文章编号:1000-5404(2014)24-2441-04

论著

阿萨希毛孢子菌氟康唑体外诱导耐药的方法优化

张德全[1,2],夏志宽[2],田艳丽[2],廖 勇[2],吕雪莲[2],陈 卫[2],王聪敏[2],杨蓉娅[2] (400038 重庆,第三军医大学[1];100700 北京,北京军区总医院全军皮肤损伤修复研究所[2])

[摘要] **目的** 观察氟康唑联合甲强龙体外诱导阿萨希毛孢子菌(*Trichosporon asahii*,*T. asahii*)获得氟康唑体外诱导耐药株的成功率及稳定性,为 *T. asahii* 唑类耐药机制研究奠定基础。**方法** 对16株 *T. asahii* 进行氟康唑的真菌体外药敏试验,分别通过氟康唑、氟康唑联合甲强龙和单纯甲强龙对其进行体外诱导耐药,并与空白对照组进行比较。所有诱导获得的耐药菌株进行30次无药传代,每株菌在每次传代后均重新进行最小抑菌浓度(MIC)检测。**结果** 空白对照组及单纯甲强龙组各菌株MIC值无明显变化;单纯氟康唑诱导获得耐药株12株(75%),氟康唑联合甲强龙诱导获得耐药株16株(100%);两组经30代传代后,单纯氟康唑组耐药株6株(37.5%),氟康唑联合甲强龙诱导获得耐药株9株(56.25%)。**结论** 甲强龙可以提高氟康唑诱导 *T. asahii* 耐药株的成功率和稳定性,氟康唑联合甲强龙优于单纯氟康唑,更适用于 *T. asahii* 氟康唑体外耐药株的诱导。

[关键词] 阿萨希毛孢子菌;氟康唑;耐药性;最小抑菌浓度
[中图法分类号] R379;R915;R978.5 [文献标志码] A

Optimization of *in vitro* induction of fluconazole-resistant *Trichosporon asahii*

Zhang Dequan[1,2], Xia Zhikuan[2], Tian Yanli[2], Liao Yong[2], Lyu Xuelian[2], Chen Wei[2], Wang Congmin[2], Yang Rongya[2] ([1]Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Institute of Skin Injury and Repair, General Hospital of Beijing Military Command, Beijing, 100700, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the *in vitro* induction successful rate and stability of fluconazole-resistant *Trichosporon asahii* (*T. asahii*) with fluconazole combined with methylprednisolone. **Methods** Sixteen strains of *T. asahii* underwent *in vitro* drug susceptibility test. The strains were induced with fluconazole alone, fluconazole combined with methylprednisolone, and methylprednisolone alone, respectively, and the drug resistance was compared with the control group. The resistant strains were passaged for 30 generations in drug-free medium, and the minimum inhibitory concentration (MIC) of each passage was detected. **Results** The control group and the methylprednisolone alone group had no obvious changes in the MIC during the induction. There were 12 resistant strains (75%) in the fluconazole alone group, and 16 strains (100%) in the fluconazole combined with methylprednisolone group. After 30 passages, there were 6 resistant strains (37.5%) in the fluconazole alone group, and 9 resistant strains (56.25%) in the fluconazole combined with methylprednisolone group. **Conclusion** Methylprednisolone is helpful for increasing the *in vitro* induction successful rate and stability of fluconazole-resistant *T. asahii*. Fluconazole combined with methylprednisolone is superior to fluconazole alone in construction of fluconazole-resistant *T. asahii*.

[**Key words**] *Trichosporon asahii*; fluconazole; drug resistance; minimum inhibitory concentration

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81271764). Corresponding author: Yang Rongya, Tel: 86-10-66721229, E-mail: yangrya@sina.com

阿萨希毛孢子菌(*Trichosporon asahii*, *T. asahii*)为一种条件致病酵母样真菌,是毛孢子菌病最常见的致病菌。氟康唑作为临床治疗真菌感染的常用药物,对阿萨希毛孢子菌感染的治疗发挥了重要作用,但随着唑类药物的广泛应用,真菌耐药现象也越来越严重,给临床治疗带来了极大的困难。因此,研究阿萨希毛

[基金项目] 国家自然科学基金(81271764)
[通信作者] 杨蓉娅,电话(010)66721229,E-mail: yangrya@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141107.0836.001.html(2014-11-07)

孢子菌的耐药机制具有重要意义。阿萨希毛孢子菌耐药机制研究的关键在于获得稳定的耐药菌株。本研究以临床和环境分离的阿萨希毛孢子菌株为诱导对象，探讨耐氟康唑阿萨希毛孢子菌体外诱导的方法及耐药株的稳定性，从而为研究阿萨希毛孢子菌耐药机制以及指导临床合理用药奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、培养基和试剂

