

STE12 α 基因对新生隐球菌形态学影响的初步研究

贾祎鹏¹ 朱红梅² 赵瑾² 温海²

(1. 解放军第 303 医院皮肤科, 南宁 530021; 2. 第二军医大学长征医院皮肤科, 上海 200003)

【摘要】 目的 研究 STE12 α 基因对新生隐球菌形态学的影响。方法 分别敲除血清 A 型和血清 B 型新生隐球菌菌株的 STE12 α 基因, 建立缺陷株, 再将 STE12 α 基因重新导入建立重建株。观察并比较野生株、STE12 α 基因缺陷株及重建株在体内、外孵育后菌落和菌落的形态学差异。**结果** STE12 α 基因缺陷株组形成的菌落明显偏少, 菌株直径偏小, 荚膜发育不良, 而重构株组这些方面的改变都得到了恢复。**结论** STE12 α 基因对新生隐球菌的形态学改变有着重要的影响, 可能直接影响其毒力。

【关键词】 新生隐球菌; STE12 α 基因; 毒力

【中图分类号】 R 379.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-3827(2010)06-0336-04

Effect of STE12 α -gene on the morphology of *Cryptococcus neoformans*

JIA Yi-Peng¹, ZHU Hong-Mei², ZHAO Jin², WEN Hai²

(1. Department of Dermatology, No. 303 Hospital of PLA, Nanning 530021, China; 2. Department of Dermatology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003)

【Abstract】 Objective To explore the effect of STE12 α -gene on the morphology of *Cryptococcus neoformans*. **Method** The STE12 α -gene was disrupted from *Cryptococcus neoformans* serotype A and serotype B to set up deficient strain. Then the gene was reconstituted into the allele locus of deficient strain. Morphological differences were studied *in vitro* and *in vivo*. **Results** Ste12 α mutant strain exhibited an obvious defect in colony quantity, colony diameter and capsular size but recovered by reconstitution. **Conclusion** STE12 α -gene play an important role in the morphology and virulence of *Cryptococcus neoformans*.

【Key word】 *Cryptococcus neoformans*; STE12 α gene; morphology; virulence

[Chin J Mycol, 2010, 5(6):336-339]

新生隐球菌是一种全球范围分布的条件性致病真菌, 多感染免疫功能低下的患者, 如 AIDS、器官移植患者等, 也可发生在免疫功能正常的人群, 是真菌性脑膜炎的主要致病菌。随着 AIDS、器官移植等免疫抑制患者的增多, 隐球菌病的发病率有增高的趋势^[1-2]。其毒力及致病机制也成为临床研究的热点。

新生隐球菌是异宗交配的个体, 其 MAT 位点除控制着菌株的性发育、繁殖过程, 也可能与菌体

入侵宿主细胞后的生物性状和行为学改变有关。而 MAT α 菌株在临床和环境分离株中均占明显优势地位, 且较 MAT α 型菌株的毒力更强^[3-4]。目前研究认为 MAT 位点中有约 20 个可能的功能基因, 它们相互之间位置相邻, 表达配合十分紧密, 在转录过程中表现出高度的相关性。本文以 MAT 位点中的 STE12 α 基因为研究对象, 对该基因在体外及动物模型中对新生隐球菌形态学及毒力的影响进行初步研究^[5]。

1 材料和方法

1.1 菌株

新生隐球菌比利时标准株 BLS71, 来自中国医

基金项目: 国家自然科学基金 (30500441, 30670118).
作者简介: 贾祎鹏, 男 (汉族), 硕士, 主治医师. E-mail: jyplg855@sina.com
通讯作者: 朱红梅, E-mail: hmzhu_cn@yahoo.com.cn; 温海, E-mail: wenhai98@sohu.com

学真菌保藏管理中心隐球菌专业实验室。为血清型 A 型。原始株命名为 B₀ 株, 将 B₀ 株 STE12 α 基因敲除后制成缺陷株, 命名为 B_D 株, 再将 STE12 α 基因重新导入缺陷株中制成重建株, 命名为 B_R 株^[6]。

临床分离株 G001, 分离自临床隐球菌感染患者, 血清型 B 型 (现血清型 B、C 型为格特隐球菌)。原始株命名为 G₀ 株, 将 G₀ 株 STE12 α 基因敲除后制成缺陷株, 命名为 G_D 株, 再将 STE12 α 基因重新导入缺陷株中制成重建株, 命名为 G_R 株^[6]。

1.2 实验动物及分组

C₅₇BL/6 雌性小鼠, 购自中科院实验动物中心, 体重 24 g \pm 3 g, 随机分为 G₀、G_D、G_R、B₀、B_D、B_R 等 6 组, 每组 12 只。

