

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20244362

· 论 著 ·

近平滑念珠菌临床分离菌株毒力因子差异表达研究

瞿玉洁¹, 李婷婷¹, 李茂媛², 胡方芳³, 金婷婷³, 杨 斌⁴, 罗振华^{1,4}

(1. 贵州大学医学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学医学检验学院, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州省人民医院检验科, 贵州 贵阳 550002; 4. 贵州省人民医院中心实验室, 贵州 贵阳 550002)

[摘要] **目的** 比较近平滑念珠菌临床分离株毒力相关因子天冬氨酸蛋白酶和生物膜形成及其基因表达的差异。**方法** 采用基因测序及微卫星分型方法, 对临床真菌感染患者分离的近平滑念珠菌进行鉴定, 检测各菌株产生分泌型天冬氨酸蛋白酶及生物膜形成的能力, 比较各菌株生物膜形成相关基因 BCR1、EFG1、HWP1 及天冬氨酸蛋白酶毒力基因 SAPP1、SAPP2、SAPP3 表达的差异。**结果** 共收集 8 株临床分离的近平滑念珠菌, 经基因鉴定均为基因 I 型。微卫星分型结果显示, 8 株临床菌株分为 4 个微卫星型别, G1、G2、G3 菌株为不同型别, 分别分离自甲患者的尿、经外周静脉置入中心静脉导管(PICC)和血; J1、J2、J3、J4、J5 菌株为同一型别, 分离自乙患者不同时期血标本。8 株临床菌株均能形成生物膜, 生物膜形成能力均高于近平滑念珠菌标准菌株 ATCC 22019, 其中 G1、G3 和 J5 菌株生物膜形成能力强, J1、J2、J3、J4 菌株生物膜形成能力中等, G2 菌株生物膜形成能力弱。8 株临床分离菌株均分泌天冬氨酸蛋白酶, 酶体外表达水平均高于近平滑念珠菌标准菌株 ATCC 22019, G3、G1、G2 菌株分别为低表达、中表达、高表达, 酶体外表达水平比较, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); J1、J5 菌株为中表达, J2、J3、J4 菌株为高表达, 中表达菌株与高表达菌株比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。甲、乙患者分离的各菌株生物膜形成基因 BCR1、EFG1、HWP1 表达水平均增加, 其中甲患者 G1 菌株 EFG1 基因表达水平高于 G2 菌株($P < 0.05$), 乙患者分离的菌株 BCR1、EFG1、HWP1 基因表达水平差异无统计学意义。甲、乙患者分离的各菌株天冬氨酸蛋白酶基因 SAPP1、SAPP2、SAPP3 表达水平均增加, 其中 G1 菌株的 SAPP1 和 SAPP2 表达水平高于 G2、G3(均 $P < 0.05$), 乙患者 SAPP1、SAPP2、SAPP3 基因表达水平差异无统计学意义。**结论** 近平滑念珠菌临床分离株生物膜形成和天冬氨酸蛋白酶产生能力均高于标准菌株, 分离自不同标本的菌株毒力因子表达具有差异性, 不同时期分离的菌株毒力因子表达差异不明显。患者可能存在同一时期多部位感染不同 MT 型别近平滑念珠菌的情况。

[关键词] 近平滑念珠菌; 毒力因子; 生物膜; 分泌型天冬氨酸蛋白酶

[中图分类号] R379.4

Differential expression of virulence factors in clinical isolates of *Candida parapsilosis*

QU Yu-jie¹, LI Ting-ting¹, LI Mao-yuan², HU Fang-fang³, JIN Ting-ting³, YANG Bin⁴, LUO Zhen-hua^{1,4} (1. Guizhou University School of Medicine, Guiyang 550025, China; 2. Guizhou Medical University School of Medical Laboratory Science, Guiyang 550004, China; 3. Department of Laboratory Medicine, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, China; 4. Department of Central Laboratory, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective** To compare the differences in virulence-related factor aspartate protease, biofilm formation, and gene expression among clinical isolates of *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*). **Methods** Gene sequencing

[收稿日期] 2023-04-17

[基金项目] 国家自然科学基金地区科学基金项目(82260406); 贵州省卫生健康委科学技术基金项目(gzwbkj2021-357); 贵州省科技计划项目[(2019)2827]

[作者简介] 瞿玉洁(1998-), 女(汉族), 贵州省铜仁市人, 硕士研究生, 主要从事微生物感染与免疫研究。

[通信作者] 罗振华 E-mail: 1106091568@qq.com

and microsatellite typing (MT) method were adopted to identify *C. parapsilosis* isolated from patients with clinical fungal infection. The production of secreted aspartate protease and biofilm formation ability of each strain were detected, and the expression of biofilm formation related-genes BCR1, EFG1, and HWP1, as well as aspartate protease virulence genes SAPP1, SAPP2, SAPP3 were compared among the strains. **Results** A total of 8 clinically isolated *C. parapsilosis* strains were collected, all of which were identified as genotype I. Based on microsatellite typing results, 8 clinical strains were divided into 4 microsatellite types. G1, G2, and G3 strains isolated from the urine, peripherally inserted central catheters (PICC), and blood of patient A were of different subtypes. J1, J2, J3, J4, and J5 strains were of the same type, and isolated from blood specimens of patient B at different periods. All 8 clinical strains could form biofilm, and their biofilm formation ability was higher than that of the standard strain of *C. parapsilosis* (ATCC 22019). G1, G3 and J5 strains had strong biofilm formation ability, J1, J2, J3, and J4 strains had moderate biofilm formation ability, and G2 strain had weak biofilm formation ability. All of the eight clinical isolates secreted aspartate protease, and their *in vitro* expression levels of the enzyme were higher than that of the standard strain (ATCC 22019). G3, G1, and G2 strains showed low, moderate, and high *in vitro* enzyme expression respectively, with statistical differences (all $P < 0.05$). Enzyme expressed moderately in J1 and J5 strains, and highly in J2, J3, and J4 strains. Difference between moderate and high expressions was statistically significant ($P < 0.05$). The expression levels of biofilm formation genes BCR1, EFG1, and HWP1 in various strains isolated from patients A and B increased. In strains isolated from patient A, the expression level of EFG1 gene in G1 strain was higher than that in G2 strain ($P < 0.05$). There was no statistically significant difference in BCR1, EFG1, and HWP1 gene expression levels among strains isolated from patient B. The expression levels of aspartate protein genes (SAPP1, SAPP2, and SAPP3) in various strains isolated from patients A and B increased. The expression levels of SAPP1 and SAPP2 in strain G1 were higher than those in G2 and G3 (both $P < 0.05$). There was no statistically significant difference in the expression levels of SAPP1, SAPP2, and SAPP3 genes in strains from patient B. **Conclusion** Clinical isolates of *C. parapsilosis* have higher biofilm formation and aspartate protease production abilities than standard strain. The expression of virulence factors varies among strains isolated from different specimens, while there is no significant difference in the expression of virulence factors among strains isolated at different periods. Patients may have been infected with different MT types of *C. parapsilosis* in multiple sites during the same period.

