也较强。但是 RAPD 结果还受实验中各种因素的影响,因此必须对 RAPD 实验中各种条件进行优化,才能得到更为稳定与准确的试验结果。同时 RAPD 还有一个很大的缺点,它设定的退火温度较低,因此更容易就出现假带,虽然这个弊端可以通过重复试验的方法来去除,但是仍然不适用于大规模的研究,所以不能在临床中得以很好的应用。

2.3 脉冲电泳核型(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)

其原理是利用电场方向有规律的变化来促使片段在电泳凝胶中迂回前进,从而完成分离。Chu^[10]等应用 PFGE 对两株标准白念进行研究,通过限制性酶切和电泳核型分析,揭示了白念菌株存在染色体长度多态性 (CLP),CLP 可由染色体的缺失、异位、重排、重叠等因素而引起,不同菌株间 CLP 也有很大差异。PFGE 有着较好的重复性,结果也比较容易记录和解释。但是 PFGE 的缺点是对于技术的要求较为严格,设备昂贵,同时电泳时间长,也容易受到各种因素的影响。

2.4 微卫星多态性分析

微卫星序列也叫简单重复序列,在真核生物基因组中含量丰富,并有多态性。微卫星多态性分析就是根据这些序列设定引物,进行 PCR 扩增之后测定产物的长度,因为不同基因型间序列的重复次数具有较大的差异,所以 PCR 产物所对应的序列重复数就可代表等位基因,并由此得到相应的基因型^[11]。该分型方法操作较为简便,且具有较好的特异性和可重复性,但是在微卫星串联复制时会容易出现打滑而导致复制出错,这样的不稳定性导致了不能再临床上广泛的使用。

2.5 ITS 区域

念珠菌的 rDNA 为串状重复序列,ITS 指 DNA 的内转录间隔区,因为 ITS1ITS2 这部分进化较快,具有种间特异性和种内保守性,可以将菌株鉴定到种、亚种,ITS 白念区域是真菌细胞内 DNA 编码核糖体 RNA(rRNA)的内转录间隔、非编码区(internalt ranscribed spacer region),利用 ITS 区域进行真菌鉴定、分型是目前的研究热点^[12]。它具有简便、快捷的优点,可以与 Genbank 里的序列做对比,从而明确的鉴定菌种,具有更高的准确性。虽然 PCR ITS 基因分型方法才刚刚用于研究,还没有大量的数据来获得更为详尽的资料,但是鉴于 PCR ITS 基因分型方法可以通过精确到碱基的差异来区分基因型,在白念珠菌基因分型研究方面将更具有说服力和优势,在白念流行病学研究中也具有更大的前景。

总的来说,对于选择哪一种方法以及结果的解释大家缺乏统一的意见,可能选择单一的方法并不是十分合适的,因此综合评定念珠菌病的流行病学需要几种分型方法的结合。有了这种意识,许多实验室都在寻找一种相对廉价、快捷并具有适当鉴别能力的方法,特别适合于大规模的鉴定。

3 基因分型相关研究的应用

3.1 基因分型方法在临床中的应用

基因分型可以通过明确不同菌株间有无关联,来判断其亲缘性的远近,从而更加深入的探索一系列问题。

目前,在常见的几种基因分型方法中,PFGE、RFLP 及微卫星序列分析等都存在不同程度的缺陷,在临床上运用较为广泛是随机扩增多态性 DNA 技术及近年来的研究热点 ITS 区域序列分析。有学者通过 RAPD 技术用于研究一间医院不同科室分离出的白念菌株,根据型别有无倾向性来了解有无同源性,明确各个病区有无流行趋势^[13],Antonella 等^[14]曾应用电泳核型分析及 RAPD 技术,曾有学者通过对新生儿重症监护病房(NICU)获得院内感染的早产儿进行感染源和感染途径的研究后发现,从护理人员的手上、患儿的结膜上及血液中分离出的菌株具有相同的基因型,则可认为院内感染是通过护理人员水平传播的。除此之外,还可以感染部位的不同来对念珠菌进行基因型分型,在大样本量的基础上以及自身共栖菌基因型对比来进行进一步研究,可以了解多部位感染病灶是由自身栖居菌感染还是由于原有病灶继发感染所引起^[15]。

此外,有很多研究中心通过同时采用 RAPD 及 ITS 区域的方法确定菌株的基因型发现 ITS 序列分析的方法更为准确及简便^[16]。

3.2 基因分型方法在研究抗真菌药物中的应用

基因分型方法在临床上大多数还是用于研究克隆起源,很

少着重于研究念珠菌基因型和毒力之间的关系^[7]。白色念珠菌有很多的毒力特性,如:粘附力、二相性、酶活性及形成生物膜等,其中对上皮细胞的粘附力和磷脂酶活性最为相关,常用来作为评价白色念珠菌毒力强弱^[8]。目前发现,在白念珠菌中有4条 MAPKs 途径:Mkc 途径、Cek1 途径、Cek2 途径和 Hog1 途径,分别介导细胞壁完整性、侵袭性菌丝的生长以及对压力胁迫的适应过程^[9]。通过对这些途径以及念珠菌毒力和基因型之间相关性的研究,可以为抗真菌药物新靶点的筛选和抗真菌新药与老药联用进行抗真菌治疗提供理论依据^[20]。

4 结语

综上所述,在以后的白念珠菌感染流行病学调查、抗真菌药物药敏及研发新型抗真菌药物的研究中,基因分型已经成为一个越来越重要的研究手段,联合使用多种基因分型方法,或者与表型分型方法相结合,再借助计算机软件进行分析,将使白念分型更加规范及标准。

