

论著·临床研究

ERK 信号通路在外阴道白假丝酵母菌对氟康唑耐药中的作用*

尹玉君¹, 李卫^{2△}, 陶纯刚³

(1. 镇江市丹徒区人民医院妇产科, 江苏 镇江 212000; 2. 江苏大学第四附属医院妇科, 江苏 镇江 212000; 3. 镇江市丹徒区人民医院检验科, 江苏 镇江 212000)

[摘要] 目的 探究细胞外信号调节蛋白激酶(ERK)信号通路抑制剂——PD98059 在逆转阴道白假丝酵母菌对氟康唑耐药中的作用。方法 选取 2020 年 8 月至 2021 年 9 月江苏大学第四附属医院门诊就诊的外阴道白假丝酵母菌病(VVC)患者 135 例, 取阴道分泌物行培养、鉴定、药敏试验等, 筛选出对氟康唑耐药的白假丝酵母菌。利用质量浓度为(0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 PD98059 作用于氟康唑耐药菌 24 h, 四甲基偶氮唑盐法检测菌株活性, 选出合适质量浓度的 PD98059 进行后续实验; 将实验菌株分为对照组、氟康唑组、PD 组和氟康唑+PD 组。使用胱天蛋白酶 3(Caspase-3)活性试剂盒检测 Caspase-3 的活化程度, 流式细胞术检测细胞内罗丹明 123 累积量, 实时荧光定量聚合酶链反应检测多药耐药基因 1(MDR1)mRNA 表达, 蛋白质印迹法检测 ERK 及磷酸化 ERK(p-ERK)蛋白表达。结果 135 例患者中分离出假丝酵母菌 131 株, 其中白假丝酵母菌 96 株(73.3%)。对氟康唑耐药的白假丝酵母菌 49 株(51.0%, 49/96)。与 PD98059 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 比较, 耐药菌细胞活性随 PD98059 质量浓度增高而下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组比较, PD 组、氟康唑+PD 组白假丝酵母菌 Caspase-3 活化程度、细胞内罗丹明 123 累积量均明显增高, 且氟康唑+PD 组白假丝酵母菌 Caspase-3 活化程度明显高于 PD 组, PD 组、氟康唑+PD 组均可明显下调白假丝酵母菌 MDR1 mRNA、p-ERK 的表达, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 白假丝酵母菌为 VVC 患者的主要病原体; 抑制 ERK 信号通路可增强 Caspase-3 活性, 促进耐药菌凋亡, 同时, 下调 MDR1 mRNA 表达, 可逆转阴道假丝酵母菌对氟康唑的耐药性。

[关键词] 外阴道白假丝酵母菌病; 白假丝酵母菌; 氟康唑; 耐药性; 多药耐药基因 1; ERK

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2025.08.010

中图法分类号: R379.4; R978.5

文章编号: 1009-5519(2025)08-1824-06

文献标识码: A

Role of ERK signaling pathway in fluconazole resistance in vulvovaginal candidiasis*

YIN Yujun¹, LI Wei^{2△}, TAO Chungang³

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Dantu District People's Hospital of Zhenjiang City, Zhenjiang, Jiangsu 212000, China; 2. Department of Gynecology, The Fourth Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212000, China; 3. Department of Laboratory Medicine, Dantu District People's Hospital of Zhenjiang City, Zhenjiang, Jiangsu 212000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway inhibitor PD98059 in reversing fluconazole resistance in vaginal Candida albicans. **Methods** A total of 135 patients with vulvovaginal candidiasis (VVC) who visited the outpatient department of the Fourth Affiliated Hospital of Jiangsu University from August 2020 to September 2021 were selected. Vaginal secretions were collected for culture, identification, drug sensitivity tests, etc., to screen out Candida albicans resistant to fluconazole. Fluconazole-resistant bacteria were treated with PD98059 at mass concentrations of (0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 hours. The activity of the strains was detected by the tetramethylazolium salt method, and the appropriate mass concentration of PD98059 was selected for subsequent experiments. The experimental strains were divided into the control group, the fluconazole group, the PD group and the fluconazole + PD group. The activation degree of Caspase-3 was detected using the Caspase-3 activity kit. The accumulation of rhodamine 123 in cells was detected by flow cytometry. The mRNA expression of multidrug resistance gene 1

* 基金项目: 镇江市社会发展项目(SH2023010)。

作者简介: 尹玉君(1986—), 硕士研究生, 主治医师, 主要从事阴道炎和生殖内分泌方面的研究。△ 通信作者, E-mail: xmliwei50885@163.com。