[**Key words**] *C. parapsilosis*; virulence factor; biofilm; secreted aspartate protease

念珠菌是全身血流感染中主要的条件致病菌,可引起人类浅表和深部感染性疾病,免疫功能低下、长期住院、使用广谱抗菌药物及使用侵入性导管等因素,致使近平滑念珠菌感染逐年增加。近平滑念珠菌通过表达毒力因子,如分泌水解酶、形成生物膜,以及对人体组织、器官及植入性医疗器械表面的黏附等促进其侵袭和感染^[1]。生物膜是由细胞外多聚基质与菌细胞构成,可附着在组织表面,在大部分念珠菌中生物膜都在其生存过程中起着重要的作用^[2]。生物膜能防止抗真菌药物穿透基质,对药物的穿透性有着一定的抵抗作用,从而降低药物的杀伤作用;同时形成生物膜的菌体,在机体内会迁移扩散,导致感染反复发作,增加临床治疗的难度^[3]。近平滑念珠菌可形成生物膜,生物膜结构主要由假菌丝形态的菌体和少量基质构成。当近平滑念珠菌以假菌丝状态存在时表现出更强的侵袭性,且菌丝的存在也

有利于其定植,增加机体患病的概率^[4]。近平滑念珠菌黏附在组织或者医疗器械上均可能导致生物膜形成,增大感染和发病的概率。目前研究^[5]发现,有多个基因参与近平滑念珠菌生物膜的形成过程,如生物膜和细胞壁调节剂 1 (biofilm and cell wall regulator 1, BCR1)、增强丝状生长蛋白 1 (enhanced filamentous growth protein 1, EFG1)、菌丝壁蛋白 1 (hyphal wall protein 1, HWP1) 等,在生物膜重要结构的形成、调节等过程发挥着重要的作用。

蛋白酶降解宿主细胞的不同蛋白质、抗体、补体和细胞因子^[6];天冬氨酸蛋白酶能结合至细胞表面,也能分泌到周围环境中,参与宿主组织的黏膜降解,并促进免疫防御蛋白的降解^[7]。近平滑念珠菌 SAPP 基因家族包括 SAPP1、SAPP2 及 SAPP3 3 个基因,对编码天冬氨酸蛋白酶有着不同的功能。SAPP 基因表达水平的增加与念珠菌毒力

增加有关^[8]。

为进一步了解不同部位来源及不同时期分离的近平滑念珠菌临床株的毒力因子表达情况,本研究通过比较同一患者不同部位来源及不同分离时期的临床株生物膜形成能力和体外分泌型天冬氨酸蛋白酶表达水平,以及生物膜形成相关基因 BCR1、EFG1、HWP1 和分泌型天冬氨酸蛋白酶 SAPP1、SAPP2、SAPP3 等毒力基因的表达差异,为研究近平滑念珠菌的毒力机制及其感染防治提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 菌株来源 8 株近平滑念珠菌分离自 2015 年 7 月—2016 年 7 月某院 2 例老年患者的非重复送检标本,包括尿、导管尖端、血(静脉血),菌株均由贵州省人民医院中心实验室于 -80℃ 保存。质控菌株为近平滑念珠菌标准菌株 ATCC 22019。临床分离菌株患者来源信息见表 1。

表 1 8 株临床分离近平滑念珠菌患者来源信息

Table 1 Information of patients from whom 8 clinical strains of *C. parapsilosis* were isolated

患者	科室	年龄(岁)	入院原因及感染情况	分离菌株号	标本来源	分离日期
患者甲	神经内科	89	无明显诱因突发跌倒在地,意识障碍入院,存在泌尿道感染等	G1	尿	2016 年 7 月 3 日
				G2	PICC 导管尖端	2016 年 7 月 20 日
				G3	血	2016 年 7 月 16 日
患者乙	ICU	87	患者因反复发热,存在肺部感染等,长期住院	J1	血	2015 年 7 月 10 日
				J2	血	2015 年 9 月 13 日
				J3	血	2015 年 9 月 16 日
				J4	血	2015 年 10 月 10 日
				J5	血	2015 年 11 月 10 日

注:ICU 为重症监护病房;PICC 为经外周静脉置入中心静脉导管。

1.2 主要仪器与试剂 BACTEC™ FX 全自动血培养仪、Phoenix-100 全自动微生物鉴定仪购自美国 BD 公司,普通基因扩增仪购自德国耶拿分析仪器股份公司,Synergy H1 微孔板检测仪购自美国 BioTek 公司,CFX Connect RT-QPCR 仪购自美国 BIORAD 公司,酵母基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司,Tirol、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (perfect Real Time)试剂盒、TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)试剂盒购自日本 Takara 公司,沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)、沙氏葡萄糖液体培养基(SDB)购于青岛海博生物技术有限公司,牛血清白蛋白(BSA)购自 biosharp 公司,琼脂粉购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株分离与鉴定 将患者送检标本接种至沙氏培养基,血标本接种至 BD BACTEC™ FX 系统,35℃ 培养 24~48 h,将真菌培养的菌株进行革兰染色,肉眼观察菌落的颜色及形态。采用酵母基因组 DNA 提取试剂盒提取真菌 DNA,扩增真菌的 ITS 区和 26s rRNA 基因的 D1/D2 区域(引物见表 2)。利用 BLAST 程序将扩增获得的序列与 Gen-

