

· 综述 ·

高通量测序技术在黄连解毒汤抗白念珠菌机制研究中的应用及探讨

曹毅 翁鹤 杨晓红

【摘要】 白念珠菌(*Candida albicans*)是临床上发生最为普遍的致病真菌,严重时可危及生命,目前主要以三唑类药物进行防治。但是由于药物长期广泛的使用及其作用位点的单一性,导致耐药问题日益突出。中药黄连解毒汤有良好的抑菌效果,并极大增强西药杀菌作用,但至今相关其分子机制的研究鲜有涉及。本文在阐述目前国内外现有高通量基因测序技术的基础上,重点探讨了高通量技术在黄连解毒汤抗白色念珠菌机制研究中的应用。

【关键词】 白念珠菌; 黄连解毒汤; 高通量测序技术; 应用探讨

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.01.020

Application and exploration of high-throughput sequencing technologies in mechanism study of Huanglian-Jiedu Decoction antagonize *Candida albicans* CAO Yi, WENG He, YANG Xiao-hong.
Department of Dermatology, First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310006, China

Corresponding author: CAO Yi, E-mail: caoyi1965@163.com

【Abstract】 *Candida albicans* is the most common clinical pathogenic fungus and life-threatening in serious situations. Triazole is the main drug used in clinic to prevent and treat individuals infected with *Candida albicans* presently. However, due to long-term extensive usage and single site of action, drug resistance problems have become increasingly prominent. Antimicrobial activity of Huanglian-Jiedu Decoction has been confirmed, and Huanglian-Jiedu Decoction has effective role in enhancing sterilization action of western medicine, but the molecular mechanism in which is rarely known. In this article we discuss the current situation of the high-throughput sequencing technologies in the world, and focus on the application and exploration of high-throughput sequencing technologies in the mechanism study of Huanglian-Jiedu Decoction antagonize *Candida albicans*.

【Key words】 *Candida albicans*; Huanglian-Jiedu Decoction; High-throughput sequencing technology; Application and discussion

白念珠菌(*Candida albicans*)又称白假丝酵母菌,广泛存在自然中,是人类和动物共患的深部条件性致病菌,寄居于皮肤、口腔、胃肠道等部位,通常情况下并不引起发病。而在菌群失调或宿主免疫力低下时大量繁殖,转为致病形态,形成病灶,引起皮肤、粘膜及内脏的念珠菌病,严重的深部白念

珠菌感染可危及病人的生命^[1-2]。据统计,深部白念珠菌感染病死率高达 68.9%。目前,随着艾滋病的传播,癌症放化疗的开展、器官移植后免疫抑制剂的应用,以及导管等越来越多生物材料的应用,白念珠菌感染率不断增加,并发生反复感染,已经成为医学上备受关注的课题^[3-4]。临床上主要以三唑类药物进行治疗和预防^[5],该类药物的作用方式为抑菌作用,因此疗程长,在长期使用过程中逐渐使耐药真菌比例增多或出现耐药突变。在有限的药物资源条件下,医药工作者试图通过个体化用药、联合用药和应用免疫调节剂等策略克服白念珠菌耐药问题,其中,探索科学的联合用药方案、开发

基金项目:国家自然科学基金(30471565)

作者单位:310006 杭州,浙江中医药大学附属第一医院皮肤科

[曹毅、翁鹤(硕士研究生)、杨晓红]

作者简介:曹毅(1965-),博士,教授,主任医师,博士生导师。

研究方向:皮肤科临床与科研。E-mail: caoyi1965@163.com

新的抗真菌药物和抗菌增效剂是公认的最有效的策略。

大量中药被证实具有明确的抗真菌作用,且副作用小、来源广、价格低廉和较少出现耐药。因此,研究开发抗真菌中药具有良好前景^[6-7]。笔者所在的课题组发现中药黄连解毒汤不仅具备良好的抗真菌活性(须癣毛癣菌和白念珠菌的平均最小抑菌浓度值分别为 0.0034 g/ml 和 0.017 g/ml),同时该药与西药联合应用时表现出良好的协同作用,可明显提高西药的抗真菌作用,增加真菌对药物的敏感性,具有良好的增效作用^[7]。但是目前对其本质的认识尚存在空白,因而制约了其发展,同时也潜在着广阔的研究内容,目前在国家自然科学基金的支持下,课题组已启动建立了与高通量活性筛选相结合的黄连解毒汤抗白念珠菌生物学机制的分析研究体系,以下将介绍有关基本情况。

