昆 明 医 学 院 学 报 2012，(3):143~146
Journal of Kunming Medical University
CN 53 - 1049/R

外阴阴道白假丝酵母菌病耐药机制研究进展

杨丽娜，祁文瑾，肖 虹
（昆明医学院第一附属医院妇产科，云南 昆明 650032）

［摘要］外阴阴道假丝酵母菌病（VVC）是妇女常见的外阴阴道炎症之一，随着抗生素和抗真菌药物的广泛应用，假丝酵母菌的菌种构成发生了一定变化．白假丝酵母菌的耐药株也逐渐增多．综述了白假酵母菌耐药机制，对寻找新的治疗策略和开发新的抗真菌药具有重要的指导意义．

［关键词］白假丝酵母菌；外阴阴道病；耐药机制
［中图分类号］R711.31 ［文献标识码］A ［文章编号］1003－4706（2012）03－0143－04

Research Progress in Mechanisms of Drug Resistance to Vulvovaginitis Caused by Candida Albicans

YANG Li－na，QI Wen－jin，XIAO Hong
（Dept. of Gynecology and Obstetrics，The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University，Kunming Yunnan 650032，China）

［**Abstract**］The vulvovaginal candidiasis（VVC）is one of common vulvovaginitis of women，due to the abuse of antibiotics and antifungal drugs， the strains of pathogenetic candida have developed a certain changes. As the main pathogen of VVC，the strains of candida albican resistant to antifungal agent are increasing. The mechanisms of insensitivity to medicine involve function variation of multiple genes in the multi–level， so the investigation focusing on the mechanisms of drug insensitivity is helpful and meaningful to exploring new therapy strategies and invention of new antifungal drugs.

［**Key words**］Candida albican；Vulvovaginitis；Mechanisms of resistance

外阴阴道假丝酵母菌病（vulvovaginal candidiasis，VVC）是一种主要累及黏膜的假丝酵母菌感染性疾病．约75%的育龄妇女一生至少患有1次外阴阴道假丝酵母菌病，40%～50%患者有再次发作的经历，其中5%的妇女反复发作成为复发性外阴阴道假丝酵母菌病（recurrent vulvovaginal candidiasis，RVVC）[1]．近年来随着抗生素和抗真菌药物的广泛应用，VVC致病菌的耐药问题日益突出，给临床治疗带来了严重困难．本文就白假丝酵母菌对常用抗真菌药物耐药的分子机制进行综述．

1 白假丝酵母菌对唑类药物的耐药机制

白假丝酵母菌对唑类药物的耐药机制主要包括：药物外排泵的过度表达、ERG11基因的改变、锌簇转录因子对耐药基因表达的调控、热休克蛋白90、小囊状空泡结构和生物膜的形成和钙调神经磷酸酶通路的参与等．近年来对药物外排泵的过度表达、ERG11基因改变的研究报道较多，因此本文着重就其它几种耐药机制进行综述．

1.1 锌簇转录因子对耐药基因表达的调控

UPC2、TAC1和MRR1等锌簇转录因子是白假丝酵母菌中某些耐药基因表达的关键调节因子，它们的点突变可引起相应耐药基因的过度表达而造成菌株对唑类药物的敏感性降低．锌簇转录因子

［基金项目］国家自然科学基金资助项目（30760265）
［作者简介］杨丽娜（1985～），女，云南芒市人，在读硕士研究生，主要从事妇科临床工作．
［通讯作者］祁文瑾．E–mail:wenjinq@sohu.com

