

白念珠菌基因变异对唑类药物耐受性的研究进展

朱春香, 高平挥, 姜远英*

(第二军医大学药学院药理教研室, 上海 200433)

摘要: 基因变异是白念珠菌产生唑类药物耐受性的主要原因之一。不同类型的变异在白念珠菌耐药性发生进程中起着不同程度的推动作用。其中 ERG 系列基因突变, 主要是影响麦角甾醇合成通路; 而白念珠菌 CDR1、MDR1 的调控因子 TAC1、Mrr1 突变影响白念珠菌药物外排泵蛋白的表达水平。此外, 基因拷贝数的变异也逐渐受到人们的重视。因此, 白念珠菌的耐药相关基因变异研究对于探讨白念珠菌耐药机制具有积极的意义。

关键词: 白念珠菌; 耐药性; 基因变异

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 07-0821-06

Advances in the study of *Candida albicans* gene mutation on azole drug resistance

ZHU Chun-xiang, GAO Ping-hui, JIANG Yuan-ying*

(Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Gene mutation of *Candida albicans* is one of the main causes for azole drug resistance. Different types of variation play different roles in promoting the process of drug resistance. ERG series of gene mutations primarily affect the ergosterol synthesis pathway. When the regulatory factors TAC1 for CDR1 gene and Mrr1 for MDR1 gene generate mutations, the expression level of drug efflux pump protein in *Candida albicans* may be changed. In addition, gene copy number variation is also gaining attention. Therefore, the research of mutation resistance-associated genes has a positive meaning to explore the mechanism of drug resistance in *Candida albicans*.

Key words: *Candida albicans*; drug resistance; gene mutation

白念珠菌是一种临床上重要的机会病原体, 随着广谱抗生素和免疫抑制剂的广泛应用, 一些免疫功能受到损坏的患者包括艾滋病、器官移植、接受放、化疗的癌症患者以及免疫抑制剂治疗的患者, 会导致严重的真菌尤其是深部真菌感染。念珠菌感染约占所有血液系统感染的 8%~9%, 但其死亡率却高达 40%^[1, 2]。目前治疗真菌感染的一线药物主要是氟康唑等三唑类药物, 而氟康唑耐药菌株的出现已经成为临床上这类感染治疗失败的主要原因。白念珠菌耐药的机制主要包括三方面: 麦角甾醇合成通路中关

键靶酶的变化 (ERG11 基因的突变和过表达); 多药耐药蛋白表达增多; 生物被膜的形成。白念珠菌耐药相关基因的变异研究一直是探讨白念珠菌耐药分子机制研究的热点。本文就白念珠菌基因变异导致的耐药性进行了综述。

1 麦角甾醇合成通路中的基因变异

目前临床上使用的抗真菌药物主要通过阻断麦角甾醇合成通路, 使得真菌细胞壁的合成受阻, 细胞膜的通透性改变, 而发挥抗真菌活性 (图 1)。该通路中的基因一旦发生突变, 特别是药物作用关键靶点位置的编码基因突变, 有可能引起靶酶的构象发生改变, 从而影响药物与靶酶的结合, 导致抗真菌活性的降低。在临床治疗白念珠菌感染中发现, 由于氟康

收稿日期: 2009-12-18.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30630071).

*通讯作者 Tel: 86-21-81871357, E-mail: jiangyycn@yahoo.com.cn

唑等唑类药物的长期治疗诱导发生变异而产生适应性的改变(即耐药性)的菌株构成了临床耐药菌株的主要来源,也成为了白念珠菌感染临床治疗的难点。

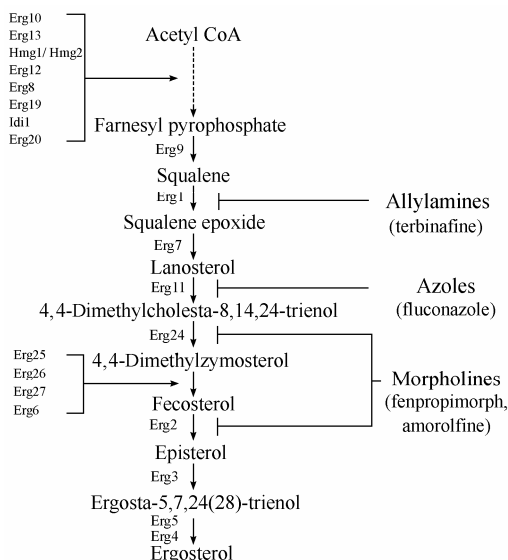


Figure 1 Linear model of the ergosterol biosynthetic pathway^[3]

