

Rli1 基因参与酵母氟康唑耐药机制的初步研究^{*}

赵 炜^{1,2}, 牛宇杰^{1,2}, 郑华珍^{1,2}, 刘新光^{1,2,3△} (1 广东医学院衰老研究所, 广东东莞 523808; 2. 广东省医学分子诊断重点实验室, 广东东莞 523808; 3. 广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 广东湛江 524023)

【摘要】 目的 初步研究 Rli1 基因缺失酵母菌株对氟康唑耐药的机制。**方法** 利用基因重组原理, 构建 Rli1 基因杂合缺失酵母菌株, 检测其对抗真菌药物氟康唑的耐药性, 以及其复制寿命。**结果** 相对于野生酵母菌株, Rli1 基因杂合缺失酵母菌株对氟康唑具有明显的耐药性, 但是其复制寿命无明显变化。**结论** Rli1 基因很可能参与了酵母氟康唑耐药机制的调控。

【关键词】 Rli1; 酵母; 氟康唑; 耐药

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2014. 16. 002 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)16-2196-03

Role of *Saccharomyces cerevisiae* Rli1 in fluconazole resistance^{*} ZHAO Wei^{1,2}, NIU Yu-jie^{1,2}, ZHENG Hua-zhen^{1,2}, LIU Xin-guang^{1,2,3△} (1. Institute of Aging Research, Guangdong Medical College, 2. Key Laboratory for Medical Molecular Diagnostics of Guangdong Province, Dongguan, Guangdong 523808, China; 3. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524023, China)

【Abstract】 Objective To study the role of *Saccharomyces cerevisiae* Rli1 in fluconazole-resistant. **Methods** To make Rli1 deficiency heterozygote yeast's by gene recombination, analyze the strain replicative lifespan and the resistant ability to fluconazole, an antifungal agent. **Results** Rli1 deficiency strain is resistant to fluconazole, but the lifespan has no significant difference compared with the wild type strain. **Conclusion** Rli1 may be involved in the yeast resistant ability to fluconazole.

【Key words】 Rli1; *Saccharomyces cerevisiae*; fluconazole; resistant

酿酒酵母是研究基因功能的经典模式生物, 被广泛应用于药物筛选、工业生产、环保以及科学研究领域^[1]。酿酒酵母 Rli1 是一种位于细胞质中的铁硫蛋白, 同时参与线粒体和细胞质铁硫簇的组装。Rli1 蛋白的 C 端含有两个 ATP-binding cassette(ABC)结构域, 可以与细胞质核糖体 Hcr1 蛋白(参与 rRNA 的组装加工和翻译起始)结合。Rli1 基因敲除会影响核糖体大小亚基的出核, 因此导致蛋白质翻译过程的滞留^[2]。

酵母 Rli1 与人类 RNase L inhibitor(RLI)具有 68% 的同源性, RLI 在干扰素处理的细胞系中参与调控线粒体 mRNA 的稳定性^[3-4]。有研究报道, 在体外实验中 RLI 可以与 HIV-1 病毒蛋白结合, 调控病毒衣壳在体外的组装^[5]。Rli1 基因对酿酒酵母来说是必需基因, 因此本研究利用二倍体酿酒酵母为研究对象, 通过基因重组原理构建 Rli1 基因杂合缺失酵母菌株, 研究 Rli1 基因缺失酵母对氟康唑耐药的机制。

1 材料与方法

1.1 菌株、载体和主要试剂 野生型二倍体酵母菌株 BY4743、载体 pRS306 由美国华盛顿大学 Matt Kaeberlein 博士赠送。La tap 酶(货号 RR02MA)购自 Takara; 微生物活性检测试剂盒-WST(货号 M439)购自 DOJINDO; 引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成; 其他常规试剂为本实验保存。

