



*SDH2*基因在白念珠菌环境适应性中的作用

王欣荣, 鲁仁义, 王彦

The role of *SDH2* gene in the environmental adaptability of *Candida albicans*

WANG Xinrong, LU Renyi, WANG Yan

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.1006-0111.202201096>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

转录因子*Cup2*对白念珠菌铜离子代谢、氧化应激调控作用的初步研究

Regulation and control of transcription factor *Cup2* on Cu^{2+} metabolism and oxidative stress in *Candida albicans*

药学实践杂志. 2017, 35(3): 224-228 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.03.008

基于D-SERS法表征两性霉素B对白色念珠菌抑制作用的研究

Research on the inhibitory effect of amphotericin B against *Candida albicans* by D-SERS

药学实践杂志. 2019, 37(2): 156-161,169 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.02.011

马尾松叶低极性部位的GC-MS分析及协同氟康唑抗耐药白念珠菌活性研究

GC-MS analysis of low polarity extracts from *Pinus massoniana* Lamb. leaves and study on their synergistic activity of fluconazole against fluconazole-resistant *Candida albicans*

药学实践杂志. 2021, 39(5): 399-402, 441 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202101011

表面增强拉曼光谱法快速鉴别失活白色念珠菌

Rapid identification of inactivated *C. albicans* by surface-enhanced Raman spectroscopy

药学实践杂志. 2017, 35(5): 422-426 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.05.009

吩嗪类衍生物的抗真菌活性研究

Study on the antifungal activity of phenazine derivatives

药学实践杂志. 2021, 39(3): 249-254 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202103083

新型含喹啉和噻吩结构的抗真菌化合物的设计与合成

Design and synthesis of novel antifungal compounds bearing quinoline and thiophene moieties

药学实践杂志. 2017, 35(1): 17-21,86 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.01.005



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

SDH2 基因在白念珠菌环境适应性中的作用

王欣荣, 鲁仁义, 王彦 (海军军医大学药学院军特药研究中心, 上海 200433)

[摘要] 目的 探究 *SDH2* 基因在白念珠菌环境适应性中的作用。方法 以野生型白念珠菌 SC5314、*SDH2* 基因敲除菌 *sdh2Δ/Δ*、基因回复菌 *sdh2Δ/SDH2* 为实验对象;应用点板实验考察野生型菌、*SDH2* 缺失菌和回复菌对外界压力刺激剂和抗真菌药物的敏感性;采用罗丹明 6G 外排实验考察 *SDH2* 基因缺失对白念珠菌药物外排能力的影响。结果 *SDH2* 基因缺失后白念珠菌对细胞壁应激刺激剂咖啡因、氧化应激刺激剂二酰胺和甲萘醌表现出轻微耐受,值得注意的是 *SDH2* 基因敲除菌 *sdh2Δ/Δ* 对唑类抗真菌药物的敏感性明显增高,*SDH2* 缺失导致白念珠菌药物外排能力下降。结论 *SDH2* 缺失会导致白念珠菌对环境适应性的改变,包括对外界环境压力应答的改变和对唑类抗真菌药物敏感性的增加,以 *SDH2* 为靶基因,开发真菌特异性 *SDH2* 抑制剂,有望发现与唑类药物协同的新型抗真菌药物。

[关键词] 白念珠菌; *SDH2*; 环境适应性; 压力应激; 药物敏感性

[中图分类号] R978.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2022)04-0309-05