Bank 中的序列进行比对鉴定,比对结果与已知菌种 ITS 序列相似度达到 98% 以上时,则可鉴定菌种种类。

1.3.2 微卫星分型 参照 Tavanti 等^[9]的方法,选择 B5、CP1、CP4、CP6 4 个高度多态性的微卫星位点对近平滑念珠菌临床菌株进行基因分型,用 6-羧基荧光素标记 B5 和 CP4 正向引物,用六氯荧光素标记 CP1 和 CP6 正向引物,引物序列见表 2。使用 4 对荧光标记的引物对提取的 DNA 进行扩增,对扩增产物进行毛细管电泳测定和结果分析。

1.3.3 生物膜形成能力的检测及判断 挑取近平滑念珠菌单菌落于 SDB 培养基中混匀制备成菌悬液,调整菌液浓度至 1×10^6 CFU/mL,取 100 μ L 加入到聚苯乙烯无菌 96 孔板中,37℃ 培养 24 h,用预冷的无菌 PBS 缓冲液(pH = 7.2~7.4)清洗 3 次将未附着的菌体洗下,检测 OD_{490nm} 值。试验设置 3 个生物学重复。根据如下判定方法判定菌株生物膜形成能力:OD_{490nm} < 0.03,无生物膜形成能力;0.03 ≤ OD_{490nm} < 0.08,生物膜形成能力弱;0.08 ≤ OD_{490nm} < 0.16 生物膜形成能力一般;OD_{490nm} ≥ 0.16,生物膜形成能力强^[10]。将 96 孔板中的 PBS 缓冲液吸取干净,置于倒置显微镜下 200× 观察生物膜形成情况。

1.3.4 天冬氨酸蛋白酶检测 挑取近平滑念珠菌单菌落,分别用无菌生理盐水配置为 1×10^6 CFU/mL 的菌悬液备用。参考杨艳华等[10]的方法制作牛血清白蛋白培养基。取 10 μ L 上述制备的各菌株菌液,滴于牛血清白蛋白培养基中预先贴有直径 6 mm 的圆形滤纸片上(每板三次生物学重复),将平板翻转倒置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 6 d,量取菌落直径和菌落加沉淀圈层的直径。计算 Pz 值;Pz = 菌落直径/(菌落直径 + 圈层总直径)。结果判断:Pz \leq 0.59,水解酶高表达;0.60 \leq Pz \leq 0.79,水解酶中表达;0.80 \leq Pz $<$ 1.00,水解酶低表达;Pz = 1,表示不产水解酶[11]。

1.3.5 毒力相关基因表达检测 按照 RNAiso 试剂说明书提取菌种总 RNA,采用 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser(perfect Real Time)试剂盒对 RNA 进行逆转录,根据 TB GreenTM Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus)试剂盒进行 qRT-PCR,采用 BIO-RAD CFX96 荧光定量 PCR 仪分别检测近平滑念珠毒力相关基因 SAPP1、SAPP2、SAPP3、BCR1、EFG1 和 HWP1 以及内参基因 18s rRNA 的荧光信号,以 BIO-RAD CFX96 Manager 分析软件收集处理各试验组扩增基因 CT 值及 RQ (relative quantity)值, $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ 。以内参基因为对照,计算各毒力相关基因的相对表达量。所有基因引物均由上海生工有限公司合成,见表 2。

1.4 统计方法 应用 Genemapper 软件分析 STR 数据,通过 MVSP 3.13 软件进行 UPGMA 聚类分析。试验所获得的数据应用 SPSS 21.0 和 Graph-Pad prism 9.0 软件分析。正态分布的连续变量以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组之间比较采用 *t* 检验,多组之间比较采用单因素方差分析; $P \leq 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 菌株鉴定及微卫星分型结果 利用通用引物 ITS1/ITS4 扩增序列片段后,将扩增产物进行测序,测序后获得的碱基序列在 NCBI 的 BLAST 中进行核酸序列比对,8 株近平滑念珠菌均鉴定为基因 I 型。采用微卫星分型方法,通过 UPGMA 聚类分析将 8 株近平滑念珠菌分为 4 个微卫星型别 (microsatellite genotype, MT),见图 1。甲患者不同部位分离的 3 株菌株 G1、G2、G3 之间的遗传相似系数较低,变化范围为 0~0.444,为 3 个不同

表 2 近平滑念珠菌 PCR 扩增引物序列信息

Table 2 PCR amplification primer sequences of *C. parapsilosis*

引物名称	引物序列(5'-3')	荧光标记
ITS 序列	ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC	-
D1/D2	NL1 GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG NL2 GGTCGGTGTTC AAGACGG	-
B5(F)	AGGTTTGTAGTAGTGTCCCTATGG	HEX
B5(R)	TATCTCTCTCGCCATTTGAACG	-
CP1(F)	AAAGTGCTACACACGCATCG	FAM
CP1(R)	GGCTTGCAATTTTCATTTCT	-
CP4(F)	CAAATCATCCAGCTTCAAACC	HEX
CP4(R)	CATCAAACAAGAATTCGATATCAC	-
CP6(F)	CAGGAACAGGACAATGGTGA	FAM
CP6(R)	TCTGGAGCCTCTAGGACGTTT	-
SAPP1(F)	ACTGGACAACAAATTGCAGATG	-
SAPP1(R)	TAAACTGCTTCATTGCTGGTGT	-
SAPP2(F)	GTCATATGGGGGATTGACAC	-
SAPP2(R)	CGCTTTGCTGATGTTACCAG	-
SAPP3(F)	CTGGGTCATTGATGCAAATTC	-
SAPP3(R)	AGGTTGAGGTGTCTGGATCG	-
BCR1(F)	TGCCTCATCAAGTGGATCAACAGC	-
BCR1(R)	GCGGTAGGAGTACACTGTGATTGC	-
EFG1(F)	CACAGAGCGGAGCAGCAGTTC	-
EFG1(R)	TTGCTGTTGTTGCTGGTGTGTTG	-
HWP1(F)	AATTCACCTCACAGGCACTGGAAC	-
HWP1(R)	TGCTGACCAACGGAATGGATTCCG	-
18s rRNA(F)	GAAGCTTTGTTCCGTCCAGC	-
18s rRNA(R)	TGATGGAGCCAAAGCAGTGA	-

