

• 综述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.04.041

## 白色念珠菌生物膜相关基因研究进展\*

王汐文<sup>1</sup>, 王攀<sup>1</sup>, 顾艺林<sup>1</sup>, 唐希远<sup>1</sup>综述, 陈丽华<sup>2△</sup>审校

(1. 中南大学湘雅医学院 2016 级麻醉系, 长沙 410013; 2. 中南大学湘雅三医院检验科, 长沙 410013)

关键词: 白色念珠菌; 生物膜; 基因

中图分类号: Q93-3

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2019)04-0563-03

白色念珠菌又称白假丝酵母菌,是普遍存在于自然界,也可见于健康人的皮肤、黏膜表面的条件致病真菌。对免疫系统功能正常的个体,白色念珠菌通常是无害的,其与宿主体内的微生物群中的其他成员可以维持平衡。然而,近些年随着免疫抑制剂、抗菌药物等的使用,以及生物装置的体内留置,使白色念珠菌导致的口腔念珠菌病、念珠菌性阴道炎等真菌感染呈逐年上升的趋势。由于长期使用抗菌药物等因素造成的宿主菌群改变,另一种微生物感染或使用免疫抑制剂治疗所导致的宿主免疫功能的改变,或因 pH 值变化或营养成分的改变所引起的局部环境的变化等,均可能使白色念珠菌过度增殖,从而造成宿主感染。

白色念珠菌的所有毒力因子中,在导管、假体(非生物)和黏膜表面(生物)上形成生物膜的能力是其最重要的因素之一。生物膜是微生物黏附在组织表面时,由自身产生的胞外多聚基质包裹的、有特定功能和结构的菌细胞群体所形成的一种形态结构。生成生物膜是菌细胞在长期进化过程中为顺应外界环境压力而形成的一种生存方式。生物膜的存在,可以保护细菌或真菌,使其逃避抗菌药物的杀伤作用,从而造成慢性难治愈的感染;同时由于形成了生物膜的菌体在体内迁移扩散,导致炎症反复发作,成为临床诊疗的一大难题。虽然不同真菌生物膜的形成过程存在差别,但大体上可分成黏附、增殖以形成锚定细胞的基底层,假菌丝和菌丝伴随细胞外基质的产生和分散酵母形式的细胞以播种新的位点这几个过程。本文对与白色念珠菌生物膜形成相关的一些基因的研究进展综述如下。

### 1 凝集素样序列 3 基因(ALS3)

ALS3 属于 ALS 基因家族的一员。具有每个 ALS 都有的 3 个特点,包括 5' 端有长约 1 300 bp 的核苷酸;中间是长约 108 bp 的串联重复序列区;3' 端则是长度和顺序变化较大的核苷酸序列<sup>[1]</sup>。在 ALS 基因家族中,ALS3 在生物膜的形成中有最显著的作用,与野生型菌株相比,ALS3 缺失会导致严重的生物膜

缺陷。ALS3 属于黏附因子基因,其编码的 Als3p 属于 GP1 锚定蛋白,与菌细胞的黏附密切相关。有研究者对患有复发性外阴阴道念珠菌病的女性阴道分泌物中收集到的白色念珠菌分离物进行培养,一段时间后发现大部分菌株都表达 ALS3,且具有 ALS3 表达的分离株的黏附能力大于对照组<sup>[2]</sup>。此外,该基因编码的菌丝黏附素在菌丝数量增多后高度表达,使所测得的 ALS3 在生物膜生成的初始和中间阶段的表达高于生物膜生成的成熟阶段<sup>[3]</sup>。

### 2 菌丝胞壁蛋白基因 1(HWP1)

HWP1 为菌丝特异性基因,其编码的酸性甘露糖蛋白 HWP1P 属于 GP1 锚定蛋白,是菌丝发育和白色念珠菌黏附于上皮细胞所必需的<sup>[4]</sup>。HWP1 不仅可以介导白色念珠菌稳定地、不可逆地黏附于宿主细胞,还能促进分散存在的白色念珠菌形成微菌落,从而促进生物膜的生成。有研究发现,bCAT 能够抑制白色念珠菌生物膜生成,其原理可能是减少 HWP1 在白色念珠菌的表达从而影响其黏附能力<sup>[5]</sup>。NOB-ILE 等<sup>[6]</sup>进行了生物膜内细胞固定实验,结果表明,HWP1 野生株、重组株可以弥补 BCR1 突变株导致的生物膜缺陷,一定程度上能恢复 BCR1 突变株的黏附功能。此外,HWP1 与 ALS 黏附素家族在生物膜形成过程中具有明显的互补效应<sup>[7]</sup>。这些试验表明 HWP1 对生物膜形成起重要作用,而 HWP1 的缺失则会对白色念珠菌的毒力造成影响<sup>[8]</sup>。