1.1 ERG11基因的突变 ERG11(CYP51)是羊毛甾醇 14a 去甲基酶(14DM)编码基因,该酶是三唑类药物作用的靶点。ERG11 基因突变是导致临床耐药菌产生的主要原因,该位点突变导致编码的氨基酸替换,能改变唑类药物与关键靶酶的亲和力,诱导白念珠菌的耐药性产生。目前通过测序比对耐药与敏感白念珠菌基因序列已发现了 60 余种 ERG11 基因突变,主要分布于 4 个热点的突变区域(图 2),其中明确参与耐药形成的突变有 R467K、G464S、Y132H、I471T、S405F 和 T315A^[4, 5]。在耐药菌株中,这些突变可以单个发生,也可以联合发生。研究证实,ERG11 单个位点的突变并不会引起氟康唑敏感性的巨大变化,但是当这些位点发生联合突变时,尤其是 G129A 与 G464S, Y132H 与 S405F, Y132H 与 G484S, R467K 与

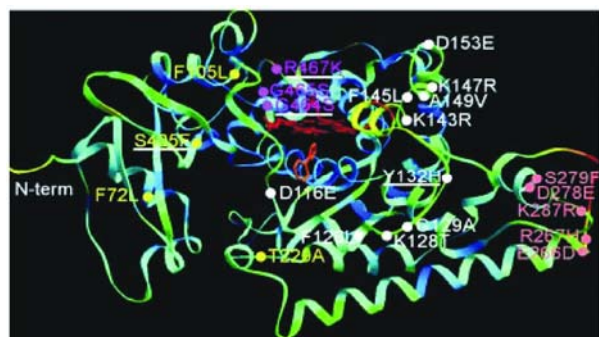


Figure 2 The crystal structure of 14DM in mutated azole-resistance *C. albicans*

G464S 将起到协同作用^[6]。

最重要的突变热点区域位于血红素结合位点附近,因为 ERG11 的活性中心位于血红素远端,深埋于蛋白内部,唑类药物分子需要通过很长的通道才能与活性中心结合发挥作用。血红素结合位点的突变引起蛋白空间结构的改变,可能导致唑类药物阻断羊毛甾醇去甲基过程的作用失活,诱导耐药性的形成。R467 和 R464 是真菌、植物、哺乳动物的 Cyp51p 所共有的两个保守氨基酸,位置靠近血红素结合位点, R467K 和 R464S 突变可以引起血红素空间结构及功能的改变,导致耐药性的产生^[6, 7]。T315A 突变能使其残基与甾醇底物 3-OH 形成氢键的能力降低,血红素酶蛋白的出峰位点由 445 nm 转移到 448 nm,改变了血红素结合位点的环境而产生耐药性^[5]。

还有一部分位点虽然远离 ERG11 的催化活性中心,但是也参与耐药性的形成过程。S405F 突变可引起耐药性的产生,其原因可能是 S405F 刚好位于 K 螺旋的后方,靠近底物/药物的结合位点,突变会影响药物进入的通道,使得唑类药物与 14DM 的亲和力下降^[6, 8]。Y132H 和 F145L 联合变异的菌株在高氟康唑浓度的条件下可以存活,可能是突变的位置位于 B 和 C 螺旋之间,该区域表现出高度的热运动,参与药物诱导的结构改变^[8, 9]。另外还发现一些位点突变可能与耐药形成有关,但仍需要进一步证实(表 1)。

此外,人们还发现调控固醇生成转录因子 UPC2p 能调节 ERG11 的表达,在临床耐药菌中发现 UPC2 等位基因突变导致编码蛋白 G648D 变异,引起了 ERG11 的高表达,羊毛甾醇去甲基产物的积累,最终导致了对氟康唑的耐药^[10]。最近又有报道发现 UPC2 纯合子上出现 G1927A 突变,尤其是两个等位基因都发生该种突变时,导致编码蛋白 A643T(苏氨酸→丙氨酸)替换,激活转录,促进 ERG11 的表达,增加耐药性。再次证实了 UPC2 等位基因突变导致的杂合性缺失,会引起白念珠菌耐药性的形成^[11]。

1.2 其他 ERG 基因对麦角甾醇合成通路的影响 白念珠菌的其他 ERG 基因对麦角甾醇的合成也有一定的意义,这些 ERG 基因的变异会导致麦角甾醇合成通路中相应编码的酶缺陷,在一定程度上改变菌株对药物的敏感性。