1.2 引物 Rli1-URA-F: 5'-GCC TTC TGC AAA AGT TCT TAA GAA AAC ACG ACA GAC CAT AAG ATT GTA CTG AGA GTG CAC-3'。Rli1-URA-R: 5'-TAA AAC AAT CGT CCT CTT GGT TCT CCG AAT CCC AAG ATG CCT GTG CGG TAT TTC ACA CCG-3'。Rli1-F: 5'-TCA TTA GCA

TCC TAC CCT TCA CAT A-3'。Rli1-R: 5'-ACA TCA AAA GGC CTC TAG GTT CC-3'。

1.3 方法

1.3.1 Rli1 基因破坏元件的扩增 以质粒 pRS306 作为 PCR 模板, Rli1-URA-F(此引物 5' 端前 40 个碱基与基因组中 Rli1 基因起始密码子上游 40 个碱基配对, 后 20 个碱基与 URA3 破坏元件上游碱基配对)、Rli1-URA-R(此引物 5' 端前 40 个碱基与基因组中 Rli1 基因终止密码子下游 40 个碱基配对, 后 20 个碱基与 URA3 破坏元件下游碱基配对)为引物, 扩增两端带有 Rli1 基因同源臂的 URA3 破坏元件, 全长为 1 232 bp。Rli1 基因组序列详见 NCBI(NC_001136.10), 含有 URA3 破坏元件的质粒 pRS306 序列详见 NCBI(U03438.1)。Taq 酶采用的是 La tap, 反应体系按照试剂说明书进行, PCR 反应条件为 94 ℃ 1 min; 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 33 个循环; 72 ℃ 5 min。

1.3.2 Rli1 基因缺失酵母菌株的构建 将 Rli1 基因破坏元件转化进野生型酵母 BY4743, 通过基因重组原理替换掉野生型酵母基因组上的 Rli1 基因(Rli1 基因纯合缺失的菌株无法存活, 仅有杂合缺失的菌株可以存活)。酵母感受态的制备和转化方法参考分子克隆进行。阳性克隆在液体 URA 缺陷型培养基中培养过夜, 提取基因组后通过 PCR 鉴定, 鉴定引物为 Rli1-F、Rli1-R(这对引物可以将野生型酵母菌株和 Rli1 杂合缺失酵母菌株区分), Taq 酶采用的是 La tap, 反应体系按照试剂说明书进行, PCR 反应条件为 94 ℃ 1 min; 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 35 个循环; 72 ℃ 5 min。野生型对照无 DNA 条带扩增, Rli1 基因缺失菌株的 PCR 产物大小为

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31101051)。

作者简介: 赵炜, 男, 博士, 助理研究员, 主要从事细胞增殖与衰老的分子机制。△ 通讯作者, E-mail: xgliu64@126.com。

1 034 bp。

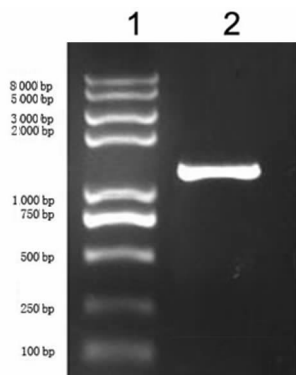
1.3.3 Rli1 基因缺失酵母菌株对氟康唑的敏感性检测 取等量 A_{600} 值的野生型菌株和 Rli1 基因缺失酵母菌株,用无菌水倍比稀释之后,分别取 5 μ L 滴在 YPD 固体培养板和含 100 μ mol/L 氟康唑的 YPD 固体培养板上,然后置于 30 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养至克隆形成。取等量 A_{600} 值为 0.1 的野生型酵母菌株野生型菌株和 Rli1 基因缺失酵母菌株,每个菌株重复三孔,培养基中含有 100 μ mol/L 氟康唑,同时置于 30 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中振荡培养 4 h;然后加入 WST 染色液,继续培养恒温培养,每间隔 2 h 用酶标仪测定标本在 450 nm 处的吸光度 A_{450} 值(操作方法按照微生物活性检测试剂盒-WST 的说明书进行)。

