·论著·

SDH2 基因在白念珠菌环境适应性中的作用

王欣荣，鲁仁义，王　彦（海军军医大学药学系军特药研究中心，上海 200433）

［摘要］ **目的**　探究 *SDH2* 基因在白念珠菌环境适应性中的作用。**方法**　以野生型白念珠菌 SC5314、*SDH2* 基因敲除菌 *sdh2Δ/Δ*、基因回复菌 *sdh2Δ/SDH2* 为实验对象；应用点板实验考察野生型菌、*SDH2* 缺失菌和回复菌对外界压力刺激剂和抗真菌药物的敏感性；采用罗丹明 6G 外排实验考察 *SDH2* 基因缺失对白念珠菌药物外排能力的影响。**结果**　*SDH2* 基因缺失后白念珠菌对细胞壁应激刺激剂咖啡因、氧化应激刺激剂二酰胺和甲萘醌表现出轻微耐受，值得注意的是 *SDH2* 基因敲除菌 *sdh2Δ/Δ* 对唑类抗真菌药物的敏感性明显增高，*SDH2* 缺失导致白念珠菌药物外排能力下降。**结论**　*SDH2* 缺失会导致白念珠菌对环境适应性的改变，包括对外界环境压力应答的改变和对唑类抗真菌药物敏感性的增加，以 *SDH2* 为靶基因，开发真菌特异性 *SDH2* 抑制剂，有望发现与唑类药物协同的新型抗真菌药物。

［关键词］ 白念珠菌；*SDH2*；环境适应性；压力应激；药物敏感性
［中图分类号］ R978.5　　［文献标志码］ A　　［文章编号］ 1006-0111(2022)04-0309-05
［DOI］ 10.12206/j.issn.1006-0111.202201096

The role of *SDH2* gene in the environmental adaptability of *Candida albicans*

WANG Xinrong, LU Renyi, WANG Yan（School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China）

［**Abstract**］ **Objective**　To investigate the role of *SDH2* gene in the environmental adaptability of *Candida albicans*. **Methods**　Wild-type *C. albicans* strain SC5314, *SDH2* gene knockout mutant *sdh2Δ/Δ* and reintegrated strain *sdh2Δ/SDH2* were used as experimental objects. Spot assay was conducted to assess the sensitivity of the WT *C. albicans* strain SC5314, *SDH2* gene knockout mutant *sdh2Δ/Δ* and reintegrated strain *sdh2Δ/SDH2* to external stress stimulants and antifungal drugs. The effect of *SDH2* gene deletion on drug efflux ability of *C. albicans* was determined by rhodamine 6G efflux assay. **Results**　After *SDH2* gene deletion, *C. albicans* showed slight tolerance to cell wall stress stimulants caffeine, oxidative stress stimulators diamide and menadione. Notably, the sensitivity of *SDH2* gene knockout mutant *sdh2Δ/Δ* to azole antifungal drugs was significantly increased. The drug efflux capacity of *C. albicans* was decreased due to the deletion of *SDH2* gene. **Conclusion**　*SDH2* gene deletion lead to changes in environmental adaptability of *C. albicans*, including changes in response to external environmental stress and increased sensitivity to azole antifungal drugs. The development of fungal-specific inhibitor targeting *SDH2* gene may lead to the discovery of new antifungal drugs which have synergistic effect with azole drugs.

［**Key words**］ *Candida albicans*; *SDH2*; environmental adaptability; stress response; drug sensitivity

白念珠菌是一种条件致病真菌，在健康人体口腔或胃肠道中以无害共生菌的形式存在。在免疫功能低下的患者中，能够导致危及生命的全身性感染。近年来，随着癌症患者、器官移植接受者等免疫功能低下人群不断增加，白念珠菌感染引发的严重疾病的发病率不断攀升[1-2]，死亡率粗略估计已高于 40%[3]。