阿萨希毛孢子菌，共16株，*T. asahii* 临床标准株（CBS2479）为日本千叶大学赠送，*T. asahii*（701～705，901、902）为本实验室保存的国内临床分离菌株，*T. asahii*（06108、06198、06674、04848、06956）、*T. asahii*（8904、8520、7137）均购自荷兰CBS公司，药敏质控的标准菌株近平滑念珠菌ATCC22019由北京大学第一医院真菌研究中心提供。菌株接种在YPD（1%酵母提取物，2%蛋白胨以及2%葡萄糖）液体培养基中，置于35 ℃摇床传代培养。RPMI1640培养基（美国Gibco公司），三氮吗啡琳丙磺酸（MOPS，美国Sigma公司）。氟康唑（批号：060M4707V，纯度≥98%，美国Sigma公司）用无菌注射用水稀释至储存浓度后，储存液密封后－20 ℃冰箱储存备用。甲泼尼龙琥珀酸钠（批号：07101022，法玛西亚普强公司）。

1.2 抗真菌药物敏感试验

按照美国临床和实验室标准协会（CLSI）推荐的M27-A3标准化方案中的操作步骤进行药敏试验，并应用MOPS将RPMI1640培养基的pH调整至7.0。用RPMI1640液体培养基将氟康唑储存液稀释成0.25～128 μg/mL浓度梯度。配制0.5麦氏浊度的菌悬液，将菌悬液用RPMI1640稀释1 000倍，接种96孔板（每孔0.1 mL），氟康唑工作浓度为0.125～64 μg/mL，35 ℃静置孵育，同时设生长对照、空白对照、质控菌株对照，48 h观察结果。按照CLSI推荐方案，通过肉眼观察对药敏结果进行判读，与生长对照相比生长明显受抑（约50%）的最低药物浓度作为最小抑菌浓度（minimum inhibitoryconcentration，MIC）。根据MIC值的不同，将菌株分为敏感型（MIC≤8 μg/mL）、剂量依赖敏感型（16 μg/mL≤MIC≤32 μg/mL）和耐药型（MIC≥64 μg/mL）。本研究中的16株 *T. asahii*，诱导前经抗真菌药物敏感实验检测均为敏感菌株。详见表1。

1.3 氟康唑诱导耐药株的形成

1.3.1 氟康唑诱导方法　将阿萨希毛孢子菌在PDA培养基上35 ℃培养48 h，再取单个菌落转种于PDA培养基上，以同样条件培养48 h，以确保其纯度和活力。然后取单个菌落转种于10 mL不含氟康唑的YPD培养液中，35 ℃振荡培养18～24 h，当菌液浓度达到约0.5麦氏单位，取0.1 mL菌液加至10 mL含1/2 MIC浓度氟康唑的YPD培养液中培养，当培养菌液浓度达到约0.5麦氏单位时，再取0.1 mL菌液转种至10 mL含1倍MIC浓度氟康唑的YPD培养液中培养至所要求浓度，然后以同样的方式进行下一级浓度梯度诱导，直至氟康唑诱导浓度达到128 μg/mL，每一代菌株均进行MIC值测定，并将每一代诱导后的菌株加50 mL/dL无菌甘油-80 ℃保存。

1.3.2 氟康唑联合甲强龙诱导方法　诱导方法步骤同氟康唑诱导法，不同之处是先在10 mL YPD培养液中加8 μg/mL甲强龙进行干预培养，然后在含递增药物浓度培养基中同时加入4 μg/mL甲强龙进行诱导培养。

1.3.3 对照组设定　所有实验菌株均列入空白对照组和甲强龙干预组。空白对照组，即将实验菌株接种至无药YPD液体培养基中，与氟康唑诱导组及氟康唑联合甲强龙诱导组进行平行传代，直至上述两组完成128 μg/mL浓度氟康唑诱导。甲强龙干预对照组传代方法同无药传代对照组，不同之处为加入与氟康唑联合甲强龙诱导组等量的甲强龙。

