

# 热带假丝酵母菌临床分离株毒力表型特征研究

于栓宝 李文革 车洁 边富宁 卢金星 吴媛

**【摘要】** 目的 描述临床分离的热带假丝酵母菌培养不同时间的天冬氨酰蛋白酶活性(蛋白酶活性)、磷脂酶活性和溶血活性,并分析不同感染部位分离菌的蛋白酶活性和溶血活性差异。**方法** 将分离自不同感染部位的热带假丝酵母菌鉴定后分别接种在牛血清蛋白培养基、卵黄琼脂培养基和羊血琼脂培养基上,培养不同时间(24、48和72 h)后检测蛋白酶活性、磷脂酶活性和溶血活性。**结果** 热带假丝酵母菌培养24、48和72 h时均具有蛋白酶活性和溶血活性,但未表现出磷脂酶活性;热带假丝酵母菌在48和72 h时的蛋白酶活性高于其在24 h时的活性,在72 h范围内,溶血活性随培养时间延长持续增长;分离自不同感染部位的热带假丝酵母菌的蛋白酶活性( $P=0.368$ )和溶血活性( $P=0.985$ )差异无统计学意义。**结论** 我国热带假丝酵母菌临床分离株培养不同时间具有蛋白酶活性和溶血活性,但无磷脂酶活性。

**【关键词】** 热带假丝酵母菌;毒力因子;天冬氨酰蛋白酶;磷脂酶;溶血活性

**Study on virulence factors of *Candida tropicalis* isolated from clinical samples** Yu Shuanbao, Li Wenge, Che Jie, Bian Funing, Lu Jinxing, Wu Yuan. State Key Laboratory for Communicable Diseases Prevention and Control, Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China  
Corresponding author: Wu Yuan, Email: wuyuan@icdc.cn

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 81301409) and National Science and Technology Major Project of China (No. 2013ZX10004203-002).

**【Abstract】 Objective** To determine the in vitro production of virulence factors for *Candida (C.) tropicalis*, including aspartyl proteinases, phospholipases and hemolytic activities, describe the regulation of virulence factors varying with time in *C. tropicalis*, and analyze the differences in aspartyl proteinases and hemolytic activities of *C. tropicalis* isolated from anatomically distinct sites. **Methods** A total of 64 *C. tropicalis* strains were spot-inoculated onto bovine albumin agar, egg yolk agar and sheep blood agar plates, respectively. Then the plates were incubated for 24, 48 and 72 hour at 37 °C, respectively. The aspartyl proteinases, phospholipase and hemolytic activities were determined at each time point, respectively. **Results** All the *C. tropicalis* isolates showed positive aspartyl proteinases and hemolytic activities at each time point, but no phospholipases activity was detected in *C. tropicalis*. On comparison of aspartyl proteinases and hemolytic activities at different time points, aspartyl proteinases activity at 48 and 72 hour was higher than that at 24 hour. During 72 hour, hemolytic activity of *C. tropicalis* increased. No statistical significant differences in aspartyl proteinases and hemolytic activities of *C. tropicalis* were observed among different infection sites ( $P=0.368$  and  $0.985$ ). **Conclusion** The *C. tropicalis* clinical isolates in China have aspartyl proteinases activity, hemolytic activity, but have no phospholipase activity.

**【Key words】** *Candida tropicalis*; Virulence factors; Aspartyl proteinases; Phospholipases; Hemolytic activity

随着免疫功能不全、长期住院患者、实施侵袭

性检查和治疗人数的增多,假丝酵母菌已成为一种重要的机会致病菌<sup>[1]</sup>,可引起浅表和/或侵袭性感染<sup>[2-4]</sup>。尽管感染主要由白假丝酵母菌导致,但近年来由非白假丝酵母菌引起的侵袭性真菌感染率逐年上升,而热带假丝酵母菌是最流行的致病性非白假丝酵母菌之一<sup>[5]</sup>。研究表明假丝酵母菌的致病性与一系列毒力因子有关,包括天冬氨酰蛋白酶活性

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.10.027

基金项目:国家自然科学基金(81301409);国家科技重大专项(2013ZX10004203-002)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所  
传染病预防控制国家重点实验室 感染性疾病诊治协同中心