1.3.4 Rli1 基因缺失酵母菌株复制寿命的检测 酵母复制寿命的检测方法按照 Matt Kaeberlein 的方法进行^[6],在显微镜下分离、统计酵母母细胞产生子细胞的个数。

1.4 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,酵母复制寿命结果数据采用 Wilcoxon 秩和检验方法进行统计学分析;酵母生长代谢活性结果数据采用 two-way ANOVA 进行统计学分析。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

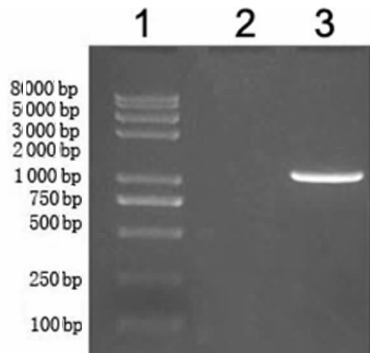
2.1 Rli1 基因破坏元件的扩增结果 Rli1 基因破坏元件全长为 1 232 bp,PCR 扩增产物大小经过琼脂糖凝胶电泳确认正确(图 1)。



注:第 1 泳道为 Marker,第 2 泳道为 PCR 产物。

图 1 Rli1 基因破坏元件的扩增结果

2.2 Rli1 基因缺失酵母菌株的鉴定 Rli1 基因被 URA3 替换之后,利用鉴定引物可以将野生型菌株(无 DNA 产物)和 Rli1 基因缺失酵母菌株(1 034 bp)区分(图 2)。



注:第 1 泳道为 Marker,第 2 泳道为野生型酵母基因组 PCR 产物,第 3 泳道为 Rli1 基因缺失菌株的 PCR 产物。

图 2 Rli1 基因缺失酵母菌株的鉴定

2.3 Rli1 基因缺失菌株对氟康唑的敏感性检测 图 3 显示, Rli1 基因缺失酵母菌株在氟康唑培养板上的克隆形成能力高于野生型菌株。图 4 显示 Rli1 基因缺失酵母菌株在氟康唑培

养基中的代谢活性明显高于野生型菌株,间接反映出 Rli1 基因缺失酵母菌株对氟康唑的耐药性高于野生型菌株。

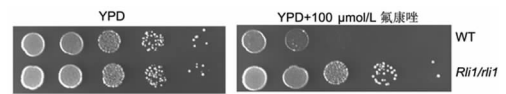


图 3 酵母菌株在氟康唑培养板上的克隆形成能力

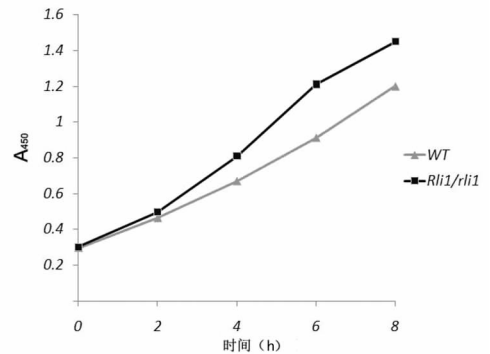
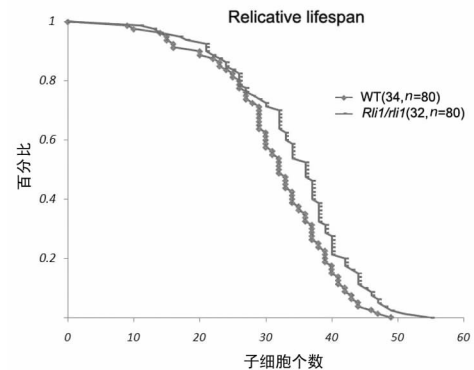