1.4 氟康唑耐药性的稳定性观察

将氟康唑耐药株接种至无药YPD液体培养基中传代培养，每次传代后，均按1.2中方法对所有菌株的MIC值进行测定，直至完成传代30次。

2 结果

2.1 诱导结果

经2、4、8、16、32、64和128 μg/mL药物浓度递增培养诱导后，氟康唑诱导组诱导完成后产生耐药菌株12株，MIC值范围为16～64 μg/mL，MIC_{50}=64 μg/mL，MIC_{90}=64 μg/mL；氟康唑联合甲强龙组诱导完成后所有菌株MIC均≥64 μg/mL；空白对照组MIC值范围为0.5～4 μg/mL，MIC_{50}=1 μg/mL，MIC_{90}=4 μg/mL；甲强龙干预组MIC值范围为0.25～4 μg/mL，MIC_{50}=0.5 μg/mL，MIC_{90}=4 μg/mL。详见表1。

表1 不同诱导条件下阿萨希毛孢子菌的最小抑菌浓度（MIC）变化（单位：μg/mL）

	组别	0 μg/mL	2 μg/mL	4 μg/mL	8 μg/mL	16 μg/mL	32 μg/mL	64 μg/mL	128 μg/mL
MIC range	FLU	0.125～4	1～8	2～16	4～32	16～64	16～64	16～64	16～64
	FLU＋MED	0.125～4	1～16	4～16	8～32	16～32	32～64	32～64	64
	MED	0.125～4	0.25～4	0.25～4	0.25～4	0.25～4	0.25～4	0.25～4	0.25～4
	Control	0.125～4	0.5～4	0.5～4	0.5～4	0.5～4	0.5～4	0.5～4	0.5～4
MIC_{50}	FLU	0.5	2	4	8	16	32	32	64
	FLU＋MED	0.5	2	8	8	32	32	32	64
	MED	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	Control	0.5	1	1	1	1	1	1	1
MIC_{90}	FLU	4	4	16	16	64	64	64	64
	FLU＋MED	4	8	16	32	32	64	64	64
	MED	4	4	4	4	4	4	4	4
	Control	4	4	4	4	4	4	4	4

注：FLU：氟康唑组；FLU＋MED：氟康唑联合甲强龙组；Control：空白对照组；MED：甲强龙干预组

表2 不同传代次数下阿萨希毛孢子菌的最小抑菌浓度(MIC)变化 (单位:μg/mL)

	组别	2	6	10	14	18	22	26	30
MIC range	FLU(n=12)	64	16~64	8~64	8~64	8~64	4~64	1~64	1~64
	FLU+MED(n=16)	64	16~64	16~64	16~64	8~64	8~64	8~64	8~64
MIC_{50}	FLU(n=12)	64	64	32	32	32	32	32	32
	FLU+MED(n=16)	64	64	64	64	64	64	64	64
MIC_{90}	FLU(n=12)	64	64	64	64	64	64	64	64
	FLU+MED(n=16)	64	64	64	64	64	64	64	64

注:FLU:氟康唑组;FLU+MED:氟康唑联合甲强龙组

2.2 耐药稳定性观察结果

经上述两种不同方式诱导,氟康唑组获得耐药株12株,氟康唑联合甲强龙组获得耐药株16株,将两组耐药株分别在无药YPD液体培养基中连续传代培养30代并测MIC值。氟康唑诱导组30次传代后获得稳定耐药菌株6株,敏感菌株2株,剂量依赖型敏感菌株4株,MIC值范围为1~64 μg/mL,MIC_{50}=32 μg/mL,MIC_{90}=64 μg/mL;氟康唑联合甲强龙组30次传代后获得稳定耐药菌株9株,敏感菌株1株,剂量依赖型敏感菌株6株,MIC值范围为1~64 μg/mL,MIC_{50}=32 μg/mL,MIC_{90}=64 μg/mL。详见表2。