注: - 为引物不加荧光标记。

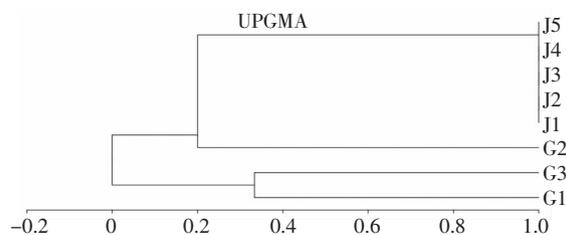


图 1 8 株临床分离的近平滑念珠菌微卫星分型结果聚类分析

Figure 1 Cluster analysis on microsatellite results of 8 clinically isolated *C. parapsilosis* strains

的 MT 型别;乙患者不同时间自血液分离的菌株 J1、J2、J3、J4、J5 之间的遗传相似系数为 1.000,为同一 MT 型别。见表 3。

表 3 8 株临床分离的近平滑念珠菌微卫星分型等位基因位点测定结果

Table 3 Allele loci detected by microsatellite typing in 8 clinically isolated *C. parapsilosis* strains

菌株号	B5	CP1	CP4	CP6
G1	129.01	242.62	358.78	270.21
G2	121.24	239.92	304.89	290.70
G3	128.90	242.70	388.80	305.62
J1	108.09	239.91	340.49	293.62
J2	108.09	239.92	340.57	293.59
J3	107.99	239.97	340.43	293.57
J4	108.05	239.94	340.49	293.65
J5	108.04	239.91	340.43	293.60

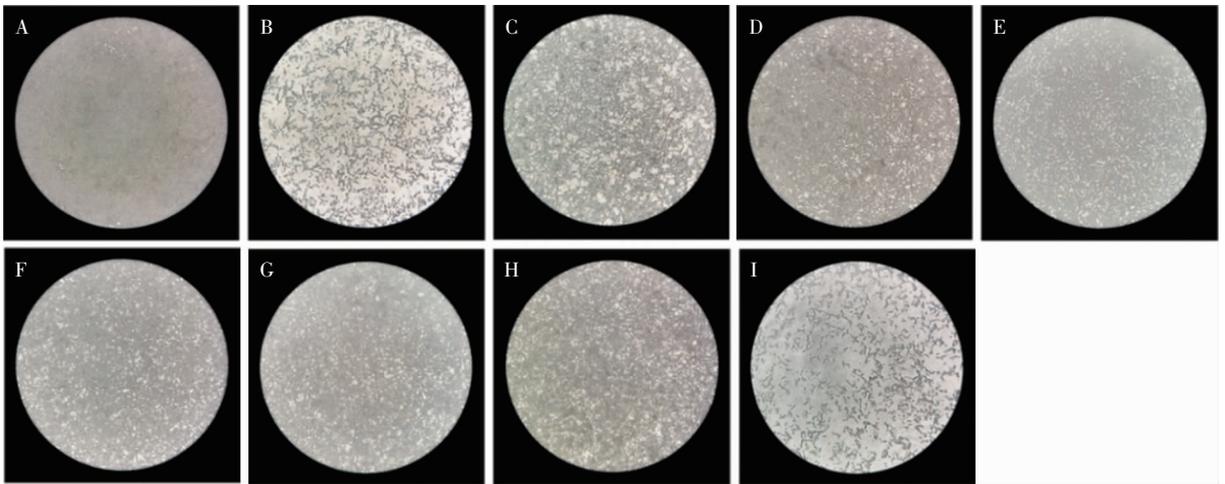
2.2 生物膜形成能力 临床菌株培养 24 h 后, 倒置显微镜 200× 观察各菌株体外生物膜形成情况。结果显示, 标准菌株 ATCC 22019 无生物膜形成能力, 镜下可见菌株呈圆形或椭圆形, 有少量菌体, 菌体无明显聚集或少量聚集。8 株临床分离菌均能够形成生物膜, 其中甲患者分离的 G1 和 G3 菌株生物膜形成能力强, 镜下见大量菌体和菌丝, 菌体与菌丝

聚集交织形成致密的网状结构; G2 菌株生物膜形成能力弱, 菌体较少, 有少量聚集现象。乙患者的 5 株菌中, J5 菌株生物膜形成能力强; J1、J2、J3、J4 菌株生物膜形成能力中等, 与生物膜形成能力强的菌株比较, 菌体较少, 并有菌丝生长且有聚集。见表 4、图 2。

表 4 近平滑念珠菌生物膜形成能力

Table 4 Biofilm formation ability of *C. parapsilosis*

菌株号	OD _{490nm} ($\bar{x} \pm s$)	生物膜形成能力
G1	0.208 ± 0.009	强
G2	0.045 ± 0.001	弱
G3	0.281 ± 0.022	强
J1	0.138 ± 0.021	中
J2	0.137 ± 0.002	中
J3	0.138 ± 0.013	中
J4	0.131 ± 0.009	中
J5	0.191 ± 0.007	强
ATCC 22019	0.010 ± 0.004	无



注: A~C 分别为 G1、G2、G3; D~H 分别为 J1、J2、J3、J4、J5; I 为 ATCC 22019。

图 2 近平滑念珠菌生物膜形成情况 (200×)