通信作者:吴媛, Email: wuyuan@icdc.cn

(蛋白酶活性)、磷脂酶活性和溶血活性等。目前,国内外关于假丝酵母菌毒力表型特征研究多集中于白假丝酵母菌,而关于热带假丝酵母菌毒力因子的研究仍不清楚。国内热带假丝酵母菌的分子型别与国外存在差异,形成3个独立的克隆群<sup>[6]</sup>。有必要对中国临床分离的热带假丝酵母菌毒力表型特征进行研究。本研究将对热带假丝酵母菌的蛋白酶、磷脂酶和溶血活性开展研究。

## 材料与方法

1. 实验菌株:收集热带假丝酵母菌临床株64株,均来自中日友好医院。菌株分离自8个感染部位:血液( $n=1$ )、尿道( $n=3$ )、排泄物( $n=5$ )、前列腺分泌物( $n=1$ )、脓液( $n=1$ )、痰液( $n=31$ )、咽拭子( $n=3$ )、尿液( $n=10$ )、阴道分泌物( $n=4$ )和标本来源未知( $n=5$ )。菌株经念珠菌 API AUX 20C (bioMérieux) 生化鉴定和转录间隔区 (Internal Transcribed Spacer, ITS) 测序鉴定为热带假丝酵母菌。质控菌株为热带假丝酵母菌 ATCC750 和白色假丝酵母菌 ATCC753, 均购买自美国模式培养物集存库(ATCC)。实验菌株用脑心浸液(英国 Oxoid 公司)-80 °C 保存。

2. 菌悬液制备:将待测热带假丝酵母菌接种于 SDA 培养基上, 25 °C 孵育 48 h, 挑取单克隆继续接种于 SDA 培养基上, 37 °C 孵育 24 h。收集菌株, 用 PBS 洗 3 次, 制成 PBS 菌悬液。将制好的菌悬液分别接种到含特定酶底物的平板(牛血清蛋白、卵黄琼脂和羊血琼脂培养基)上, 测定其水解酶活性<sup>[7]</sup>。

### 3. 酶活性测定:

(1) 蛋白酶活性测定:将菌悬液浓度调至  $1 \times 10^8$  CFU/ml ( $A_{490}=2.5$ ), 用微量移液器吸取 5  $\mu$ l 菌悬液点接种到牛血清蛋白培养基上, 在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24、48 和 72 h 后, 分别测定其菌落直径和(菌落+沉淀环)直径。用 PrZ 表示蛋白酶活性,  $PrZ = \text{菌落直径} / (\text{菌落} + \text{沉淀环}) \text{直径}$ 。

(2) 磷脂酶活性测定:将菌悬液浓度调至  $1 \times 10^8$  CFU/ml ( $A_{490}=2.5$ ), 用微量移液器吸取 5  $\mu$ l 菌悬液点接种到卵黄琼脂培养基上, 在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24、48 和 72 h 后, 分别测定其菌落直径和(菌落+沉淀环)直径。用 PhZ 表示其磷脂酶活性,  $PhZ = \text{菌落直径} / (\text{菌落} + \text{沉淀环}) \text{直径}$ 。

(3) 溶血活性测定:将菌悬液浓度调至  $1 \times 10^7$  CFU/ml ( $A_{490}=1.3$ ), 用微量移液器吸取 10  $\mu$ l 菌悬液点接种到羊血培养基上, 在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 条件

下培养 24、48 和 72 h 后, 分别测定其菌落直径和(菌落+溶血环)直径。用 HZ 表示其溶血活性,  $HZ = \text{菌落直径} / (\text{菌落} + \text{溶血环}) \text{直径}$ 。