(MDR1) was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction. The protein expressions of ERK and phosphorylated ERK (p-ERK) were detected by Western blotting. **Results** Among the 135 patients, 131 strains of *Candida albicans* were isolated, including 96 strains (73.3%) of *Candida albicans*. A total of 49 strains (51.0%, 49/96) resistant to fluconazole. Compared with PD98059 at 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the cell activity of drug-resistant bacteria decreased with the increase of the mass concentration of PD98059, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the control group, the activation degree of Caspase-3 enzyme and the accumulation of rhodamine 123 in cells of *Candida albicans* in the PD group and the fluconazole + PD group were significantly increased, and the activation degree of Caspase-3 enzyme in *Candida albicans* in the fluconazole + PD group was significantly higher than that in the PD group. Both the PD group and the fluconazole + PD group could significantly down-regulate the expressions of MDR1 mRNA and p-ERK in *Candida albicans*, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** *Candida albicans* is the main pathogen of VVC. Inhibition of ERK signaling pathway can enhance Caspase-3 activity. Promote apoptosis of drug-resistant bacteria, meanwhile down-regulation of MDR1 mRNA expression, reversing the resistance of vaginal *Candida albicans* to fluconazole.

〔Key words〕 Vulvovaginal candidiasis; *Candida albicans*; Fluconazole; Drug resistance; Multi-drug resistance gene; ERK

外阴道假丝酵母菌病(VVC)是妇科常见的真菌性外阴道炎,也称为霉菌性阴道炎,是女性生殖系最常见的感染性疾病^[1]。白假丝酵母菌是人体内的正常寄居菌,同时,也是VVC的条件性致病菌,在人体免疫力低下时白假丝酵母菌异常增殖形成侵袭性,可引起VVC^[2]。VVC虽不危及生命,但会引起剧烈的瘙痒、疼痛、分泌物增多等阴道炎症,影响患者的夫妻生活。大约75%的女性在一生中会患1次VVC^[3]。目前,临床治疗的一线药物仍以唑类药物,特别是氟康唑为主^[4]。由于氟康唑治疗周期长、患者依从性差、临床应用广泛等原因其耐药率日益增加^[5]。

细胞外信号调节蛋白激酶(ERK)普遍存在于真核生物中,ERK信号通路异常激活可引起多种细胞增殖、分化和凋亡^[6],同时,ERK的活化可调控多种生物的耐药性^[7]。有研究发现,在假丝酵母菌中存在多种与ERK同源的蛋白^[8],其中白假丝酵母菌中与人ERK蛋白高度同源的假丝酵母菌ERK样激酶1是调控菌株生长、菌丝形成、侵袭性产生的关键因素^[9]。有研究表明,ERK基因转入真菌细胞中可明显促进菌丝的生长^[10]。但其对真菌耐药的调控目前尚不清楚。本研究采用ERK特异性抑制剂——PD98059阻断ERK信号通路,探讨了靶向调控ERK对白假丝酵母菌氟康唑耐药性的影响并分析了其潜在作用机制,旨在为VVC患者的治疗提供可能的新途径。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 菌株来源 选取2020年8月至2021年9月江苏大学第四附属医院门诊就诊的VVC患者135例,年龄21~56岁,病程1~8周。取阴道分泌物行

培养、鉴定、药敏试验等,筛选出对氟康唑耐药的白假丝酵母菌。本研究获江苏大学第四附属医院医学伦理委员会审批通过(伦理批号:202011)。

1.1.2 纳入标准 (1)有不同程度VVC临床症状;(2)氢氧化钾(KOH)溶液镜检涂片假丝酵母菌阳性;(3)对症状典型镜检阴性者接种沙保罗培养基(SDA)培养;(4)1周内未使用抗真菌药物;(5)已明确本研究目的和要求,且自愿参与。