图 4 酵母菌株在氟康唑培养基中的代谢活性



注:横坐标为母细胞产生的子细胞个数。纵坐标为产生相同数目子细胞的母细胞占总检测母细胞的比例。

图 5 酵母菌株复制寿命的检测

2.4 Rli1 基因缺失菌株复制寿命的测定 本研究同时检测了野生型酵母菌株 BY4743 和 Rli1 基因缺失酵母菌株的复制寿命(图 5),结果显示:两者平均寿命分别是 34 代和 32 代($n=80$ 表示母细胞个数),两者之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨 论

氟康唑是氟代三唑类药物,是目前治疗念珠菌感染的首选药物。但由于长期、反复的应用,加上抗菌药物、激素的滥用,导致了氟康唑耐药菌株的出现。大约 15.5% 的白色念珠菌(属于假丝酵母菌,和酿酒酵母之间存在高度的同源性)对氟康唑耐药,艾滋病患者口咽部感染的白色念珠菌 33% 以上是耐药株。

目前发现白色念珠菌对氟康唑的耐药机制主要有如下几点:编码 14- α 去甲基化酶(氟康唑的靶酶)的 ERG11 基因的突变和过度表达^[7-8];外排泵基因念珠菌耐药基因 1(CDR1)、念珠菌耐药基因 2(CDR2)和多药耐药基因 1(MDR1)基因的过度表达^[9-10];热休克蛋白(Hsp)90 的高表达^[11];白色念珠菌生物膜的形成和细胞外磷脂酶活性的增加与氟康唑耐药也存在一定相关性^[12]。最近报道耐唑类药物白色念珠菌中 MXR J 基因表达高度上调^[13]。虽然目前对白色念珠菌对唑类药物的耐药机制有了一定的了解,但是仍未有效解决这一临床用药上的难题^[14]。

由于酿酒酵母属于非致病性真菌,再加上其清晰的遗传背

景,被广泛地被运用于人类疾病研究和药物筛选。鉴于酿酒酵母与白色念珠菌的同源性,本研究构建酵母 Rli1 基因杂合缺失酵母菌株,通过克隆形成实验,发现 Rli1 基因杂合缺失酵母菌株对氟康唑表现出明显的抗药性(图 3)。同时,Rli1 基因杂合缺失酵母菌株在含有氟康唑的培养基中的生物代谢活性明显高于野生型菌株(图 4)。表明 Rli1 基因的 Knockdown 很可能激活了酵母对氟康唑的耐药机制。

进一步对复制寿命(表示单个酵母细胞在死亡之前出芽的总数)的研究发现,Rli1 基因杂合缺失酵母菌株的复制寿命相对于野生型菌株并没有增加(图 5),表明菌株耐药性的增加与酵母本身出芽的能力无关。

综上所述,本研究通过 Rli1 基因杂合缺失的二倍体酵母菌株,发现 Rli1 基因的低表达会导致酵母菌株对氟康唑耐药性的增加,这对于深入研究氟康唑杀灭真菌的作用机制、酵母样真菌的耐药机制以及 Rli1 基因的功能提供了有益线索。

参考文献

- [1] Schmitt MJ, Breinig F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application[J]. FEMS Microbiol Rev, 2002, 26(3): 257-276.
- [2] Kispaal G, Sipos K, Lange H, et al. Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria[J]. EMBO J, 2005, 24(3): 589-598.
- [3] Le Roy F, Bisbal C, Silhol M, et al. The 2-5A/RNase L/RNase L inhibitor (RLI) [correction of (RNI)] pathway regulates mitochondrial mRNAs stability in interferon alpha-treated H9 cells[J]. J Biol Chem, 2001, 276(51): 48473-48482.
- [4] Laxman S, Tu B. The essential ATP-binding cassette protein RLI1 functions in translation by promoting preinitiation complex assembly[J]. J Biol Chem, 2004, 279(40): 42157-42168.

