

· 论著 ·

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

张金宇¹, 王丽红², 秦玉璘¹, 张璐璐¹, 姜远英¹, 曹永兵¹ (1. 第二军医大学药学院新药研究中心, 上海 200433; 2. 中国药科大学, 江苏南京 211198)

[摘要] **目的** 利用白念珠菌(*Candida albicans*)不同转录因子基因缺失菌, 考察参与调控铜离子(Cu^{2+})代谢和氧化应激的重要转录因子。**方法** 点板实验(spot assay)、生长曲线法。**结果** spot assay 筛选发现, 转录因子 *Cup2* 缺失菌 *Cup2* Δ/Δ 对 Cu^{2+} 的敏感性增加, 进一步研究表明 *Cup2* Δ/Δ 在含 5 mmol/L 的 Cu^{2+} 培养液中生长缓慢; *Cup2* Δ/Δ 对 H_2O_2 的敏感性也有所增加, 而且 Cu^{2+} 协同 H_2O_2 发挥抑菌作用, 在 BCS 螯合 Cu^{2+} 后, 增加了 *Cup2* Δ/Δ 和亲本菌 SN250 对 H_2O_2 诱导的氧化应激的耐受性。在氟康唑、咪康唑和酮康唑敏感性实验中, *Cup2* Δ/Δ 并未表现出对唑类药物敏感。**结论** 敲除转录因子 *Cup2*, 可增加白念珠菌对 Cu^{2+} 和 H_2O_2 的敏感性。转录因子 *Cup2* 可能参与调控白念珠菌对 Cu^{2+} 的代谢和 H_2O_2 诱导的氧化应激反应, 但并未参与对唑类药物耐药性的调控。

[关键词] 白念珠菌; 转录因子 *Cup2*; 铜离子(Cu^{2+}); 过氧化氢; 药物敏感性

[中图分类号] R96 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2017)03-0224-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.03.008

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

ZHANG Jinyu¹, WANG Lihong², QIN Yulin¹, ZHANG Lulu¹, JIANG Yuanying¹, CAO Yongbing¹ (1. Research and Development Center of New Drug; School of Pharmacy; Second Military Medical University; Shanghai 200433, China; 2. Department of Pharmacology; School of Pharmacy; China Pharmaceutical University; Nanjing 211198, China)

[Abstract] **Objective** To detect the transcription factors of copper ion (Cu^{2+}) metabolism and oxidative stress by *Candida albicans* knocked down different transcription factors. **Methods** Spot assay, growth curve were used. **Results** The sensitivity to Cu^{2+} in *Cup2* Δ/Δ was increasing and the growth of *Cup2* Δ/Δ was inhibited in 5 mmol/L Cu^{2+} medium. The results showed that *Cup2* Δ/Δ also increased the sensitivity to H_2O_2 , interestingly, Cu^{2+} and H_2O_2 played a synergistic antifungal effect. The tolerance of *Cup2* Δ/Δ and SN250 to H_2O_2 induced oxidative stress was increased after BCS chelating Cu^{2+} . In the fluconazole, miconazole and ketoconazole susceptibility experiments, *Cup2* Δ/Δ did not show susceptibility to azole drugs. **Conclusion** Knockout transcription factor *Cup2*, which could increase the sensitivity to Cu^{2+} and H_2O_2 in *Candida albicans*. Transcription factor *Cup2* might be involved in the regulation and control of *Candida albicans* metabolism on Cu^{2+} and oxidative stress induced by H_2O_2 , but not involved in the regulation and control of drug resistance to azole drugs.

[Key words] *Candida albicans*; transcription factor *Cup2*; copper ion (Cu^{2+}); hydrogen peroxide (H_2O_2); drug susceptibility

白念珠菌是引起临床免疫缺陷病人感染致死的主要条件致病菌。近年来, 在真菌感染中, 白念珠菌感染的发病率最高^[1], 临床常用唑类药物进行治疗。然而, 长期的治疗易使白念珠菌产生耐药性^[2]。目前, 对白念珠菌耐药机制的研究较多, 但其耐药机制