### 3 SFP1

目前,大多数针对白色念珠菌生物膜相关基因的研究都与生物膜形成的激活有关,而 SFP1 却是少数在生物膜形成中起负调控作用的基因之一<sup>[9]</sup>。相比野生型菌株,SFP1 缺失的菌株细胞黏附和生物膜形成的功能增强。SFP1 通过改变细胞壁结构和组成,导致黏附相关细胞表面性质的变化。此外,SFP1 也可以抑制编码黏附素蛋白的 ALS1、ALS3 和 HWP1 的表达,并且这些基因的表达减少是 SFP1 通过抑制 BCR1 和 EFG1 而间接介导的。对这些激活和抑制生物膜形成基因的研究将使人们对生物膜形成背景下

\* 基金项目:中南大学研究性学习和创新实验计划资助项目(YC20180673)。

△ 通信作者,E-mail:39673368@qq.com。

负面和正面调节的、复杂的相互作用有更深入的了解。

#### 4 CaBGL2

白色念珠菌从不致病到致病会经历从酵母相到与其致病性相关的菌丝相的转变,其生物膜的形成过程也包括这种转变。CaBGL2 编码的 Bgl2 蛋白在白色念珠菌生物膜生成过程中对菌丝的生长起促进作用<sup>[10]</sup>。实验表明,与对照株相比,突变株会使菌丝的形成在生物膜生成的早期受到抑制。并且,缺失 CaBGL2 会导致编码转变为菌丝相所需的转录因子基因 CPH2 和 TEC1 的表达下降。

#### 5 ARC18

ARC18 对生物膜的黏附过程起调节作用。ARC18 的转录受到抑制时白色念珠菌会出现严重的黏附缺陷。ARC18 对生物膜形成的作用主要是通过编码 Arp2/3 复合物的成员来实现。Arp2/3 复合体参与调节肌动蛋白细胞骨架和内吞作用,其成分的耗尽不仅影响了黏附,还导致生物膜形成减少,细胞表面疏水性增加以及细胞壁几丁质和  $\beta$ -葡聚糖暴露增加。Arp2/3 复合物的功能降低会导致细胞壁完整性受损和 Rho1 介导的细胞壁应激反应的激活,从而导致细胞壁重塑和黏附能力的降低<sup>[11]</sup>。

#### 6 ERG3 与 ERG11

ERG3 与 ERG11 是白色念珠菌细胞膜成分——麦角甾醇合成途径中关键的编码基因,可干扰麦角甾醇的合成<sup>[12]</sup>。并且在以往的实验中已经证实,ERG11 的过表达产物会导致白色念珠菌对唑类药物产生耐药性,同时在国内外的研究中也发现了 ERG3 与唑类药物耐药性有所关联<sup>[13-14]</sup>。但是 ERG3/ERG11 在白色念珠菌生物膜形成中的作用一直未被阐明。在近期的实验中突破性地指出了 ERG3/ERG11 参与了白色念珠菌的黏附以及菌丝的形成这两个过程<sup>[15]</sup>。ERG3 $\Delta/\Delta$  和 ERG11 $\Delta/\Delta$  菌株仅可以形成无毒性的菌丝,并且与野生型相比,其黏附性也大大降低。提示 ERG3/ERG11 与黏附有关,具体作用途径仍有待进一步研究。

#### 7 表面抗原蛋白 2 基因(Csa2)

白色念珠菌的菌丝形态能够通过溶解红细胞,结合血红蛋白,提取血红素和内吞作用从血红蛋白和血红素蛋白中吸收铁,从而对宿主产生毒力作用<sup>[16-17]</sup>。因此,影响白色念珠菌毒力的一个关键因素是它在宿主体内从酵母相转变成菌丝相的能力。Csa2 是白色念珠菌 Rbt5 蛋白质家族和真菌细胞外膜(CFEM)蛋白质超家族中的成员。与附着于细胞壁和质膜的其他 CFEM 蛋白不同,小的分泌蛋白 Csa2 不具有糖基磷脂酰肌醇锚<sup>[18]</sup>,其具体作用是参与铁の利用和血红蛋白结合,并且在将血红蛋白呈递给其他血红素结合蛋白之前与血红蛋白结合<sup>[19]</sup>。Csa2 通过参与白色念珠菌菌丝生长过程中对铁的摄取而对宿主产生毒性