1 三唑类抗真菌药物抗白念珠菌的机制及耐药情况

目前,临床上广泛应用的抗真菌药物为三唑类(如酮康唑、氟康唑、伊曲康唑等)、两性霉素 B 和 5-氟胞嘧啶^[5]。5-氟胞嘧啶能引起胃肠道反应、一过性转氨酶升高、碱性磷酸酶升高及白细胞和血小板减少等不良反应,同时能快速产生 5-氟胞嘧啶耐药菌株,因此该药很少用于临床治疗深部真菌感染;两性霉素 B 无论口服还是肌肉注射均难吸收,大部分药剂在体内代谢灭活,不易透过血脑屏障,并且在体内消除缓慢,引起较多不良反应,最常见包括静滴药物后寒战、高热等即刻反应以及贫血、肝肾毒性、低血钾等。且该药肾毒性大,并呈剂量依赖性,约 80% 患者发生氮质血症,这些因素大大限制了该药在临床上作为常规药物的应用。三唑类抗真菌药物是目前使用最广泛的一类抗真菌药物,其中,酮康唑是最先使用的口服药,而现在多被更有效低毒的三唑类衍生物如氟康唑和伊曲康唑等取代。氟康唑为广谱抗真菌药,其抗菌谱与酮康唑相似,体内抗真菌作用比酮康唑强 10~20 倍。除对氟康唑具有天然耐药性的克柔氏念珠菌和光滑念珠菌外,氟康唑对其他念珠菌、隐球菌、毛孢子菌属、毛癣菌属、皮炎芽生菌及粗球孢子菌等均比较敏感。因其吸收好、给药方便、抗菌谱广、疗效高和毒副作用小等特点,是目前临床上治疗白念珠菌感染的首选药物,得到广泛应用^[8]。伊曲康唑能优先

与角蛋白组织(如指甲、头发和皮肤)结合,因此在治疗浅表、皮下真菌感染方面有良好的疗效。该药对非白念珠菌和曲霉菌属的真菌有广谱抗菌活性。然而其口服吸收差,在临床深部真菌感染治疗效果受限制,因此该药主要作为侵袭性曲霉菌病的二线用药及组织胞浆菌病和皮炎芽生菌病的一线用药。

由于目前日益严重的耐药现象和有限的治疗药物使白念珠菌感染成为临床上迫切需要解决的问题。因此,深入研究真菌的生化反应机制和耐药机理已经成为必要。研究人员发现,临床产生耐药的原因主要包括细胞间药物量积累的减少、药物对靶标蛋白结合力降低、靶标表达水平增高以及麦角甾醇合成途径的改变等^[9-10]。Dunkel 等^[11-13]发现编码转运蛋白包括 ATP 结合盒式蛋白(ATP-binding cassette transporter, ABC)的 CDR1 和 CDR2 基因,及编码易化扩散载体超家族(major facilitator superfamily, MFS)蛋白的 MDR1 基因等过量表达,引起大量药物快速排除真菌细胞,使细胞间药量积累水平明显降低,这是造成真菌耐药的重要原因之一。Clemens 等进一步研究发现,转运蛋白的过量表达是由于其转录调控因子发生点突变引起的,因此,转录调控因子点突变是致使真菌产生耐药性的深层次原因。目前,已发现的转录调控因子点突变包括 A643T、G648D 等^[14-15]。Lamb 等发现三唑类药物靶标蛋白 ERG11 点突变后,蛋白构象发生变化,使药物对靶标蛋白的结合力降低,造成真菌耐药^[16]。目前,已发现的点突变包括 F126L、G129A、Y132H、T229A、G307S、S405F、F449S、G464S、G465S、R467K、I471T 等^[10,17-18]。ERG11 表达量增高是真菌耐药的另一个重要原因。Marichal 等^[19]发现 C. glabrata 耐药菌株中 ERG11 基因存在多个拷贝,Heilmann 等发现转录调控因子 UPC2p 点突变能调控 ERG11 表达量增加,引起耐药现象^[12]。此外,Chau 等^[16-20]研究发现 ERG3 突变造成功能缺失,引起麦角甾醇合成途径的改变,也能引起真菌耐药。分子流行病学研究发现多个耐药机制可同时存在于一个耐药菌株中。Wirsching 等^[15]证实一个白念真菌菌株的耐药是由于 MDR1 基因表达上调和 ERG11 蛋白 G463S 点突变共同造成的。