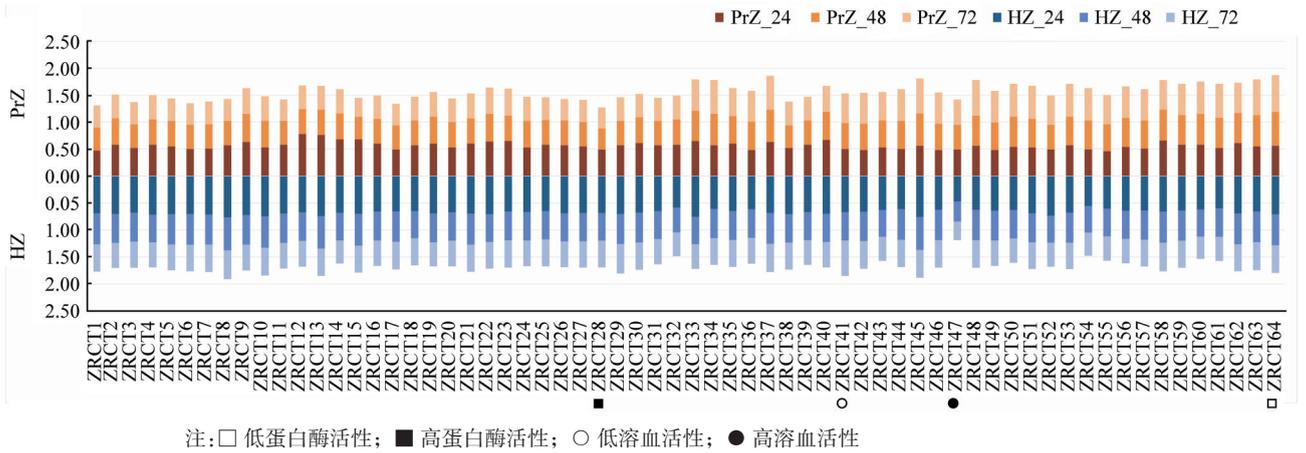
(4) 毒力表型特征分级:主要参考 Galán-Ladero 的分级标准<sup>[7]</sup>。PrZ、PhZ 和 HZ 统一用 PZ 表示。PZ < 0.41 表示高毒力活性;  $0.41 \leq PZ < 0.61$  表示中等毒力活性;  $0.61 \leq PZ < 1.00$  表示低毒力活性; PZ = 1.00 表示无毒力活性。

4. 统计学分析:采用 SPSS 22.0 软件进行统计学处理, 采用频数、M 和四分位数间距进行统计学描述, 采用 Kruskal-Wallis H 检验和 Friedman M 检验进行多组资料间的比较, 采用 Bonferroni 法进行两两比较。检验水准为  $\alpha=0.05$ 。

## 结果

1. 热带假丝酵母菌的蛋白酶活性、磷脂酶活性和溶血活性随时间变化规律:64 株热带假丝酵母菌在 37 °C 条件下, 孵育 24、48 和 72 h 后, 均表现出蛋白酶和溶血活性(图 1), 但未能检测到磷脂酶的分泌。以 PrZ 为比较指标(PrZ 值越小, 蛋白酶活性越强), 有 35 株(54.7%)热带假丝酵母菌在 72 h 之内随时间延长, 蛋白酶活性增强; 17 株菌(26.6%)的蛋白酶活性在 72 h 之内随时间增长, 酶活性减弱; 其余(18.8%)菌株的酶活性在 48 h 之内随时间增长, 酶活性增强, 随后随时间延长, 酶活性逐渐减弱(图 1 和图 2)。以 HZ 为比较指标(HZ 值越小, 溶血活性越强), 在 72 h 内, 热带假丝酵母菌(除 1 株, ZRCT17)的溶血活性均随时间延长而增强(图 1 和图 2)。经统计学 Friedman M 检验, 热带假丝酵母菌在不同时间点的天冬氨酸蛋白酶和溶血活性差异有统计学意义(均  $P=0.000$ )。用 Bonferroni 法进行两两比较, 热带假丝酵母菌在 24 h 时的蛋白酶活性低于其在 48 和 72 h 时的活性(均  $P=0.000$ ), 而 48 和 72 h 时的蛋白酶活性差异无统计学意义( $P=0.295$ ); 热带假丝酵母菌在 48 和 72 h 时的溶血活性高于 24 h 时的溶血活性(均  $P=0.000$ ), 72 h 时的溶血活性高于 48 h 时的溶血活性( $P=0.000$ )。