Figure 2 Formation of biofilm by *C. parapsilosis* (200×)

2.3 分泌型天冬氨酸蛋白酶表达水平 牛血清白蛋白培养基近平滑念珠菌最佳生长时间为第 6 天, 于第 6 天测量菌圈及圈层直径, 计算 Pz 值, 结果显示, 8 株临床菌株均能在牛血清白蛋白培养基上不同程度地产生天冬氨酸蛋白酶, 在菌落周围形成乳白色的沉淀圈。来自患者甲的菌株产天冬氨酸蛋白酶活性存在差异, G1 菌株中表达, G2 菌株高表达,

G3 菌株低表达, 3 株菌酶体外表达水平比较, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 来自患者乙不同时期血标本分离的 5 株菌, J1、J5 菌株中表达, 酶体外表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), J2、J3、J4 菌株高表达, 酶体外表达水平差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 中表达菌株与高表达菌株比较, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。见表 5、图 3。

表 5 近平滑念珠菌体外天冬氨酸蛋白酶表达水平

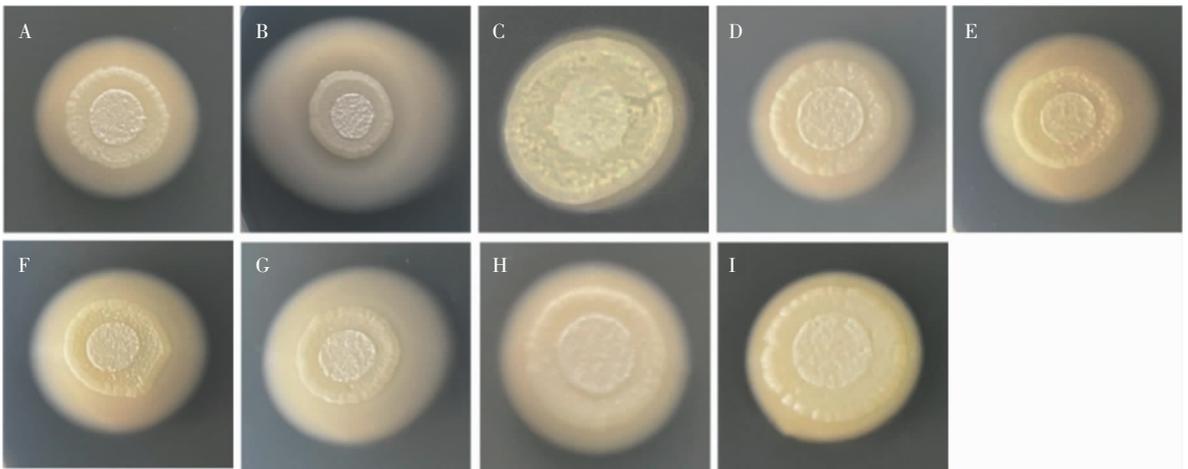
Table 5 *In vitro* expression levels of aspartic protease in *C. parapsilosis*

菌株号	Pz	表达水平
G1	0.607 ± 0.014	中表达
G2	0.434 ± 0.025	高表达
G3	0.953 ± 0.036	低表达
J1	0.740 ± 0.030	中表达
J2	0.561 ± 0.013	高表达
J3	0.560 ± 0.011	高表达
J4	0.521 ± 0.072	高表达
J5	0.744 ± 0.065	中表达
ATCC 22019	0.946 ± 0.065	低表达

2.4 毒力相关基因表达情况

2.4.1 生物膜形成相关基因 BCR1、EFG1、HWP1

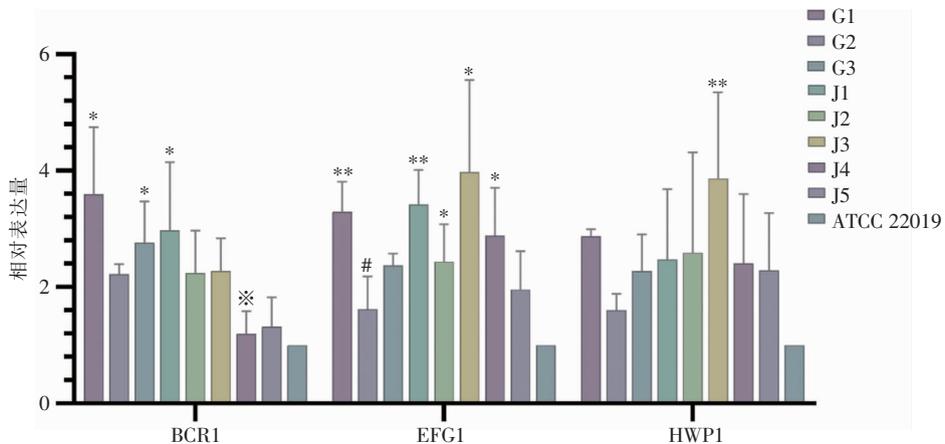
采用 qRT-PCR 检测 8 株近平滑念珠菌 BCR1、EFG1、HWP1 基因表达水平,其中 G1、G3、J1 菌株 BCR1 基因表达上调,G1、J1、J2、J3、J4 菌株 EFG1 基因表达上调,J3 菌株 HWP1 基因表达上调,与标准株 ATCC 22019 相比,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。患者甲自尿液分离的 G1 菌株,BCR1、EFG1、HWP1 基因的表达水均为最高,G2 菌株 EFG1 基因表达水平低于 G1 菌株($P < 0.05$),其余菌株基因表达水平比较,差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。患者乙以分离时间最早的 J1 菌株为对照,各菌株 BCR1、EFG1、HWP1 基因表达均上调,但差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。见图 4。



注:A~C 分别为 G1、G2、G3;D~H 分别为 J1、J2、J3、J4、J5;I 为 ATCC 22019。

图 3 近平滑念珠菌在牛血清白蛋白培养基上产生天冬氨酸蛋白酶情况(培养第 6 天)

Figure 3 Production of aspartic protease by *C. parapsilosis* on bovine serum albumin medium (on the 6th day of cultivation)