2 中药黄连解毒汤在抗白念珠菌方面的研究前景分析

中医学中有大量中药被证实具有明确的抗真

菌作用,且中药具有副作用小、来源广、价格低廉和较少出现耐药等优点,因此,研究开发抗真菌中药具备良好前景^[6-7]。中药具有很多活性强而副作用小的有效成分,许多化合物结构新颖,与现有药物完全不同,因此从中药中寻找抗真菌新药或先导化合物,是近年中药研究的热点之一。目前已经研究发现的具有抗真菌作用的中药及其单体主要包括粉防己^[21]、吴茱萸^[22]、黄芩苷^[23-24]等。黄杉等^[23]发现联用黄芩苷和氟康唑可以有效抑制氟康唑耐药的白念珠菌株生长,目前一般认为黄芩苷对白念珠菌生物膜形成有抑制作用^[24]。

黄连解毒汤,首载于葛洪《肘后备急方》,是中医药中已发现的具有良好抗菌作用的药剂之一,由黄连、黄芩、黄柏和栀子组成,具有清热、泻火、解毒之功效,主治疗一切实热火毒、三焦热盛之证。现代药理学研究认为黄连解毒汤具有良好的抗菌作用,除对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、乙型链球菌、变形杆菌、痢疾杆菌和大便产碱杆菌等多种细菌有明显抑制作用外,对白念珠菌悬浮菌亦具有良好的抑制作用,其最小抑菌浓度范围为 0.0016 ~ 0.0063 g/ml^[19]。此外,临床应用黄连解毒汤浸泡治疗足癣也取得良好的治疗效果,总有效率高达 82.5%。因此,从表型实验及临床数据显示,黄连解毒汤有良好的抑菌效果,并极大增强西药杀菌作用。但基本未涉及分子机理的研究,比如:白念珠菌受黄连解毒汤处理时,响应的关键基因是什么,以及其信号传递网络等。由于几乎没有其他可参考的数据,因此,构筑数据平台、提供参考线索,是挖掘黄连解毒汤对白念珠菌作用机制的先决条件,而采用新一代高通量测序技术测定转录组的变化是一个快速有效的解决方案。充分利用现代科学技术和方法进行高效快速的黄连解毒汤抗白念珠菌的药效和作用机理的研究,不但是挖掘、发展和完善中医药宝库的迫切需要,而且是中药现代化研究中急需解决的根本问题。

3 高通量测序技术在药物研究中的应用

3.1 基因测序技术发展

基因测序技术的发展大体上可分为三代,第一代毛细管电泳测序技术,第二代高通量测序技术,第三代单分子测序技术。目前,国外凭借其高通量基因测序技术和测序设备的研发优势,利用基因资源的唯一性,抢先申请基因专利,谋求垄断未来全球的基因产业。而高通量基因测序技术的