2. 热带假丝酵母菌的蛋白酶活性和溶血活性:以 48 h 时的蛋白酶活性作为衡量热带假丝酵母菌蛋白酶活性的指标, 多数(96.88%)菌株表现出中等蛋白酶活性(表 1), 各有 1 株(1.56%)热带假丝酵母菌表现为低蛋白酶(ZRCT64)和高蛋白酶活性(ZRCT28), 见图 1。热带假丝酵母菌在 48 h 时表现出的低、中和高蛋白酶活性, 见图 2。



注: □ 低蛋白酶活性; ■ 高蛋白酶活性; ○ 低溶血活性; ● 高溶血活性

图 1 热带假丝酵母菌在不同时间点(24、48 和 72 h)的蛋白酶活性和溶血活性

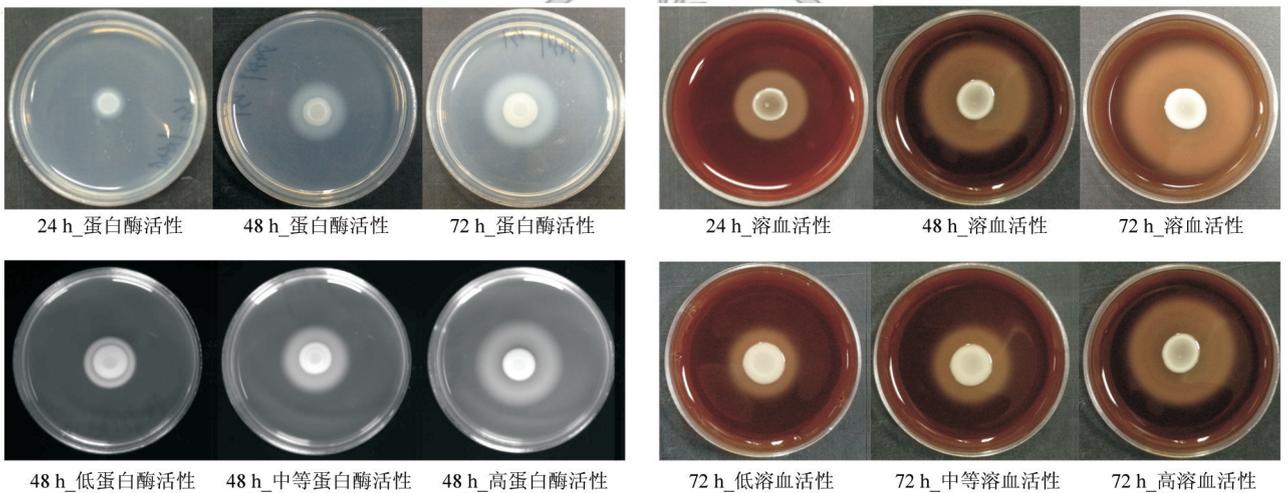


图 2 热带假丝酵母菌不同时间点的蛋白酶和溶血活性及其分级

表 1 热带假丝酵母菌在不同时间点的天冬氨酰蛋白酶、磷脂酶及溶血活性分级

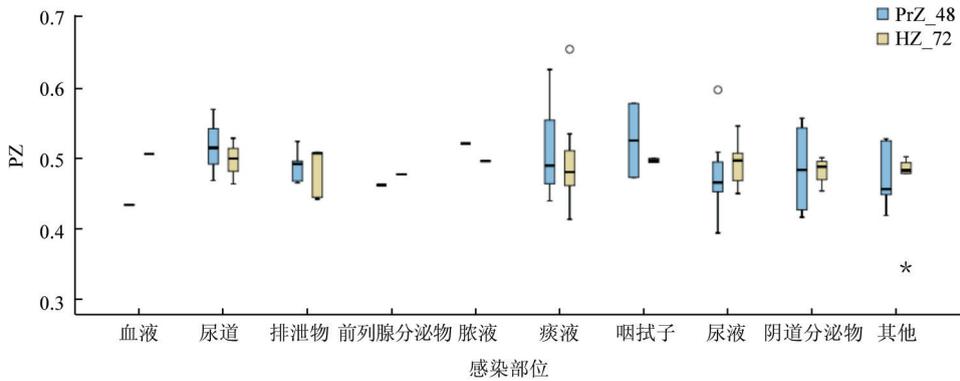
酶活性分级	PZ 指数	热带假丝酵母菌培养时间(h)		
		24	48	72
<b>蛋白酶活性</b>				
无	1.00	0	0	0
低	0.61 ~ 1.00	11(17.19)	1(1.56)	8(12.50)
中	0.41 ~ 0.61	53(82.81)	62(96.88)	49(89.06)
高	<0.41	0	1(1.56)	7(10.94)
<b>磷脂酶活性</b>				
无	1.00	64(100.00)	64(100.00)	64(100.00)
低	0.61 ~ 1.00	0	0	0
中	0.41 ~ 0.61	0	0	0
高	<0.41	0	0	0
<b>溶血活性</b>				
无	1.00	0	0	0
低	0.61 ~ 1.00	59(92.19)	1(1.56)	1(1.56)
中	0.41 ~ 0.61	5(7.81)	62(96.88)	62(96.88)
高	<0.41	0	1(1.56)	1(1.56)

