

• 综 述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.06.036

隐球菌耐药机制研究进展

祁 傲¹, 胡慧敏²综述, 陈世平^{3△} 审校

1. 中国药科大学综合门诊部, 江苏南京 210000; 2. 南京医科大学第二附属医院微生物室, 江苏南京 210000; 3. 南京医科大学第二附属医院呼吸与危重症医学科, 江苏南京 210000

关键词: 隐球菌; 耐药机制; 真菌

中图法分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2022)06-0845-03

隐球菌是担子菌酵母类真菌, 广泛分布于自然界, 在鸽粪中大量存在, 也可存在于人体表面、口腔和肠道中。隐球菌属包括 17 个种和 8 个变种, 其中对人致病最主要的是新型隐球菌及其变种^[1]。隐球菌病是由新型隐球菌引起的深部真菌病, 主要侵犯中枢神经系统和肺, 常发生于恶性肿瘤、白血病、淋巴瘤或应用大剂量糖皮质激素或化疗等免疫功能低下的患者^[2]。2015 年, FANG 等^[3]报道了我国免疫功能正常人群发生隐球菌感染的病例。隐球菌的毒力因子包括荚膜、黑色素、脲酶、磷脂酶、降解酶等。常见抗新型隐球菌感染的药物包括多烯类、唑类、核酸抑制剂类。近年来, 隐球菌耐药问题日渐突出, 成为其感染治疗失败的一个重要原因。氟康唑治疗过程中出现耐药可能与药物剂量不达标或治疗缺乏依从性有关^[4]。临床上耐药菌株的产生通常是多种因素共同作用的结果^[5]。本文对隐球菌耐药机制综述如下。

1 隐球菌的耐药机制

1.1 生物膜的形成 生物膜是菌体适应外部环境、抵抗外界伤害所做出的反应, 它是一种由融合的芽生孢子层、菌丝成分和细胞外多聚基质组成的二维结构^[6]。形成生物膜的能力是新型隐球菌抗性的表现, 膜内菌对药物、高温、寒冷、紫外线等更具抵抗性, 生物膜形成可导致患者出现临床耐药并反复感染^[6]。通常, 新型隐球菌可在各种组织上形成生物膜并将自身包裹, 阻止或延缓抗真菌药物进入细胞内, 这些组织可以是活组织, 也可以是无活力组织。细胞外多聚基质形成的生物屏障是菌株出现多重耐药的主要原因。有研究证实, 有生物膜的菌株比浮游菌株对各种抗真菌药物有不同程度的抗药性, 尤其是对唑类具有完全抗药性^[7-8]。生物膜除了作为生物屏障防止药物进入菌体外, 还可以通过限制营养的方式减缓菌体生长, 从而避免因菌体活性过高被药物杀伤^[9]。ROBERTSON 等^[10]研究表明, 细胞外基质分泌的乙二胺四乙酸能阻止生物膜形成, 这种阻止可以在加入二价

阳离子(如镁、钙)后逆转, 提示缺乏二价阳离子可抑制生物膜形成。这一发现可能成为隐球菌耐药病例治疗新的突破口。

1.2 麦角固醇合成酶基因(ERG11)改变 麦角固醇由真菌合成, 是真菌细胞膜的主要组分, 也是唑类抗真菌药物的作用靶点。14- α -去甲氧基酶是合成麦角固醇的关键酶, 该酶由 ERG11 编码。唑类药物通过黏附作用限制 14- α -去甲氧基酶的活性, 影响细胞膜形成而发挥抗真菌作用。ERG11 改变包括基因高表达和基因突变, 高表达意味着合成更多的 14- α -去甲氧基酶, 且需要更高的药物浓度来抑制该酶; 基因突变导致药物对该酶的亲和力降低^[11-12], 从而使耐药性增加。有学者通过分析某些耐药菌株 ERG11 的基因序列, 发现一位点上甘氨酸 484 被丝氨酸替代, 此为氟康唑耐药的突变位点, 与氟康唑最低抑菌浓度提高密切相关^[13]。