高适应性是白念珠菌传播和致病的关键因素之一，包括对宿主和外界环境的适应性、形态的转换以及对抗真菌药物的适应性。代谢的改变能够影响白念珠菌的药物敏感性，Ene 等[4] 发现培养基中碳源由葡萄糖转变为乳酸后白念珠菌对抗真菌药物（咪康唑、两性霉素 B、卡泊芬净）的敏感性发生改变。线粒体作为重要的代谢细胞器，其中的某些基因缺失或者功能缺陷，会导致白念珠菌药物敏感性的变化，Sun 等[5] 发现线粒体复合体 I 相关基因 *GOA1* 和 *NDH51* 的缺失会导致白念珠菌对唑类药物敏感性上升，Edwina 等[6] 的研究发现线粒体关键基因 *FZO1* 的缺失能够增强白念珠菌对唑类药物的敏感性。

本课题组前期发现 *SDH2* 基因缺失导致白念珠菌致病力显著下降，并发现白念珠菌无法利用非发酵碳源[7]。生物信息学分析显示 *SDH2* 基因编码

［基金项目］ 军队生物安全研究专项（20SWAQX29-1-6）
［作者简介］ 王欣荣，硕士研究生，Email：yunhubuxi7799@163.com；鲁仁义，讲师，Email：lurenyi@smmu.edu.cn
［通信作者］ 王　彦，博士，教授，博士生导师，研究方向：药理学，Email：wangyansmmu@126.com

琥珀酸脱氢酶(SDH)的铁硫亚基,琥珀酸脱氢酶在三羧酸循环和线粒体电子传递链中均发挥作用,是能量代谢中重要的一环。*SDH2* 基因可能在白念珠菌代谢过程中发挥重要的作用,那么它是否能够通过影响代谢从而改变白念珠菌的环境适应性呢?本研究聚焦 *SDH2* 基因对白念珠菌环境适应性的影响,包括对外界压力应答和药物敏感性的影响,并探索其可能的机制。

1　材料和方法

1.1　菌株培养

挑取少量冻存于−80℃、30% 甘油中的菌株,在 YPD 液体培养基中活化,30℃,200 r/min 振荡培养 24 h 后,吸取 10 μl 置于新的 1 ml YPD 液体培养基中,继续在 30℃,200 r/min 振荡条件下培养 16 h,用 SDA 固体培养基划板,30℃ 培养 48 h,置于 4℃ 保存备用。实验时挑取 SDA 平板上的单克隆菌落置于 1 ml YPD 液体培养基中,30℃,200 r/min 振荡培养 16 h 过夜,使其处于对数生长期用于后续实验。

1.2　点板实验检测药物敏感性

白念珠菌活化 16 h ,用 YPD 液体培养基调整菌浓度至 3×10^6 细胞/ml。制备每种菌株的系列稀释液,以 10 倍倍比稀释成 5 个浓度梯度,每种白念珠菌的系列浓度稀释物各取 5 μl,点在事先加入了待考察的不同浓度的化学试剂和药物的 YPD 琼脂平板上,倒置于孵箱内,25、30、37 ℃ 培养 24 ~ 48 h,期间观察各菌株之间生长的差异并拍照记录。

1.3　罗丹明 6G 的外排测定实验

收集处于对数生长期的白念珠菌细胞悬浮液,用无菌 PBS 洗涤 3 次。随后将细胞重悬于无菌 PBS 中调整其浓度至 5×10^7 细胞/ml,孵育 2 h 以耗尽能量,并加入终浓度为 10 μmol/L 的罗丹明 6G。30℃、200 r/min 振荡培养细胞悬浮液 60 min,使罗丹明 6G 积累。洗涤白念珠菌细胞悬浮液 3 次,注意要保证白念珠菌细胞最终浓度为 5×10^7 细胞/ml。然后加入终浓度为 20 mmol/L 的葡萄糖。分别在 25 、30、37℃ 条件下,200 r/min 振荡培养白念珠菌细胞悬浮液 2 h,取白念珠菌细胞样品 (约 1 ml) 离心,收集上清液,在 527 nm 处测量吸光度。