1.3 方法

菌悬液的配制 G₀、G_D、G_R、B₀、B_D、B_R 各组隐球菌接种于沙氏试管培养基, 37 $^{\circ}$ C 温箱中培养 3 d。以无菌生理盐水稀释、吸取菌液; 镜下血细胞计数板计数, 最终配成终浓度为 5×10^6 CFU/mL 的新生隐球菌生理盐水悬液。

体外培养 无菌条件下分别取各组隐球菌新鲜配制的菌悬液各 0.2 mL 涂布于直径 8.5 cm 的沙氏平皿培养基 (SDA), 37 $^{\circ}$ C 温箱中培养 2 周。

动物模型的制备 各组 C₅₇BL/6 小鼠均先腹腔注射 200 mg/kg 剂量的环磷酰胺溶液进行免疫抑制; 3 d 后经尾静脉注射新鲜配制的各组菌悬液 0.2 mL, 室温常规分隔饲养。

C₅₇BL/6 小鼠在接种菌悬液 24 h 后处死, 每组分别取脑、肺组织各 0.25 g 匀浆后涂布于直径 8.5 cm 的沙氏培养皿, 37 $^{\circ}$ C 培养。于培养第 48 h 时观察菌落生长情况, 计数菌落数, 量取其中 20 个菌落的直径; 于培养第 72 h 时分别取样制成墨汁涂片在显微镜下观察比较其荚膜的生长情况。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件对不同组别菌落计数、直径数据进行 q 检验, $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

2 结 果

2.1 体外培养结果

G₀、G_D、G_R 3 组中, G_D 组培养皿上的菌落直径在 72 h 及 2 周时均明显小于 G₀ 及 G_R 组, 后两者之间无显著差异 (见图 1)。

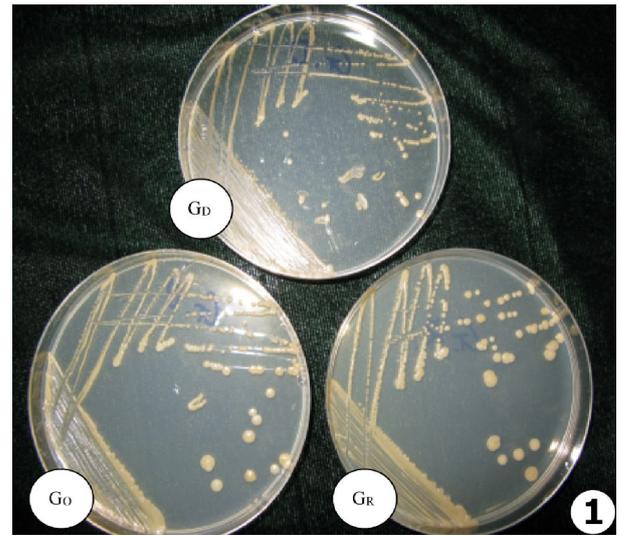


图 1 G₀、G_D、G_R 各组菌悬液 SDA 培养 2 周时的菌落

Fig. 1 G₀, G_D, G_R on SDA after 2-week culture

体外接种于培养皿 B₀、B_D、B_R 3 组间的培养菌落直径在 72 h 及 2 周时均未见显著差异。

2.2 对小鼠脑组织和肺菌荷量的影响

6 组小鼠的脑和肺组织匀浆后都出现了菌落生长, G_D 组和 B_D 组各时相点的菌落数量明显偏少 (见表 1)。

2.3 对不同组别脏器中菌落生长的影响

6 组小鼠的脑组织和肺组织匀浆后都出现了菌落生长, 但两个缺陷株组 G_D 和 B_D 形成的菌株直径明显小于原始株组和重建株组, 差异有显著意义 ($P < 0.05$, 见表 1)。

2.4 STE12 α 基因对新生隐球菌荚膜生长的影响

注射菌悬液 24 h 后取脑组织和肺组织, 匀浆培养 72 h 后, 取培养菌落制备墨汁涂片。新生隐球菌血清型 A 型和 B 型的各组菌均可见到菌体周围荚膜生长, 原始株形成的荚膜较为宽大, 两个缺陷株形成的荚膜明显变薄, 发育不良。脑组织匀浆培养物中, G_D 和 B_D 组的荚膜狭小, 较各自的原始株和重构株荚膜大小的差异尤为明显 (见图 2、3)。

3 讨 论

新生隐球菌是一种机会致病真菌, 感染机体后, 宿主内环境的改变, 如: 温度、pH 值、氧化酶、渗透压的改变等, 都会迫使真菌病原体作出相应的生长、分化及繁殖方式的调整。有研究证明, 有丝分裂原活化蛋白激酶级联放大系统 (Mitogen-activated

表 1 接种菌悬液 24 h 取材的 C₅₇BL/6 小鼠脑、肺组织经体外培养 48 h 的结果

Tab.1 Brain and lung of C₅₇BL/6 mice cultured for 48 hours after strain inoculation