仍未被完全阐明, 至今也没有发现克服真菌耐药的有效药物或防治策略。

一直以来, 铜离子(Cu^{2+})常被用于抗细菌和抗真菌^[3]。皮肤真菌感染是人畜共患病, 硫酸铜联合聚维酮能够很好地治疗牛真菌感染和牛羊腐蹄病^[4,5]。含有硫酸铜的波尔多液, 可抑制苹果轮纹病真菌孢子的萌发, 并在农业生产中也已应用了百余年^[6]。近期研究表明, Cu^{2+} 与两性霉素 B (AmB) 形成 AmB- Cu^{2+} 复合物后, 增强了 AmB 的活性及抗真菌作用。可见, Cu^{2+} 可用作抗真菌药物的佐剂^[7], 并且可能因此增强药物的抗真菌活性。因此,

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81673478)

[作者简介] 张金宇, 硕士研究生。研究方向: 药理学、抗真菌药物及真菌耐药机制研究。Email: rsuzhang@163.com

[通讯作者] 曹永兵, 博士, 教授。研究方向: 药理学、抗真菌药物及真菌耐药机制研究等。Email: ybcao@vip.sina.com

研究 Cu^{2+} 的抗真菌作用机制及调控通路,或将有利于阐明真菌的耐药机制及研究其防治策略。

临床分离出的致病白念珠菌,几乎都表现出对 Cu^{2+} 二价盐高度耐受^[1]。原核生物、真核生物(包括动物)中参与有氧代谢的大量金属硫蛋白,主要参与加氧酶、氧化酶和超氧化物歧化酶催化的生物反应,而这些酶中都含有 Cu^{2+} ,由 Cu^{2+} 介导电子传递,完成酶催化的反应^[8]。笔者通过考察发现转录因子缺失菌 *Cup2* Δ/Δ 对 Cu^{2+} 、 H_2O_2 的耐受性改变,初步研究转录因子 *Cup2* 在白念珠菌中对 Cu^{2+} 代谢、氧化应激的调控作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 白念珠菌(*candida albicans*)菌种保存:每 200 μl 菌液和 200 μl 100% 甘油混合均匀,于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。表 1 中是 24 株白念珠菌转录因子缺失菌编号及对应的被敲除转录因子名称。白念珠菌转录因子缺失菌用营养缺陷基因敲除法敲除获得,缺失菌及菌株 SN250 由中科院巴斯德研究所陈昌斌教授提供。*Cup2* Δ/Δ 在上述菌株中的编号为 KC21。本实验中,使用的国际通用 ATCCMYA-2876(SC5314)菌株由 William A. Fonzi 教授惠赠。

表 1 24 株白念珠菌转录因子缺失菌编号
以及对应的被敲除转录因子名称

编号	开放阅读框	被敲除转录因子	编号	开放阅读框	被敲除转录因子
KC 01	orf19.454	<i>Sfl1</i>	KC 13	orf19.5855	<i>Mbp1</i>
KC 02	orf19.1069	<i>Rpn4</i>	KC 14	orf19.5924	<i>Zcf31</i>
KC 03	orf19.1499	<i>Ctf1</i>	KC 15	orf19.6514	<i>Cup9</i>
KC 04	orf19.3308	<i>Stb5</i>	KC 16	orf19.6874	<i>C2_05640W</i>
KC 05	orf19.3753	<i>Sef1</i>	KC 17	orf19.7068	<i>Mac1</i>
KC 06	orf19.3876	<i>Zcf19</i>	KC 18	orf19.7583	<i>Zcf39</i>
KC 07	orf19.4225	<i>Leu3</i>	KC 19	orf19.217	<i>C2_08890W</i>
KC 08	orf19.4288	<i>Cta7</i>	KC 20	orf19.391	<i>Upc2</i>
KC 09	orf19.4450	<i>Zcf23</i>	KC 21	orf19.5001	<i>Cup2</i>
KC 10	orf19.4941	<i>Tye7</i>	KC 22	orf19.1035	<i>War1</i>
KC 11	orf19.5097	<i>Cat8</i>	KC 23	orf19.1496	<i>C2_01870C</i>
KC 12	orf19.5651	<i>CA_00260W</i>	KC 24	orf19.921	<i>Hms1</i>

1.1.2 培养基 RPMI1640 培养液:洛斯维(RP-MI1640, Invitrogen 公司) 10 g、吗啉基丙磺酸(MOPS)34.5 g 和碳酸氢钠 2.0 g(生工公司)置锥形瓶中,先加入三蒸水 900 ml,于室温下用 1 mol/L NaOH 将 pH 调至 7.0,定容至 1 000 ml,在超净台内过滤除菌,保存于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱备用。