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202201096

The role of *SDH2* gene in the environmental adaptability of *Candida albicans*

WANG Xinrong, LU Renyi, WANG Yan (School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of *SDH2* gene in the environmental adaptability of *Candida albicans*. **Methods** Wild-type *C. albicans* strain SC5314, *SDH2* gene knockout mutant *sdh2Δ/Δ* and reintegrated strain *sdh2Δ/SDH2* were used as experimental objects. Spot assay was conducted to assess the sensitivity of the WT *C. albicans* strain SC5314, *SDH2* gene knockout mutant *sdh2Δ/Δ* and reintegrated strain *sdh2Δ/SDH2* to external stress stimulants and antifungal drugs. The effect of *SDH2* gene deletion on drug efflux ability of *C. albicans* was determined by rhodamine 6G efflux assay. **Results** After *SDH2* gene deletion, *C. albicans* showed slight tolerance to cell wall stress stimulants caffeine, oxidative stress stimulators diamide and menadione. Notably, the sensitivity of *SDH2* gene knockout mutant *sdh2Δ/Δ* to azole antifungal drugs was significantly increased. The drug efflux capacity of *C. albicans* was decreased due to the deletion of *SDH2* gene. **Conclusion** *SDH2* gene deletion lead to changes in environmental adaptability of *C. albicans*, including changes in response to external environmental stress and increased sensitivity to azole antifungal drugs. The development of fungal-specific inhibitor targeting *SDH2* gene may lead to the discovery of new antifungal drugs which have synergistic effect with azole drugs.

[Key words] *Candida albicans*; *SDH2*; environmental adaptability; stress response; drug sensitivity

白念珠菌是一种条件致病真菌,在健康人体口腔或胃肠道中以无害共生菌的形式存在。在免疫功能低下的患者中,能够导致危及生命的全身性感染。近年来,随着癌症患者、器官移植接受者等免疫功能低下人群不断增加,白念珠菌感染引发的严重疾病的发病率不断攀升^[1-2],死亡率粗略估计已高于 40%^[3]。

高适应性是白念珠菌传播和致病的关键因素之一,包括对宿主和外界环境的适应性、形态的转

换以及对抗真菌药物的适应性。代谢的改变能够影响白念珠菌的药物敏感性, Ene 等^[4]发现培养基中碳源由葡萄糖转变为乳酸后白念珠菌对抗真菌药物(咪康唑、两性霉素 B、卡泊芬净)的敏感性发生改变。线粒体作为重要的代谢细胞器,其中的某些基因缺失或者功能缺陷,会导致白念珠菌药物敏感性的变化, Sun 等^[5]发现线粒体复合体 I 相关基因 *GOA1* 和 *NDH51* 的缺失会导致白念珠菌对唑类药物敏感性上升, Edwina 等^[6]的研究发现线粒体关键基因 *FZO1* 的缺失能够增强白念珠菌对唑类药物的敏感性。

本课题组前期发现 *SDH2* 基因缺失导致白念珠菌致病力显著下降,并发现白念珠菌无法利用非发酵碳源^[7]。生物信息学分析显示 *SDH2* 基因编码

[基金项目] 军队生物安全研究专项(20SWAQX29-1-6)

[作者简介] 王欣荣, 硕士研究生, Email: yunhubuxi7799@163.com; 鲁仁义, 讲师, Email: luren yi@smmu.edu.cn

[通信作者] 王彦, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 药理学, Email: wangyansmmu@126.com

琥珀酸脱氢酶(SDH)的铁硫亚基,琥珀酸脱氢酶在三羧酸循环和线粒体电子传递链中均发挥作用,是能量代谢中重要的一环。*SDH2*基因可能在白念珠菌代谢过程中发挥重要的作用,那么它是否能够通过影响代谢从而改变白念珠菌的环境适应性呢?本研究聚焦*SDH2*基因对白念珠菌环境适应性的影响,包括对外界压力应答和药物敏感性的影响,并探索其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 菌株培养

挑取少量冻存于 -80°C 、30%甘油中的菌株,在YPD液体培养基中活化, 30°C ,200 r/min振荡培养24 h后,吸取10 μl 置于新的1 ml YPD液体培养基中,继续在 30°C ,200 r/min振荡条件下培养16 h,用SDA固体培养基划线, 30°C 培养48 h,置于 4°C 保存备用。实验时挑取SDA平板上的单克隆菌落置于1 ml YPD液体培养基中, 30°C ,200 r/min振荡培养16 h过夜,使其处于对数生长期用于后续实验。

1.2 点板实验检测药物敏感性

白念珠菌活化16 h,用YPD液体培养基调整菌浓度至 3×10^6 细胞/ml。制备每种菌株的系列稀释液,以10倍倍比稀释成5个浓度梯度,每种白念珠菌的系列浓度稀释物各取5 μl ,点在事先加入了待考察的不同浓度的化学试剂和药物的YPD琼脂平板上,倒置于孵箱内, 25 、 30 、 37°C 培养24~48 h,期间观察各菌株之间生长的差异并拍照记录。