1.1.3 排除标准 (1)未达到VVC临床诊断标准;(2)患有自身免疫性疾病、糖尿病等相关基础疾病。

1.1.4 主要试剂及仪器 SDA、酵母浸出粉胨葡萄糖(YPD)液体培养基购自青岛海博生物技术有限公司,二甲基亚砜购自南京生兴生物技术有限公司,质控白假丝酵母菌ATCC90028购自中国科学院微生物研究所,科玛嘉念珠菌显色培养基购自杭州驰成医药科技有限公司,KOH购自天津市科密欧化学试剂有限公司,四甲基偶氮唑盐(MTT)购自北京索莱宝科技有限公司,法国梅里埃真菌药敏试剂购自青岛源恒生物科技有限公司,胱天蛋白酶3(Caspase-3)活性试剂盒购自南京建成科技有限公司,罗丹明123购自德国默克公司,引物合成由安徽通用生物股份有限公司完成,PD98059购自上海碧云天生物技术股份有限公司,总RNA提取试剂盒购自江苏康为世纪生物科技有限公司,互补DNA(cDNA)逆转录试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司,荧光定量聚合酶链反应(PCR)反应试剂盒购自厦门生命互联科技有限公司,荧光PCR仪购自美国赛默飞世尔科技公司,兔抗酵母菌ERK、磷酸化ERK(p-ERK)一抗、小鼠抗GAPDH单克隆抗体均购自美国CST公司,辣根过氧化物酶羊抗兔免疫球蛋白G、羊抗鼠免疫球蛋白G二抗均购自武汉三鹰生物技术有限公司,放射免疫沉淀

法(RIPA)细胞裂解液购自北京普利莱基因技术有限公司,二喹啉甲酸检测法(BCA)蛋白定量试剂盒购自江苏康为世纪生物科技有限公司,化学发光成像系统购自上海伯乐生命医学产品有限公司。

1.2 方法

1.2.1 VVC 病原菌的培养、鉴定和药敏试验 阴道后穹隆取分泌物涂片,在标本中加入 10.0% KOH 溶液,镜下观察芽生孢子及假菌丝,分泌物接种于 SDA 培养基,37 ℃ 培养 48 h,观察菌落形态;取纯化 2 次后的单菌落接种在科玛嘉念珠菌显色培养基培养 24~48 h,观察菌落颜色进行鉴定。使用梅里埃真菌药敏试剂进行药敏试验:选取少许纯化后的白假丝酵母菌单菌落至 0.85% 氯化钠中,配置成 2 麦氏浓度(相当于 6×10^8 cfu/mL)菌悬液,吸取其中 135 μ L 菌悬液至装有 5 种常用抗真菌药的凹槽杯中,避光置于 37 ℃ 温箱湿化培养 24 h。肉眼观察杯槽中菌株生长状态与标准杯比较,评估记录生长分数。参照美国临床和实验室标准协会制定的 M100-S27 标准判读药敏检测结果。用白假丝酵母菌 ATCC90028 作为质控标准。

1.2.2 MTT 法测定 PD98059 对白假丝酵母菌细胞活性的影响 将处于对数期生长的氟康唑耐药白假丝酵母菌悬液离心后去上清液,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 2 次。用 YPD 液体培养基重悬,使菌终浓度为 1.0×10^7 cfu/mL,加入 96 孔板,各孔中分别加入 0、2、4、8、16、32、64 μ g/mL 的 PD98059 处理 24 h(每组 9 例)。分别在每个孔添加 20 μ L MTT(5 mg/mL)在常温下作用 3 h 后吸去培养液,PBS 冲洗 3 次吸去液体,再添加 100 μ L 二甲基亚砜,37 ℃ 摆床 20 min 充分混匀,检测波长 490 nm 下光密度(OD)值。白假丝酵母菌细胞活性(%)=(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照孔 OD 值-空白组 OD 值)×100%,检测各组菌株细胞活性,筛选出合适 PD98059 作用浓度进行后续实验。计算 10% 抑制浓度(IC_{10})。

1.2.3 实验分组 将氟康唑耐药白假丝酵母菌加入 YPD 液体培养基中振荡培养 16 h,使其处于对数期生长,离心去上清液,PBS 冲洗 2 次,将菌株细胞重悬于 YPD 液体培养基,调整菌液浓度至 1.0×10^7 cfu/mL,随机数字表法分为对照组(只含菌液)、氟康唑组(加氟康唑 8 μ g/mL)、PD 组(加 PD98059 8 μ g/mL)和氟康唑+PD 组(加氟康唑和 PD98059 各 8 μ g/mL),每组 9 例。加入的氟康唑、PD98059 均分别作用 24 h。

1.2.4 酶标仪测定白假丝酵母菌 Caspase-3 活化程度 根据 1.2.3 项进行实验分组后将白假丝酵母菌悬液离心,PBS 冲洗 3 次,吸去上清液,加裂解液冰浴裂解,4 ℃ 离心;取样加入 2 倍浓缩的反应液、裂解液、5 μ L 乙酰基-缬氨酸-天冬氨酸-缬氨酸-丙氨酸-天冬氨