研究在中国目前处于起步阶段,具有非常重要的迫切性。在未来,生物医药、临床医疗等领域的开展都将建立在现代的基因测序技术基础上,尤其在基因诊断和基因治疗方面。

3.2 毛细管电泳测序技术

在 1977 年, Sanger 等提出了经典的双脱氧核苷酸末端终止测序法,在 Sanger 法的基础上,1986 年美国应用生物系统公司(ABI)推出世界上第一台全自动电泳测序仪,以荧光标记代替放射性同位素标记、以荧光信号接收器和计算机信号分析系统代替放射性自显影的自动测序仪,也把该研究成果发表在杂志《Nature》上。毛细管电泳测序技术使得人类获取全基因组图谱的梦想得以实现,1990 年美国国会正式批准了人类基因组计划(1990 年)。人类基因组计划耗时 13 年,耗资约 30 亿美元,完成了由 30 亿个碱基对组成的人类基因组 DNA 关键序列图的测序工作,中国于 1999 年 9 月加入国际人类基因组计划,承担该次人类基因组计划 1% 工作,用 6 个多月的时间完成了人类第 3 号染色体短臂从 D3S3610 至端粒的 30 Mb 区域上 3000 万个碱基对的测序任务。目前国内从事毛细管电泳测序技术的有关院校和单位有中国科学院、中国科技大学与台湾国立成功大学、国立中山大学、浙江大学、福建师范大学、中山大学等。

3.3 高通量测序技术

虽然毛细管电泳测序技术已经帮助人们完成了从噬菌体基因组到人类基因组草图等大量的测序工作,但是存在成本高、速度慢等方面的不足。高通量基因测序技术是对毛细管电泳测序技术一次革命性的改变,该技术的特点是可以对大量 DNA 或 RNA 直接测序,并通过测序结果和标准基因组序列(本物种或其他相近)的分析比对,在转录水平上确认基因的表达量,即获得精确的数字表达谱及具体响应基因。第一个推向市场的高通量基因测序仪是 2005 年 10 月由美国的 454 Life Sciences 公司推出的 GS20。高通量测序设备具有极高的测序通量,相对于第一代的 96 道毛细管电泳测序仪,高通量测序一次实验可以读取相当于 40 万到 400 万条通道的序列。读取长度根据各个公司的高通量基因测序仪不同,从 25 bp 到 450 bp,不同的测序仪在一次实验中,可以读取 1 G 到 14 G 不等的碱基数。高通量测序技术的强大快速测序能力使得对一个物种的 RNA 转录组、全基因组进行功能分析等成为

可能。自 2007 年 1 月 Illumina 公司新一代高通量测序仪 Solexa 正式商业化使用以来,国际权威期刊《Nature》和《Science》已有多篇论著报道新一代高通量测序仪成功测定物种的基因及转录组。Liu 等^[25]应用高通量测序技术分析三唑类药物戊唑醇处理后禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*)基因表达量的变化,发现麦角甾醇生物合成途径中的多个基因表达量明显上升,极大地响应了药剂的处理。中国第一台高通量测序仪是深圳华因康基因科技有限公司在 2008 年 10 月推出,第二代高通量测序仪的测序能力在不断得到提高,而测序费用在不断的降低。2007 年,美国国立人类基因组研究会提出利用第二代高通量测序技术,测序个人基因组只需花费 1000 美元的目标。

3.4 单分子测序技术

单分子测序技术作为未来的第三代测序技术,它将是分子影像技术、纳米技术等多项技术的结晶。分子影像技术可以在细胞、基因和分子水平上实现生物体内部生理或病理过程的无创实时动态在体成像,而纳米技术应用于分子影像学的根本目的就是为增强荧光分子探针识别特异性靶分子的能力,提高分子显像效果,实现微观机理的可视化,但是目前单分子测序技术尚未商业化。

4 高通量测序技术在黄连解毒汤对白念珠菌作用机制方面的应用前景

由于使用高通量测序技术可以实现对不同组织 mRNA 表达差异进行检测,通过与基因组进行比较可以确定组织特异表达的基因,因此具有取代“基因芯片”技术的态势。由于基因芯片的检测范围取决于芯片上探针的信息,因此只能检测人们已知序列的特征,缺乏发现寻找新基因的能力,而高通量测序则能够很好地弥补基因芯片这方面的不足,因此在未来的几年中,高通量测序技术将会取代“基因芯片”越来越成熟并得到更加广泛的应用。