组别	脑组织		肺组织	
	菌落计数 (个)	菌落直径 (mm)	菌落计数 (个)	菌落直径 (mm)
B ₀	146	1.52 ± 0.52	1 406	1.12 ± 0.23
B _D	38	0.99 ± 0.51	816	0.38 ± 0.17
B _R	40	1.64 ± 0.31	2 040	0.62 ± 0.21
G ₀	119	1.75 ± 0.49	32	1.37 ± 0.24
G _D	65	0.82 ± 0.20	24	0.69 ± 0.20
G _R	107	1.95 ± 0.69	70	1.27 ± 0.27

注:经 q 检验,各血清型的组间,原始株及重建株组的菌落数、菌落直径均大于缺陷株组,有统计学意义 (P < 0.05)

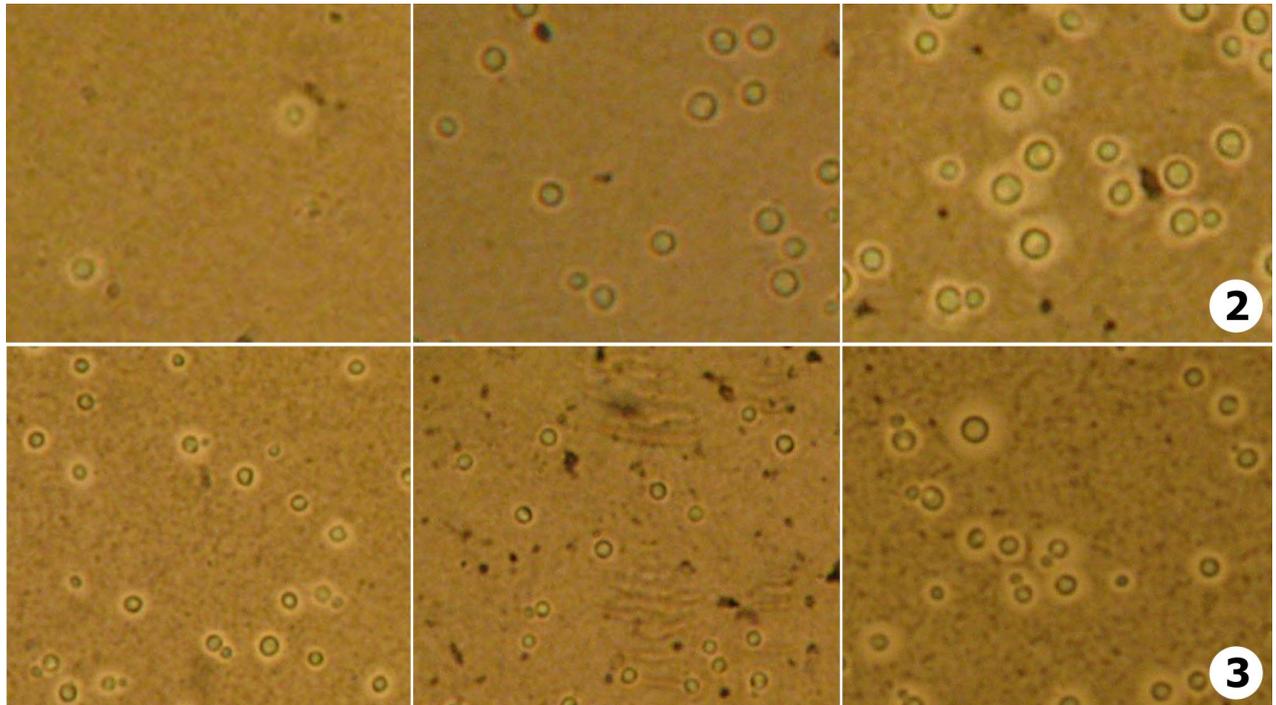


图 2 C₅₇BL/6 小鼠模型脑组织匀浆培养 72 h 菌落墨汁涂片结果 (从左至右分别为 B₀、B_D、B_R组) 图 3 小鼠模型脑组织匀浆培养 72 h 菌落墨汁涂片结果 (从左至右分别为 G₀、G_D、G_R组)

Fig. 2 Microscopy: brain of C₅₇BL/6 mice cultured for 72 hours (from left to right: group B₀, B_D, B_R) Fig. 3 Microscopy: brain of C₅₇BL/6 mice cultured for 72 hours (from left to right: group G₀, G_D, G_R)

protein kinase, MAPK) 通路对调节酿酒酵母、白念珠菌等真菌的生长、分化方式起着重要的作用,并影响到某些已知毒力因子的表达。而包括 STE12 及其相应编码蛋白等在内的 STE 家族,在其中重要的交配信息素-MAPK 通路的不同环节起着信号