在麦角甾醇合成通路中最重要的基因是 ERG3 (ERG11 通路上游的基因),它是与白念珠菌毒力有关的一个编码基因,其编码的 Δ C-5, 6 脱氢酶缺陷已经

Table 1 Point mutations of *C. albicans* ERG11 possible leading azole drug resistance and corresponding changes in amino codons. Referring to the published ERG11 sequence in GenBank (accession No. X13296), the start codon is the ATG in 148–150 bp

Mutations near the heme binding site of ERG11p			Mutations in other regions of ERG11p		
Position in ERG11 gene/bp	Mutation in codon	Change in ERG11p	Position in ERG11 gene/bp	Mutation in codon	Change in ERG11p
1 090–1 092	ACT→GCT	T315A	541–543	TAT→CAT	Y132H
1 489–1 491	GGG→GAG	G448E	574–576	AAA→GAA	K143E
1 489–1 491	GGG→CGG/AGG	G448R	574–576	AAA→AGA	K143R
1 489–1 491	GGG→GTG	G448V	580–582	TTT→CTT	F145L
1 492–1 494	TTT→CTT	F449L	640–642	GAA→TAC	E165Y
1 492–1494	TTT→TCT	F449S	1 357–1 359	GTT→CTT	V404L
1 537–1 539	GGT→AGT	G464S	1 360–1 362	TCT→TTT	S405F
1 540–1 542	GGT→AGT	G465S			
1 546–1 548	AGA→AAA	R467K			
1 558–1 560	ATT→ACT	I471T			
1 609–1 611	GTT→ATT	V488I			

成为白念珠菌的唑类药物耐受性的机制之一。ERG3 变异引起了 Δ C-5, 6 脱氢酶钝化, 使得 14-methylfecosterol 和少量的有毒麦角甾醇中间体的积累, 最终导致耐药性。Yan 等^[12]发现, ERG3 发生单个的氨基酸替换 (D19E) 导致 ERG3 的钝化, 可以引起耐药菌株中甾醇前体物的积累和麦角甾醇合成基因表达水平的改变。有趣的是, ERG3 钝化的菌株虽然能同时引起体外及肾脏中菌丝形成缺陷, 并伴有毒力的减弱, 但甾醇 Δ C-5, 6 脱氢酶活性降低在体内并不会诱导产生氟康唑耐药性^[13]。

但是, 有些功能性的基因突变或缺失会导致药物的敏感性增加。Pierson 等^[14]发现, ERG27 基因作为一个编码的 3-酮还原酶 (甾醇的 C-4 去甲基化必需的基因), 敲除后会导致白色念珠菌完全失去 3-酮还原酶和氧化鲨烯环化酶 (Erg7p) 活性而影响甾醇合成, 提示抑制 ERG27p 的分子药物可成为有效的抗真菌药物。ERG2 和 ERG16 突变的菌株除了导致麦角甾醇合成通路的酶缺陷而引起细胞对药物作用敏感性增加以外, 同时突变导致的膜鞘脂-麦角甾醇相互作用的变化也会干扰白念珠菌的一个主要药物转运蛋白 Cdr1p 的正常表面定位和运作^[15]。

2 多药耐药基因及其转录因子的变异

ABC 转运蛋白 (CDR1 和 CDR2) 及多药耐药蛋白 (MDR) 的过度表达引起的药物外排作用增强, 也是白念珠菌耐药的主要机制之一。ABC 转运蛋白家族是一种 ATP 依赖型转运体, 通过 ATP 水解释放能量将药物泵出细胞外; 而 MDR 以质子动力为能量来源, 通过原生质膜转运药物或其他化合物。

在针对临床分离的耐药菌和敏感菌的研究中发现: 耐药菌的 CDR1 或 CDR2 高表达率显著高于敏感菌^[16]。由此可见, 外排泵蛋白的高表达是区别耐药菌与敏感菌的重要标志。而编码外排泵蛋白的基因以及调控该基因表达的转录因子突变可能是引起蛋白表达水平明显升高的主要原因, 其高表达导致药物外排作用增强, 使进入细胞内的有效药物浓度降低, 最终导致白念珠菌的唑类药物耐受性。

