

## 真菌多种耐药机制的研究进展

高鹏<sup>1</sup>, 白丽<sup>2\*</sup>

**摘要** :目前由于治疗全身真菌感染的药物有限和抗生素的滥用等因素致使真菌感染的发病率呈上升趋势。真菌的耐药现象日益增多, 耐药真菌感染的治疗已成为一个非常棘手的临床问题。为了寻找控制耐药真菌的感染最佳策略线索, 本文通过归纳目前临床常用和正在研发中的抗真菌药物耐药机制, 对耐药机制进行深入的探讨, 为临床用抗真菌治疗提供一定的理论依据。

**关键词** :真菌; 耐药机制; 综述

中图分类号: R519 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2012)9-1142-05

Progress in mechanism of multiple drug resistance of fungi. GAO Peng, BAI Li. (Department of Medical Microbiology and Immunology, Dali University, Dali 671000, Yunnan, China; Corresponding author: E-mail: bailiqian@yahoo.com)

**Abstract**: At present, treatments for systemic fungal infection limited, and misuse of antibiotics lead to upward trends in the incidence of fungal infections in recent years, increasing resistance of fungi. Treatment of drug-resistant fungal infection has become a very difficult clinical problem. In search of drug-resistant fungal infection control best strategy lead, must explore mechanisms of drug resistance. This paper summarized the current clinical and is commonly used in the research and development of antifungal resistance mechanisms, provides a reference for antifungal therapy for clinical use.

**Key words**: Fungus; Drug resistance; Review

由于广谱抗生素、免疫抑制剂、细胞毒药物的广泛应用, 近年来导管介入、器官移植、静脉营养等治疗手段的普及, 血液病、糖尿病、老年疾病、恶性肿瘤及艾滋病等临床严重疾病的发生率不断上升, 真菌感染日益增多, 已成为引起这类患者致死的主要原因之一。同时, 随着临床抗真菌药物的应用, 真菌耐药性也越来越严重。目前, 在抗真菌药物非常有限的条件下, 耐药真菌的出现无疑给临床治疗带来了极大的挑战, 这一点已引起国内外许多学者的瞩目。现将真菌感染中占有绝对多数的真菌耐药机制作综述如下。

### 1 抗真菌药物耐药的细胞机制

真菌表现抗真菌药物耐药的细胞机理包括以下方面: (1) 耐药性真菌改变为更具优势的种类, 不同种类的真菌耐药性不同。患者使用抗真菌药物预防和治疗过程中, 敏感菌被抑制从而使耐药菌更多生长成为优势种株。文献报道, 克柔念珠菌和光滑念珠菌继发感染的频率在经过唑类药物进行治疗和预防的患者中增高<sup>[1]</sup>; (2) 改变为更耐药的白念珠菌: 白念珠菌株的不同显型对唑类药物表现不同的耐药性; 研究已证实了在治疗中同一患者身上会出现一种新的耐药菌株或更耐药菌株代替原来菌株的情况发生<sup>[2]</sup>; (3) 遗传变异导致整个株系的耐药: 研究表明菌株长期暴露于药物, 菌株适应药物从而发生继发耐药。本来基因自然突变率很低, 但在经过药物的选择作用后发生突变而耐药的菌株最终成为优势菌<sup>[3]</sup>; (4) 基因的短暂表达

导致菌株的暂时性耐药; 研究表明白念珠菌可以由于基因的短暂表达而暂时产生获得性耐药, 这种获得性耐药的表现在体内外都被证实<sup>[4]</sup>; (5) 真菌种群的改变: 种群具有某些机制能随机选择表现耐药或敏感, 从而在一个真菌种群中呈现出固定的耐药性, 因此种群所处的状态及形式对耐药性有影响。