- [5] Zimmerman C, Klein KC, Kiser PK, et al. Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids[J]. Nature, 2002, 415(6867): 88-92.
- [6] Steffen KK, Kennedy BK, Kaeberlein M. Measuring replicative Life span in the budding yeast[J]. J Vis Exp, 2009(28): 1209.
- [7] Ribeiro MA, Paula CR. Up-regulation of ERG11 gene among fluconazole-resistant *Candida albicans* generated in vitro; is there any clinical implication? [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2007, 57(1): 71-75.
- [8] Heilmann CJ, Schneider S, Barker KS, et al. An a643T mutation in the transcription factor Upc2p causes constitutive ERG11 upregulation and increased fluconazole resistance in *Candida albicans*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(1): 353-359.
- [9] Feng LJ, Wan Z, Wang XH, et al. Relationship between antifungal resistance of fluconazole resistant *Candida albicans* and mutations in ERG11 gene[J]. Chin Med J, 2010, 123(5): 544-548.
- [10] Niimi M, Niimi K, Takano Y, et al. Regulated overexpression of CDR1 in *Candida albicans* confers multidrug resistance[J]. J Antimicrob Chemother, 2004, 54(6): 999-1006.
- [11] 许辉, 李若瑜, 刘伟. 真菌耐药性产生的新机制: 热休克蛋白 90 的作用[J]. 中国真菌学杂志, 2009, 4(1): 55-58.
- [12] López-Ribot JL. *Candida albicans* biofilms: more than filamentation[J]. Curr Biol, 2005, 15(12): 453-455.
- [13] 谭宏月, 李平, 胡婵, 等. 白念珠菌新型耐药基因 MXR1 的敲除与鉴定[J]. 中国真菌学杂志, 2013, 8(2): 69-73.
- [14] 索桂英, 付萍. 白念珠菌氟康唑耐药机制的研究进展[J]. 皮肤病与性病, 2013, 35(2): 90-91.

(收稿日期: 2013-12-23 修回日期: 2014-02-28)

(上接第 2195 页)

- al. Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes[J]. Cell, 2000, 102(3): 315-323.
- [2] Chen Y, Ruan XZ, Li Q, et al. Inflammatory cytokines disrupt LDL-receptor feedback regulation and cause statin resistance; a comparative study in human hepatic cells and mesangial cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2007, 293(3): F680-F687.
- [3] Ma KL, Ruan XZ, Powis SH, et al. Inflammatory stress exacerbates lipid accumulation in hepatic cells and fatty livers of apolipoprotein E knockout mice[J]. Hepatology, 2008, 48(3): 770-781.
- [4] Ruan XZ, Moorhead JF, Varghese Z. Lipid redistribution in renal dysfunction[J]. Kidney Int, 2008, 74(4): 407-409.
- [5] Chen YX, Ruan XZ, Huang AL, et al. Mechanisms of dysregulation of low-density lipoprotein receptor expression in HepG2 cells induced by inflammatory cytokines[J].

Chin Med J (Engl), 2007, 120(24): 2185-2190.

- [6] Zhao L, Chen Y, Tang R, et al. Inflammatory stress exacerbates hepatic cholesterol accumulation via increasing cholesterol uptake and de novo synthesis[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2011, 26(5): 875-883.
- [7] Xu ZE, Chen Y, Huang A, et al. Inflammatory stress exacerbates lipid-mediated renal injury in ApoE/CD36/SRA triple knockout mice[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2011, 301(4): 713-722.
- [8] Qiang Ye, Han Lei, Zhongcai Fan, et al. Difference in LDL receptor feedback regulation in macrophages and vascular smooth muscle cells: foam cell transformation under inflammatory stress[J]. Inflammation, 2014, 37(2): 555-565.
- [9] Rosenfeld ME, Ross R. Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits[J]. Arteriosclerosis, 1990, 10(5): 680-687.

(收稿日期: 2014-01-16 修回日期: 2014-04-20)