酸-对硝基苯胺(Ac-DEVD-pNA),37 ℃ 孵育 4 h,观察颜色变化明显,检测 405 nm 波长下的 OD 值。白假丝酵母菌 Caspase-3 活化程度的相对值=(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照孔 OD 值-空白组 OD 值)。

1.2.5 流式细胞术检测白假丝酵母菌细胞内罗丹明 123 累积量的影响 根据 1.2.3 项进行实验分组后将各组白假丝酵母菌悬液与终浓度为 10 μ mol/L 的罗丹明 123,37 ℃ 孵 60 min 后离心弃上清液,用冰 PBS 洗涤 2 次,离心弃上清液。将白假丝酵母菌接种于 YPD 液体培养基,37 ℃ 培养 30 min。流式细胞仪检测各孔荧光强度,激发波长为 488 nm,发射波长为 530 nm,分析曲线荧光强度计算各组白假丝酵母菌细胞内罗丹明 123 累积量。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 检测白假丝酵母菌多药耐药基因 1(MDR1)mRNA 表达水平 根据 1.2.3 项进行实验分组后将白假丝酵母菌悬液离心取适量菌泥按总 RNA 抽提试剂(Trizol)说明提取 RNA,将其反转录为 cDNA,以 β -actin 为内参,PCR 反应体系 25 μ L:SYBR Green PCR Master Mix 12.5 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 上、下游引物各 1 μ L, 无核酸酶双蒸水 9.5 μ L。MDR1 上游引物: 5'-TTCAGTCGATGT-CAGAAAATG-3', 下游引物: 5'-TCCAAGCG-GCTAACCCA-3'; β -actin 上游引物: 5'-AATGGG-TAGGGTGGGAAAAC-3', 下游引物: 5'-AGC-CATTCCATTGATCGTC-3'。扩增条件: 预变性 95 ℃ 10 min、变性 95 ℃ 10 s、退火 58 ℃ 30 s、延伸 72 ℃ 30 s, 循环 40 次, 收集循环阈值; 记录每组样品的循环阈值, 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法测定各组白假丝酵母菌 MDR1 mRNA 相对表达水平。

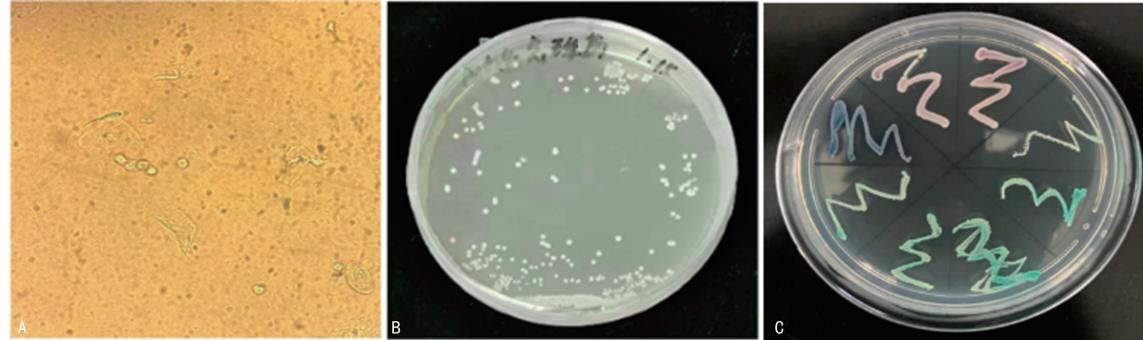
1.2.7 蛋白质印迹法检测 ERK 信号通路蛋白表达水平 根据 1.2.3 项进行实验分组后离心取适量白假丝酵母菌泥,洗涤后将菌液重悬,加入 RIPA 细胞裂解液,置入-20 ℃ 冰箱溶解 30 min,离心取上清液,使用 BCA 盒检测蛋白;蛋白加入上样缓冲液煮沸 5 min;采用聚丙烯酰胺凝胶电泳将蛋白转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,80 V 电泳 90 min,300 mA 转 PVDF 膜 90 min,使用 5% 脱脂牛奶溶液封闭 2 h,加入一抗 p-ERK 抗体(1:2 000)、ERK 抗体(1:1 000)、GAPDH 抗体(1:5 000),4 ℃ 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次;加入二抗羊抗兔(1:2 000)、羊抗鼠(1:2 000),室温孵育 1 h;采用增强化学发光成像技术及 Image J 软件测定条带密度值,并计算各组白假丝酵母菌蛋白相对表达量。