注: 括号外数据为菌株数, 括号内数据为百分率(%)

以 72 h 时的溶血活性作为衡量热带假丝酵母菌溶血活性的指标, 96.88% 的热带假丝酵母菌均表现出中等溶血活性(表 1), 分别有 1 株(1.56%)热带假丝酵母菌表现出低溶血活性和高溶血活性, 相应菌株编码为 ZRCT41 和 ZRCT47(图 1)。热带假丝酵母菌在 72 h 时的低、中和高溶血活性见图 2。

3. 分离自不同感染部位的热带假丝酵母菌蛋白酶活性和溶血活性比较: 蛋白酶活性最强的热带假丝酵母菌(ZRCT28)是尿液分离株(PrZ=0.394), 表现为高蛋白酶活性; 最弱(ZRCT64)的来自痰液标本(PrZ=0.626), 表现为低蛋白酶活性。在已知标本来源的样本中, 溶血活性最强和最弱的热带假丝酵母菌均来自痰液标本, HZ 分别为 0.414 和 0.655, 相应菌株编码为 ZRCT60 和 ZRCT41, 在该研究中溶血活性最强的热带假丝酵母菌 ZRCT47(HZ=0.344)未能收集到其感染部位(图 3)。

本研究中样本来源最多的是痰液(31 份), 占有所有标本来源的 48.4%, 其次为尿液(共 10 份), 占



注：“箱体”部分的上下两端表示上四分位数( $P_{75}$ )和下四分位数( $P_{25}$ )；“箱体”的大小表示四分位数间距；上下两条“触须”表示扣除异常值之外的最大值和最小值；“o”表示大于1.5倍四分位数间距的数值；“\*”表示大于3倍四分位数间距的数值；“-”代表该部位菌株数太少

图3 不同感染部位热带假丝酵母菌的蛋白酶活性和溶血活性

15.6%，其他感染部位的标本均较少。痰液样本分离的热带假丝酵母菌的 PrZ  $M=0.490$ ，尿液样本来源菌株 PrZ  $M=0.466$ ，经两组独立样本比较的秩和检验，差异无统计学意义 ( $P=0.119$ )，见图3；痰液和尿液标本的 HZ  $M$  分别为 0.481 和 0.497，两者较相近 (图3)。经 Kruskal-Wallis  $H$  检验，未发现分离自不同感染部位的热带假丝酵母菌的 PrZ 和 HZ 差异有统计学意义 ( $P=0.368$  和  $0.985$ )，见图3。