### 2 真菌耐药的分子机制

**2.1 菌体细胞内药物聚积减少** 真菌产生耐药的重要机制是细胞内的药物浓度降低<sup>[5]</sup>。大致分为膜的通透性下降致使进入胞内的药物减少和胞内药物外排作用增加, 其中外排增加是主要原因。药物外排主要由MDR(Multi-drug resistance)蛋白介导, 即ATP结合转运蛋白(ATP binding cassette transporters ABC)和易化扩散载体超家族(Major facilitator superfamily, MFS)。ABC是ATP能量依赖型的多药转运载体, 是胞膜上的外排泵, 编码的基因族主要有4大类: MDR、CFTR、YEF和PDR。目前, 已从念珠菌和曲霉中分离出属于ABC转运子的8个基因, 即PDR族的cdr基因(cdr1-cdr5), MDR族的hst6, CFTR族的yef1和YEF族的elf1。其中, cdr1基因编码的跨膜蛋白, 是一种ATP依赖性的转运子, 可将小分子物质进行跨膜转运, sanglard等证明了cdr1基因对光滑念珠菌对获得性耐药有确定性作用。易化扩散载体超家族是通过电化学势能进行被动转运的, 赋予非能量依赖载体。此家族中由MDR1编码的Mdr1P有抑制摄入氮唑类抗

作者单位: 大理学院基础医学院微生物与免疫学教研室, 云南 大理 671000

作者简介: 高鹏(1985~) 男, 汉族, 河北人, 硕士研究生, 研究方向: 感染与免疫。

\*通讯作者: E-mail: bailiqian@yahoo.com

真菌药物的作用<sup>[5]</sup>。耐药念珠菌中 Cdr1、Cdr2 和 Mdr1 的表达明显增强,并伴有细胞内唑类药物的降低<sup>[6]</sup>。同时也发现控制蛋白泵的基因位于真菌的染色体上,该基因的突变是蛋白泵的表达过度,蛋白泵将药物从胞内泵出从而降低了胞内的浓度。

**2.2 药物作用靶酶的改变** 耐药真菌的细胞色素 P450 中 14 $\alpha$ -去甲基酶(14-DM)编码基因 ERG11 发生了基因突变,导致 14-DM 的结构发生变化,使其 mRNA 过度表达,P450 中 14-DM 合成增加。基因测序分析比较发现有 12 个碱基的点突变出现于耐药株靶酶基因 ERG11 编码区,导致产物中 4 个氨基酸的改变。研究证实:突变体的 ERG11 P450 酶的催化活性没有改变,但对唑类药物的亲和力下降,显示了靶酶基因 ERG11 发生突变与真菌的耐药有一定的相关性。此外靶酶基因的过度表达可产生大量的靶酶,胞内药物的浓度达不到完全抑制靶酶的活性的标准,也促使真菌产生耐药性。另有研究发现对唑类耐药的光滑念珠菌中,其麦角固醇的含量增加,主要是由于 14-DM 表达增多,也证实了 ERG11 基因过度表达与念珠菌耐药表型的关系。故此药物作用靶位的改变可有以下途径引起:(1)靶酶基因改变:由于等位基因的多态性致使靶酶基因编码区发生改变,可引起酶活性和三维结构发生改变,导致酶与药物的亲和力降低而产生耐药<sup>[7]</sup>;(2)靶酶基因过度表达:靶酶基因调控区和/或相应的调节基发生改变,靶酶基因过度表达,细胞内药物不能完全抑制靶酶的活性而耐药;(3)靶位缺乏:细胞膜中麦角固醇缺乏或者改变的真菌常对多烯类药物耐药<sup>[8]</sup>。

**2.3 膜甾醇合成通路发生变化** 唑类药物与念珠菌作用后阻滞去甲基反应引起麦角甾醇合成受阻,麦角甾醇被 14 $\alpha$ -methyl-3,6-diol 这一细胞毒性甾醇替代进而干扰真菌甾醇与磷脂的整合,最终抑制细胞生长导致死亡。如果菌体内缺乏 ERG3 编码的甾醇去饱和酶(A5,6-desaturase),会导致细胞毒性低的甾醇 14 $\alpha$ -methylfecosterol 聚集,使唑类药物对真菌的抑制作用被对抗而产生耐药性<sup>[9]</sup>。