2.1 药物转运蛋白变异 在比对临床耐药菌与敏感菌 CDR1 基因序列时发现^[17]: 在自然条件下突变能获得 6 个有意义的单核苷酸多肽性 NS-SNPS, 但通过定点突变研究其中一个位于 TMS11 和 TMS12 之间的 F1399 残基显示, 其变异并不会影响 CDR1 的功能, 提示自然获得的等位基因突变主要发生在蛋白质非保守区域, 可能不会产生 cdr1p 功能性的变化。CDR2 基因序列存在广泛的等位基因杂合现象和功能等位基因变异, CDR2 某些位点的 NS-SNPS (如 TMS12 位点的 G1473A 和 I1474V 替换) 会导致 cdr2p 等位基因编码蛋白的功能上的区别, 但是杂合性缺失并不影响唑类药物敏感性^[18]。

但是, 人为定点突变研究 CDR1 构效关系发现, TMS6、TMS11、TMS4 上发生 F774A、T1351F、W629L 氨基酸替换时, 突变菌株对氟康唑等敏感性增加。TMS6 的 F774 对底物特异性结合以及 cdr1p 的正确定位起着重要作用; TMS11 的 T1351F 突变可能影响药物从结合位点释放的速度, 使药物转运减慢, 细胞内药物浓度增加; TMS4 的 W629L 突变与药物转运有密切的关系, 且与咪康唑和伊曲康唑结合的转运关

系更密切^[19-21]。NBD 区是 ATP 水解部位, 为药物外排功能的实现提供能量, 当发生 C193K、K901C 定向突变时会损坏 ATP 水解活性, 导致敏感性增加^[22, 23]。以上研究证实了当编码 CDR1 的基因突变引起编码氨基酸变化时可以改变 CDR1p 的功能, 最终影响菌株的药物敏感性。但是临床耐药菌的测序研究并未发现极具意义的位点突变。

2.2 转运蛋白调控因子变异 调控药物转运蛋白表达的转录因子激活, 也会导致白念珠菌内的药物转运蛋白的表达水平上调。TAC1、Mrr1 分别是 ABC 转运蛋白、MDR1 的关键调控因子。TAC1 编码的基因位于白念珠菌 5 号染色体交配型基因座 (mating type-like locus, mlt) 附近, 可调控药物转运蛋白 CDR1、CDR2 的表达水平。TAC1 暴露在唑类抗真菌药物下可发生杂合性的缺失, 即由于药物诱导导致在有丝分裂重组过程中第 5 号染色体左臂上 TAC1 位置基因转变获得高致活性的等位基因, 引起 CDR1、CDR2 表达水平的上调^[24]。Coste 等^[25]发现 TAC1 位置发生 N977D 突变, 使得对应的氨基酸从天冬酰胺变成天冬氨酸, 可导致 TAC1 的高转录活性, 从而使得 CDR1、CDR2 高表达, 且定点突变研究再次证实 N977D 是引起 TAC1 基因高活性及产生耐药性的重要原因。本课题组 Yan 等^[12]在一对耐药菌与敏感菌中也发现, N977K 突变与耐药菌中 CDR1、CDR2 表达上升有关。作为调控 MDR1 表达水平的转录因子 Mrr1 位于白念珠菌的 3 号染色体上, Mrr1 基因序列发生 P683S 及 G997V 突变会引起转录激活, 导致 MDR1 过度表达, 介导白念珠菌的多药耐药性形成^[26]。

除了转运蛋白的转录因子突变以外, 白念珠菌的 CDR1 启动子区域也存在着一些序列调控 CDR1 中的表达水平。有研究发现, 突变或者敲除 CDR1 启动子区域的负调控元件 (NRE 位于 CDR1 转录起始位点上游 -272 ~ -265 bp 区域, 碱基序列为 5'CTGATTGA3'), 会导致耐药菌中抑制作用的减弱, 引起 CDR1 的高表达水平, 最终表现耐药性^[27]。

3 基因拷贝数的变异

随着白念珠菌耐药机制研究的深入, 研究的重点已不再局限于单基因或者多基因突变引起的耐药性。越来越多的研究发现, 耐药菌中存在着不同程度的染色体变化, 提示染色体的变异可能参与白念珠菌的耐药性产生, 其中 5 号染色体是研究关注的重

点。目前已发现, 在 5 号染色体上形成的围绕单个着丝粒反向重复的等臂染色体与唑类药物耐受性密切相关, 两个左臂构成的等臂染色体的获得与缺失会使菌株表现出耐药性的增强与减弱, 推测这种等臂染色体的产生可能是对抗真菌药物选择的一种适应反应^[28]。进一步研究发现, 等臂染色体的出现引起耐药性的机制是: 由于杂合性缺失导致的包括 TAC1 和 ERG11 在内的唑类药物耐药基因拷贝数增加, 进而影响编码麦角甾醇合成的作用靶酶的基因, 药物流出泵的基因以及调控药物流出泵基因的转录因子的表达^[24, 29]。