1.3 罗丹明6G的外排测定实验

收集处于对数生长期的白念珠菌细胞悬浮液,用无菌PBS洗涤3次。随后将细胞重悬于无菌PBS中调整其浓度至 5×10^7 细胞/ml,孵育2 h以耗尽能量,并加入终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 的罗丹明6G。 30°C 、200 r/min振荡培养细胞悬浮液60 min,使罗丹明6G积累。洗涤白念珠菌细胞悬浮液3次,注意要保证白念珠菌细胞最终浓度为 5×10^7 细胞/ml。然后加入终浓度为20 mmol/L的葡萄糖。分别在 25 、 30 、 37°C 条件下,200 r/min振荡培养白念珠菌细胞悬浮液2 h,取白念珠菌细胞样品(约1 ml)离心,收集上清液,在527 nm处测量吸光度。

1.4 统计分析

使用GraphPad Prism软件对全部数据进行分析,时序检验(Mantel Cox)方法比较各组差异,当 $P<0.05$ 时,表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *SDH2*在白念珠菌应激反应中的作用

我们利用多种刺激剂考察了*SDH2*在白念珠菌应激反应中的作用。实验应用了*sdh2 Δ/Δ* 敲除菌、野生型菌和回复菌,考察在存在应激刺激剂的培养基中*sdh2 Δ/Δ* 敲除菌的生长情况与野生型菌和回复菌的区别,从而判断*SDH2*在白念珠菌应激反应中的作用。应激刺激剂包括细胞壁应激刺激剂(十二烷基硫酸钠和咖啡因)、渗透压应激刺激剂(氯化钠)、氧化应激刺激剂(过氧化氢、二酰胺和甲萘醌)。敏感性实验在 25 、 30 、 37°C 三种不同的温度下进行,将不同浓度相同体积的白念珠菌接种于琼脂培养板上,同样的培养板制备3份,白念珠菌生长形成明显的菌落后拍照。结果显示,与野生型菌或回复菌相比,*sdh2 Δ/Δ* 敲除菌于 25°C 在0.03%十二烷基硫酸钠培养板上生长得多(图1A)。此外,在所有培养温度下,*sdh2 Δ/Δ* 敲除菌在含咖啡因、二酰胺或甲萘醌的培养板上也较野生型菌/回复菌生长得多(图1A、1B、1C)。

2.2 *sdh2 Δ/Δ* 对唑类药物的敏感性增加

我们考察了*sdh2 Δ/Δ* 敲除菌、野生型菌和回复菌对抗真菌药物的敏感性,考察的药物包括唑类抗真菌药物特比萘芬、两性霉素B、氟胞嘧啶和阿尼芬净。将不同浓度相同体积的白念珠菌接种于琼脂培养板上,同样的培养板制备3份,白念珠菌生长形成明显的菌落后拍照。药物敏感性实验结果显示,与野生型菌/回复菌相比,*sdh2 Δ/Δ* 敲除菌在含有氟康唑、酮康唑和伊曲康唑的培养板上生长得明显减少(图2A、2B、2C),而在含有其他抗真菌药物,如特比萘芬、两性霉素B、氟胞嘧啶和阿尼芬净的培养板上没有明显差别。