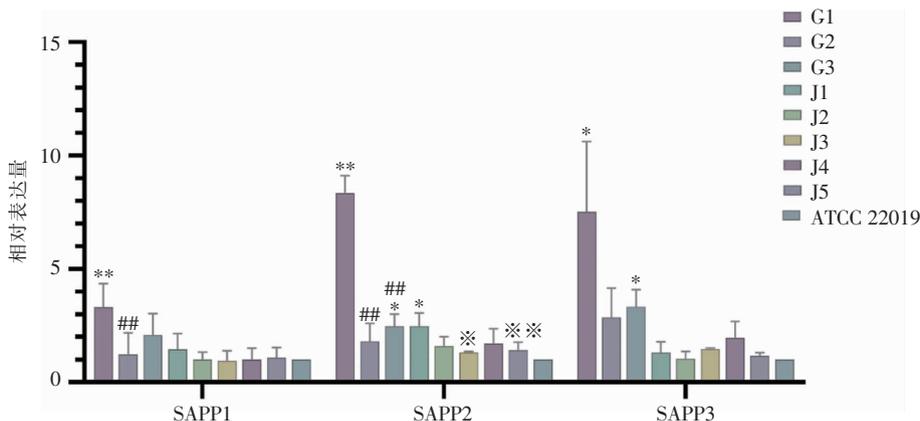
注: * 表示与标准菌株 ATCC 22019 相比, $P < 0.05$; ** 表示与标准菌株 ATCC 22019 相比, $P < 0.01$; # 表示与甲患者 G1 菌株相比, $P < 0.05$; ※ 表示与乙患者 J1 菌株相比, $P < 0.05$ 。

图 4 近平滑念珠菌生物膜形成相关基因的表达水平

Figure 4 Expression levels of biofilm formation-related genes in *C. parapsilosis*

2.4.2 天冬氨酸蛋白酶 SAPP 基因 采用 qRT-PCR 检测 8 株近平滑念珠菌天冬氨酸蛋白酶 SAPP1、SAPP2、SAPP3 基因表达水平,与标准株 ATCC 22019 相比,G1 菌株 SAPP1 基因表达上调,G1、G3、J1 菌株 SAPP2 基因表达上调,G1、G3 菌株 SAPP3 基因表达上调,差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。患者甲自尿液分离的 G1 菌株,SAPP1、SAPP2、SAPP3 基因表达水平均为最高,G2、G3 菌

株 SAPP1、SAPP2 基因表达水平均低于 G1 菌株(均 $P < 0.05$),其余菌株各基因表达水平比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。患者乙以分离时间最早的 J1 菌株为对照,除 J3、J5 菌株 SAPP2 基因表达低于 J1 菌株($P < 0.05$)外,其余各菌株 SAPP1、SAPP2、SAPP3 基因表达均上调,但差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。见图 5。



注: * 表示与标准菌株 ATCC 22019 相比, $P < 0.05$; ** 表示与标准菌株 ATCC 22019 相比, $P < 0.01$; # 表示与甲患者 G1 菌株相比, $P < 0.05$; ## 表示与甲患者 G1 菌株相比, $P < 0.01$; ※ 表示与乙患者 J1 菌株相比, $P < 0.05$; ※※ 表示与乙患者 J1 菌株相比, $P < 0.01$ 。

图 5 近平滑念珠菌 SAPP 基因表达水平

Figure 5 Expression level of SAPP gene in *C. parapsilosis*

3 讨论

近平滑念珠菌是最常见侵袭性念珠菌,能引起人类浅表和全身性真菌感染,其感染发病率在不断增加,是目前亚洲、欧洲和南美国家医院中侵袭性念珠菌感染第二或第三常见的菌种^[5]。本研究 8 株临床分离株均来自于老年患者,提示老年人是近平滑念珠菌的易感染人群,与老年人器官功能老化,免疫功能下降,住院时间长等因素相关。因此,老年患者应该积极治疗原发病,提高抵抗力,缩短卧床时间,以减少感染的发生。目前发现的近平滑念珠菌具有 I、II、III 型三种基因型,据报道^[12]其中感染发病率最高的是 I 型近平滑念珠菌,其次是 II 型,III 型较罕见。本研究临床分离株通过基因鉴定,均为基因 I 型。对 8 株近平滑念珠菌临床菌株进行微卫星分型后共分为 4 个型别,甲患者不同部位分离的 3 株菌属于 3 个不同的型别,提示患者可同时感染不同型别的近平滑念珠菌;乙患者不同时间自血液分离的 5 株菌株为同一型别。

真菌的发病机制是由多种毒力因子的动态表达促进的,其形成的生物膜和分泌的蛋白水解酶与疾病的发生和发展有关。生物膜是微生物菌体与细胞外基质的复合体,是由菌体在其分泌的细胞外基质内包裹中形成的结构。念珠菌形成的生物膜结构和组成具有高度的物种依赖性,与白念珠菌相比,近平滑念珠菌形成的生物膜结构更简单,主要由聚集的芽孢、假菌丝和大量低蛋白质含量的细胞外碳水化合物组成。不同临床分离株的整体生物膜形成能力存在很大的差异^[13]。近平滑念珠菌产生的成熟生物膜对宿主构成了威胁,其为抗真菌药物作用菌体和宿主免疫识别菌株提供了保护。多数情况下生物膜的存在加重患者的病情,甚至威胁患者的生命^[14]。BCR1 基因是生物膜主要的调节因子及转录因子,是白念珠菌和近平滑念珠菌生物膜形成所必需的一种乙烷锌脂蛋白的编码基因^[15],该基因对白念珠菌中的细胞壁蛋白基因 *Als1*、*Als3* 和 *Hwp1* 的表达十分重要。在 $\Delta bcr1/bcr1$ 菌株中 *ALS3* 和 *HWP1* 的表达降低,黏附于内皮细胞、上皮细胞的能力降低^[16]。在近平滑念珠菌中,删除 BCR1 基因时,生物膜与正