### 讨 论

天冬氨酰蛋白酶通过扰乱宿主的黏膜功能，降解其免疫蛋白和结构蛋白而促进热带假丝酵母菌在宿主内的定植和侵袭<sup>[4,8-9]</sup>。现有研究测量假丝酵母菌蛋白酶活性的时间点并未统一，多集中在 24、48、72 和 96 h<sup>[3-4,10-12]</sup>，这些研究显示，热带假丝酵母菌蛋白酶活性在 48 h 时达到最大，因此本研究选用 48 h 作为测量热带假丝酵母菌蛋白酶活性的时间节点。本研究中，热带假丝酵母菌均表现出蛋白酶活性，与 Galán-Ladero 等<sup>[7]</sup>的研究结果保持一致；而 Tellapragada 等<sup>[13]</sup>和 Deorukhkar 等<sup>[10]</sup>的研究中只发现部分菌株表现出蛋白酶活性。本研究结果显示多数热带假丝酵母菌 (98.66%) 表现为中等蛋白酶活性，各有 1 株表现为低蛋白酶活性和高蛋白酶活性。而在其他一些研究中热带假丝酵母菌的蛋白酶活性较低，如 Galán-Ladero 等<sup>[7]</sup>的研究中 27.59% 的菌株表现为中等蛋白酶活性，其余菌株表现为低蛋白酶活性；França 等<sup>[14]</sup>的研究显示，57.1% 的热带假丝酵母菌表现为中等蛋白酶活性，其余菌株表现出低蛋白酶活性或未表现出蛋白酶活性。研究结果之间的差异可能是由于各研究中菌悬液浓度不同及菌株本身的生物学固有特性引起的。

Tellapragada 等<sup>[13]</sup>和 Costa 等<sup>[15]</sup>研究组发现血源性热带假丝酵母菌蛋白酶活性高于阴道和口腔分离株。本研究虽未发现分离自不同感染部位的热带假丝酵母菌的蛋白酶活性存在统计学差异，但尿液分离株 PrZ 的  $M$  低于痰液标本，同时血液和前列腺分泌物的热带假丝酵母菌分离株的蛋白酶活性也较高，由于血液和前列腺分泌物等均为无菌标本，因此该研究结果提示致病性的热带假丝酵母菌蛋白酶活性较高。

磷脂酶能够使磷脂水解为脂肪酸，通过分解宿主细胞的膜磷脂而导致细胞膜通透性升高、完整性受损和受体暴露，从而促进假丝酵母菌的黏附和入侵<sup>[10]</sup>。本研究未检测到热带假丝酵母菌胞外磷脂酶的分泌，Tellapragada 等<sup>[13]</sup>和 Samaranayake 等<sup>[16]</sup>的研究也均未发现热带假丝酵母菌表现出磷脂酶活性。然而，Deorukhkar 等<sup>[10]</sup>通过对不同来源的 125 株热带假丝酵母菌进行研究，发现有 72 株 (57.6%) 表现出磷脂酶活性；Galán-Ladero 等<sup>[7]</sup>研究发现在 37 °C 条件下，孵育 24 h 后，71.4% 的热带假丝酵母菌表现出非常低的磷脂酶活性 ( $0.81 \leq \text{PhZ} < 0.99$ )，但随着观察时间的增长，磷脂酶活性又逐渐消失，Galán-Ladero 等<sup>[7]</sup>认为这种变化是由不断生长的菌落掩盖了微小的沉淀环造成的。

溶血活性是指假丝酵母菌产生的溶血素破坏血红蛋白并促进假丝酵母菌铁元素利用的能力<sup>[17]</sup>。因为人体中没有游离铁的存在，多数病原菌只能通过利用溶血素分解含铁化合物来得到铁元素，所以溶血活性被视为假丝酵母菌生长繁殖及造成机体感染的一个重要毒力因子。现有研究测量假丝酵母菌溶血活性的时间点并未统一，本研究中热带假丝酵母菌 (除 1 株, ZRCT17) 的溶血活性在 72 h 内均随时间

延长而增强,因此以72 h时的溶血活性作为测量热带假丝酵母菌溶血活性的指标。本研究发现热带假丝酵母菌均表现出溶血活性,也有研究显示,热带假丝酵母菌具有溶血活性<sup>[4,11,17-18]</sup>。研究结果显示除各有1株(ZRCT41和ZRCT47)热带假丝酵母菌表现为低溶血活性和高溶血活性外,其余(96.88%)热带假丝酵母菌均表现为中等溶血活性。在Galán-Ladero等<sup>[7]</sup>的研究中也发现多数(89.66%)热带假丝酵母菌表现为中等溶血活性,较少菌株表现为低溶血活性或高溶血活性。在已知标本来源的样本中,溶血活性最弱和最强的菌株均来自于痰液标本,可能与本研究中较高比例(48.4%)的痰液标本有关;此外,在本研究中分离自不同感染部位的热带假丝酵母菌的溶血活性较相似,其他研究中也未发现分离自不同感染部位的热带假丝酵母菌和白色假丝酵母菌溶血活性存在差异<sup>[4,14,19]</sup>。