YPD 培养基:酵母提取物 10 g 和蛋白胨 20 g(美国 BD 公司)、葡萄糖 200 g(生工公司)置锥形瓶中,加三蒸水定容至 1 000 ml,封口, $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压灭菌处理 15 min。配制 YPD 固体培养基,需再向其中加入琼脂 18 g(美国 BD 公司)。

沙堡葡萄糖琼脂培养基(SDA):蛋白胨 10 g(美国 BD 公司)、葡萄糖 40 g(生工公司)、琼脂 17 g(生工公司)置锥形瓶中,加入氯霉素水溶液 50 ml,加三蒸水定容至 1 000 ml, $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压灭菌处理 15 min。

磷酸盐缓冲液(PBS):磷酸二氢钾 0.27 g、磷酸氢二钠 3.84 g、氯化钠 8 g、氯化钾 0.2 g(均购自生工公司)置锥形瓶中,加三蒸水 950 ml,用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.4,定容至 1 000 ml, $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压灭菌处理 15 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.1.3 主要试剂 氟康唑(FLC)、酮康唑(KTC)、咪康唑(MCZ)、AmB(均购自 Sigma 公司),五水合硫酸铜和过氧化氢(H_2O_2 , 均购自生工公司),铜离子螯合剂(BCS, 美国 Sigma 公司)。用二甲亚砜(DMSO, 生工公司)溶解上述药物。

1.1.4 仪器 HZ-2111K-B 恒温振荡器和恒温智能培养箱(宁波江南仪器厂),5417R 型温度调节离心机(德国 Eppendorf)。

1.2 方法

1.2.1 菌株活化及菌液浓度调节 挑取 SDA 平板上保存的白念珠菌 SN250 和不同基因缺失菌单克隆菌落,移至含有 1 ml 新鲜 YPD 液体培养基的试管中,于 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、250 r/min 培养 16 h。离心收集菌体,用 PBS 溶液清洗 2 次后,1 ml PBS 溶液重悬,吸取适量菌液置透明 96 孔板中,用 PBS 溶液调节菌体浓度,用酶标仪检测 630 nm 处的光密度(OD),调节菌液浓度,使被检测菌液的 OD_{630} 为 0.7 ± 0.05 ,此时菌液浓度约为 2×10^7 cells/ml。

1.2.2 生长曲线法 调节已活化好的白念珠菌 SN250 和 *Cup2* Δ/Δ 菌液浓度至约 2×10^7 cells/ml。空白对照组以 5 ml YPD 培养液稀释并调整菌液浓度至 1×10^6 cells/ml;在浓度为 1×10^6 cells/ml 的菌液中加入无菌 CuSO_4 溶液,使得 Cu^{2+} 的终浓度为 5 mmol/L,于 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、250 r/min 条件下,振荡培养,分别于 0、2、4、6、8、10、12、16、20、24 h 时间点取样 100 μl ,用酶标仪测定 630 nm 处 OD 值,以 OD_{630} 值确定菌株生长变化情况。

1.2.3 点板实验 调节 SN250 和 *Cup2* Δ/Δ 活化 16 h 后菌液浓度,酶标仪检测,使 OD_{630} 为 0.7 ± 0.05 ,此时菌液浓度为 2×10^7 cells/ml。将此菌液

逐级 10 倍稀释,直至 10^2 cells/ml。YPD 固体培养基灭菌后,待冷却时加入药液,使配制成终浓度为 $8 \mu\text{g/ml}$ KTC、 $16 \mu\text{g/ml}$ FLC、 $8 \mu\text{g/ml}$ MCZ、 5 mmol/L 和 10 mmol/L H_2O_2 、 5 mmol/L CuSO_4 、 5 mmol/L $\text{CuSO}_4 + 5 \text{ mmol/L}$ H_2O_2 的药敏板,分别取不同浓度菌液 $5 \mu\text{l}$ 依次滴加于药敏板上,于 30°C 恒温培养箱中培养 24 h,肉眼观察不同菌株的生长情况,判断菌体对药物的敏感性。

2 实验结果

2.1 24 株转录因子缺失菌对 Cu^{2+} 的敏感性筛选

利用含不同浓度 Cu^{2+} 的培养基,通过 spot assay 初步筛选 24 株转录因子缺失菌、野生型 SC5314 和亲本菌 SN250 对 Cu^{2+} 的敏感性。其中,点板时控