1.3 药物外排增加 药物外排增加使细胞内药物浓度减少, 从而产生对抗真菌药物的耐药性。药物外排增加可由菌株内多药物转运蛋白上调来实现。多药物转运蛋白包括 ABC 超家族转运蛋白和 MFS 超家族转运蛋白, 前者在新型隐球菌中发挥主要作用。ABC 转运蛋白有三大家族参与药物外排, 分别是多药耐药家族、多药耐药相关蛋白家族、多效性耐药家族^[14]。新型隐球菌中 ABC 转运蛋白由抗真菌药物耐药基因 1 (AFR1) 编码, 在耐唑类药物菌株中呈高表达^[14], 提示 AFR1 上调与新型隐球菌的唑类抗性密切相关。有研究发现, ABC 转运蛋白对两性霉素 B、5-氟胞嘧啶、棘白菌素的灵敏度无明显作用^[15]。

1.4 基因组的可塑性 染色体重排、异染色体形成、非整倍体或二倍体形成均是基因组可塑性的体现, 可以影响药物作用靶点或外排泵的表达, 从而产生耐药。新型隐球菌分为 A、B、C、D 和 AD 5 个血清型^[16], SIONOV 等^[17]在血清型 A 和 D 的菌株中发现了染色体二倍体, 这是新型隐球菌为了适应氟康唑而

△ 通信作者, E-mail: qiao1844@163.com。

本文引用格式: 祁傲, 胡慧敏, 陈世平. 隐球菌耐药机制研究进展[J]. 检验医学与临床, 2022, 19(6): 845-847.

形成的。染色体二倍体数量越多,菌株耐受氟康唑的浓度越高,一旦停止用药后,二倍体数量减少,可使原本耐药菌株重新回到敏感水平。抗真菌药物可通过隐球菌凋亡诱导因子(AIF)诱发新型隐球菌类似细胞凋亡的细胞死亡,新型隐球菌可通过下调 AIF 表达而减少细胞凋亡。有研究发现,剔除 AIF 可促进染色体多倍体形成,从而对氟康唑产生耐药^[18-19]。新型隐球菌耐药主要体现在 1 号染色体上,1 号染色体的重塑与 ERG11 和 AFR1 2 个基因关系甚密,这种适应机制最终导致氟康唑治疗隐球菌病失败或者在维持治疗过程中复发。

1.5 异质性耐药 异质性耐药的特点是在敏感菌株的单个菌落内出现高耐药水平的较小亚群,是真菌耐药的一种特殊类型。MONDON 等^[20]报道了新型隐球菌对氟康唑的异质性耐药现象,新型隐球菌对唑类的异质性耐药广泛存在,这种耐药是固有的,且与菌株的毒力有关,但耐药水平与其毒力水平不一定呈正相关^[7]。新型隐球菌异质性耐药的出现通常与患者长期应用某种药物有关。药物长期作用导致新型隐球菌的染色体发生变异,从而引起其表型变化,体现在隐球菌生长模式、形态和毒力等方面,这可能是隐球菌病在治疗过程中即使抗真菌药物没有停用,疾病也会加重或复发的原因。当药物压力作用消失,这种耐药性也会随之消失,菌株可以恢复到原来的敏感水平^[21]。有研究表明,异质性耐药主要出现在唑类单药治疗过程中,联合治疗可有效避免异质性耐药产生,如氟康唑联合 5-氟胞嘧啶治疗可有效抑制体内耐药亚群扩增^[22-23],研究其异质性耐药水平有助于在长期维持治疗过程中合理使用氟康唑。

1.6 真菌耐药性的表观遗传机制 表观遗传不是通过改变 DNA 序列或蛋白质编码,而是由 DNA 序列修饰以外的因素介导目标基因的表达^[24],这一作用是瞬间影响,主要有基于 RNA 和基于染色质修饰两种机制,与隐球菌密切相关的为基于染色质修饰。染色质修饰主要有两种:结构修饰和化学修饰。结构修饰指 DNA-DNA 相互作用和染色质重塑,化学修饰指烷基化、磷酸化、泛素化等。目前已知新型隐球菌中 HDAC 基因参与了染色质的去乙酰化过程,它被证实是可以调节菌株毒力和适应外界压力所需的基因^[24],一旦该基因缺失,将导致菌株毒力下降及对外界压力敏感^[25]。

1.7 应激反应通路的调节 微生物具有对抗外界各种压力刺激的能力,其中抗菌药物就是重要的外界压力刺激,这种能力通过复杂的应激反应通路实现。分子伴侣蛋白热休克蛋白 90(HSP90)能维持各种酶的稳定性,是真菌对抗真菌药物应激反应通路中必不可