因此认为可以以新一代高通量测序技术的发展为契机,应用该技术测定黄连解毒汤处理白念珠菌过程中菌株转录组的变化,采用生物信息学方法对测序结果进行分析、整理和归类,识别其中的响应基因及网络。同时,结合特异性荧光定量 PCR 法的大样本验证工作及基因敲除等研究手段,观察敲除关键基因后的突变白念珠菌对黄连解毒汤敏感性、致病性、生长特性和抗逆性等表型的改变,详细

鉴定关键基因功能。另外,利用临床分离到的黄连解毒汤白念珠菌抗性和敏感菌株,测定关键基因序列,并采用真菌转化技术,观察含有点突变的关键基因转化子对黄连解毒汤抗性的变化,以期明确黄连解毒汤对白念珠菌的作用机理及调控网络,从理论上阐明黄连解毒汤对西药的增效作用。有助于真菌临床耐药问题监测工作的开展,并为新药物开发和新型治疗方案研制提供理论依据,同时为古方的现代化应用提供新的研究思路,必将产生较大的社会效益及经济效益。

参 考 文 献

- [1] Arendrup. MC. Epidemiology of invasive candidiasis [J]. Curr Opin Crit Care, 2010, 16(5): 445-452.
- [2] Kothavade RJ, Oberai CM, Valand AG, et al. Disseminated cryptococcosis and fluconazole resistant oral candidiasis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) [J]. J Infect Dev Ctries, 2010, 4(10): 674-678.
- [3] Saunus JM, Kazoullis A, Farah CS. Cellular and molecular mechanisms of resistance to oral *Candida albicans* infections [J]. Front Biosci, 2008, 13: 5345-5358.
- [4] Wilson DT, Drew RH, Perfect JR. Antifungal therapy for invasive fungal diseases in allogeneic stem cell transplant recipients: an update [J]. Mycopathologia, 2009, 168(6): 313-327.
- [5] Brito GN, Inocência AC, Querido SM. et al. In vitro antifungal susceptibility of *Candida* spp. oral isolates from HIV-positive patients and control individuals [J]. Braz Oral Res, 2011, 25(1): 28-33.
- [6] 汪长中,程惠娟,官妍,等. 黄连解毒汤对体外白念珠菌生物膜形成的影响 [J]. 热带病与寄生虫学, 2007, 5(2): 82-84.
- [7] 陶茂灿,夏修蛟,曹毅. 黄连解毒汤体外抗真菌活性及其与西药的联合药敏试验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(3): 585-587.
- [8] Holzkecht BJ, Thorup J, Arendrup MC, et al. Decreasing candidaemia rate in abdominal surgery patients after introduction of fluconazole prophylaxis [J]. Clin Microbiol Infect, Clin Microbiol Infect, 2011, 17(9): 1372-1380.
- [9] MacCallum DM, Coste A, Ischer F, et al. Genetic Dissection of Azole Resistance Mechanisms in *Candida albicans* and Their Validation in a Mouse Model of Disseminated Infection [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(4): 1476-1483.
- [10] Sanglard D, Coste A, Ferrari S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation [J]. FEMS Yeast Res, 2009, 9(7): 1029-1050.
- [11] Coste A, Turner V, Ischer F, et al. A mutation in *Tac1p*, a transcription factor regulating *CDR1* and *CDR2*, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans* [J]. Genetics, 2006, 172(4): 2139-2156.
- [12] Dunkel N, Blass J, Rogers PD, et al. Mutations in the multidrug resistance regulator *MRR1*, followed by loss of heterozygosity, are the main cause of *MDR1* overexpression in fluconazole-resistant