制每株菌的点板浓度为 2×10^7 cells/ml。在 Cu^{2+} 浓度为 3 mmol/L 时,24 株转录因子缺失菌、野生型 SC5314 和亲本菌 SN250 的生长基本相同。 Cu^{2+} 浓度为 5 mmol/L 时,发现 $\text{Cup2} \Delta/\Delta$ 的生长减弱,而其他菌株的生长均未受到影响(图 1)。

2.2 $\text{Cup2} \Delta/\Delta$ 对 Cu^{2+} 的敏感性 用营养缺陷法将亲本菌 SN250 基因 Cup2 敲除后,在全营养培养基 YPD 的条件下培养 $\text{Cup2} \Delta/\Delta$ 。观察发现, $\text{Cup2} \Delta/\Delta$ 在生长速率上基本与亲本菌 SN250 相同,表明转录因子 Cup2 缺失并没有导致正常生长情况下的生长缺陷(图 2A)。但在含 5 mmol/L Cu^{2+} 的 YPD 培养基中, $\text{Cup2} \Delta/\Delta$ 生长明显弱于亲本菌 SN250 (图 2B)。spot assay 实验结果表明, $\text{Cup2} \Delta/\Delta$ 对 10 mmol/L Cu^{2+} 也很敏感(图 3)。

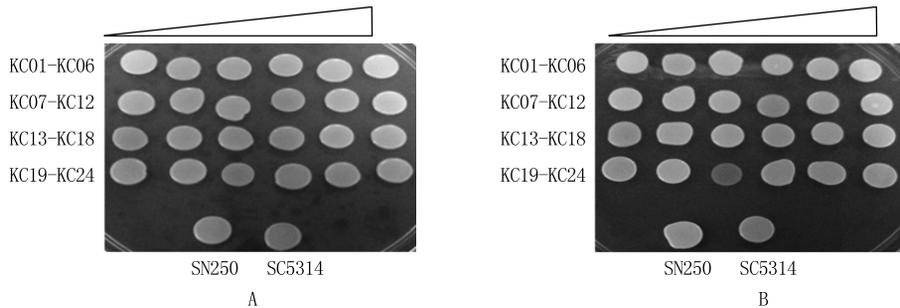


图 1 24 株白念珠菌转录因子缺失菌及 SN250、SC5314 菌体对 Cu^{2+} 的敏感性检测

A. 含 3 mmol/L Cu^{2+} 的 YPD 培养基; B. 含 5 mmol/L Cu^{2+} 的 YPD 培养基;
 $\text{Cup2} \Delta/\Delta$ 编号为 KC21, 图片左侧为对应菌体编号, 图片上方三角形表示编号递增