1.3 统计学处理 应用 SPSS25.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差、LSD-t 检验等。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 VVC 病原菌镜检、培养、鉴定、药敏试验情况

135 例患者分离出假丝酵母菌 131 株, 阴道分泌物涂片在 10% KOH 溶液下观察可见球状芽生孢子。见图 1A。阴道分泌物接种于 SDA 培养基可见假丝酵母菌为圆形、奶油状, 直径 1~3 mm 白色菌落。见图 1B。科玛嘉显色培养基判断翠绿色菌落为白假丝酵母菌, 紫红色菌落为光滑假丝酵母菌, 蓝灰色菌落为热带假丝酵母菌。



注: A 为 10% KOH 溶液镜下观察假丝酵母菌形态可见球状芽生孢子(400 \times); B 为 SDA 培养基上假丝酵母菌落; C 为科玛嘉培养基假丝酵母菌生长情况。

图 1 外阴道假丝酵母菌镜检、培养及鉴定情况

2.2 PD98059 对氟康唑耐药白假丝酵母菌细胞活性的影响 PD98059 4、8、16、32、64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组细胞活性与 PD98059 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。 IC_{50} 为 8.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 白假丝酵母菌细胞活性大于或等于 90%, 是对菌株细胞毒副作用小的安全剂量, 故选用 PD98059 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 用作后续实验。见图 2。

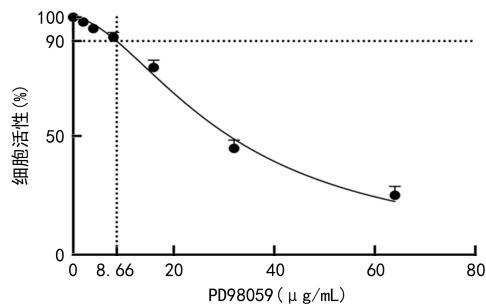


图 2 PD98059 对氟康唑耐药白假丝酵母菌细胞活性的影响

2.3 PD98059 单用及联合氟康唑对白假丝酵母菌 Caspase-3 活化程度的影响 氟康唑组白假丝酵母菌 Caspase-3 活化程度 (1.06 ± 0.09) 与对照组 (1.02 ± 0.04) 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); PD 组、氟康唑 + PD 组白假丝酵母菌 Caspase-3 活化程度均明显高于对照组, PD 组、氟康唑 + PD 组 Caspase-3 活化程度均明显高于氟康唑组, 氟康唑 + PD 组白假丝酵母菌 Caspase-3 活化程度明显高于 PD 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 PD98059 单用及联合氟康唑对白假丝酵母菌细胞内罗丹明 123 累积量的影响 氟康唑组白假丝酵母菌细胞内罗丹明 123 累积量 (666.67 ± 120.56) 与

母菌。131 株假丝酵母菌鉴定出自白假丝酵母菌 96 株 (73.3%), 光滑假丝酵母菌 19 株 (14.5%), 热带假丝酵母菌 9 株 (6.9%)。见图 1C。96 株白假丝酵母菌中对两性霉素 B 最敏感 [68.8% (66/96)], 对氟康唑敏感只有 35 株 (36.5%), 耐药 49 株 (51.0%)。

对照组 (564.22 ± 137.14) 比较, PD 组白假丝酵母菌细胞内罗丹明 123 累积量 (2250.67 ± 181.84) 与氟康唑 + PD 组 (2372.55 ± 260.63) 比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); PD 组、氟康唑 + PD 组白假丝酵母菌细胞内罗丹明 123 累积量 均明显高于氟康唑组, 氟康唑 + PD 组细胞内罗丹明 123 累积量 明显高于 PD 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3。