常条件下形成的生物膜相比更薄^[17]。EFG1 基因编码增强丝状生长蛋白,通过改变菌株存在的形态,使菌株侵袭能力增强^[18]。HWP1 基因编码酸性甘露糖蛋白(HWP1P),研究^[19]发现,HWP1P 是近平滑念珠菌菌丝发育和生物膜形成所必须的,同时还可介导近平滑念珠菌稳定的黏附在宿主细胞上。本研究中的 8 株临床菌株均能不同程度的形成生物膜,患者甲不同部位分离的菌株形成生物膜的能力比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$),其中尿液和血液来源的近平滑念珠菌较导管来源的近平滑念珠菌生物膜形成能力更强,与其生物膜形成基因表达一致。G1 菌株生物膜形成相关基因 BCR1、EFG1 及 HWP1 的表达都是最高的,其次是从血液分离的菌株 G3,自导管分离的菌株 G2 3 个基因的表达量均低于 G1、G3 菌株。患者乙不同时间自血液分离的 5 株近平滑念珠菌体外生物膜形成能力,均有中等形成能力,各菌株间分离时间相差一个月左右,其中 J5 菌株生物膜形成能力强于其他 4 株(均 $P < 0.05$),提示临床分离的近平滑念珠菌大多数具有生物膜形成能力,给近平滑念珠菌感染患者带来严重的威胁。不同生存环境会影响生物膜的形成,导致菌株之间的致病能力也有所不同。近年来,植入式医疗设备在患者中的应用数量急剧增加。医疗设备植入后,宿主组织细胞和病原菌竞争黏附于其表面。生物膜定植在组织和留置装置上被认为是危及生命感染的一个重要危险因素,特别是在易感宿主中,近平滑念珠菌是医疗植入设备感染的主要原因。因此,抑制生物膜的形成,将成为防治近平滑念珠菌感染的一个重要靶点。

在入侵过程中,病原真菌会分泌各种水解酶破坏宿主细胞膜,降解细胞外基质成分,从而破坏宿主组织。除损伤宿主屏障功能外,真菌水解酶还可促进细胞黏附,生物膜形成或细胞内存活。天冬氨酸蛋白存在于各种生物体中,是病原真菌分泌的水解酶,可以直接介导毒力。天冬氨酸蛋白酶通过降解参与宿主防御的蛋白质(如补体和抗菌蛋白)或逃避体液免疫反应的抗体来促进入侵宿主。此外该蛋白酶降解多种其他蛋白质,如细胞外基质和细胞表面蛋白质,以增强入侵过程中的营养获取^[10]。目前,通过研究近平滑念珠菌产生天冬氨酸蛋白酶的分子机制,已经鉴定出 3 个天冬氨酸蛋白酶编码基因 SAPP1、SAPP2 和 SAPP3。尽管 SAPP1 极大地决定了近平滑念珠菌的毒力,但其并不是蛋白酶产生的唯一原因。研究^[20]表明,在没有 SAPP1 的情况下,另一个分泌天冬氨酸蛋白酶编码基因(SAPP2)

的表达显著升高,显示出补偿作用。SAPP2 对底物的作用不同于 SAPP1 对底物的切割,表明这两种蛋白质的激活机制有所不同^[21]。SAPP3 也可以翻译成活性蛋白,在重组人类口腔上皮感染的过程中 SAPP3 表达水平升高^[22]。

本研究发现,8 株临床菌株均能表达天冬氨酸蛋白酶,患者甲不同部位分离的不同 MT 型别的菌株天冬氨酸蛋白酶的表达水平具有明显的差异,其中 G3 为低表达,G1 为中表达,G2 为高表达。天冬氨酸蛋白酶基因表达检测结果显示,来自尿液的 G1 菌株 SAPP1、SAPP2、SAPP3 基因的表达水平是最高的,且均高于 G2、G3 菌,自血管导管分离的菌株 G2 3 个基因的表达水平最低,表明同一患者不同感染部位分离的菌株在不同的环境中天冬氨酸蛋白酶表达水平存在差异。患者乙不同时期自血液分离的 5 株近平滑念珠菌中天冬氨酸蛋白酶的表达水平,J1、J5 为中表达,J2、J3、J4 菌株为高表达;SAPP1、SAPP2、SAPP3 基因表达水平差异不大,在不同时间段患者血液内,内环境在不断的变化,使得 SAPP 基因在这 5 株临床菌株内的表达水平不断变化。SAP 家族酶学活性具有 pH 依赖性,常只在酸性 pH 值范围内活化。对病原体而言,若共处在中性 pH 值范围的宿主组织中极为不利。即便如此,SAP 家族各成员的最适 pH 值也明显不同,SAPP1 ~ SAPP3 在低 pH 值活性最高。因此,SAP 的最适 pH 值给近平滑念珠菌提供了 pH 值从 2~7 的水解活性范围,有利于真菌感染泌尿道或阴道(均为酸性)从而致病^[22]。

病原菌的毒力因子能够促进病原菌侵入、定植及造成宿主损伤。毒力因子与感染风险、药物的敏感性密切相关,通过检测毒力因子的表达水平可以确定感染菌株的毒力大小,预测抗真菌感染药物的疗效及患者的感染风险,从而指导抗真菌药物的选择,为制定针对性治疗方案提供依据。与标准菌株相比,临床分离株的各毒力因子表达水平均明显升高,提示临床分离株强毒力导致其致病能力增强,引起患者感染。老年患者由于基础疾病较多,免疫力下降,是真菌感染的高危人群,同时长期卧床的老年患者常留置导管,从而引起多源性感染。本研究发现同一患者同时期可能存在多部位感染不同型别的近平滑念珠菌,不同部位分离的菌株毒力因子表达存在差异,分离自尿液的临床株毒力因子表达水平明显高于其他来源的菌株,不同时期分离的菌株间毒力因子的表达无明显差异。近平滑念珠菌感染是一个复杂的过程,受患者血液、尿液等体液环境变化