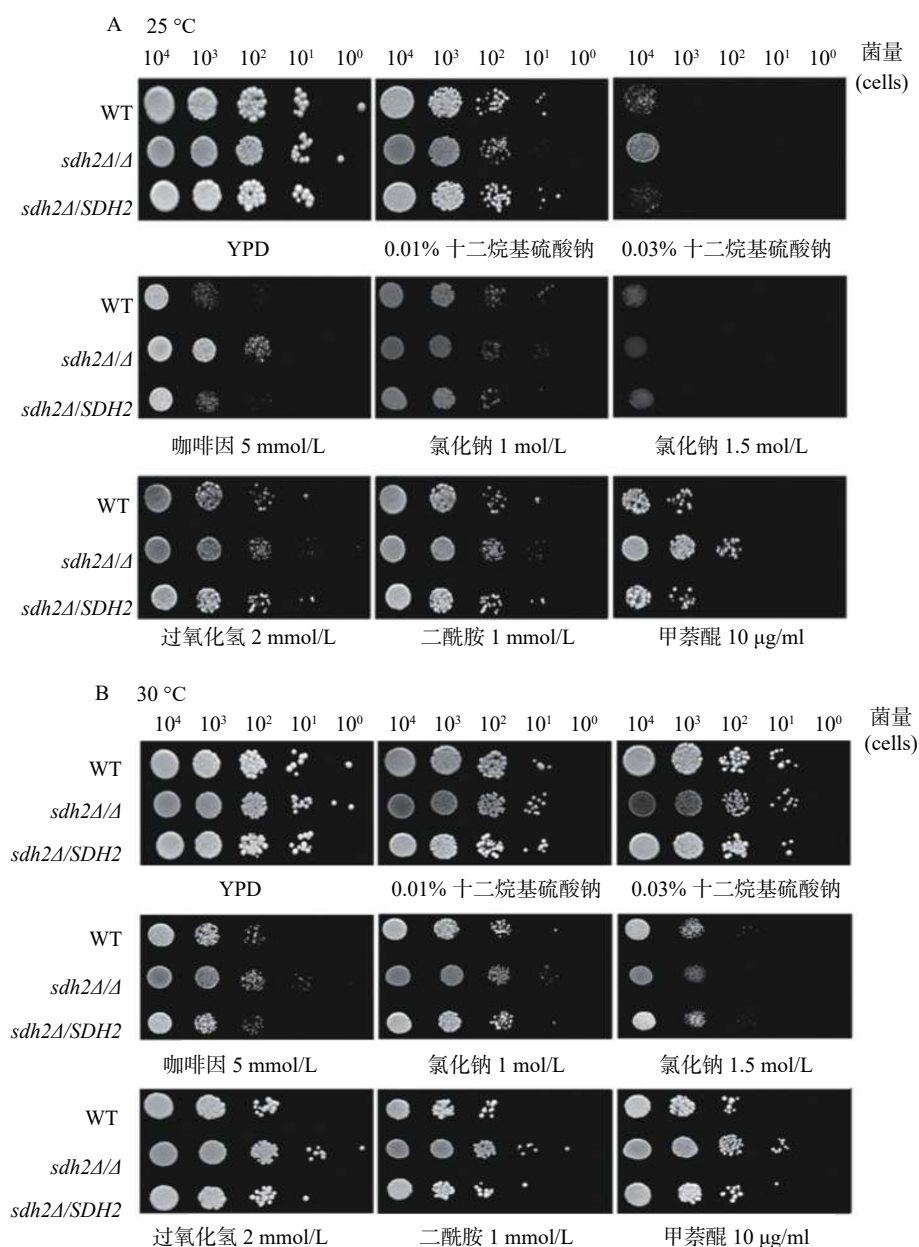
2.3 *SDH2*缺失导致白念珠菌药物外排缺陷

罗丹明6G是ABC(ATP-binding cassette)转运蛋白的特异性底物,在能量不足时被被动扩散的方式进入白念珠菌细胞,加入葡萄糖供能后,可通过药物外排泵以主动转运的方式泵出细胞外。我们通过罗丹明6G的外排实验考察了*SDH2*敲除对白念珠菌药物外排能力的影响。结果显示在 30°C 和 37°C 培养温度下,通过添加葡萄糖以启动能量代谢2 h后,与野生型菌相比,从*sdh2 Δ/Δ* 敲除菌的细胞中泵出的罗丹明6G显著减少($P<0.01$,见图3)。有趣的是,在 25°C 的培养温度下,3种菌株泵出的罗丹明6G都较 30°C 和 37°C 条件下有所减少,但各菌株之间没有显著差异(图3)。