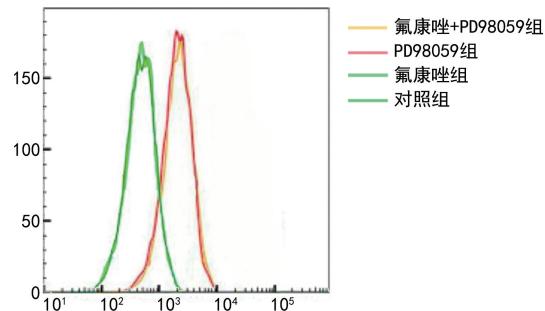


图 3 PD98059 单用及联合氟康唑对白假丝酵母菌细胞内罗丹明 123 累积量的影响

2.5 PD98059 单用及联合氟康唑对白假丝酵母菌 MDR1 mRNA 表达水平的影响 氟康唑组白假丝酵母菌 MDR1 mRNA 表达水平 (0.99 ± 0.07) 与对照组 (1.03 ± 0.09) 比较, PD 组白假丝酵母菌 MDR1 mRNA 表达水平 (0.74 ± 0.06) 与氟康唑 + PD 组 (0.71 ± 0.08) 比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); PD 组、氟康唑 + PD 组白假丝酵母菌 MDR1 mRNA 表达水平 均明显低于对照组、氟康唑组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.6 PD98059 单用及联合氟康唑对白假丝酵母菌 ERK 蛋白表达水平的影响 氟康唑组白假丝酵母菌 p-ERK 蛋白表达水平 (1.01 ± 0.02) 与对照组 (1.01 ± 0.02)

0.01) 比较, 氟康唑 + PD 组白假丝酵母菌 p-ERK 蛋白表达水平 (0.51 ± 0.04) 与 PD 组比较 (0.53 ± 0.04), 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); PD 组、氟康唑 + PD 组白假丝酵母菌 p-ERK 蛋白表达水平明显低于对照组、氟康唑组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4。

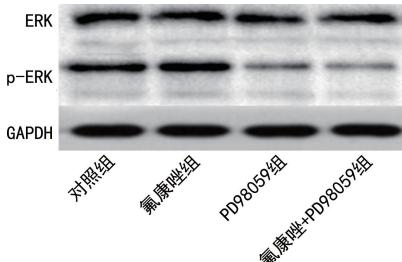


图 4 PD98059 单用及联合氟康唑对白假丝酵母菌 ERK 蛋白表达水平的影响

3 讨 论

VVC 是女性下生殖道最常见的感染性疾病, 因其对经典抗真菌药物——氟康唑耐药性的逐步上升, 增加了 VVC 的治疗难度^[11]。本研究结果显示, 白假丝酵母菌是 VVC 的主要病原菌, 其对氟康唑敏感性仅为 36.5%, 对两性霉素 B 敏感性最高, 达 68.8%, 与部分文献报道结果不一致^[12], 可能与实验菌株数量、来源, 以及药敏分析的方法不同有关。但本研究结果与已有的文献报道同时表明, 白假丝酵母菌对两性霉素 B 具有较高的敏感性, 后者可用于治疗顽固性真菌感染, 但不良反应广泛且严重, 可引起肾毒性、低钾血症、神经系统毒性等, 因此, 不能作为临床治疗 VVC 的一线抗真菌药物。因此, 提高白假丝酵母菌对氟康唑的敏感性对治疗 VVC 患者至关重要。

有研究发现, ERK 普遍存于真核细胞中, 与细胞生长、凋亡等有关, 同时, 参与了多种生物的耐药过程, ERK 激活可诱发肿瘤外排泵机制, 使肿瘤细胞获得性耐药, 引起细胞不可控生长, 导致对药物敏感性降低^[13]。既往研究提示, ERK 抑制剂可明显抑制烟曲霉菌及玉米大斑病菌孢子的萌发和菌丝生长的速度^[14-15], 表明 ERK 信号通路可能在真菌生长、增殖、凋亡过程中发挥作用。为探究 ERK 信号通路对氟康唑耐药白假丝酵母菌的影响本研究设置了浓度梯度检测 PD98059 对氟康唑耐药白假丝酵母菌细胞活性的影响, 结果显示, 菌株的细胞活性随 PD98059 质量浓度的增加而降低, 本研究为降低 PD98059 对菌株细胞的毒性作用计算到 IC_{10} 为 8.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 白假丝酵母菌细胞活性大于或等于 90%, 是对菌株细胞毒副作用少的安全剂量, 故选择 PD98059 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 进行后续研究。菌株细胞凋亡的增加对抑制菌株细胞生长具有重要意义, 菌株细胞的凋亡涉及重要的凋亡蛋白及相关通路, 线粒体呼吸对白假丝酵母菌生存具有重要作用, 活性氧可破坏线粒体呼吸功能, 诱导菌珠凋