3 讨论

目前,临床致病真菌的耐药问题是人类所面临的医学难题之一,抗真菌药物长期、低剂量的预防和治疗是真菌产生耐药性的重要原因。但随着唑类药物的广泛应用,*T. asahii* 的耐药现象也越来越严重,给临床治疗带来了极大的困难和挑战。因此获得稳定的氟康唑耐药菌株、研究有关氟康唑对 *T. asahii* 的耐药机制具有重要的研究价值。但目前针对阿萨希毛孢子菌的氟康唑体外诱导耐药株研究较少,Kushima 等[1]报道的关于 *T. asahii* 氟康唑耐药菌株的研究中样本数量较少,且其对传代稳定性的结论与本研究中所观察到的稳定性变化存在差异,因此我们对以往诱导方法进行了改进优化,采用氟康唑联合甲强龙诱导法对16株阿萨希毛孢子菌进行人工体外诱导获得耐药株,并对获得的耐药株进行30次传代,观察耐药株稳定性,在 *T. asahii* 的耐药株建立中首次应用激素干预,以期获得更为稳定的耐药株。无药传代及甲强龙干预传代各菌株MIC值范围、MIC_{50}、MIC_{90}变化幅度不大,说明单纯传代及单纯甲强龙干预对 *T. asahii* 的耐药性没有影响。而在单纯氟康唑诱导组中,16株阿萨希毛孢子菌中有12株(75%)在128 μg/mL氟康唑浓度培养基中培养后成为耐药株;氟康唑联合甲强龙诱导组中,16株(100%)阿萨希毛孢子菌均在128 μg/mL氟康唑浓度培养后成为耐药株,表明甲强龙对氟康唑诱导耐药具有促进作用,可明显增强氟康唑诱导耐药的成功率,氟康唑联合甲强龙诱导法优于单纯氟康唑诱导法。但在体内氟康唑联合甲强龙是否可以出现相似的作用目前尚不清楚,有待于动物实验进一步验证。在临床治疗中,我们主张尽量避免应用氟康唑的同时应用甲强龙,因为这有可能促进 *T. asahii* 对氟康唑耐药的发生。两组菌株经30代传代后,单纯氟康唑组与甲强龙干预氟康唑组分别获得稳定耐药株6株(37.5%)和9株(56.25%),MIC_{50}分别为32 μg/mL和64 μg/mL,MIC_{90}均为64 μg/mL,这表明在获得耐药株稳定性方面,氟康唑联合甲强龙诱导法亦优于单纯氟康唑诱导法,同时也提示在临床治疗中,即使在氟康唑耐药性产生后间隔一段时间再次给药,仍有部分患者可能无法获得满意的治疗效果。

目前,有关糖皮质激素与真菌的研究主要集中在对真菌形态学、生长状态、基因表达及蛋白表达的影响等方面。一些研究显示酵母细胞如白色念珠菌在添加类固醇激素的培养基中生长,可出现形态学及生长速率等改变[2-4]。类固醇激素与白色念珠菌相关的另一个现象是当女性月经后期雌激素与孕激素水平升高时,更易罹患念珠菌性阴道炎[5]。有趣的是,假丝酵母中确实存在类固醇结合蛋白如雌二醇结合蛋白、皮质类固醇结合蛋白和孕激素结合蛋白,它们可能不属于DNA结合蛋白[6],且在酵母细胞中激素信号传导通路也并不清楚。类固醇激素可作为真菌生长和形态发生的调控剂,致病真菌从孢子到菌丝的形态转换被认为是最主要的毒力特征,这种转换取决于宿主体内的环境因素,类固醇激素可作为一种环境因素促进致病真菌的形态转换[7-8]。目前已有少量关于转录组及蛋白组对激素反应的研究[7-10],这些有限的研究已经足以证明在激素的影响下,酵母细胞的形态学、生长状态、基因表达及蛋白表达均会发生变化,但其具体机制仍不是很明确。

关于甲强龙可以提高氟康唑诱导耐药的成功率以

及稳定性的研究较少,机制尚不完全清楚。已有研究表明,类固醇激素可影响致病和非致病酵母细胞的药物敏感性,但类固醇激素这种作用的分子机制及信号通路尚不清楚[3, 11-12]。Banerjee 等[8]的研究发现,类固醇激素可增强白色念珠菌对氟康唑及酮康唑耐药性,用微量稀释法检测含有人类类固醇激素黄体酮及β-雌二醇的环境中的白色念珠菌 SC5314 及缺乏上述两种激素环境的该菌株,可发现含有两种激素环境中的菌株其氟康唑及酮康唑的 MIC80 呈持续性增高。同时也有学者通过研究表明类固醇可增强白色念珠菌的耐药性[13]。类固醇激素可作为多重耐药泵蛋白的底物,尽管引起临床菌株唑类耐药性的机制已较为明确,但归属于 ABC(ATP-binding cassette,如 CaCDR1、CaCDR2)或 MF(major facilitator, 如 CaMDR1)超家族的药物外排泵编码基因的上调仍是药物耐药的主要机制。多种药物转运体 CaCDR1p 可以特异性地转运 β-雌二醇和皮质酮,这一进程可在 β-雌二醇、皮质酮、麦角固醇及地塞米松过量时被阻断。但黄体酮不能作为 CaCDR1p 的底物。一些药物如放线菌酮、氯霉素、氟康唑等可阻止 β-雌二醇的外流并提高其聚集浓度,这表明激素和药物之间可能存在共同的结合位点[14]。类固醇激素可在转录水平激活酵母细胞的多重耐药基因,Karnani 等[15]发现类固醇敏感区(steroid responsive region,SRR)可使 β-雌二醇和黄体酮获得激活 CaCDR1 启动子的能力。deMicheli 等[16]通过研究确定了 CaCDR1 和 CaCDR2 启动子中与雌二醇相关的顺式调控元件。本研究的不足之处在于尚未阐明氟康唑联合甲强龙对阿萨希毛孢子菌耐药性增强的可能机制,下一步的研究将主要集中于该方法对耐药基因突变位点和外排泵的影响,以进一步探索该机制,同时本研究也在一定程度上为后续研究奠定了基础。