**2.4 真菌细胞壁组成的变化** 真菌对药物的敏感性不仅与膜的变化有关,还与真菌细胞壁组分的变化有关。真菌细胞壁成分的变化可引起曲霉对多烯类药物的耐药<sup>[10]</sup>。在指数生长期的白色念珠菌,AmB 通过细胞壁与膜作用具有限速作用,细胞壁 $\beta$ 葡聚糖的变化能导致耐药性的产生。另有报道,真菌细胞壁的另一组分几丁质含量低时,可诱导酵母菌耐药性的产生<sup>[11]</sup>。

**2.5 热休克蛋白 90** Cowen<sup>[12]</sup>等首先通过分子生物学方法得到 3 中酿酒酵母菌株,分别是高表达 Hsp90

的 Hi90 菌株,低表达 Hsp90 的 Lo90 菌株及通过重组得到的 Re90 菌株(其 Hsp90 表达介于 Hi90 和 Lo90 之间)。结果发现 Hi90 菌株中存在对浓高度氟康唑(16-128g/ml)耐药的菌株,而 Lo90 菌株则不能产生对氟康唑的耐药性,说明 Hsp90 对酿酒酵母耐药性的产生存在重要作用。进一步研究证明,Hsp90 介导的酿酒酵母菌对氟康唑的抗药性是通过快速选择机制产生的。Hsp90 介导的耐药性变异菌株是通过快速选择机制产生的,而慢选择机制产生的变异菌株则不是由 Hsp90 介导。其对氟康唑耐药性是通过转录因子 Pdr1 使外排泵如 Pdr5 表达增多产生的<sup>[13]</sup>。另外在自然界中,由于环境的变化(如高温)产生的蛋白质折叠,从而产生新的表型,也不依赖 Hsp90 的作用<sup>[14]</sup>。通过对接受氟康唑治疗至少 2a 的 HIV 患者中分离出的白念珠菌研究发现,这些菌株的耐药性更强,且 Hsp90 抑制剂(GdA)或 Calcineurin 抑制剂(CsA)对这些耐药菌株的作用较差。这是因为这些 HIV 患者由于感染而经常发热,发热能抑制 Hsp90 的作用,通过这种长期的热刺激迫使菌株产生变异,这种环境造成的变异不依赖于 Hsp90 的作用,直接引起蛋白质的折叠和细胞信号传导系统的改变,从而出现新的表型<sup>[15]</sup>。

**2.6 真菌产生生物膜** 生物膜是附着于无活力的或活组织表面的、由其自身产生的细胞外基质(ECM)包裹的有结构的菌细胞群体,是相对于单个分散的游离状态菌细胞而言的另一种微生物独特的生存形式。膜内菌细胞的形态常与浮游菌不同,且对药物的敏感性差。其耐药机制可能与下列因素有关:(1)膜内真菌生长速率慢;(2)胞外聚合物基质所形成的膜屏障作用;(3)丧失诱导性耐药基因的表达。有丝分裂原激活蛋白(Mitogen-activated protein,MAP)激酶 Mkk1p 白念珠菌的 Mkk1p 变异株可以正常产生生物膜,游离细胞对氟康唑的敏感性不变,但生物膜对氟康唑的敏感性却较之野生株有极大的提高<sup>[16]</sup>。这一发现有可能为我们在基因水平上解释白念珠菌生物膜的耐药性提供研究依据。徐瑞宏<sup>[17]</sup>的研究表明 MAP Mkk1p 特异性地增强真菌生物膜的耐药性;Mukherjee 等<sup>[18]</sup>构建了 CDPd、CDPL<sub>2</sub>、MDR1 双基因和三基因白念珠菌缺陷株,发现缺少 CDR 和 MDR1 基因的变异株形成的早期生物膜比中晚期的生物膜对氟康唑的敏感性要高,而由变异株与母株形成的成熟的生物膜均对其有高度耐药性;(4)对抗机制的免疫逃避 生物膜致病菌群采用多种方式对抗机体的免疫防御机制,还有研究表明麦角甾醇水平在白念珠菌生物膜形成的中期和成熟期与早期相比有明显下降,说明麦角甾醇可能参与了中期和成熟期生物膜耐药<sup>[19]</sup>;(5)耐药株的存在 有研究表明,生物膜内存在着耐药亚群,其生物学