1.4　统计分析

使用 GraphPad Prism 软件对全部数据进行分析,时序检验 (Mantel Cox) 方法比较各组差异 ,当 $P<0.05$ 时,表示差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　*SDH2* 在白念珠菌应激反应中的作用

我们利用多种刺激剂考察了 *SDH2* 在白念珠菌应激反应中的作用。实验应用了 ***sdh2Δ/Δ*** 敲除菌、野生型菌和回复菌,考察在存在应激刺激剂的培养基中 ***sdh2Δ/Δ*** 敲除菌的生长情况与野生型菌和回复菌的区别,从而判断 *SDH2* 在白念珠菌应激反应中的作用。应激刺激剂包括细胞壁应激刺激剂(十二烷基硫酸钠和咖啡因)、渗透压应激刺激剂(氯化钠)、氧化应激刺激剂(过氧化氢、二酰胺和甲萘醌)。敏感性实验在 25、30、37 ℃ 三种不同的温度下进行,将不同浓度相同体积的白念珠菌接种于琼脂培养板上,同样的培养板制备 3 份,白念珠菌生长形成明显的菌落后拍照。结果显示,与野生型菌或回复菌相比,***sdh2Δ/Δ*** 敲除菌于 25 ℃ 在 0.03% 十二烷基硫酸钠培养板上生长得多(图 1A)。此外,在所有培养温度下,***sdh2Δ/Δ*** 敲除菌在含咖啡因、二酰胺或甲萘醌的培养板上也较野生型菌/回复菌生长得多 (图 1A、1B、1C)。

2.2　*sdh2Δ/Δ* 对唑类药物的敏感性增加

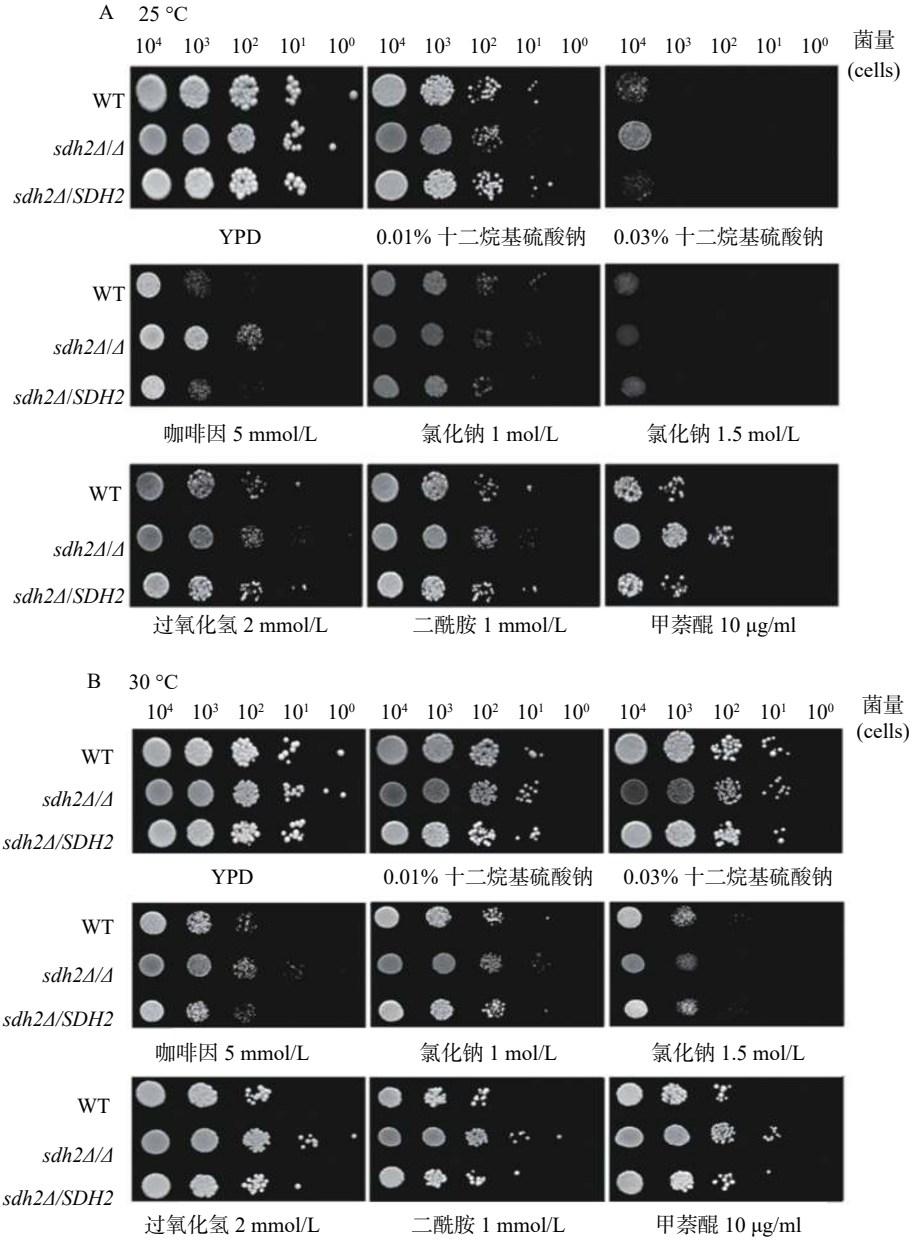
我们考察了 ***sdh2Δ/Δ*** 敲除菌、野生型菌和回复菌对抗真菌药物的敏感性,考察的药物包括唑类抗真菌药物特比萘芬、两性霉素 B、氟胞嘧啶和阿尼芬净。将不同浓度相同体积的白念珠菌接种于琼脂培养板上,同样的培养板制备 3 份,白念珠菌生长形成明显的菌落后拍照。药物敏感性实验结果显示,与野生型菌/回复菌相比,***sdh2Δ/Δ*** 敲除菌在含有氟康唑、酮康唑和伊曲康唑的培养板上生长得明显减少 (图 2A、2B、2C),而在含有其他抗真菌药物,如特比萘芬、两性霉素 B、氟胞嘧啶和阿尼芬净的培养板上没有明显差别。