作用。

为研究 Csa2 对生物膜形成的作用,实验者构建了野生型、Csa2 突变体和互补型白色念珠菌菌株并对其生长、形态转变和生物膜的形成进行了比较。实验发现,敲除 Csa2 导致菌落变小同时变少,血清诱导条件下酵母相-菌丝相的形态转变显著减弱,以及生物膜的形成减少,而互补型菌株的上述指标可以恢复到野生型菌株水平。以上结果表明,Csa2 在血清诱导条件下参与了酵母菌对菌丝的形态转换,并且促成了白色念珠菌的生物膜形成<sup>[20]</sup>。

#### 8 EFG1

基因 EFG1 编码的增强菌丝生长蛋白是来自 APSES 家族的转录因子,也是目前研究最深入的多功能调节因子之一,它在生物膜形成过程中几种形态变化的转录回路中起着中心作用<sup>[21]</sup>。EFG1 与其他 5 种(BCR1、BRG1、Ndt80、Rob1 和 TEC1)调控基因共同控制下游约 1 000 个靶基因,可以正向调节菌丝的形成过程<sup>[22]</sup>,影响白色念珠菌在活体或非活体组织表面形成。同时,它也与调节细胞的形态转换有紧密联系。此外,生物膜态的白色念珠菌 EFG1 的表达水平显著增高,与游离态的白色念珠菌表达水平有明显差别。因此考虑 EFG1 有正向调控黏附因子、菌丝生成从而促进生物膜形成的作用<sup>[23]</sup>。也有研究发现,ALS1 在体外的表达完全依赖于 EFG1<sup>[24]</sup>,在近期的实验中进一步证实了这种猜测。在康涅狄格大学 XU 等<sup>[25]</sup>的实验中发现,ALS1 为 EFG1 的下游产物,即 EFG1 在生物膜生长后期诱导黏附素 ALS1 的促进白色念珠菌的聚集和黏附作用。

#### 9 小结与展望

综上所述,白色念珠菌生物膜的形成过程受到多种基因的共同调控。其中,大部分基因如:ALS3、HWP1 对生物膜形成过程中的几个关键步骤(黏附、菌丝的形成、基质的产生、生物膜的成熟及细胞分散)起正向调控作用,小部分基因如 SFP1 起负调控作用。除此之外,1 个基因可能同时对多个过程起不同的调控效应或对同一过程采取不同的调控途径,而多个基因也可彼此互补、对同一途径进行调控,并且 1 个基因也可能对另 1 个基因的表达起诱导作用。

从目前研究看来,生物膜形成初期的黏附过程是整个生物膜形成的历程中起始的、决定性的步骤之一。并且,迄今为止对生物膜相关基因的研究也主要着眼于黏附和菌丝形成这 2 个过程。未来研究的抗白色念珠菌药物可以以这两个过程的相关基因为主要作用靶点;与白色念珠菌生物膜形成相关的经典基因,如 ALS 基因家族、HWP1、EFG1 等,其作用机制已较为清楚,目前的研究主要是针对基因靶向治疗。此外,近期发现的一些基因,如 SFP1、Csa2 也对白色念珠菌生物膜形成起着一定的调节作用,但目前国内外对这部分基因的作用机制研究较少。另外,结合目

前研究成果来看,在不同的外界因素刺激下,传导通路的作用机制可能并不一致,故还需在体内实验中继续进行深入研究,为临床治疗白色念珠菌导致的感染带来新的、切实有效的办法。

### 参考文献

[1] HOYER L L, HECHT J E. Identification of candida albicans ALS2 and ALS4 and localization of als proteins to the fungal cell surface[J]. J Bacteriol, 1998, 180(20): 5334-5343.

[2] ROUDBARMOHAMMADI S, ROUDBARY M, BAKHSHI B, et al. ALS1 and ALS3 gene expression and biofilm formation in Candida albicans isolated from vulvovaginal candidiasis[J]. Adv Biomed Res, 2016, 5(1): 105-109.

[3] DE BARROS P P, ROSSONI R D, DE CAMARGO RIBEIRO F. Temporal profile of biofilm formation, gene expression and virulence analysis in candida albicans strains [J]. Mycopathologia, 2017, 182(3/4): 285-295.

[4] ORSI C F, BORGHI E, COLOMBARI B, et al. Impact of candida albicans hyphal wall protein 1 (HWP1) genotype on biofilm production and fungal susceptibility to microglial cells[J]. Microb Pathog, 2014, 70(4): 20-27.