Upc2p 可调节 ERG11（唑类药物的作用靶位酶，真菌麦角固醇合成通路的关键酶羊毛甾醇 14- 脱甲基酶的编码基因）以及 ERGl、ERG3、ERG4 等其他有关麦角固醇生物合成基因的表达，还是麦角固醇代谢的关键调节因子. UPC2 基因的缺失可以影响细胞在厌氧环境的生长并导致细胞对酮康唑和氟康唑高度敏感. 相反，它的过度表达导致细胞对酮康唑、氟康唑的耐药[2]. TACl 是第 1 个被发现的介导白假丝酵母菌耐药基因调控的转录活化因子，其编码基因 TACl 位于白假丝酵母菌 5 号染色体左臂上，与 ERG11 基因相邻，是 CDRl（白假丝酵母菌耐药蛋白 Cdr1p 的编码基因）和 CDR2（白假丝酵母菌耐药蛋白 Cdr2p 的编码基因）基因表达上调的必需因子[3]. TAC1 野生型的等位基因在诱导剂如氟奋乃静等的存在下可以引起 CDRl、CDR2 表达的上调，而 TAC1 机能亢进的等位基因能引起 CDRl、CDR2 的持续性高表达[4]. TAC1 点突变也与 CDRl、CDR2 的持续性高表达有关，T225A、A736V、N977D、N972D 和 G980E 等氨基酸置换都可能导致 CDR1 和 CDR2 的高表达，从而导致耐药的发生[4-6]. 锌簇转录因子 MRR1（多药耐药蛋白 1-MDR1 外排泵的主要调节因子多药耐药调节子）在白假丝酵母菌临床耐药株中的正向调节与 MDR1 相平行. MRRl 失活的同时 MDRl 的表达和多药耐药现象也消失了. 许多 MRRlp 靶基因编码氧化还原酶类，在氟康唑耐药株中这些酶的上调可能有助于阻止暴露于氟康唑时毒力分子引起的细胞破坏，从而导致菌株耐药[7]. Chen C G 等研究还发现 MDRl 的负调节蛋白（REP1）在酿酒酵母菌中的过度表达降低氟康唑敏感性，而 REPl 的无效突变引起 MDRl mRNA 的过度表达，从而降低药物敏感性[8].

1.2 热休克蛋白 90（heat shock protein 90，HSP90）

HSP90 是一种分子伴侣，是所有真核生物所必须的，在靶蛋白的折叠、转运、成熟和降解的过程中起调节作用. 其调节机制有以下 2 种：（1）Hsp90 与底物结合后使底物不能接受刺激信号而失活. （2）Hsp90 在信号介导后帮助底物蛋白进行最终的折叠、复合物的形成及维持复合物的稳定性. 有研究证实，Hsp90 介导的酿酒酵母菌对氟康唑的抗药性是通过快速选择机制[9]产生的；Hsp90 可以使一系列基因发生突变，如：Erg3、Erg6、ymrl02c 等而产生抗真菌药物的耐药性. 其中 Erg3 导致的耐药机制较为常见，其机制为：Erg3 突变体改变了细胞膜的麦角固醇组成，同时避免了合成麦角固醇中间毒性产物的聚积，即 Erg3 基因突变后不能生成有活性的△5，6 去饱和酶，引起真菌细胞内蓄积的固醇中间产物转变为 14α－甲基法尼醇（14α-methylfecosterol），而不是 14α－麦角烷-8，24（28）－二烯-3β，6α－二醇（14α-methylergosta-8，24（28）-dien-3β，6α-diol），前者能够部分代替麦角固醇的功能，支持真菌生存，而后者的蓄积则是抑制白假丝酵母菌的生长，从而使白假丝酵母菌发生耐药而能在含高浓度氟康唑的培养基上生存. 而钙调磷酸酶（Calcineurin）是 Hsp90 底物蛋白，可以调控真菌受刺激时产生的多种反应，包括对氟康唑的耐药机制[10]. Calcineurin 介导的耐药性主要是引起 Erg3 基因突变. 环孢素 A（CsA）是 Calcineurin 的抑制物，它能与 Calcineurin 形成复合物而抑制 Calcineurin 的作用. Cowen[11] 等发现 CsA 可以通过抑制 Calcineurin 的活性而使 Erg3 突变体丧失其原有的对氟康唑的耐药性. 从而证明 Hsp90 一 Caicineurin 一 Erg3 基因突变可能是酿酒酵母菌耐药性产生的一条途径.

1.3 小囊状空泡（vesicular vacuoles）

Maebashi 等[12]报告了另一种的白假丝酵母菌对唑类药物的耐药机制：他们在对某些耐氟康唑等唑类药物的白假丝酵母菌进行超微结构观察时发现其最显著的变化是有许多的小囊状空泡，直径 150～400 nm，这些空泡以前从未被观察到，敏感菌株中没有此结构. 通过电镜负染对亚细胞结构观察发现，大多数小囊状空泡在 P- 120（pellet fraction by centrifugation at 120）部分可见，这种小囊状空泡可能与其它细菌中介导耐药性的膜泡（membrane vesicles）相似.