传导因子的作用^[7-8]。MAT 位点内的 STE12 基因,是否会类似其在其他真菌中同源物,影响新生隐球菌的毒力因子,如:荚膜、37℃ 生长、黑素、胞外蛋白酶等,尚有待研究。

本实验选用血清型 A 型和 B 型的 2 种菌株为

代表,对 STE12 α 基因在体外及动物模型中对新生隐球菌形态学及毒力的影响进行初步研究。

两型菌株在敲除了 STE12 α 基因后在小鼠体内的生长都受到了明显的影响,STE12 α 基因缺陷株在主要感染脏器脑和肺组织的菌荷量均小于原始株,而且在培养基上形成的菌落直径也明显偏小,明显处于一种生长不良的状态,对小鼠的侵袭力也大大降低,当我们将敲除的 STE12 α 基因重新导入缺陷株后,菌株的生长能力,即侵袭力明显得到了恢复,说明 STE12 α 基因在调节隐球菌在小鼠体内生长起重要作用。

对比不同组别的隐球菌形成的荚膜,原始株形成的荚膜较为宽大,两个 STE12 α 基因缺陷株形成的荚膜明显变薄,发育不良,荚膜是隐球菌重要的致病因子之一,缺乏发育良好的荚膜这也是缺陷株毒力低下的原因之一。1999 年 CHANG YC 等^[9] 人研究发现 STE12 α 基因在 D 型菌株中,能明显上调 CAP10 基因的表达,而 CAP10 基因是决定荚膜生长发育的重要基因。本实验观察到的结果也经动物实验得到验证。

我们的初步研究表明,STE12 α 基因对某些血清型的新生隐球菌在体外 37 $^{\circ}$ C 生长可能具有影响,对体内的菌落生长以及荚膜形成具有较大的影响,可能直接影响到菌株的毒力及其致病性。新生隐球菌的 STE12 α 基因及其编码蛋白如何影响菌体在宿主体内的生长分化和繁殖过程,是否还影响其他毒力因子,还有待于后续的深入研究。

参 考 文 献

- [1] 廖万清,吴绍熙. 真菌病研究进展[M]. 上海:第二军医大学出版社,1998:95-105.
- [2] 赵辨. 临床皮肤病学[M]. 南京:江苏科学出版社,2001:583-587.
- [3] Kwong-Chung KJ, Bennett JE. Distribution of α and alpha mating types of *C. neoformans* among natural and clinical isolates [J]. Am J Epidemiol, 1978, 108:337-340.
- [4] Kwong-Chung KJ, Edman JC, Wickes BL. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans* [J]. Infect Immun, 1992, 60(2):602-605.
- [5] 贾祎鹏,朱红梅,温海. 新生隐球菌交配型的研究进展[J]. 中国真菌学杂志,2008; 3(6): 381-384.
- [6] 朱红梅,娄永华,贾祎鹏,温海. 新生隐球菌 STE12 α 基因的克隆及表达载体的构建[J]. 中国真菌学杂志,2009, 4(1):13-15.
- [7] Roberts RL, Fink GR. Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth [J]. Genes and Development, 1994, 8(24): 2974-2985.
- [8] Roman E, Arana DM, Nombela C, et al. MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence [J]. Trends Microbiol, 2007, 15(4):81-90.
- [9] Chang YC, Kwon-Chung KJ. Isolation, characterization, and localization of a capsule-associated gene, CAP10, of *Cryptococcus neoformans* [J]. J Bacteriol, 1999, 181(9):5636-5643.

[收稿日期] 2010-11-05

[本文编辑] 王 飞

欢迎订阅《中国真菌学杂志》

《中国真菌学杂志》是由国家新闻出版总署批准出版发行的高级医学学术期刊,由上海长征医院主办,现已被“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”收录。

本刊主要报道我国真菌学特别是医学真菌学的最新研究进展,内容涉及基础医学及临床医学中的大部分专业,以从事皮肤、感染、血液、呼吸、器官移植、肿瘤、急救、创伤、检验等与真菌感染专业有关的中高级医务人员、研究人员及从事微生物学、分子生物学及药学等基础研究的研究人员为主要读者群,是真菌学工作者之间交流的窗口和平台。辟有:专家论坛、论著、论著摘要、技术和方法、学术讲座、继续医学教育、综述、真菌病治疗和疑难病例分析等栏目。

本刊为双月刊,大 16K,铜版纸彩色印刷,每期定价 9.8 元,全年共 58.8 元。可在当地邮局订阅(邮发代号 4-799),漏订者可来函本刊编辑部办理邮购。地址:上海市凤阳路 415 号《中国真菌学杂志》编辑部 邮编:200003 联系人:王飞 电话:021-81885496 传真:021-81885497 电子信箱:zgjzjzz@126.com