特性与普通细胞不同,由于耐药亚群的存在使得药物无法完全清除生物膜<sup>[20]</sup>。(6)附着面粗糙度有学者发现植入物(钛)上的自念珠菌生物膜对两性霉素B的耐药性与植入物的表面粗糙程度相关<sup>[21]</sup>。念珠菌生物膜耐药性还可能与微环境的改变(如缺氧、pH值)等因素有关,生物膜致病菌可采用多种方式对抗机体的免疫防御机制,从而逃脱免疫系统<sup>[22-25]</sup>。晚期成熟白念珠菌生物膜易由耐药启动基因被诱活,但其药物扩渗通道决定簇(Drug efflux determinants)的数量与浮游白念珠菌细胞相近,此现象与早期生物膜的情形相反,说明这些耐药基因的诱活有量效反馈抑制机制调控<sup>[26]</sup>。研究发现,CDR1/CDR2双敲除菌株形成的生物膜可以被较高浓度的咪康唑和克霉唑完全清除,而参考株YEM30的生物膜则有较大比例的耐药株幸存;抗真菌药物与CDR1抑制剂联合应用都显示较好的杀灭效果,当EnniatinB抑制了CDR1基因后,克霉唑对CDR2缺陷株取得了与CDR1,CDR2双敲除缺陷株相似的杀灭效果;在排除了MDR1基因的干扰后(MDR1基因缺陷),抑制CDR1基因,同样有利于耐药株的杀灭作用。以上结果都证实,至少CDR1基因与耐药株的耐药性有关<sup>[27]</sup>。总之,生物膜细胞抗药或抗机体免疫防御的机制不是单一的,而是多个机制共同作用的结果<sup>[28]</sup>。

### 3 各类抗真菌药物耐药机制

3.1 多烯类 某些真菌如白吉利丝孢酵母(*Trichosporon beigeli*)和*Pseudallescheria boydii*的细胞膜中无麦角固醇,因此对多烯类固有耐药。两性霉素B临床应用近40年,对其产生耐药的往往只局限于不太常见的念珠菌,如葡萄牙念珠菌、光滑念珠菌和季也蒙念珠菌。目前有如下假说解释两性霉素的耐药性<sup>[29]</sup>:(1)穿过真菌细胞壁是两性霉素B到达细胞膜的第一道屏障,可能耐药菌中这一通路发生改变;(2)细胞膜中脂类的数量和质量发生变化,特别是麦角固醇含量减少,降低了两性霉素B与细胞膜结合的几率,这些变化可能与ERG2或ERG3基因突变有关;(3)真菌细胞对两性霉素B引起的氧化现象敏感性降低。

3.2 5-氟胞嘧啶(5-FC) 5-氟胞嘧啶的作用机制是真菌在胞嘧啶通透酶的作用下将其摄入细胞内,经胞嘧啶脱氨酶转变成氟尿嘧啶,再经多步反应转变成氟尿苷三磷酸(FUTP),氟尿苷三磷酸能掺入到真菌RNA中去,影响蛋白质的合成。氟尿嘧啶还能转变成氟脱氧尿苷一磷酸,竞争性抑制胸苷酸合成酶,影响DNA的合成。真菌突变引起的胞嘧啶透性酶、胞嘧啶脱氨酶、尿苷一磷酸焦磷酸化酶(UMPP)三者中任何一个酶变异,都能使真菌产生耐药性<sup>[30]</sup>。目前普遍认为胞嘧啶脱氨酶及UMP-焦磷酸化酶的缺陷是真菌对5-氟