少的关键蛋白,它通过钙调神经磷酸酶控制应激反应,包括耐药性。有研究显示,HSP90 可以增加新型隐球菌对唑类和棘白菌素的抗性,抑制其表达能有效降低新型隐球菌的耐药性^[26]。

1.8 其他耐药基因的表达

1.8.1 同源基因(PKH) 新型隐球菌 PKH 在其生物活动及隐球菌病发病机制信号传导中发挥重要作用。PKH 又称磷酸肌醇激酶 1,有 PKH1、PKH2、PKH3 3 种,PKH1 和 PKH2 主要参与调节细胞生命功能,包括细胞 RNA 的新陈代谢、维持细胞壁的完整性及鞘脂生物合成等;PKH3 主要参与新型隐球菌的抗性形成,包括其毒力、氧化应激及抗真菌药物^[27],尤其是对氟康唑和两性霉素 B 的耐药。此外,PKH2 还与新型隐球菌抑制肿瘤坏死因子及产生氧自由基有关。总之,PKH 参与调节了新型隐球菌的抗性。

1.8.2 Kar2 Kar2 是未折叠蛋白反应(UPR)通路下游重要的分子伴侣,参与 UPR 信号通路调控内质网蛋白质的各种活动。JUNG 等^[28]研究发现,缺乏 Kar2 的新型隐球菌因不能耐受应激、高热、抗真菌药物等外界压力而易出现死亡;相反,Kar2 超表达则可有效解决错误蛋白质折叠,使毒性蛋白降解,维持细胞生存。由此可见,Kar2 基因与新型隐球菌的适应性和抗性形成密不可分,在其生长过程中不可或缺。

2 小 结

隐球菌的耐药机制十分复杂,可以是一种也可以是多种机制并存。井然等^[29]研究显示,我国目前新型隐球菌对伏立康唑全部敏感,但从 2013 开始就分离出了对氟康唑耐药的新型隐球菌菌株,且至今其耐药率逐年缓慢增加,由此提示全面认识隐球菌的耐药机制已刻不容缓。随着科学技术的发展及研究的进一步深入,将会有新的耐药机制被发现,了解这些耐药机制可以帮助临床医生从分子生物学角度更好地识别隐球菌,从而选择有效的抗真菌药物造福广大患者。

参考文献

- [1] 陈东科,孙长贵,魏莲花,等.实用临床微生物学检验与图谱[M].北京:人民卫生出版社,2011:594.
- [2] 蔡柏蓓,李龙芸,白春学,等.协和呼吸病学[M].2 版.北京:中国协和医科大学出版社,2011:932.
- [3] FANG W,FA Z,LIAO W. Epidemiology of Cryptococcus and Cryptococcosis in China[J]. Fungal Genet Biol,2015,78(1):7-15.
- [4] 苏玉莹,赵建平,王坚苗.氟康唑体外不敏感隐球菌感染 1 例并耐药相关研究现状[J].内科急危重症杂志,2019,25(3):249-252.
- [5] ROBBINS N,CAPLAN T,COWEN L E. Molecular evo-