3 讨论

SDH2 编码琥珀酸脱氢酶中的一个亚基, 琥珀酸脱氢酶参与三羧酸循环, 并且它位于线粒体内膜上, 发挥电子传递的作用, 对于能量代谢十分重要^[8]。我们对 *SDH2* 基因在白念珠菌环境适应性中的作用进行了初步探索, 实验选择在 30 °C (白念珠菌最适宜生长温度)、37 °C (宿主温度) 和 25 °C (室温) 三种温度下进行。实验之所以选用三种温度, 一方面是由于在不同环境温度下白念珠菌的代谢可能不同, 选用不同的温度可以考察温度造成的差别; 另一方面在三种温度下考察 *SDH2* 基因的功能, 结果相互之间可以比较或者印证, 增加信息量, 有利于分析 *SDH2* 基因的功能。有意思的是 *SDH2* 基

因缺失后菌株对唑类抗真菌药物 (氟康唑、酮康唑、伊曲康唑) 的敏感性显著上升, 而对于其他类型的抗真菌药物包括丙烯胺类特比萘芬、多烯类两性霉素 B、核苷类氟胞嘧啶和棘白菌素类阿尼芬净, 其敏感性和野生型菌没有差异。唑类药物的敏感性与药物外排泵的功能密切相关, 药物外排功能障碍可导致对唑类抗真菌药物敏感性增加^[9]。药物外排泵包括 ABC 转运蛋白超家族和主要易化因子超家族, 其中 ABC 转运蛋白中的 Cdr1p、Cdr2p 发挥作用都需要消耗能量。罗丹明 6G 是能量依赖型 ABC 转运蛋白的特异性底物, 通过外排泵以能量依赖的主动转运方式排出细胞外。罗丹明 6G 外排实验的结果能显示能量依赖型 ABC 转运蛋白的功能。研究发现 *SDH2* 缺失后白念珠菌在 30 °C 和