胞嘧啶产生耐药的最主要原因。人体组织缺乏胞嘧啶脱氨酶而不受该药的影响,缺乏胞嘧啶透性酶和胞嘧啶脱氨酶的真菌对该药呈固有耐药<sup>[31]</sup>。在抗氟胞嘧啶白念菌株中最常见变异的酶是尿苷一磷酸焦磷酸化酶,最少见变异的酶是胞嘧啶通透酶。获得性耐药的机制是编码胞嘧啶透性酶、胞嘧啶脱氨酶或UMDP的基因发生点突变,从而导致其中一种酶失活。对白色念珠菌的基因组学研究证实,对氟胞嘧啶类药物的耐药是由特殊菌株的基因型所决定的隐性特征,在菌株的遗传位点上存在着耐药基因FCY(FCY为显性,fcy为隐性)。因此,FCY/FCY菌株对氟胞嘧啶敏感,其尿嘧啶磷酸核苷转移酶(UPRT酶)活性;部分耐药的菌株表现出耐药基因的杂合子FCY/fcy,其UPRT酶活性减弱;杂合子进一步突变将产生耐药表现型fcy/fcy,其UPRT酶几乎没有活性<sup>[32]</sup>。单倍体新型隐球菌中基因突变最可能引起5-氟胞嘧啶耐药。遗传分析表明有2个遗传位点FCY1和FCY2,两者突变可产生5-氟胞嘧啶耐药<sup>[33]</sup>。

3.3 唑类 唑类抗真菌药是通过抑制真菌的14 $\alpha$ -去甲基化酶(CYP51)或3-甾酮还原酶,影响羊毛甾醇14 $\alpha$ -甲基的羟基化反应,进而阻止麦角固醇合成。所以唑类抗真菌药的耐药可由以下机制引起:(1)通过主动外排以减少唑类真菌药的累积,这可能是最普遍的耐药机制<sup>[34]</sup>。ABC转运子(ABC transporter)是与小分子物质跨膜运动相关的外排泵(其编码的基因族主要有4大类:MDR、CFR、YH、和I PDR)迄今为止,已从念珠菌和曲霉菌中分离出8个关于A转运子的基因,包括属于PDR族的CDR基因,其中(CDR1、CDI2、CDR3、CDR4、CDR5)与唑类的耐药性有关,CDI11产物为Cdr1P,具有ABCT1载体蛋白的共性,是一种膜蛋白。整个蛋白有4个区,其中2个区为疏水区,为穿膜部分,另2个区推测为与ATP结合区。Sanglard等研究发现CDR2超表达株显示对唑类药物耐药。但CDR2单独破坏株并求对唑类药物高度敏感,而CDR1和CDR2同时破坏株显示对唑类药物高度敏感。Cdr1P、Cdr2p与Mdr1P等均属MIR蛋白,近年来对真菌耐药性的研究多集中在这些蛋白。Cdr1P、Cdr2P通过增加药物的外排,而Mdr1P通过抑制药物摄入降低细胞内药物浓度。外排泵的作用增强可见于固有性耐药和获得性耐药的白色念珠菌、克柔念珠菌、光滑念珠菌、烟曲霉菌等。这种机制最常发生在氟康唑,此外还可发生在特比萘芬;(2)耐药真菌的细胞色素P45014DM编码基因—ERG11发生了基因突变,导致14 $\alpha$ -去甲基化酶的结构发生变化,从而与唑类抗真菌药的亲和力下降,使唑类药物的敏感性下降<sup>[35,36]</sup>;(3)固醇合成旁路下游的改变,使甾醇去饱