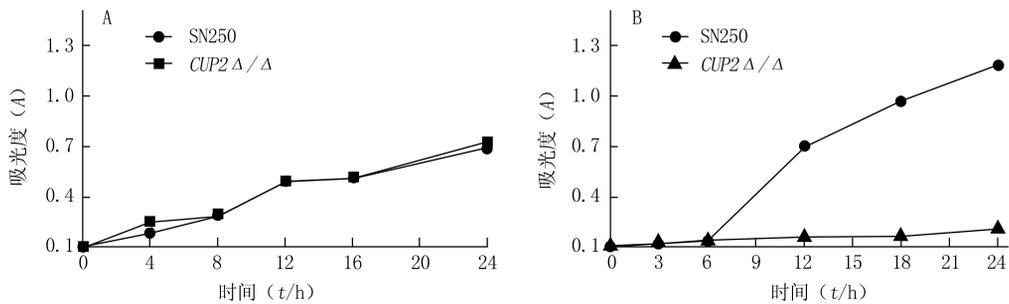


图 2 生长曲线法检测 $\text{Cup2} \Delta/\Delta$ 和 SN250 对 Cu^{2+} 的敏感性

A. YPD 培养基; B. 含 5 mmol/L Cu^{2+} 的 YPD 培养基

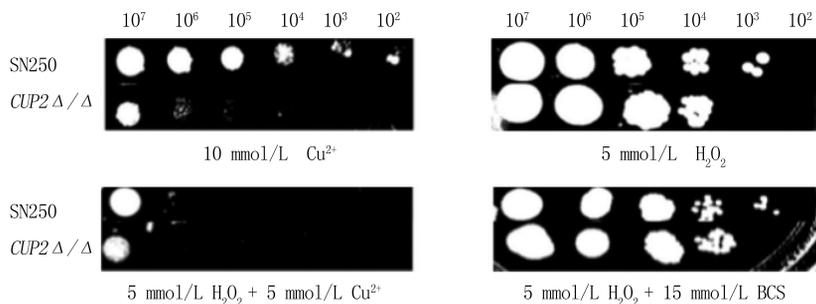


图 3 $\text{Cup2} \Delta/\Delta$ 和亲本菌 SN250 对 Cu^{2+} 和 H_2O_2 的敏感性

注: 图片上方数字, 表示每毫升菌液中菌体的个数。图中展示的是对应浓度的菌体生长情况

2.3 *Cup2* Δ/Δ 对 H_2O_2 的敏感性 一般抗真菌药物作用于白念珠菌后,菌体内会发生氧化应激。诱导氧化应激常用 H_2O_2 ,本研究对 *Cup2* Δ/Δ 在 H_2O_2 诱导的氧化应激条件下的生长情况进行了考察。通过 spot assay 实验检测进一步证明,与亲本菌相比,*Cup2* Δ/Δ 对 Cu^{2+} 的敏感性增加,对 H_2O_2 的敏感也有所增加。在培养基中加入 BCS 去除 Cu^{2+} 后,*Cup2* Δ/Δ 及其亲本菌 SN250 对 H_2O_2 的敏感性均未改变(图 3),但在培养基中加入 Cu^{2+}

后,两菌株对 H_2O_2 的敏感性都显著增加。 Cu^{2+} 和 H_2O_2 表现出显著的协同抗真菌作用。

2.4 *Cup2* Δ/Δ 对唑类药物的敏感性 利用不同浓度的 FLC、MCZ、KTC,通过 spot assay 实验发现,与亲本菌 SN250 相比,*Cup2* Δ/Δ 对唑类药物的敏感性并未改变(图 4)。

3 讨论

Cu^{2+} 为体内外生物反应所必需。无论在体内

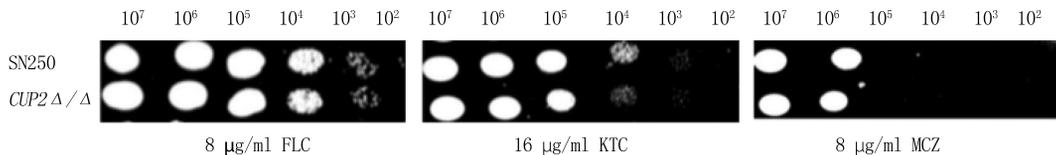


图 4 *Cup2* Δ/Δ 和 SN250 对 3 种唑类药物的敏感性

还是在体外,过多的 Cu^{2+} 能够诱导 DNA 和蛋白以及其他生物大分子损伤,导致酶失活、多糖氧化解聚和脂质过氧化,不利于细胞生长^[9]。研究表明, Cu^{2+} 储存在吞噬体内,参与巨噬细胞吞噬病原体的过程^[10]。体外的巨噬细胞需要 Cu^{2+} 才能杀死白念珠菌^[11]。但是, Cu^{2+} 在白念珠菌中的作用仍报道较少, Cu^{2+} 对白念珠菌生长的重要作用有待深入研究。已有研究表明,在酿酒酵母中,*Cup1*编码特定的铜整合蛋白和酵母金属硫蛋白,调控菌体对铜的耐受性,*Cup1*表达的拷贝数越多,对铜的耐受性越强。而 *Cup2*控制着 *Cup1*的转录。当 *Cup2*被激活后,*Cup1*才能进行转录,表达 CUP1。CUP1能够与 Cu^{2+} 结合,从而使得菌体产生对铜的抗性^[12]。

已有研究证明,白念珠菌中 *Cup1*编码的蛋白也能结合 Cu^{2+} ,调控白念珠菌对 Cu^{2+} 的代谢和利用^[13]。虽然并没有研究表明白念珠菌 *Cup2*的作用,但由于白念珠菌和酵母在进化上存在较高的相似性,所以可以推测白念珠菌中的 *Cup2*也有和酵母中 *Cup2*相似的生物功能,可能参与对 *Cup1*的转录调控^[14]。综上,推测白念珠菌转录因子 *Cup2*,可能也是调控 Cu^{2+} 利用的转录因子。因此,本研究通过考察比较 *Cup2* Δ/Δ 及其白念珠菌野生菌对 Cu^{2+} 敏感性的差异,发现 *Cup2* Δ/Δ 对 Cu^{2+} 变得更敏感,证明 *Cup2*确实参与了白念珠菌对 Cu^{2+} 利用的调控,但 *Cup2*对 Cu^{2+} 的利用是如何进行调节的,以及具体的调控机制,还有待进一步深入研究。