- lution of antifungal drug resistance[J]. *Annu Rev Microbiol*, 2017, 71(1): 753-775.
- [6] 魏建全, 钱军, 苏秦柳晔, 等. 细菌生物膜引起致病菌耐药机制及抗菌肽 LL-37 对生物膜作用的研究进展[J]. *河西学院学报*, 2020, 36(5): 38-43.
- [7] FELIX B, RITA O, SARA G, et al. A systematic review of fluconazole resistance in clinical isolates of *Cryptococcus* species[J]. *Mycoses*, 2018, 61(5): 290-297.
- [8] 李晨, 陈杏春, 张小团. 国内三家医院 33 例临床隐球菌病病原菌分离、药敏试验和临床分析[J]. *现代检验医学杂志*, 2020, 35(4): 113-115.
- [9] TOBUDIC S, KRATZER C, LASSNIGG A, et al. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilm[J]. *Mycoses*, 2012, 55(3): 199-204.
- [10] ROBERTSON E J, WOLF J M, CASADEVALL A. EDTA inhibits biofilm formation, extracellular vesicular secretion, and shedding of the capsular polysaccharide glucuronoxylomannan by *Cryptococcus neoformans*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(22): 7977-7984.
- [11] GAST C E, BASSOJR L R, BRUZUAL L, et al. Azole resistance in *Cryptococcus gattii* from the pacific north-west: investigation of the role of ERG11[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(11): 5478-5485.
- [12] XIANG M J, LIU J Y, NI P H, et al. Erg 11 mutations associated with azole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*[J]. *FEMS Yeast Res*, 2013, 13(4): 386-393.
- [13] BOSCO-BORGEAT M E, MAZZA M, TAVERNA C G, et al. Amino acid substitution in *Cryptococcus neoformans* lanosterol 14- α -demethylase involved in fluconazole resistance in clinical isolates[J]. *Rev Argent Microbiol*, 2016, 48(2): 137-142.
- [14] BASSOJR L R, GAST C E, BRUZUAL I, et al. Identification and properties of plasma membrane azole efflux pumps from the pathogenic fungi *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70(5): 1396-1407.
- [15] CHANG M, SIONOV E, LAMICHHANE A K, et al. Role of three *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* efflux pump coding genes in response to drug treatment[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62(4): e01751-17.
- [16] 徐新民, 张媛媛, 杜鹏程, 等. 艾滋病患者感染新型隐球菌的 MLST 分型及临床特点分析[J]. *标记免疫分析与临床*, 2020, 27(5): 829-832.
- [17] SIONOV E, LEE H, CHANG Y C, et al. *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes[J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6(4): e1000848.
- [18] ZHAO Y Y, YAN D J, CHEN Z W. Role of AIF-1 in the regulation of inflammatory activation and diverse disease processes[J]. *Cell Immunol*, 2013, 284(1/2): 75-83.
- [19] SEMIGHINI C P, AVERETTE A F, PERFECT J R, et al. Deletion of *Cryptococcus neoformans* AIF ortholog promotes chromosome aneuploidy and fluconazole-resistance in a metacaspase-independent manner [J]. *PLoS Pathog*, 2011, 7(11): e1002364.
- [20] MONDON P, PETTER R, AMALFITANO G, et al. Heteroresistance to fluconazole and voriconazole in *Cryptococcus neoformans*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(8): 1856-1861.
- [21] CHANG Y C, LAMICHHANE A K, KWON-CHUNG K J. *Cryptococcus neoformans*, unlike *Candida albicans*, forms aneuploid clones directly from uninucleated cells under fluconazole stress[J]. *mBio*, 2018, 9(6): e01290-18.
- [22] STONE N R, RHODES J, FISHER M C, et al. Dynamic ploidy changes drive fluconazole resistance in human *Cryptococcal meningitis*[J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(3): 999-1014.
- [23] 艾莉莎, 梁运光. 氟康唑联合氟胞嘧啶治疗艾滋病合并新型隐球菌性脑膜炎 26 例疗效观察[J]. *中国伤残医学*, 2015, 23(1): 114-115.
- [24] CHANG Z, YADAV V, LEE S C, et al. Epigenetic mechanisms of drug resistance in fungi[J]. *Fungal Genet Biol*, 2019, 132: 103253.
- [25] BRAND O F, ESHER S K, OST K S, et al. HDAC genes play distinct and redundant roles in *Cryptococcus neoformans* virulence[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 5209-5212.
- [26] ROBBINS N, LEACH M, COWEN L. Elysian deacetylases hda1 and RPD3 regulate HSP90 function thereby governing fungal drug resistance[J]. *Cell Rep*, 2012, 2(4): 878-888.
- [27] LEE H, LAMICHHANE A K, GARRAFFO H M, et al. Involvement of PDK1, PKC and TOR signaling pathways in basal fluconazole tolerance in *Cryptococcus neoformans* [J]. *Mol Microbiol*, 2012, 84(1): 130-146.
- [28] JUNG K W, KANG H A, BAHN Y S. Essential roles of the Kar2/BiP molecular chaperone downstream of the UPR pathway in *Cryptococcus neoformans* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58956.
- [29] 井然, 侯欣, 肖盟, 等. 中国侵袭性真菌耐药监测网成员单位重症监护室侵袭性酵母的分布特征及其对唑类药物敏感性的变迁[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2020, 20(2): 175-180.