1.4 生物膜的形成

生物膜是附着于无活力或活组织表面的、由其自身产生的细胞外基质（extracellular matrix，ECM）包裹的有结构的菌细胞群体，是相对于单个分散的游离状态菌细胞而言的另一种微生物独特的生存形式[13]. 许多研究表明，白假丝酵母菌生物膜的形成可能导致大多数唑类抗真菌药的耐药性急剧增加[14]. 生物膜的存在是药敏结果和临床实际情况不符的主要原因之一，其导致耐药的机制主要包括：（1）ECM 阻碍药物渗透的物理屏障作用. （2）生物膜内的细胞营养受限，生长缓慢，处于代谢休眠期，导致了真菌代谢降低. 对抗真菌药物敏感性降低. （3）麦角甾醇的异常:生物被膜的麦角甾醇水平在成熟期减少，而成熟期恰是白假丝酵母菌生物被膜耐药性提升的时期，故麦角甾醇的减

少很可能增加其耐药程度．（4）生物膜耐药相关基因的表达．Lyons 等[15]通过比较生物膜细胞和敏感细胞在基因表达上的差异来研究耐药性，结果证实转运蛋白（CDR 或 MDR）表达上调可能与生物膜耐药有关．Mukheoee 等[16]构建了 CDR1、CDR2、MDR1 双基因和三基因白假丝酵母菌缺陷株，发现缺少 CDR1 和 MDR1 基因的变异株形成的早期生物膜比中晚期的生物膜对氟康唑的敏感性要高，而由变异株与母株形成的成熟生物膜均对氟康唑有高度耐药性．（5）与细菌生物膜类似，念珠菌生物膜耐药性还可能与微环境的改变（如缺氧、pH 值）以及对抗机体的免疫防御等因素有关，生物膜致病菌可采用多种方式对抗机体的免疫防御机制，从而逃脱免疫系统[17]．

1.5　钙调神经磷酸酶通路的参与

有研究报道了一种新型白假丝酵母对唑类药物的耐药机制，认为白假丝酵母菌的钙调神经磷酸酶通路能够参与白假丝酵母菌耐药性的产生，并导致白假丝酵母菌菌细胞形态学的改变和致病力的增强[18]．Jia 等[19]通过构建 RTA2 基因高表达菌株，经过菌株敏感测试，定量 RT–PCR、甾醇分析和罗丹明 6G 外排实验对其机制深入研究后，发现 RTA2 基因能够参与钙调神经磷酸酶通路，并导致菌株耐药性的产生．

2　白假丝酵母菌对其他抗真菌药的耐药机制

2.1　白假丝酵母菌的多烯类耐药机制

多烯类抗真菌药物是快速杀菌药，它与真菌细胞膜麦角固醇形成复合体，此复合体形成穿膜的孔洞，从而导致快速杀灭白假丝酵母菌．目前应用于临床的多烯类抗真菌药物主要是两性霉素 B（AMB），其耐药机制分为以下几种：（1）穿过真菌细胞壁是两性霉素 B 到达细胞膜的第一道屏障，耐药菌中这一通路可能发生改变；（2）ERG3 基因突变后，真菌细胞内 14α– 甲基法尼醇蓄积，细胞膜中脂类的数量和质量发生变化，特别是麦角固醇含量减少，降低了两性霉素 B 与细胞膜结合的几率;唑类抗真菌药能抑制麦角甾醇的生物合成，导致细胞膜中缺乏两性霉素 B 的结合位点，使真菌对两性霉素 B 产生耐药性；（3）真菌细胞对两性霉素 B 引起的氧化现象敏感性降低[20]．