2.3　*SDH2* 缺失导致白念珠菌药物外排缺陷

罗丹明 6G 是 ABC(ATP-binding cassette)转运蛋白的特异性底物,在能量不足时以被动扩散的方式进入白念珠菌细胞,加入葡萄糖供能后,可通过药物外排泵以主动转运的方式泵出细胞外。我们通过罗丹明 6G 的外排实验考察了 *SDH2* 敲除对白念珠菌药物外排能力的影响。结果显示在 30 ℃ 和 37 ℃ 培养温度下,通过添加葡萄糖以启动能量代谢 2 h 后,与野生型菌相比,从 ***sdh2Δ/Δ*** 敲除菌的细胞中泵出的罗丹明 6G 显著减少 ($P<0.01$,见图 3)。有趣的是,在 25 ℃ 的培养温度下,3 种菌株泵出的罗丹明 6G 都较 30 ℃ 和 37 ℃ 条件下有所减少,但各菌株之间没有显著差异 (图 3)。

3　讨论

SDH2 编码琥珀酸脱氢酶中的一个亚基，琥珀酸脱氢酶参与三羧酸循环，并且它位于线粒体内膜上，发挥电子传递的作用，对于能量代谢十分重要[8]。我们对 *SDH2* 基因在白念珠菌环境适应性中的作用进行了初步探索，实验选择在 30 ℃（白念珠菌最适宜生长温度）、37 ℃（宿主温度）和 25 ℃（室温）三种温度下进行。实验之所以选用三种温度，一方面是由于在不同环境温度下白念珠菌的代谢可能不同，选用不同的温度可以考察温度造成的差别；另一方面在三种温度下考察 *SDH2* 基因的功能，结果相互之间可以比较或者印证，增加信息量，有利于分析 *SDH2* 基因的功能。有意思的是 *SDH2* 基因缺失后菌株对唑类抗真菌药物（氟康唑、酮康唑、伊曲康唑）的敏感性显著上升，而对于其他类型的抗真菌药物包括丙烯胺类特比萘芬、多烯类两性霉素 B、核苷类氟胞嘧啶和棘白菌素类阿尼芬净，其敏感性和野生型菌没有差异。唑类药物的敏感性与药物外排泵的功能密切相关，药物外排功能障碍可导致对唑类抗真菌药物敏感性增加[9]。药物外排泵包括 ABC 转运蛋白超家族和主要易化因子超家族，其中 ABC 转运蛋白中的 Cdr1p、Cdr2p 发挥作用都需要消耗能量。罗丹明 6G 是能量依赖型 ABC 转运蛋白的特异性底物，通过外排泵以能量依赖的主动转运方式排出细胞外。罗丹明 6G 外排实验的结果能显示能量依赖型 ABC 转运蛋白的功能。研究发现 *SDH2* 缺失后白念珠菌在 30 ℃ 和