4 展望

白念珠菌基因突变特别是唑类药物作用靶点的变异, 导致白念珠菌的耐药形势严峻。因此迫切需要开发出具有新型化学结构、新作用机制、新作用靶位的新型抗真菌药物, 克服白念珠菌耐药性。

近年来相继提出了许多抗白念珠菌药物作用的新靶点, 如以真菌细胞壁为靶点的棘白菌素类药物, 主要通过非竞争性抑制 β -(1, 3)-D-葡聚糖合成发挥杀菌作用, 其优点在于 β -葡聚糖合成酶在动物细胞内不存在而具有高效低毒的临床效果^[30]; 以真菌细胞膜为靶点开发出的 Histatin (人富组蛋白) 类药物, 这种阳离子抗菌肽通过在细胞膜表面聚合而改变脂质双分子层, 破坏细胞膜功能达到杀菌作用。另外, 从基因水平寻找新的分子靶向药物成为一种新兴的手段。如以质子泵 ATP 酶为靶点的真菌杀菌剂 BM2 (结构为 D-NH₂-RRRFWWFRRR-C, 其中 R 为精氨酸), 可增加唑类药物的效能并拮抗其耐药性^[31]。以 I 型内含子核酶为靶点的 RNA 抑制剂喷他脒, 在体外可抑制临床白念珠菌内的 I 型内含子核酶的基本 rRNA 基因 (Ca. LSU), 导致对 rRNA 的剪接成熟过程受阻发挥杀菌作用, 可成为抗菌治疗的新靶点^[32]。

当然, 从我国丰富的天然资源中探索和发现新的抗真菌活性化合物, 也是研究新型抗真菌药的重要方向。本实验室一方面从大量的临床菌中筛选出耐药菌, 发现新的突变位点, 鉴定和验证新的耐药基因, 并深入探讨其作用机制; 另一方面根据已建立的高通量的抗真菌药物筛选模型, 从具有一定抗微生物活性的中药材中提取有效成分进行探索, 希望开发出新型抗真菌活性化合物, 与唑类药物联合用药扩大药物的抗菌谱, 解决临床上普遍出现的白念珠菌唑类药物耐受现象, 缩短治疗周期、降低毒副作用

和剂量。现已发现黄连素中提取的有效成分小檗碱与氟康唑联合使用,在体外及系统性真菌感染小鼠体内均有协同抗耐药白念珠菌的作用。因此,开发抗真菌活性化合物,与唑类药物联合应用于临床,将为解决临床耐药白念珠菌感染的治疗困扰带来巨大的福音。