2.2　白假丝酵母菌的 5 一氟胞嘧啶耐药机制

5 一氟胞嘧啶（Fc）是核苷类似物，能选择性地进入真菌细胞内，在真菌胞嘧啶脱氨酶的作用下转化为氟尿嘧啶，后者再在尿嘧啶核酸核糖转移酶（Furlp）作用下最终转变成磷酸核苷氟尿嘧啶（FuMP）．FuMP 渗入 RNA 分子，破坏真菌 RNA 的结构和功能，从而发挥抗真菌作用．另外，FuMP 还可以转化成 FdTMP 渗入 DNA 分子，干扰 DNA 的功能[21]．最近的分子生物学研究确定了 Furlp 突变在白假丝酵母菌对 Fc 耐药中的作用[21]．功能缺失或缺陷的 Furlp 不能有效地把 FC 转化成毒性的 FuMP，因而出现耐药．大多数白假丝酵母菌 Fc 耐药的临床株 Furlp 基因有 C30lT 突变，这种突变发生在 Furlp 的保守区域，C30lT 纯合突变时菌株表现为 FC 高度耐药株，C30lT 杂合突变表现为中度耐药性．把野生型 FURl 基因转化到纯合 C310T 突变子后，转化子对 FC 变得敏感[22]．其它研究还提示，胞嘧啶透酶（cytosine permease）、胞嘧啶脱氨酶（cyosine deaminase）功能缺陷或胸苷酸合酶活性改变也可能是白假丝酵母菌对 FC 耐药的机制[21,22]．

2.3　对棘白菌素类耐药的机制

棘白菌素（echinocandins）类抗真菌药物是近年来新上市的一类抗真菌药物，主要有卡泊芬净（caspofungin，CAS）、米卡芬净（micafungin）等．这类药物通过抑制真菌细胞 β 葡聚糖合成酶的活性而抑制细胞壁（1，3） β –D 一葡聚糖合成，发挥抗真菌作用．在白假丝酵母菌，β 一葡聚糖合成酶的编码基因为 CaFKS1．在一些临床分离对棘白菌素耐药的白假丝酵母菌株中发现，其两个 CaFKS1 等位基因之一的保守区发生突变（Phe 641 to Asp 648）与对棘白菌素类药物敏感性降低明显相关；基因定点突变的方法也发现这一区域的突变足以引起对棘白菌素敏感性降低[23]．为了解 CDR1、CDR2、MDR1 基因的过度表达在白假丝酵母菌对棘白菌素类药物耐药中的作用，Niimi[24]等构建了过度表达 CDR1、CDR2、MDR1 基因的白假丝酵母菌转化子，并测定这些转化子对 CAS 和米卡芬净的敏感性，结果发现它们对这两种药物的敏感性与野生株相比没有明显差别．因此认为 CDR1、CDR2、MDR1 基因在白假丝酵母菌对棘白菌素敏感性降低中无明显作用．另外，CAS 抗白假丝酵母菌的作用呈“浓度依赖的矛盾现象”，即在低浓度的 CAS 下，白念珠菌对 CAS 敏感；而在提高 CAS 浓度后，对 CAS 敏感性降低．这一现象发生的机制可能与蛋白激酶 C（PKC）细胞壁合成途径变化有关[25]．在一些对棘白菌素耐药的临床分离白色念珠菌株中还发现了 FKS、F641Y、S645P 和 S645F 的突变，F641S 突变与白假丝酵母菌对

棘白菌素的耐药也有关[26].

综上所述，白假丝酵母菌对药物的耐药性是影响抗真菌药物疗效的重要因素，其耐药性的产生是一个逐步发展的过程，是多基因在多层次水平变异的结果，因此对白假丝酵母菌耐药机制的研究对于寻找新的治疗策略和开发新的抗真菌药具有重要的指导意义.

[参考文献]

[1] 朱晓芳. 外阴阴道念珠菌病的病原学研究进展[J]. 国外医学(微生物 学分册),2002,25(2):33

[2] MACPHERSON S,AKACHE B,WEBER S,et al. Candida albicans zinc cluster protein Upc2p confers resistance to antifungal drugs and is an activator of ergosterol biosynthetic genes[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005 , 49 (5): 1 745 – 1 752.

[3] COSTE A,SELMEEKI A,FOREHE A,et al. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential Candida albicans iso1ates [J]. Eukaryot Cell,2007,6 (10):1 889 – 1 904.

[4] COSTE A,TURNER V,ISCHER F,et al. A mutation in Tacl P,a transcription factor regulating CDRI and CDR2.is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in candida albicans [J]. Genetics,2006,172(4):2 139 – 2 156.

[5] LIU T T,ZNAIDI S,BARKER K S,et al. Genome. wide expression and location analyses of the Candida albicans Taclp regulon[J]. Eukaryot Cell,2007,6(11):2 122 – 2 138.