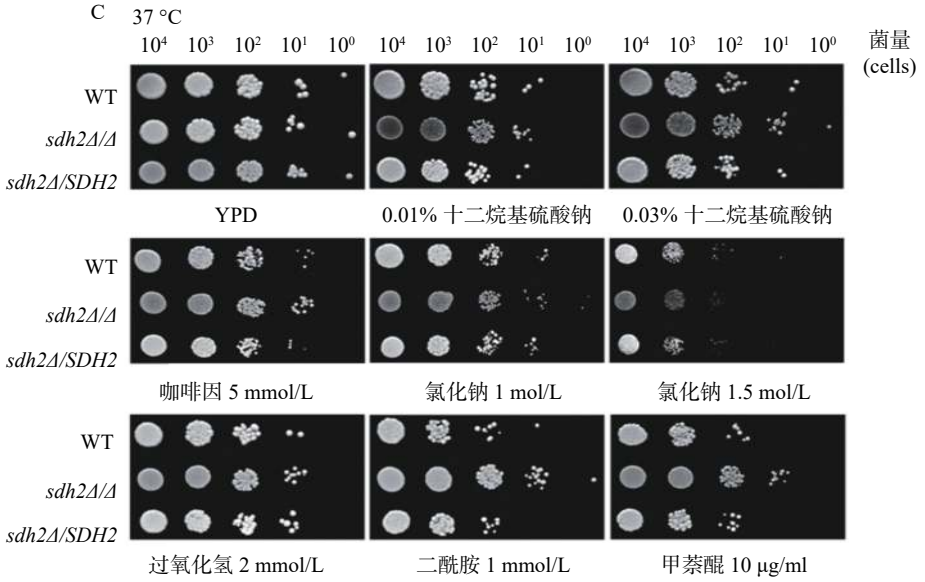


图 1　*SDH2* 基因缺失菌与野生型菌株对各种应激刺激剂的敏感性

A. 25 ℃ 下培养；B. 30 ℃ 下培养；C. 37 ℃ 下培养

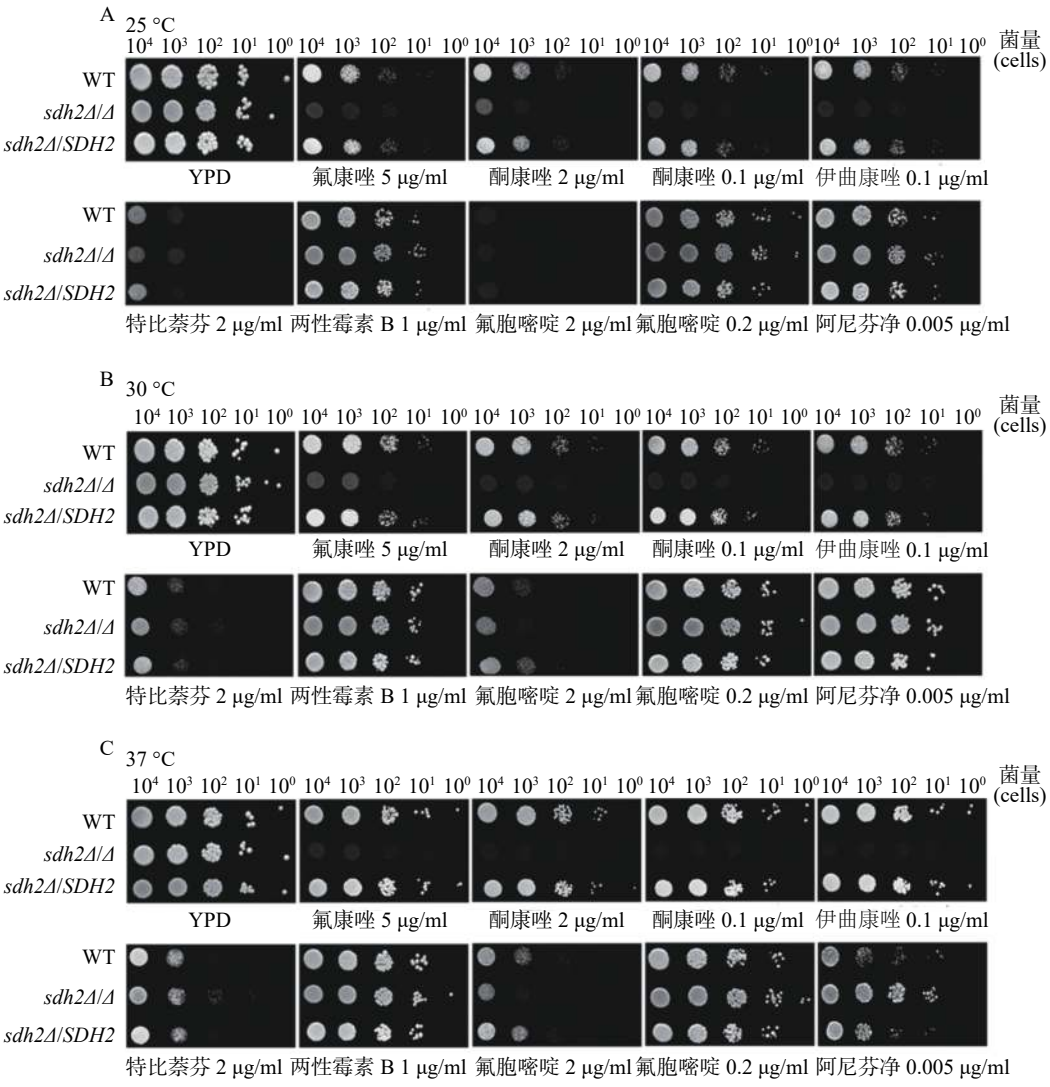


图 2　*SDH2* 基因缺失菌与野生型菌株对抗真菌药物的敏感性

A. 25 ℃ 下培养；B. 30 ℃ 下培养；C. 37 ℃ 下培养

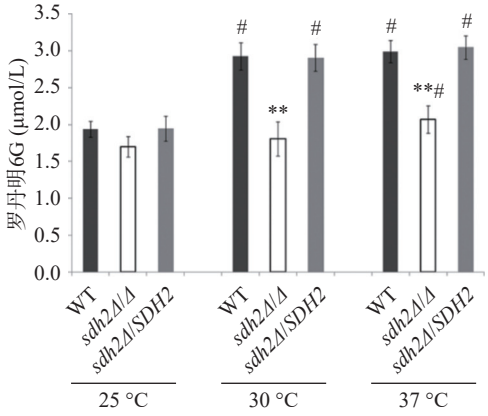


图 3　*SDH2* 基因缺失菌与野生型菌株对罗丹明 6G 的外排能力

$^{\#}P$<0.05, 与 25 ℃ 比较; $^{**}P$<0.01, 与 WT 比较

37 ℃ 时外排能力都显著降低。*SDH2* 对能量代谢非常重要，*SDH2* 基因缺失后，菌株能量代谢异常，能量依赖型 ABC 转运蛋白的功能下降，缺失菌对唑类抗真菌药物的敏感性增加。