由于临床广泛应用唑类药物治疗真菌感染,一般唑类药物作用于白念珠菌后,可能会引起菌体发生氧化应激反应,而 Cu^{2+} 也参与了白念珠菌的氧化

应激反应,因此本研究考察了 *Cup2*缺失菌及其亲本菌对唑类药物的敏感性差异。然而结果表明,*Cup2* Δ/Δ 并没有增加对唑类药物的敏感性。

微量液基稀释实验结果表明(实验结果并没有在文中展示), $32 \mu\text{g/ml}$ BCS 整合培养基中 Cu^{2+} 后,对实验菌珠的生长没有抑制作用,甚至有轻微的促进作用。这表明菌体在正常生长代谢环境中,低浓度的 Cu^{2+} 对白念珠菌的生长影响并不大,或稍有不和。BCS 整合培养基中的 Cu^{2+} 后,各实验菌体对 H_2O_2 的敏感性并未改变,表明低浓度 Cu^{2+} 并不影响白念珠菌应对 H_2O_2 诱导的氧化应激。但加入高浓度 Cu^{2+} 后,可显著增加 H_2O_2 诱导的氧化应激对白念珠菌的损伤。而在敲除 *Cup2*后,即使没有 H_2O_2 诱导,高浓度 Cu^{2+} 也会严重损伤白念珠菌。因此 H_2O_2 和高浓度的 Cu^{2+} 具有协同抗真菌作用。综上所述可以证明,转录因子 *Cup2*参与调控 Cu^{2+} 的代谢,并影响了白念珠菌的氧化应激能力,但可能不参与调控白念珠菌对唑类药物的耐药。

Cu^{2+} 在白念珠菌中起着双刃剑的作用,不能片面地理解和分析 Cu^{2+} 的作用。高浓度 Cu^{2+} 的生长环境对菌体的生长不利,并且可以协同抗菌药物发挥抗菌作用。低浓度 Cu^{2+} 的生长环境,满足菌体正常生长代谢所需。 Cu^{2+} 在白念珠菌中的稳态平衡,需要进行自我调控,而在这调控之中,需要转录因子 *Cup2*的参与。*Cup2*在白念珠菌中对 Cu^{2+} 的调控作用及机制,与其在酵母以及哺乳动物中是否相同仍有待研究。进一步研究白念珠菌 *Cup2*对 Cu^{2+} 的调控作用以及 Cu^{2+} 参与的生长代谢,将是揭示真菌氧化应激反应及耐药性的一条新路径。

【参考文献】

[1] 杨雪梅,温洁新,李素华,等. 2010年我院124株白念珠菌药物敏感试验及耐药性分析[J]. 山西医药杂志,2012,41(5):445-446.

[2] Kanoshiki RL, de Paula SB, Santos JP, et al. Effects of fluconazole treatment of mice infected with fluconazole-susceptible and -resistant *Candida tropicalis* on fungal cell surface hydrophobicity, adhesion and biofilm formation[J]. Indian J Med Microbiol,2015,33(Suppl):97-101.

[3] 金仕强,杨丁,左之才.硫酸铜联合聚维酮碘治疗育肥牛皮肤真菌感染一例[J]. 黑龙江畜牧兽医,2015,(11):130.

[4] Dollwet, HHA., Sorenson, JRJ. Historic uses of copper compounds in medicine[J]. Trace Elem Med,1985,2(2),80-87.

[5] 木合塔尔. 应用煅硫酸铜治疗牛羊腐蹄病[J]. 中国兽医杂志,2002,(2):38

[6] 张玉聚,宋凤仙. 高分子有机酸复合碱式硫酸铜的杀菌效果研究[J]. 华北农学报,1998,13(2):98-101.

[7] Chudzik B, Tracz IB, Czernel G, et al. Amphotericin B-copper(II) complex as a potential agent with higher antifungal activity against *Candida albicans*[J]. Eur J Pharm Sci,2013,49(5):850-857.