- Candida albicans strains [J]. Mol Microbiol, 2008, 69 (4): 827-840.
- [13] Coste A, 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): 1250-1267.
- [14] Heilmann CJ, Schneider S, Barker KS, et al. An A643T Mutation in the transcription factor Upc2p causes constitutive ERG11 up-regulation and increased fluconazole resistance in Candida albicans [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54 (1): 353-359.
- [15] Wirsching S, Michel S, Morschhäuser J. Targeted gene disruption in Candida albicans wild-type strains; the role of the MDR1 gene in fluconazole resistance of clinical Candida albicans isolates [J]. Mol Microbiol, 2000, 36 (4): 856-865.
- [16] Pinjon E, Moran GP, Jackson CJ, et al. Molecular mechanisms of itraconazole resistance in Candida dubliniensis [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47 (8): 2424-2437.
- [17] Morschhäuser J. The genetic basis of fluconazole resistance development in Candida albicans [J]. Biochemica et Biophysica Acta, 2002, 1587 (2-3): 240-248.
- [18] Lamb DC, Kelly DE, White TC, et al. The R467K Amino Acid Substitution in Candida albicans Sterol 14 α -Demethylase Causes Drug Resistance through Reduced Affinity [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44 (1): 63-67.
- [19] Marichal P, Vanden Bossche H, Odds FC. et al. Molecular biological characterization of an azole-resistant Candida glabrata isolate [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41 (10): 2229-2237.
- [20] Chau AS, Gurnani M, Hawkinson R, et al. Inactivation of sterol $\Delta 5,6$ -desaturase attenuates virulence in Candida albicans [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49 (9): 3646-3651.
- [21] Zhang H, Gao AL, Li FX, et al. Mechanism of action of tetrandrine, a natural inhibitor of Candida albicans drug efflux pumps [J]. Yakugaku Zasshi, 2009, 129 (5): 623-633.
- [22] Adams M, Mahringer A, Kunert O, et al. Cytotoxicity and p-glycoprotein modulating effects of quinolones and indoloquinazolines from the Chinese herb Evodia rutaecarpa [J]. Planta Med, 2007, 73 (15): 1554-1557.
- [23] Huang S, Cao YY, Dai BD, et al. In vitro synergism of fluconazole and baicalein against clinical isolates of Candida albicans resistant to fluconazole [J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31 (12): 2234-2236.
- [24] Cao YY, Dai BD, Wang Y, et al. In vitro activity of baicalein against Candida albicans biofilms [J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 32 (1): 73-77.
- [25] Liu X, Jiang JH, Shao JF, et al. Gene transcription profiling of Fusarium graminearum treated with an azole fungicide tebuconazole [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 85: 1105-1114.

(收稿日期: 2012-10-13)

(本文编辑: 秦楠)

马兜铃酸肾毒性的研究进展

彭金玲 边育红 王丽 李金奎

【摘要】 马兜铃酸(AA)为硝基菲类有机酸类化合物,是马兜铃、关木通、细辛、广防己等植物的主要成分。马兜铃酸药理作用广泛,有抗感染、抗癌、增强细胞免疫及终止妊娠等功能。目前,含有马兜铃酸的中药或中成药广泛应用于风湿及泌尿系统等多种疾病,由于服用含有马兜铃酸成分的中药而引起的肾脏损害报道日益增加,马兜铃酸肾毒性作用越来越受到人们的重视。本文总结了近年来马兜铃酸化学结构、毒理作用基础及临床研究,并对其肾毒理作用机制进行综述,使其为临床合理应用含有马兜铃酸的中药或中成药制剂提供参考。通过设计安全有效的药用剂型,严格控制用药剂量和时间,避免长期或大剂量服用,预防并减少毒性作用,将使该药在临床上得到更广泛应用。

【关键词】 马兜铃酸; 肾毒性; 马兜铃酸肾病; 发病机制

【中图分类号】 R96 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.01.021

基金项目:国家自然科学基金(81072741)

作者单位:063400 河北省唐山市丰润区第二人民医院计划免疫科(彭金玲);天津中医药大学中医学院免疫教研室(边育红);天津市传染病医院制剂科(王丽);新探健康发展研究中心控烟项目办公室(李金奎)

作者简介:彭金玲(1968-),本科,主治医师。研究方向:流行病学。E-mail:chaihuogun0423@yahoo.com.cn

通讯作者:边育红(1968-),博士,硕士生导师,教授。研究方向:干细胞、表观遗传学。E-mail:bianyuhong_2012@163.com