和酶的失活。这种耐药见于白色念珠菌和酿酒酵母菌对氟康唑和酮康唑耐药,这些耐药菌同时对制霉菌素和两性霉素B交叉耐药<sup>[37,38]</sup>。(4)真菌细胞膜对抗真菌药的通透性下降,使药物不能进入真菌细胞内,如从临床分离的耐药克柔念珠菌表现出对唑类药物的通透性明显降低。对唑类和多烯类同时耐药的隐球菌对唑类药物的通透性明显下降的同时,其细胞膜羊毛甾醇的含量明显升高。以上几种耐药机制的某些具体过程和产生的原因正在进一步研究,亦可能存在其他耐药机制。真菌对唑类药物的耐药是逐渐形成的,涉及多种不同的耐药机制共同作用的结果。在唑类药物选择压力作用下,部分真菌最初可能通过其中某一机制产生低水平耐药。然后被筛选出来成为优势菌群的低水平耐药菌株,持续的选择压力作用下,又可能发生基因突变,新的耐药机制产生作用,其耐药水平亦进一步上升,这样经过多次选择,形成对多类药物高度耐药的菌株。

3.4 烯丙胺类和硫代氨甲酸酯类 这两类药物都能竞争性抑制角鲨烯环氧化酶,阻止角鲨烯转变成羊毛甾醇,使角鲨烯堆积,麦角甾醇生成减少,影响细胞膜的结构和功能。目前还没有发现人的致病真菌对烯丙胺类药物产生继发性耐药性,临床对烯丙胺耐药性的报道较少,但已经出现临床皮肤真菌红色毛孢子菌(*Trichosporon rubrum*)耐特比萘芬,对该耐药株的SE基因进行序列分析,结果显示每株都包含1个氨基酸突变I393F<sup>[39]</sup>。符合致病真菌*Ustilago maydis*能对烯丙胺类产生耐药性。真菌细胞内药物含量下降,角鲨烯环氧化酶对药物的亲和力下降与真菌的耐药性产生有关。

3.5 棘白菌素(Echinocandins)类 棘白菌素(Echinocandins)类药物通过抑制真菌细胞 $\beta$ -葡聚糖合成酶的活性而抑制细胞(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖合成,发挥抗真菌作用。已上市的有卡泊芬净(Caspofungin, CAS)米卡芬净,已有从治疗失败的念珠菌病患体内分离出对卡泊芬净的MIC升高的白念珠菌的报道。但由于棘白菌素类药物MIC与临床疗效问的关系还没有完全确定,目前对丁棘白菌素类抗真菌药物,用敏感性降低一词比耐药更为准确。在白念珠菌 $\beta$ -葡聚糖合成酶的编码基因为CaFKS1在体外诱导出的棘白菌素敏感性降低的白念珠菌中发现,其两个CaFKS1等位基因之一的保守区发生突变突(Phe 641 to Asp 648)对棘白菌素类药物敏感性降低明显相关,基因定点突变的方法也发现这一区域的突变足以引起对棘白菌素敏感性降低。为了解CDR1、CDR2、MDR1基因的过度表达在念珠菌对棘白菌素类药物耐药中的作用,Niimi . K等<sup>[40]</sup>构建了过度表达CDR1、CDR2、

MDR1的白色念珠菌转化子。测定这些转化子对CAS和米卡芬净的敏感性,结果发现它们对这两种药物的敏感性与野生株相比没有明显差别,因此rDR1、CDR2、MDR1在白色念珠菌对棘白菌素敏感性降低中无明显作用。目前真菌对卡泊芬净耐药性的研究还限于实验室突变株。酵母和念珠菌分离株中的fsk1和fsk2基因的突变与卡泊芬净耐药性有关。此外,涉及细胞壁成分运输的一个高尔基体蛋白-sbe2p的过表达会导致酿酒酵母耐药。虽然以前认为卡泊芬净不是外排泵的底物,但最近有文献报道ABC转运子中Cdr2p的过表达会导致菌株对卡泊芬净耐药。值得一提的是,临床上重要的病原菌新型隐球菌对卡泊芬净不敏感,虽然该菌细胞壁中含有 $\beta$ (1,3)-D-葡聚糖,且体外最佳条件下源于新型隐球菌的 $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖合酶确实对卡泊芬净非常敏感<sup>[41]</sup>,详细的机制还在进一步研究中。