[8] Goldstein S, Czapski G. Transition metalions and oxygen radicals[J]. Int Rev Exp Pathol,1990,31,133-164.

[9] Kadiiska M B, Mason RP. *In vivo* copper-mediated free radical production: an ESR spin-trapping study[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc,2002,58(6):1227-1239.

[10] Flannagan RS, Cosío G, Grinstein S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies [J]. Nat Rev Microbiol,2009,7(5):355-366.

[11] Babu U, Failla ML. Respiratory burst and candidacidal activity of peritoneal macrophages are impaired in copper-deficient rats[J]. Nutr,1990,120(12),1692-1699.

[12] Buchman C, Skroch P, Welch J, et al. The *Cup2* gene product, regulator of yeast metallothionein expression, is a copper-activated DNA-binding protein[J]. Mol Cell Biol,1989,9(9):4091-4095.

[13] Hoffman AE, Miles L, Greenfield TJ, et al. Clinical isolates of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida krusei* have different susceptibilities to Co(II) and Cu(II) complexes of 1,10-phenanthroline[J]. Bio Metals,2015,28(2):415-423.

[14] Jensen LT, Howard WR, Strain JJ, et al. Enhanced effectiveness of copper ion buffering by *Cup1* metallothionein compared with CRS5 metallothionein in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. J Biol Chem,1996,271(31):18514-18519.

[收稿日期] 2017-02-28 [修回日期] 2017-05-03
[本文编辑] 顾文华

(上接第200页)

[19] 刘凡. 炎症性肠病药物治疗现状与进展[J]. 沈阳医学院学报,2006,8(4):241-242.

[20] Hindorf U, Lindqvist M, Hildebrand H, et al. Adverse events leading to modification of therapy in a large cohort of patients with inflammatory bowel disease [J]. Aliment Pharmacol Ther,2006,24(2):331-342.

[21] Gao X, Zhang FB, Ding L, et al. The potential influence of 5-aminosalicylic acid on the induction of myelotoxicity during thiopurine in inflammatory bowel disease patients [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol,2012,24(8):958-964.

[22] Lewis JD, Schwartz JS, Lichtenstein GR. Azathioprine for maintenance of remission in Crohn's disease: benefits outweigh the risk of lymphoma [J]. Gastroenterol,2000,118(6):1018.

[23] Hanauer SB, Korelitz BI, Rutgeerts P, et al. Postoperative maintenance of Crohn's disease remission with 6-mercaptopurine, mesalamine, or placebo: a 2-year trial[J]. Gastroenterology,2004,127(3):723-729.

[24] Lichtenstein GR, Abreu MT, Cohen R, et al. American Gastroenterological Association Institute medical position statement on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease [J]. Gastroenterology,2006,130(3):935-939.

[25] Feagan G, John M. Low-Dose Cyclosporine for the Treatment of Crohn's Disease [J]. Med,1994,330(26):1846-1851.

[26] Cheifetz AS, Stern J, Garud S, et al. Cyclosporine is safe and effective in patients with severe ulcerative colitis [J]. Clin Gastroenterol,2011,45(2):107-112.

[27] 崔静. 炎症性肠病发病机制和治疗方面某些进展[D]. 郑州:郑州大学,2004.

[28] 王俊珊,刘占举. 炎症性肠病的诊断和药物治疗相关指南解读[J]. 世界临床药物,2005,36(12):809-813.

[29] 黄瑛,王玉环. 儿童炎症性肠病的药物治疗[J]. 世界临床药物,2009,30(8):459-464.

[30] 李世荣. 生物靶向药物在炎症性肠病中的应用现状[J]. 中国新药杂志,2010,19(19):1750-1757.

[31] 杨志红,邓彤斌,王梦明,等. 炎症性肠病的病因学和药物治疗研究进展[J]. 中国药师,2013,16(6):905-907.

[32] 高树娟,施瑞华. 炎症性肠病治疗的新进展[J]. 世界华人消化杂志,2012,36:3742-3747.

[33] Papadakis KA. Safety and efficacy of adalimumab in Crohn's disease patients with an attenuated response to infliximab [J]. Gastroenterology,2011,100(1):75-79.

[34] Colombel JF, Sandborn WJ, Rutgeerts P, et al. Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease[J]. Aliment Pharmacol Ther,2010,132(1):1296-1309.

[收稿日期] 2016-09-20 [修回日期] 2016-12-03
[本文编辑] 顾文华