亡^[16], 线粒体功能的丧失可激活 Caspase 的凋亡途径。Caspase 家族在介导假丝酵母菌细胞凋亡的启动和执行中具有重要作用, Caspase-3 是其主要的家族成员, 激活后通过剪裁多种底物蛋白, 引发下游级联反应, 导致细胞核 DNA 断裂和细胞死亡^[17]。本研究对凋亡的效应分子——Caspase-3 的活化程度进行了检测, 结果显示, 单独使用氟康唑对 Caspase-3 影响不明显, 单独使用 PD98059 和氟康唑 + PD98049 联用后 Caspase-3 的活化程度明显增高, 且氟康唑 + PD98049 联用后 Caspase-3 的活化程度高于单独使用 PD98059。据文献报道, 氟康唑可破坏白假丝酵母菌线粒体的膜电位, 导致线粒体功能损伤, 使细胞色素 C 从线粒体进入细胞质, 与凋亡蛋白激酶活因子结合成凋亡复合体, 启动执行 Caspase 凋亡途径^[18]。表明氟康唑 + PD98059 联用可协同促进耐药菌的凋亡。

药物外排功能的增强是白假丝酵母菌产生多药耐药的一个重要机制, 罗丹明 123 是白假丝酵母菌 MDR1 的荧光底物, 通过监测细胞内罗丹明 123 累积量可判断外排泵的功能状态^[19]。本研究结果显示, 单独使用氟康唑对白假丝酵母菌细胞内罗丹明 123 累积量无明显影响, 单独使用 PD98059 及联用氟康唑可明显增加白假丝酵母菌细胞内罗丹明 123 累积量, 进一步说明抑制 ERK 信号通路可降低耐药菌细胞 MDR1 外排泵活性。但氟康唑 + PD 组白假丝酵母菌细胞内罗丹明 123 累积量并未明显高于 PD 组, 表明氟康唑对药物外排基因 MDR1 的表达无明显影响。

MDR1 基因是膜转运蛋白超家族中的重要成员, 在多种生物耐药的过程中发挥关键作用。有研究表明, MDR1 基因在耐药白假丝酵母菌中的表达明显高于敏感菌株, 其通过减少细胞内的有效药物浓度参与调控白假丝酵母菌对唑类药物的耐药性^[20-21]。据文献报道, ERK 通过磷酸化促使肿瘤细胞 MDR1 基因启动子上游元件激活, 从而增加 MDR1 基因的表达, 将细胞内的药物泵出胞外, 产生耐药性^[22]。本实验通过选择 PD98059 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用于耐药菌, 保证菌株细胞的活性不低于 90%, 从而减少 PD98059 的对菌株的杀伤作用, 进一步探究了 ERK 的磷酸化和药物外排基因 MDR1 的内在联系及对氟康唑耐药性的影响, 结果显示, 单独使用氟康唑对 MDR1 mRNA、p-ERK 蛋白表达的影响不明显, 单独使用 PD98059 及联用氟康唑可明显下调 MDR1 mRNA、p-ERK 蛋白的表达, 提示 ERK 信号传导途径在氟康唑耐药的白假丝酵母菌中处于激活状态, 抑制 ERK 磷酸化可下调 MDR1 mRNA 的表达, 从而参与调节白假丝酵母菌对氟康唑的耐药性。据文献报道, ERK 的活化可通过调节应激反应、促进细胞生长增殖、抑制凋亡等作用加速耐药的进程^[23]。ERK 信号通路失活可能会导致白假丝酵母菌的药物外排泵及机体应激调节功

能的降低,减弱菌株的抗药性,从而使氟康唑对菌株细胞膜蛋白的靶位点作用增强,细胞内药物浓度增加,提高白假丝酵母菌对药物的敏感性。白假丝酵母菌对氟康唑耐药是由多个机制引起的,多种机制间存在交互关联,如药物外排泵的过度表达和应激反应等,但其各种机制之间何如作用仍需进一步探索。

综上所述,假丝酵母菌为 VVC 的主要病原菌,其对氟康唑的耐药率较高。通过 ERK 特异性抑制剂—PD98059 干预氟康唑耐药白假丝酵母菌可降低药物外排泵功能,促进菌株细胞的凋亡效应。PD98059、氟康唑联用可协同增强菌株细胞的凋亡作用,抑制菌丝的形成。二者间的协同效应可能与抑制耐药菌 ERK 信号通路、下调外排基因 MDR1 的表达、增加细胞内氟康唑有效抑菌浓度、提高氟康唑对耐药菌的敏感性有关,可为 VVC 患者的临床治疗提供有效的策略。

参考文献

[1] KSIEZOPOLSKA E, GABALDON T. Evolutionary emergence of drug resistance in candida opportunistic pathogens[J]. Genes, 2018, 9(9):461.