#### 4 展望

真菌耐药性的发展已经受到各国学者的高度重视,从而有力的促进了抗真菌药物的耐药性研究的深入发展,但是由于全球各地真菌的感染者的组成不同,以及抗真菌药物的使用情况不尽相同,各地区报道的耐药菌株的耐药机制和谱系也不同,因此在重视深入研究的过程中应着眼于本国本地区的实际,制定相应的适合的对策,加快新型抗真菌药物研发的同时对传统的药物进行相应的改造创新。

#### 参考文献:

- [1] Odds FC. Resistance of yeasts to azole-derivative antifungals[J]. J Antimicrob Chemother, 1993, 31(4): 463-471.
- [2] Bart-Delabesse E, Boiron P, Carlotti A, et al. Candida albicans genotyping in studies with patients with AIDS developing resistance to fluconazole[J]. J Clin Microbiol, 1993, 31(11): 2933-2937.
- [3] Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA. Resistance of Candida species to fluconazole[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995, 39(1): 1-8.
- [4] Pinjon E, Moran GP, Jackson CJ, et al. Molecular mechanisms of itraconazole resistance in Candida dubliniensis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(8): 2424-2437.
- [5] Isham N, Ghannoum MA. Antifungal activity of miconazole against recent Candida strains[J]. Mycoses, 2010, 53(5): 434-437.
- [6] Wirsching S, Moran GP, Sullivan DJ, et al. MDR1-mediated drug resistance in Candida dubliniensis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(12): 3416-3412.
- [7] Marr KA, Lyons CN, Ha K, et al. Inducible azole resistance associated with a heterogeneous phenotype in Candida albicans[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 45(1): 52-59.
- [8] Henry KW, Nickels JT, Edlind TD. Upregulation of ERG genes in Candida species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(10): 2693-2700.
- [9] Seo K, Akiyoshi H, Ohnishi Y. Alteration of cell wall composition leads to amphotericin B resistance in Aspergillus flavus[J]. Microbiol Immunol, 2011, 55(1): 1-10.