总之,我们通过对体外阿萨希毛孢子菌氟康唑耐药方法的优化,发现氟康唑联合甲强龙诱导法在诱导成功率及获得耐药株稳定性方面均优于单纯氟康唑诱导方法,说明甲强龙在耐药菌株的诱导中与氟康唑有协同作用,为毛孢子菌耐药机制的后续系列研究奠定基础,为指导临床合理用药提供了可靠的理论依据。

参考文献:

[1] Kushima H, Tokimatsu I, Ishii H, *et al*. Cloning of the lanosterol 14-alpha-demethylase (ERG11) gene in Trichosporon asahii: a possible association between G453R amino acid substitution and azole resistance in *T. asahii*[J]. FEMS Yeast Res, 2012, 12(6): 662-667.

[2] Kinsman O S, Collard A E. Hormonal factors in vaginal candidiasis in rats[J]. Infect Immun, 1986, 53(3): 498-504.

[3] Zhang X, Essmann M, Burt E T, *et al*. Estrogen effects on Candida albicans: a potential virulence-regulating mechanism[J]. J Infect Dis, 2000, 181(4): 1441-1446.

[4] Zhang X, De-Micheli M, Coleman S T, *et al*. Analysis of the oxidative stress regulation of the Candida albicans transcription factor, Cap1p [J]. Mol Microbiol, 2000, 36(3): 618-629.

[5] Fidel P L Jr, Cutright J, Steele C. Effects of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis[J]. Infect Immunity. 2000, 68(2): 651-657.

[6] Madani N D, Malloy P J, Rodriguez-Pombo P, *et al*. Candida albicans estrogen-binding protein gene encodes an oxidoreductase that is inhibited by estradiol[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(3): 922-926.

[7] Cheng G, Yeater K M, Hoyer L L. Cellular and molecular biology of Candida albicans estrogen response[J]. Eukaryot Cell, 2006, 5(1): 180-191.

[8] Banerjee D, Martin N, Nandi S, *et al*. A genome-wide steroid response study of the major human fungal pathogen Candida albicans[J]. Mycopathologia, 2007, 164(1): 1-17.

[9] Banerjee D, Pillai B, Karnani N, *et al*. Genome-wide expression profile of steroid response in Saccharomyces cerevisiae[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 317(2): 406-413.

[10] Banerjee D, Lelandais G, Shukla S, *et al*. Responses of pathogenic and nonpathogenic yeast species to steroids reveal the functioning and evolution of multidrug resistance transcriptional networks[J]. Eukaryot Cell, 2008, 7(1): 68-77.

[11] Tanaka S, Hasegawa S, Hishinuma F, *et al*. Estrogen can regulate the cell cycle in the early G1 phase of yeast by increasing the amount of adenylate cyclase mRNA[J]. Cell, 1989, 57(4): 675-681.

[12] Romani L, Bistoni F, Puccetti P. Adaptation of Candida albicans to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts[J]. Curr Opin Microbiol, 2003, 6(4): 338-343.

[13] Manoharlal R, Sharma M, Prasad R. Molecular determinants of transient and reversible induced up-regulation of CaCDR1 in azole susceptible clinical isolates of Candida albicans[J]. Biosci Rep, 2011, 31(1): 31-43.

[14] Krishnamurthy S, Chatterjee U, Gupta V, *et al*. Deletion of transmembrane domain 12 of CDR1, a multidrug transporter from Candida albicans, leads to altered drug specificity: expression of a yeast multidrug transporter in baculovirus expression system[J]. Yeast. 1998, 14(6): 535-550.

[15] Karnani N, Gaur N A, Jha S, *et al*. SRE1 and SRE2 are two specific steroid-responsive modules of Candida drug resistance gene 1 (CDR1) promoter[J]. Yeast, 2004, 21(3): 219-239.

[16] de-Micheli M, Bille J, Schueller C, *et al*. A common drug-responsive element mediates the upregulation of the Candida albicans ABC transporters CDR1 and CDR2, two genes involved in antifungal drug resistance[J]. Mol Microbiol, 2002, 43(5): 1197-1214.

(**收稿**:2014-07-13;**修回**:2014-09-19)

(编辑 邓强庭)