References

- [1] Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem [J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20: 133–163.
- [2] Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study [J]. Clin Infect Dis, 2004, 39: 309–317.
- [3] Onyewu C, Blankenship JR, Del Poeta M, et al. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47: 956–964.
- [4] Xu YH, Chen LM, Li CY. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* species to fluconazole and detection of *Candida albicans* ERG11 mutations [J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 61: 798–804.
- [5] Lamb DC, Kelly DE, Schunck WH, et al. The mutation T315A in *Candida albicans* sterol 14-demethylase causes reduced enzyme activity and fluconazole resistance through reduced affinity [J]. J Biol Chem, 1997, 272: 5682–5688.
- [6] Sanglard D, Ischer F, Koymans L, et al. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42: 241–253.
- [7] Lamb DC, Kelly DE, White TC, et al. The R467K amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase causes drug resistance through reduced affinity [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44: 63–67.
- [8] Podust LM, Poulos TL, Waterman MR. Crystal structure of cytochrome P450 14 α -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 3068–3073.
- [9] Kudo M, Ohi M, Aoyama Y, et al. Effects of Y132H and F145L substitutions on the activity, azole resistance and spectral properties of *Candida albicans* sterol 14-demethylase P450 (CYP51): a live example showing the selection of altered P450 through interaction with environmental compounds [J]. J Biochem, 2005, 137: 625–632.
- [10] Dunkel N, Liu TT, Barker KS, et al. A gain-of-function mutation in the transcription factor Upc2p causes upregulation of ergosterol biosynthesis genes and increased fluconazole resistance in a clinical *Candida albicans* isolate [J]. Eukaryot Cell, 2008, 7: 1180–1190.
- [11] Heilmann CJ, Schneider S, Barker KS, et al. An A643T mutation in the transcription factor Upc2p causes constitutive ERG11 upregulation and increased fluconazole resistance in *Candida albicans* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54: 353–359.
- [12] Yan L, Zhang J, Li M, et al. DNA microarray analysis of fluconazole resistance in a laboratory *Candida albicans* strain [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2008, 40: 1048–1060.
- [13] Miyazaki T, Miyazaki Y, Izumikawa K, et al. Fluconazole treatment is effective against a *Candida albicans* erg3/erg3 mutant *in vivo* despite *in vitro* resistance [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50: 580–586.
- [14] Pierson CA, Jia N, Mo C, et al. Isolation, characterization, and regulation of the *Candida albicans* ERG27 gene encoding the sterol 3-keto reductase [J]. Med Mycol, 2004, 42: 461–473.
- [15] Mukhopadhyay K, Prasad T, Saini P, et al. Membrane sphingolipid-ergosterol interactions are important determinants of multidrug resistance in *Candida albicans* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48: 1778–1787.
- [16] Sun WW, Gao PH, Jiang YY, et al. ATP-binding-cassette transporters and fluconazole-resistance of clinical *Candida albicans* strains [J]. Acad J Second Mil Med Univ (第二军医大学学报), 2008, 29: 1038–1041.
- [17] Haque A, Rai V, Bahal BS, et al. Allelic variants of ABC drug transporter Cdr1p in clinical isolates of *Candida albicans* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 352: 491–497.
- [18] Holmes AR, Tsao S, Ong SW, et al. Heterozygosity and functional allelic variation in the *Candida albicans* efflux pump genes CDR1 and CDR2 [J]. Mol Microbiol, 2006, 62: 170–186.
- [19] Shukla S, Saini P, Smiriti, et al. Functional characterization of *Candida albicans* ABC transporter Cdr1p [J]. Eukaryot Cell, 2003, 2: 1361–1375.
- [20] Shukla S, Ambudkar SV, Prasad R. Substitution of threonine-1351 in the multidrug transporter Cdr1p of *Candida albicans* results in hypersusceptibility to antifungal agents and is essential

- for synergic effects of calcineurin inhibitor FK520 [J]. J Antimicrob Chemother, 2004, 54: 38–45.
- [21] Gao PH, Cao YB, Jia XM, et al. Drug susceptibilities of yeast cells are affected when expressing mutant *Candida albicans* drug resistance protein [J]. Int J Antimicrob Agents, 2006, 28: 69–74.
- [22] Jha S, Karnani N, Dhar SK, et al. Purification and characterization of N-terminal nucleotide-binding domain of an ABC drug transporter of *Candida albicans*: uncommon cysteine 193 of Walker A is critical for ATP hydrolysis [J]. Biochemistry, 2003, 42: 10822–10832.
- [23] Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM. The “LSGGQ” motif in each nucleotide-domain of human P-glycoprotein is adjacent to the opposing Walker A sequence [J]. J Biol Chem, 2002, 277: 41303–41306.
- [24] Coste A, Selmecki A, Forche A, et al. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates [J]. Eukaryot Cell, 2007, 6: 1889–1904.
- [25] Coste A, Turner V, Ischer F, et al. A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating CDR1 and CDR2, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans* [J]. Genetics, 2006, 172: 2139–2156.
- [26] Morschhäuser J, Barker KS, Liu TT, et al. The transcription factor Mrr1p controls expression of the MDR1 efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans* [J]. PLoS Pathog, 2007, 3: e164.
- [27] Gaur NA, Manoharlal R, Saini P, et al. Expression of the CDR1 efflux pump in clinical *Candida albicans* isolates is controlled by a negative regulatory element [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 332: 206–214.
- [28] Selmecki A, Forche A, Berman J. Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans* [J]. Science, 2006, 313: 367–370.
- [29] Selmecki A, Gerami-Nejad M, Paulson C, et al. An isochromosome confers drug resistance *in vivo* by amplification of two genes, ERG11 and TAC1 [J]. Mol Microbiol, 2008, 68: 624–641.
- [30] Denning DW. Echinocandins: a new class of antifungal [J]. J Antimicrob Chemother, 2002, 49: 889–891.
- [31] Monk BC, Niimi K, Lin S, et al. Surface-active fungicidal D-peptide inhibitors of the plasma membrane proton pump that block azole resistance [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49: 57–70.
- [32] Miletti KE, Leibowitz MJ. Pentamidine inhibition of group I intron splicing in *Candida albicans* correlates with growth inhibition [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44: 958–966.