[6] COSTE A T,CRITTIN J,BAUSER C,et al. Functional analysis of cis and trans acting elements of the Candida albicans CDR2 promoter with a novel promoter reporter system[J]. Eukaryot Cell,2009,8(8):1 250 – 1 267.

[7] MORSCHHITUSER J,BARKER K S,LIU T T,et al. The transcription factor MrrlP controls expression of the MDRl efflux pump and mediates multidrug resistance in candida albicans[J]. PLOS Pathog,2007,3(11):164.

[8] CHEN C G,YANG Y L,TSENG K Y,et al. Replp negatively regulating MDRI efflux pump involved in drug resistance in candida albicans [J]. Fungal Genet Bi01, 2009,46(9):714 – 720.

[9] ANDERSON J B,SIRJUSINGH C,PARSONS A B,et al. Mode of selection and experimental evolution of antifungal drug resistance in Saccharomyces cerevisiae [J]. Genetics,2003,163(4):1 287 – 1 298.

[10] SANGLARD D,LSCHER F,MARCHETTI O,et al. Calcineurin a of Candida albicans:involvement in antifungal tolerance,cell morphogenesis and virulence [J]. Mol Microbiol,2003,48(4):959 – 976.

[11] COWEN L E,LINDQUIST S. Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits:drug resistance in diverse fungi [J]. Science,2005,309(5744):2 185 – 2 189.

[12] COWEN L E. The evolution of fungal drug resistance: modulating thetmectory from genotype to phenotype[J]. Nat Bey Micmbiol,2008,6(3):187 – 198.

[13] DONLAN R M,COSTERTON J W. Biofilms;survival mechanisms of clinically relevant microorganisms[J]. Clin Microbiol Rev,2002,15(2):167 – 193.

[14] JACOBY G A. QnrB,another plasmid–mediated gene for quinolone resistance [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006,50(4):1 178 – 1 l82.

[15] LYONS C N,WHITE T C. Transcriptional analyses of antifungal drug resistance in candida albicans[J]. Antimicrob Agents Chemother,2000,44(9):2 296 – 2 303.

[16] MUKHEOEE P K. Infect Immun ance in diverse fungi [J]. Science,2005,309(5744):2 185 – 2 189.

[17] MUKHERJEE P K,CHANDRA J. Candida biofilm resistance [J]. Drug Resist Updat,2004,7 (4–5):301 – 309.

[18] RICHARD D C,ERWIN L,ANN R H,et al. Candida albicans drug resistance–other way to cope with stress[J]. Microbiology,2007,153(10):3 211 – 3 217.

[19] JIA XIN–MING,WANG YAN,JIANG YUAN–YING,et al. RTA2 is involved in calcineurin–mediated azole resistance and sphingoid long chain base release in Candida albicans [J]. Cell Mol Life Sci,2009,66(10):122 – 134.

[20] ALAN J. Antimicrobiol agents:antibacterials and antifungals [J]. J Antimicro Chemother,2006,58 (1):231.

[21] AKINS R A. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in Candida albicans [J]. Med Mycol, 2005,43(4):285 – 318.

[22] HOPE W W,TABERNERO L,DENNING D W,et al.Molecular mecha nisms of primary resistance to flucyto sine in candida albicans [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004,48 (11):4 377 – 4 386.

[23] PARK S,KELLY R,NIELSEN KAHN J,et al. Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical Candida sp. isolates [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005,49:3 264 – 3 273.

[24] NIIMI K,MAKI K,IKEDA F,et al. Overexpression of candida albicans CDR1,CDR2,or MDR1 does not produce significant changes in echinocandin susceptibility [J]. Antimicrob Agents Chemother,2006,50 (4):1 148 – 1 155.

[25] WIEDERHOLD N P,KONTOYIANNIS D P,PRINCE R A,et al. Attenuation of the activity of caspofungin at high concentrations against candida albicans:possible role of cell wall integrity and calcineurin pathways[J]. Antimicrob Agents Chemother,2005,49(12):5 146 – 5 148.

[26] 宋阳,韩中波,于宏波. 结核分枝杆菌利福平和异烟肼耐药基因的快速检测[J]. 中国实验诊断学,2006 ,10 (11):1 352 – 1 353.

（2012 – 01 – 07 收稿）