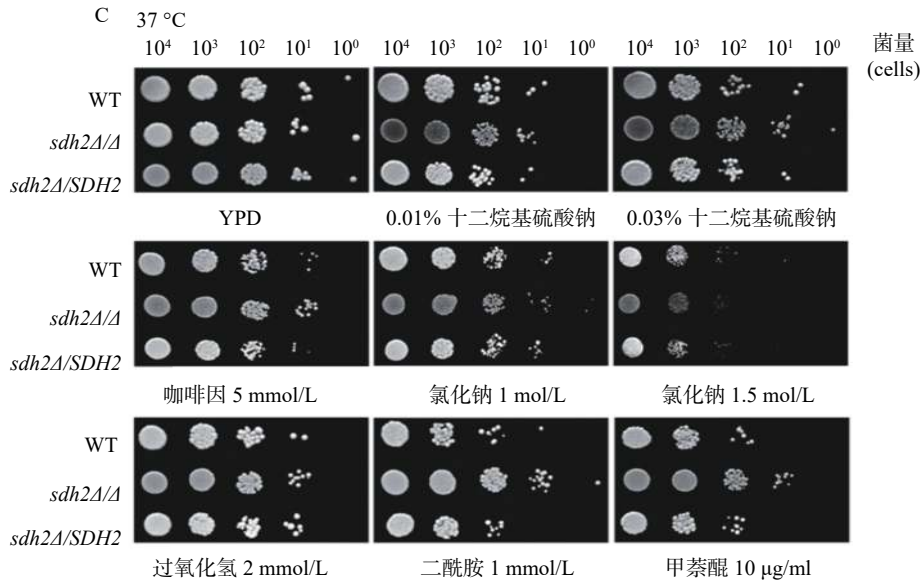


图1 *SDH2* 基因缺失菌与野生型菌株对各种应激刺激剂的敏感性
A. 25 °C 下培养; B. 30 °C 下培养; C. 37 °C 下培养

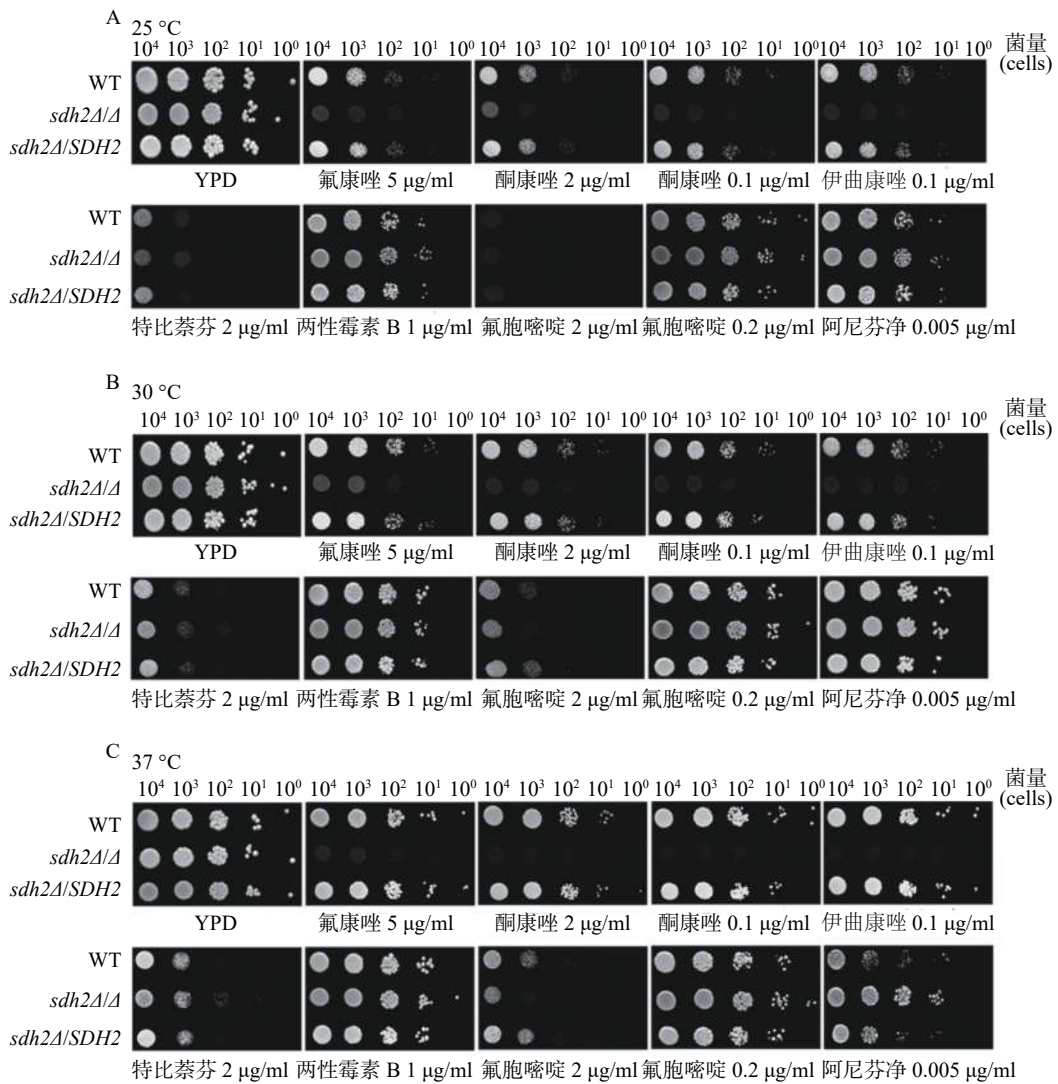


图2 *SDH2* 基因缺失菌与野生型菌株对抗真菌药物的敏感性
A. 25 °C 下培养; B. 30 °C 下培养; C. 37 °C 下培养

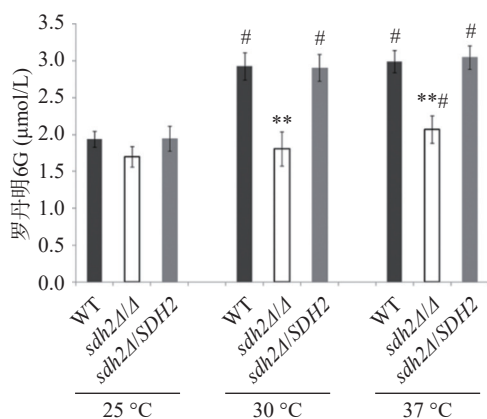


图 3 *SDH2* 基因缺失菌与野生型菌株对罗丹明 6G 的外排能力
$P < 0.05$, 与 25 °C 比较; ** $P < 0.01$, 与 WT 比较