#### 参 考 文 献

- [1] Jung SI, Shin JH, Song JH, et al. Multicenter surveillance of species distribution and antifungal susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates in South Korea [J]. *Med Mycol*, 2010, 48(4):669-674.
- [2] Chaves GM, Diniz MG, da Silva-Rocha WP, et al. Species distribution and virulence factors of *Candida* spp. isolated from the oral cavity of kidney transplant recipients in Brazil [J]. *Mycopathologia*, 2013, 175(3/4):255-263.
- [3] Mohandas V, Ballal M. Distribution of *Candida* species in different clinical samples and their virulence: biofilm formation, proteinase and phospholipase production: a study on hospitalized patients in southern India [J]. *J Glob Infect Dis*, 2011, 13(1):4-8.
- [4] Gacsér A, Trofa D, Schafer W, et al. Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(10):3049-3058.
- [5] Kothavade RJ, Kura MM, Valand AG, et al. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole [J]. *J Med Microbiol*, 2010, 59(Pt 8):873-880.
- [6] Wu Y, Zhou HJ, Wang J, et al. Analysis of the clonality of *Candida tropicalis* strains from a general hospital in Beijing using multilocus sequence typing [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11):e47767.
- [7] Galán-Ladero MA, Blanco MT, Sacristán B, et al. Enzymatic activities of *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients [J]. *Med Mycol*, 2010, 48(1):207-210.
- [8] Pichová I, Pavlíčková L, Dostál J, et al. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors [J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268(9):2669-2677.
- [9] Borst A, Fluit AC. High levels of hydrolytic enzymes secreted by *Candida albicans* isolates involved in respiratory infections [J]. *J Med Microbiol*, 2003, 52(Pt 11):971-974.
- [10] Deorukhkar SC, Saini S, Mathew S. Virulence factors contributing to pathogenicity of *Candida tropicalis* and its antifungal susceptibility profile [J]. *Int J Microbiol*, 2014, 2014:456878.
- [11] Negri M, Martins M, Henriques M, et al. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients [J]. *Mycopathologia*, 2010, 169(3):175-182.
- [12] Moralez AT, França EJ, Furlaneto-Maia L, et al. Phenotypic switching in *Candida tropicalis*: association with modification of putative virulence attributes and antifungal drug sensitivity [J]. *Med Mycol*, 2014, 52(1):106-114.
- [13] Tellapragada C, Eshwara VK, Johar R, et al. Antifungal susceptibility patterns, in vitro production of virulence factors, and evaluation of diagnostic modalities for the speciation of pathogenic *Candida* from blood stream infections and vulvovaginal candidiasis [J]. *J Pathog*, 2014, 2014:142864.
- [14] França EJM, Furlaneto-Maia L, Quesada RMB, et al. Haemolytic and proteinase activities in clinical isolates of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* with reference to the isolation anatomic site [J]. *Mycoses*, 2011, 54(4):e44-51.
- [15] Costa CR, Passos XS, e Souza LK, et al. Differences in exoenzyme production and adherence ability of *Candida* spp. isolates from catheter, blood and oral cavity [J]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 2010, 52(3):139-143.
- [16] Samaranyake LP, Raeside JM, MacFarlane TW. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro [J]. *Sabouraudia*, 1984, 22(3):201-207.
- [17] Luo G, Samaranyake LP, Yau JYY. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(8):2971-2974.
- [18] Rossoni RD, Barbosa JO, Vilela SFG, et al. Comparison of the hemolytic activity between *C. albicans* and non-*albicans* *Candida* species [J]. *Braz Oral Res*, 2013, 27(6):484-489.
- [19] Pakshir K, Zomorodian K, Karamitalab M, et al. Phospholipase, esterase and hemolytic activities of *Candida* spp. isolated from onychomycosis and oral lichen planus lesions [J]. *J Mycol Med*, 2013, 23(2):113-118.

(收稿日期:2015-02-15)

(本文编辑:万玉立)