- nol, 1999, 43(11): 1017–1025.
- [10] Espinel-Ingroff A, Cuenca-Estrella M, Fothergill A, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38–A2 document) [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(11):5150–5154.
- [11] Bahmed K, Bonaly R, Coulon J. Relation between cell wall chitin content and susceptibility to amphotericin B in *Kluyveromyces*, *Candida* and *Schizosaccharomyces* species[J]. *Res Microbiol*, 2003, 154(3): 215–222.
- [12] Sangster TA, Lindquist S, Queitsch C. Under cover: causes, effects and implications of Hsp90-mediated genetic capacitance[J]. *Bioessays*, 2004, 26(4): 348–362.
- [13] Heitman J. Cell biology. A fungal Achilles' heel[J]. *Science*, 2005, 309(5744): 2175–2176.
- [14] Pratt WB, Toft DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery[J]. *Exp Biol Med*, 2003, 228(2): 111–133.
- [15] Lotz GP, Lin H, Harst A, et al. Aha1 binds to the middle domain of Hsp90, contributes to client protein activation, and stimulates the ATPase activity of the molecular chaperone[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(19): 17228–17235.
- [16] Kumamoto CA. A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive growth and biofilm development[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(15): 5576–5581.
- [17] Olson GM, Fox DS, Wang P, et al. Role of protein O-mannosyltransferase Pmt4 in the morphogenesis and virulence of *Cryptococcus neoformans*[J]. *Eukaryot Cell*, 2007, 6(2): 222–234.
- [18] Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, et al. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols[J]. *Infect Immun*, 2003, 71(8): 4333–4340.
- [19] Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, et al. Investigation of multi-drug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2002, 49(6): 973–980.
- [20] LaFleur MD, Kumamoto CA, Lewis K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal tolerant persister cells[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(11): 3839–3846.
- [21] Tsang CS, Ng H, Mcmillan AS. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* biofilms on titanium discs with different surface roughness [J]. *Clin Oral Investig*, 2007, 11(4): 361–368.
- [22] Mukherjee PK, Chandra J. *Candida* biofilm resistance[J]. *Drug Resist Updat*, 2004, 7(4–5): 301–309.
- [23] Andes D, Nett J, Oschel P, et al. Development and characterization of an *in vivo* central venous catheter *Candida albicans* biofilm model[J]. *Infect Immun*, 2004, 72(10): 6023–6031.
- [24] Baillie GS, Douglas LJ. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42(8): 1900–1905.
- [25] Kuhn DM, George T, Chandra J, et al. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(6): 1773–1780.
- [26] Punithavathy PM, Nalina K, Menon T. Antifungal susceptibility testing of *Candida tropicalis* biofilms against fluconazole using calorimetric indicator resazurin[J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2012, 55(1): 72–74.
- [27] Yu LH, Wei X, Ma M, et al. Possible inhibitory molecular mechanism of farnesol on the development of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilm[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(2): 770–775.
- [28] Nett JE, Sanchez H, Cain MT, et al. Interface of *Candida albicans* biofilm matrix-associated drug resistance and cell wall integrity regulation[J]. *Eukaryot Cell*, 2011, 10(12):1660–1669.
- [29] Andre B. *Antimicrobial agents: antibacterials and antifungals*[M]. Washington DC, ASM Press, 2005: 1265.
- [30] Yamaguchi H. Molecular and biochemical mechanisms of drug resistance in fungi[J]. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 1999, 40(4): 199–208.
- [31] Vanden Bossche H, Marichal P, Odds FC. Molecular mechanisms of drug resistance in fungi[J]. *Trends Microbiol*, 1994, 2(3): 393–400.
- [32] Zipfel PF, Skerka C. Complement, *Candida*, and cytokines: The role of C5a in host response to fungi[J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(4): 822–825.
- [33] Hope WW, Taberner L, Denning DW, et al. Molecular mechanisms of primary resistance to flucytosine in *Candida albicans*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(11): 4377–4386.
- [34] White TC. Increased mRNA levels of ERG6, CDR, and MDR correlated with increase in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 41(7): 1482–1487.
- [35] Sanglard D, Ischer F, Koymans L, et al. Amino acid substitutions in the cytochrome P450 lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42(2): 241–253.
- [36] Asai K, Tsuchimori N, Okonogi K, et al. Formation of azole-resistant *Candida albicans* by mutation of sterol 14-demethylase P450[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(5): 1163–1169.
- [37] Knoke M, Bernhardt H, Zimmermann K, et al. Funguria and *Candida*-specific immunoglobulins in patients with systemic candidosis[J]. *Mycoses*, 2000, 43(3–4): 145–149.
- [38] Nolte FS, Parkinson T, Falconer DJ, et al. Isolation and characterization of fluconazole and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 41(1): 196–199.
- [39] Osborne CS, Leitner I, Favre B, et al. Amino acid substitution in *Trichophyton rubrum* squalene epoxidase associated with resistance to terbinafine[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(7): 2840–2844.
- [40] Chau AS, Gurnani M, Hawkinson R, et al. Inactivation of sterol Delta 5, 6-desaturase attenuates virulence in *Candida albicans*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(9): 3646–3651.
- [41] Maligie MA, Selitrennikoff CP. *Cryptococcus neoformans* resistance to echinocandins: (1,3)- $\beta$ -glucan synthase activity is sensitive to echinocandins[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(7): 2851–2856.

收稿日期:2012-05-06 编辑:崔宜庆