[2] 杨心茹,罗伟,邢丽枝,等.妊娠期念珠菌性阴道炎与不良妊娠结局关系的研究进展[J].中国真菌学杂志,2019,14(5):313-315.

[3] DENNING D W, KNEALE M, SOBEL J D, et al. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review[J]. Lancet Infect Dis, 2018, 18(11):e339-347.

[4] GHADDAR N, ANASTASIADIS E, HALIMEH R, et al. Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida albicans* causing vaginal discharge among pregnant women in Lebanon[J]. BMC Infect Dis, 2020, 20(1):32-36.

[5] 范琳媛,刘朝晖,白会会,等.中国 1 200 株外阴阴道假丝酵母菌病致病菌对 5 种常用抗真菌药物的耐药性和敏感性分析[J].中华妇产科杂志,2022,57(8):601-607.

[6] 柴冬亚,袁佳琪,周轶平. MAPK 信号通路影响肿瘤多药耐药的研究进展[J].中国新药杂志,2019,28(8):948-953.

[7] GUO Y J, PAN W W, LIU S B, et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis[J]. Exp Ther Med, 2020, 19(3):1997-2007.

[8] SUN Y, LIU W Z, LIU T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis[J]. J Recept Signal Transduct Res, 2015, 35(6):600-604.

[9] 周文婷,李琛妍,黄凯黎,等.白色念珠菌菌丝形成与黏附侵袭致病的调控机制研究[J].右江民族医学院学报,2022,44(5):744-748.

[10] ATIENZA J M, SUH M, XENARIOS I, et al. Human ERK1 induces filamentous growth and cell wall remodeling pathways in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. J Biol Chem, 2000, 275(27):20638-20646.

[11] PRISTOV K E, GHANNOUM M A. Resistance of *candida* to azoles and echinocandins worldwide[J]. Clin Microbiol Infect, 2019, 25(7):792-798.

[12] 李赛男,祁文瑾,黄蓉,等.复发性外阴阴道假丝酵母菌病药物敏感性与耐药基因表达的相关性分析[J].现代妇产科进展,2021,30(5):350-354.

[13] KONG X, KUILMAN T, SHAHRABI A, et al. Cancer drug addiction is relayed by an ERK2-dependent phenotype Switch[J]. Nature, 2017, 550(7675):270-274.

[14] 王崇伦.索拉非尼抗烟曲霉作用及机理的研究[D].济南:山东大学,2020.

[15] 范永山,谷守芹,董金皋,等.特异性 MEK 抑制剂 U0126 对玉米大斑病菌孢子萌发、附着胞产生和致病性的影响[J].中国农业科学,2006,39(1):66-73.

[16] CHO J, LEE D G. Oxidative stress by antimicrobial peptide pleurocidin triggers apoptosis in *Candida albicans* [J]. Biochimie, 2011, 93(10):1873-1879.

[17] 赵瑞杰,李引乾,王会,等. Caspase 家族与细胞凋亡的关系[J].中国畜牧杂志,2010,46(17):73-78.

[18] WU Z, WU Q F, YUAN W L, et al. Arthrocolins synergizing with fluconazole inhibit Fluconazole-Resistant *candida albicans* by increasing riboflavin metabolism and causing mitochondrial dysfunction and autophagy[J]. Microbiol Spectr, 2023, 11(2):e0405122.

[19] SUN L M, CHENG A X, WU X Z, et al. Synergistic mechanisms of retigeric acid B and azoles against *Candida albicans*[J]. J Appl Microbiol, 2010, 108(1):341-348.

[20] 张晓云,彭国林,姜利群.氟康唑耐药白色念珠菌 upc2 基因转录对 mdr1 转录的影响[J].海南医学,2019,30(1):22-24.

[21] 邓稀仁,黄孝天.白念珠菌多药耐药基因 CaMDR1 研究进展[J].中国人兽共患病学报,2017,33(9):837-840.

[22] MCCUBREY J A, STEELMAN L S, ABRAMS S L, et al. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance[J]. Adv Enzyme Regul, 2006, 46:249-279.

[23] 罗玉梅.细胞外信号调节激酶的研究进展[J].中国生物制品学杂志,2018,31(1):93-96.

(收稿日期:2024-11-21 修回日期:2025-04-01)