[5] 许珊. 多肽 bCAT 通过下调白色念珠菌 HWP1 基因表达抑制生物膜的形成机制[J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(4): 387-392.

[6] NOBILE C J, NETT J E, ANDES D R, et al. Function of candida albicans adhesin Hwp1 in biofilm formation[J]. Eukaryot Cell, 2006, 5(10): 1604-1610.

[7] DESAI J V, MITCHELL A P. Candida albicans biofilm development and its genetic control[J]. Microbiol Spectr, 2015, 3(3): 78-85.

[8] FREIRE F, DE BARROS P P, PEREIRA C A, et al. Photodynamic inactivation in the expression of the Candida albicans genes ALS3, HWP1, BCR1, TEC1, CPH1, and EFG1 in biofilms[J]. Lasers Med Sci, 2018, 33(7): 1447-1454.

[9] CHEN H F, LAN C Y. Role of SFP1 in the regulation of candida albicans biofilm formation[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0129903.

[10] CHEN X Y, ZHANG R Y, TAKADA A, et al. The role of Bgl2p in the transition to filamentous cells during biofilm formation by Candida albicans[J]. Mycoses, 2017, 60(2): 96-103.

[11] LEE J A, ROBBINS N, XIE J L, et al. Functional genomic analysis of candida albicans adherence reveals a key role for the Arp2/3 complex in cell wall remodelling and biofilm formation[J]. PLoS Genet, 2016, 12(11): e1006452.

[12] VINCENT B M, LANCASTER A K, SCHERZ-SHOVAL R, et al. Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to amphotericin B[J]. PLoS Biol, 2013, 11(10): e1001692.

[13] 乔祖莎. 念珠菌 ERG3 基因突变对抗真菌药物耐药的作用[D]. 太原:山西医科大学, 2012.

[14] 祝欣. VVC 患者临床分离白色念珠菌 ERG3、Efg1 与唑类药物耐药关系的研究[D]. 太原:山西医科大学, 2017.

[15] ZHOU Y J, LIAO M, ZHU C G, et al. ERG3 and ERG11 genes are critical for the pathogenesis of Candida albicans during the oral mucosal infection[J]. Int J Oral Sci, 2018, 10(2): 9-15.

[16] MANNS J M, BUCKLEY H R. Production of a hemolytic factor by Candida albicans[J]. Infect Imm, 1994, 62(11): 5154-5156.

[17] WEISSMAN Z, KORNITZER D. A family of Candida cell surface haem-binding proteins involved in haemin and haemoglobin-iron utilization[J]. Mol Microbiol, 2004, 53(4): 1209-1220.

[18] SOSINSKA G J, DE GROOT P W, DE MATTOS M, et al. Hypoxic conditions and Iron restriction affect the cell-wall proteome of Candida albicans grown under vaginasimulative conditions[J]. Microbiol Sgm, 2008, 154(2): 510-520.

[19] OKAMOTO-SHIBAYAMA K, KIKUCHI Y, KOKUBU E A, et al. Csa2, a member of the Rbt5 protein family, is involved in the utilization of Iron from human hemoglobin during Candida albicans hyphal growth[J]. FEMS Yeast Res, 2014, 14(4): 674-677.

[20] OKAMOTO-SHIBAYAMA K, KIKUCHI Y, KOKUBU E. Possible involvement of surface antigen protein 2 in the morphological transition and biofilm formation of candida albicans[J]. Med Mycol J, 2017, 58(4): E139-E143.

[21] MANCERA E, PORMAN A M, CUOMO C A, et al. Finding a missing gene, EFG1 regulates morphogenesis in candida tropicalis [J]. G3 (Bethesda), 2015, 5(5): 849-856.

[22] DESAI P R, LENGELER K, KAPITAN M, et al. The 5 untranslated region of the EFG1 transcript promotes its translation to regulate hyphal morphogenesis in candida albicans[J]. mSphere, 2018, 3(4): e00280-e00218.

[23] UPPULURI P, DINAKARAN H, THOMAS D P, et al. Characteristics of candida albicans biofilms grown in a synthetic urine medium [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(12): 4078-4083.

[24] LASSAK T, SCHNEIDER E, BUSSMANN M, et al. Target specificity of the Candida albicans Efg1 regulator[J]. Mol Microbiol, 2011, 82(3): 602-618.

[25] XU H B, SOBUE T, BERTOLINI M, et al. S. oralis activates the Efg1 filamentation pathway in C. albicans to promote cross-kingdom interactions and mucosal biofilms [J]. Virulence, 2017, 8(8): 1602-1617.