的影响,可能通过影响菌株毒力的表达从而导致致病力的不同。本研究发现自尿液分离的 G1 菌株生物膜形成能力强,体外天冬氨酸蛋白酶分泌水平较高,其相关基因的表达水平也相应较高,提示近平滑念珠菌临床株生物膜形成能力与生物膜形成相关基因 BCR1、EFG1、HWP1 表达可能存在关联,天冬氨酸蛋白酶的分泌水平与天冬氨酸蛋白酶 SAPP 基因的表达可能存在关联。本研究因样本量较少,具有一定的局限性,后续将扩大样本量,进一步研究不同来源菌株毒力因子差异的特征及关联性。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] Staniszevska M. Virulence factors in *Candida* species[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2020, 21(3): 313–323.
- [2] 羊玉林, 叶水文, 张楠. 念珠菌生物被膜特性及抗生物被膜治疗[J]. *中国抗生素杂志*, 2020, 45(10): 968–973.
Yang YL, Ye SW, Zhang N. Characteristics of *Candida* biofilm and anti-biofilm therapy[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2020, 45(10): 968–973.
- [3] Silva S, Henriques M, Martins A, et al. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition[J]. *Med Mycol*, 2009, 47(7): 681–689.
- [4] 姜佳玉, 王汐文, 唐希远, 等. 白念珠菌生物被膜治疗研究进展[J]. *中国抗生素杂志*, 2019, 44(8): 899–903.
Jiang JY, Wang XW, Tang XY, et al. Research progress of the treatment of biofilms of *Candida albicans* [J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2019, 44(8): 899–903.
- [5] Deorukhkar SC, Saini S, Mathew S. Virulence factors contributing to pathogenicity of *Candida tropicalis* and its antifungal susceptibility profile[J]. *Int J Microbiol*, 2014, 2014: 456878.
- [6] Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms[J]. *Virulence*, 2013, 4(2): 119–128.
- [7] Singh DK, Németh T, Papp A, et al. Functional characterization of secreted aspartyl proteases in *Candida parapsilosis*[J]. *mSphere*, 2019, 4(4): e00484–19.
- [8] Sabino R, Sampaio P, Rosado L, et al. New polymorphic microsatellite markers able to distinguish among *Candida parapsilosis* sensu stricto isolates[J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(5): 1677–1682.
- [9] Tavanti A, Hensgens LAM, Mogavero S, et al. Genotypic and phenotypic properties of *Candida parapsilosis* sensu strictu strains isolated from different geographic regions and body sites[J]. *BMC Microbiol*, 2010, 10: 203.
- [10] 杨艳华, 陈佳仪, 陈妍, 等. 阴道白念珠菌毒力因子表达水平及与耐药的相关性[J]. *中国热带医学*, 2022, 22(5): 423–428.
Yang YH, Chen JY, Chen Y, et al. Expression level of virulence factors of vaginal *Candida albicans* and its correlation with drug resistance[J]. *China Tropical Medicine*, 2022, 22(5): 423–428.
- [11] Tóth R, Nosek J, Mora-Montes HM, et al. *Candida parapsilosis*: from genes to the bedside[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2019, 32(2): e00111–18.
- [12] Souza ACR, Fuchs BB, Alves VDS, et al. Pathogenesis of the *Candida parapsilosis* complex in the model host *Caenorhabditis elegans*[J]. *Genes (Basel)*, 2018, 9(8): 401.
- [13] Silva S, Henriques M, Martins A, et al. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition[J]. *Med Mycol*, 2009, 47(7): 681–689.
- [14] Modiri M, Khodavaisy S, Barac A, et al. Comparison of biofilm-producing ability of clinical isolates of *Candida parapsilosis* species complex[J]. *J Mycol Med*, 2019, 29(2): 140–146.
- [15] Nobile CJ, Mitchell AP. Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p[J]. *Curr Biol*, 2005, 15(12): 1150–1155.
- [16] Nobile CJ, Andes DR, Nett JE, et al. Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation *in vitro* and *in vivo*[J]. *PLoS Pathog*, 2006, 2(7): e63.
- [17] Ding CF, Jalbert T, Landry SP. The relationship between university rankings and outcomes measurement[J]. *Coll Teach Methods Styles J*, 2007, 3(2): 1–10.
- [18] Connolly LA, Riccombeni A, Grózer Z, et al. The APSES transcription factor EFG1 is a global regulator that controls morphogenesis and biofilm formation in *Candida parapsilosis* [J]. *Mol Microbiol*, 2013, 90(1): 36–53.
- [19] Araújo D, Henriques M, Silva S. Portrait of *Candida* species biofilm regulatory network genes [J]. *Trends Microbiol*, 2017, 25(1): 62–75.
- [20] Horváth P, Nosanchuk JD, Hamari Z, et al. The identification of gene duplication and the role of secreted aspartyl proteinase 1 in *Candida parapsilosis* virulence[J]. *J Infect Dis*, 2012, 205(6): 923–933.
- [21] Merkerová M, Dostál J, Hradilek M, et al. Cloning and characterization of Sapp2p, the second aspartic proteinase isoenzyme from *Candida parapsilosis* [J]. *FEMS Yeast Res*, 2006, 6(7): 1018–1026.
- [22] Silva S, Henriques M, Oliveira R, et al. Characterization of *Candida parapsilosis* infection of an *in vitro* reconstituted human oral epithelium[J]. *Eur J Oral Sci*, 2009, 117(6): 669–675.

(本文编辑:文细毛)

本文引用格式: 瞿玉洁, 李婷婷, 李茂媛, 等. 近平滑念珠菌临床分离菌株毒力因子差异表达研究[J]. *中国感染控制杂志*, 2024, 23(1): 16–24. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20244362.

Cite this article as: QU Yu-jie, LI Ting-ting, LI Mao-yuan, et al. Differential expression of virulence factors in clinical isolates of *Candida parapsilosis*[J]. *Chin J Infect Control*, 2024, 23(1): 16–24. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20244362.