而关于基因分型与毒力方面的相关研究可以指导我们临床选择抗真菌药物以及研制新的抗真菌药物,目前这一块的研究还没有很充分,需要我们更进一步的探索。

参考文献(References)

- [1] Lee I, Fishman NO, Lautenbach E, et al. Risk factors for fluconazole-resistant *Candida glabrata* bloodstream infection [J]. Arch Intern Med, 2009, 169(4):379-383
- [2] Lockhart S R, Messer S A, Diekema D J, et al. Identification of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a large global collection of *Candida glabrata* isolates: comparison to the literature [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(4):1216-1217
- [3] 赵民, 施卫, 周曾同, 等. 应用 ITS1/ITS2 区域鉴定口腔念珠菌[J]. 临床口腔医学, 2004, 20(12):710-714
Zhao Min, Shi Wei, Zhou Zeng-tong, et al. Use ITS1/ITS2 area to identification oral candidiasis [J]. Clinical Stomatolog, 2004, 20(12): 710-714
- [4] Beata Krawczyk, Justyna Leibner-Cisak, Anna Mielech, et al. PCR melting profile (PCR MP) - a new tool for differentiation of *Candida albicans* strains. BMC Infectious Diseases, 2009, 9:177-189
- [5] Monge RA, Roman E, Nombela C, et al. The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans* [J]. Microbiology, 2006, 152 (Pt 4):905-912
- [6] 曹晖. 关于深部真菌感染的相关研究进展 [J]. 医学综述, 2005, 11 (10):946-947
Cao Hui. Research Progress of deep fungal infections [J]. Medical Review, 2005, 11(10):946-947
- [7] 靳颖, 刘锦, 张明华, 等. 白假丝酵母菌感染及分型方法的研究进展[J]. 武警医学, 2009, 18(11):987-989
Jin Ying, Liu Jin, Zhang Ming-hua, et al. Research Progress of *Candida albicans* infection and genotyping methods [J]. J. Cent. Military Medical Univ, 2009, 18(11):987-989
- [8] 黄静, 刘慧, 朱家馨, 等. 白念珠菌基因多态性与耐药性关系[J]. 中山大学学报, 2007, 28(1):35-39
Huang Jing, Liu Hui, Zhou Jia-xin, et al. The relationship between *Candida albicans* gene polymorphism and drug resistance [J]. J. Cent. Zhong Shan Univ, 2007, 28(1):35-39
- [9] 沈雪敏. 口腔白色念珠菌的基因分型研究进展[J]. 国外医学口腔医学分册, 2002, 29(1):50-52
Shen Xue-min. Research Progress of oral *Candida albicans* genotyping [J]. International of oral Medicine, 2002, 29(1):50-52
- [10] Chu WS, Magee BB, Magee PT, J. Bacteriol, 1993, 175:6637-6651
- [11] Dassanayake RS, Samaranayake LP. Amplification-based nucleic acid scanning techniques to assess genetic polymorphism in *Candida*. Crit Rev Microbiol, 2003, 29:1-24
- [12] 赵民, 周曾同, 张济, 等. 口腔念珠菌的 PCR/ITS1-ITS2 和 RAPD 基因分型[J]. 上海第二医科大学学报, 2005, 25(4):342-344
Zhao Min, Zhou Zeng-Tong, Zhang Ji, et al. Oral candidiasis' genotyping by PCR ITS1-ITS2 and RAPD [J]. J. Cent. Shanghai second medical Univ, 2005, 25(4):342-344
- [13] 胡晓军, 王曙霞. 口腔念珠菌病主要病原菌的 RAPD 分析[J]. 中国医师杂志, 2010, 12(4):534-536
Hu Xiao-jun, Wang Shu-Xia. The oral candidiasis' major pathogens of RAPD analyzing [J]. Chinese medical Journal, 2010, 12(4):534-536
- [14] Lupetti A, Tavanti A, Davini P, et al. Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(7):2363-2369
- [15] 余晓东, 王学军, 符关华, 等. 念珠菌患者多部位分离菌株 DNA 分型研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2007, 40(8):479-481
Yu Xiao-dong, Wang Xue-jun, Fu Guan-hua, et al. DNA typing of *Candidiasis* strains with multi-site separation [J]. Chinese Journal of Dermatology, 2007, 40(8):479-481
- [16] Shin-ichi Fujita, Yasuko Senda, Shigeki Nakaguchi, et al. Multiplex PCR Using Internal Transcribed Spacer 1 and 2 Regions for Rapid Detection and Identification of Yeast Strains [J]. Journal of clinical microbiology, 2001, 39(10):3617-3622
- [17] 朱晓芳, 章强强, 蓝和魁, 等. 白念珠菌临床分离株的基因分型及药物感性研究[J]. 扬州大学学报, 2004, 25(4):82-84
Zhu Xiao-fang, Zhang Qiang-qiang, Lan He-kui, et al. Clinical isolates of *Candida albicans* genotyping and drug sensitive studies [J]. J. Cent. Yangzhou Univ, 2004, 25(4):82-84
- [18] Lyon JP, de Resende MA. Correlation between adhesion, enzyme production and susceptibility to fluconazole in *Candida albicans* obtained from denture wearers [J]. Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006, 102(5):632-638
- [19] Monge RA, Roman E, Nombela C, et al. The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans* [J]. Microbiology, 2006, 152 (Pt 4):905-912
- [20] 黄悦, 张子平, 程波. 白念珠菌高渗透性甘油信号通路研究进展[J]. 国际皮肤性病杂志, 2010, 36(1):17-19
Huang Yue, Zhang Zi-ping, Cheng Bo. Research Progress of *Candida albicans* high permeability of glycerol signaling pathway [J]. International journal of Dermatology and Venereology, 2010, 36(1): 17-19