37 °C 时外排能力都显著降低。*SDH2* 对能量代谢非常重要, *SDH2* 基因缺失后, 菌株能量代谢异常, 能量依赖型 ABC 转运蛋白的功能下降, 缺失菌对唑类抗真菌药物的敏感性增加。

SDH2 基因缺失后白念珠菌对咖啡因、二酰胺和甲萘醌都表现出轻微的耐受, 这提示 *SDH2* 基因在白念珠菌环境应激中有一定的作用, 这些环境因素包括细胞壁压力的刺激以及氧化刺激, 具体的作用机制还有待进一步探讨。

综上所述, 本研究发现 *SDH2* 基因缺失会导致白念珠菌对环境压力应激反应的改变; 此外, *SDH2* 基因缺失后菌株的药物外排能力降低, 菌株对唑类抗真菌药物的敏感性增加。代谢对白念珠菌的环境适应能力和致病力十分重要, *SDH2* 基因缺失导致白念珠菌对唑类抗真菌药物专特性地敏感, 以 *SDH2* 为靶基因, 开发真菌特异性 *SDH2* 抑制剂, 有望发现与唑类药物协同的新型抗真菌药物。

【参考文献】

- [1] PFALLER M A, DIEKEMA D J. Epidemiology of invasive mycoses in North America[J]. *Crit Rev Microbiol*, 2010, 36(1): 1-53.
- [2] ENOCH D A, YANG H N, ALIYU S H, et al. The changing epidemiology of invasive fungal infections[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1508: 17-65.
- [3] BROWN G D, DENNING D W, GOW N A, et al. Hidden killers: human fungal infections[J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(165): 165rv13.
- [4] ENE I V, ADYA A K, WEHMEIER S, et al. Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen[J]. *Cell Microbiol*, 2012, 14(9): 1319-1335.
- [5] SUN N, FONZI W, CHEN H, et al. Azole susceptibility and transcriptome profiling in *Candida albicans* mitochondrial electron transport chain complex I mutants[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(1): 532-542.
- [6] THOMAS E, ROMAN E, CLAYPOOL S, et al. Mitochondria influence CDR1 efflux pump activity, Hog1-mediated oxidative stress pathway, iron homeostasis, and ergosterol levels in *Candida albicans*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(11): 5580-5599.
- [7] BI S, LV Q Z, WANG T T, et al. *SDH2* is involved in proper hypha formation and virulence in *Candida albicans*[J]. *Future Microbiol*, 2018, 13: 1141-1156.
- [8] OYEDOTUN K S, LEMIRE B D. The quaternary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase. Homology modeling, cofactor docking, and molecular dynamics simulation studies[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(10): 9424-9431.
- [9] HANS S, FATIMA Z, HAMEED S. Insights into the modulatory effect of magnesium on efflux mechanisms of *Candida albicans* reveal inhibition of ATP binding cassette multidrug transporters and dysfunctional mitochondria[J]. *Biometals*, 2021, 34(2): 329-339.

[收稿日期] 2022-01-26 [修回日期] 2022-06-23

[本文编辑] 陈盛新

(上接第 301 页)

- [16] DOUDNA J A. The promise and challenge of therapeutic genome editing[J]. *Nature*, 2020, 578(7794): 229-236.
- [17] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [18] JUNE C H, O'CONNOR R S, KAWALEKAR O U, et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer[J]. *Science*, 2018, 359(6382): 1361-1365.
- [19] LUNDSTROM K. Viral vectors in gene therapy[J]. *Diseases*,

2018, 6(2): 42.

- [20] ZEBALLOS D M A, GAJ T. Next-generation CRISPR technologies and their applications in gene and cell therapy[J]. *Trends Biotechnol*, 2021, 39(7): 692-705.
- [21] TAGUCHI S, FUKUHARA H, TODO T. Oncolytic virus therapy in Japan: progress in clinical trials and future perspectives[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2019, 49(3): 201-209.
- [22] 杨若南, 许丽, 徐萍, 等. RNA 疗法产业发展态势分析及建议[J]. *中国生物工程杂志*, 2021, 41(2): 162-171.

[收稿日期] 2021-12-06 [修回日期] 2022-07-06

[本文编辑] 李睿旻