SDH2 基因缺失后白念珠菌对咖啡因、二酰胺和甲萘醌都表现出轻微的耐受，这提示 *SDH2* 基因在白念珠菌环境应激中有一定的作用，这些环境因素包括细胞壁压力的刺激以及氧化刺激，具体的作用机制还有待进一步探讨。

综上所述，本研究发现 *SDH2* 基因缺失会导致白念珠菌对环境压力应激反应的改变；此外，*SDH2* 基因缺失后菌株的药物外排能力降低，菌株对唑类抗真菌药物的敏感性增加。代谢对白念珠菌的环境适应能力和致病力十分重要，*SDH2* 基因缺失导致白念珠菌对唑类抗真菌药物专特性地敏感，以 *SDH2* 为靶基因，开发真菌特异性 *SDH2* 抑制剂，有望发现与唑类药物协同的新型抗真菌药物。

【参考文献】

[1] PFALLER M A, DIEKEMA D J. Epidemiology of invasive mycoses in North America[J]. Crit Rev Microbiol, 2010, 36(1): 1-53.

[2] ENOCH D A, YANG H N, ALIYU S H, et al. The changing epidemiology of invasive fungal infections[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1508: 17-65.

[3] BROWN G D, DENNING D W, GOW N A, et al. Hidden killers: human fungal infections[J]. Sci Transl Med, 2012, 4(165): 165rv13.

[4] ENE I V, ADYA A K, WEHMEIER S, et al. Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen[J]. Cell Microbiol, 2012, 14(9): 1319-1335.

[5] SUN N, FONZI W, CHEN H, et al. Azole susceptibility and transcriptome profiling in *Candida albicans* mitochondrial electron transport chain complex I mutants[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(1): 532-542.

[6] THOMAS E, ROMAN E, CLAYPOOL S, et al. Mitochondria influence CDR1 efflux pump activity, Hog1-mediated oxidative stress pathway, iron homeostasis, and ergosterol levels in *Candida albicans*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(11): 5580-5599.

[7] BI S, LV Q Z, WANG T T, et al. SDH2 is involved in proper hypha formation and virulence in *Candida albicans*[J]. Future Microbiol, 2018, 13: 1141-1156.

[8] OYEDOTUN K S, LEMIRE B D. The quaternary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase. Homology modeling, cofactor docking, and molecular dynamics simulation studies[J]. J Biol Chem, 2004, 279(10): 9424-9431.

[9] HANS S, FATIMA Z, HAMEED S. Insights into the modulatory effect of magnesium on efflux mechanisms of *Candida albicans* reveal inhibition of ATP binding cassette multidrug transporters and dysfunctional mitochondria[J]. Biometals, 2021, 34(2): 329-339.

［收稿日期］ 2022-01-26　［修回日期］ 2022-06-23
［本文编辑］ 陈盛新

(上接第 301 页)

[16] DOUDNA J A. The promise and challenge of therapeutic genome editing[J]. Nature, 2020, 578(7794): 229-236.

[17] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823.

[18] JUNE C H, O'CONNOR R S, KAWALEKAR O U, et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer[J]. Science, 2018, 359(6382): 1361-1365.

[19] LUNDSTROM K. Viral vectors in gene therapy[J]. Diseases, 2018, 6(2): 42.

[20] ZEBALLOS D M A, GAJ T. Next-generation CRISPR technologies and their applications in gene and cell therapy[J]. Trends Biotechnol, 2021, 39(7): 692-705.

[21] TAGUCHI S, FUKUHARA H, TODO T. Oncolytic virus therapy in Japan: progress in clinical trials and future perspectives [J]. Jpn J Clin Oncol, 2019, 49(3): 201-209.

[22] 杨若南, 许丽, 徐萍, 等. RNA疗法产业发展态势分析及建议[J].中国生物工程杂志, 2021, 41(2): 162-171.

［收稿日期］ 2021-12-06　［修回日期］ 2022-07-06
［本文编辑］ 李睿旻