中国科学 C 辑:生命科学 2009 年 第 39 卷 第 7 期: 699 ~ 710
www.scichina.com life.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

氟胞嘧啶作用后的红色毛癣菌表达谱特征分析

赵蓉[①†], 宾文[①†], 刁有江[②], 杨剑[②], 刘涛[②], 彭俊平[②], 金奇[①②*]

① 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 病毒基因工程国家重点实验室, 北京 100176;
② 中国医学科学院病原生物学研究所, 北京 100730
† 同等贡献
* 联系人, E-mail: zdsys@vip.sina.com

收稿日期: 2009-02-12; 接受日期: 2009-06-22
国家高技术研究发展计划(批准号: 2006AA020504)资助项目

摘要 红色毛癣菌是最常见的人类浅部真菌病病原体之一, 可引起皮肤和指甲慢性感染. 为研究抗真菌药物作用下特异表达的基因, 用 cDNA 芯片技术分析了 5-氟胞嘧啶作用下的红色毛癣菌表达谱. 从红色毛癣菌表达序列标签文库中挑选基因制备 cDNA 芯片, 测定 5-氟胞嘧啶的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC), 进行芯片杂交和数据分析, 选取有代表性的 7 个基因用实时定量反转录多聚酶链反应技术(real-time reverser transcription polymerase chain reaction, Real-time RT-PCR)进行验证. 数据分析表明, 有 474 个基因发生了差异性表达, 196 个基因表达上调, 278 个基因表达下调. 核酸代谢途径中的 *CDC21*, 核酸转录因子 E2F1, RNA 代谢途径中的 *SGN1*, *RIM4* 和 *NOP1* 等基因出现明显下调表达. 其他参与了信号转导、分子伴侣活性、离子转运、次级代谢途径、氨基酸转运、脂质转运和潜在耐药机制等作用途径的基因表达也发生相应改变. 所选基因的 Real-time RT-PCR 结果验证了芯片结果的可信性. 本研究得到了第 1 个 5-氟胞嘧啶作用下的红色毛癣菌表达谱, 为进一步研究 5-氟胞嘧啶的药物作用机制和耐药机理提供了有价值的信息.

关键词
红色毛癣菌 (*Trichophyton rubrum*)
cDNA 芯片
5-氟胞嘧啶
基因表达

红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*)是最常见的人类浅部真菌病病原体之一, 可引起皮肤和指甲慢性感染[1,2]. 随着介入性医学治疗的广泛开展、抗真菌药物的滥用、艾滋病感染人群的增加, 尤其在免疫抑制患者发生的深部真菌感染中, 红色毛癣菌引起的感染和复发越来越引起人们的关注[3]. 由于目前临床上常用的几种抗真菌药物的毒副作用和耐药性的频繁出现, 研发新的抗真菌药物成为真菌学研究的重要目标, 而对已知抗真菌药物的研究可以为新药开发提供有用的线索.

红色毛癣菌的流行特点使之成为研究人类丝状真菌感染的理想模式生物. 红色毛癣菌表达序列标签(expressed sequence tags, EST)文库已于 2006 年建成, 基因表达注释也随后完成[4~6]. 从 EST 文库中挑选基因制备 cDNA 芯片, 可用于研究抗真菌药物作用后的真菌基因表达特征, 为研究药物作用机制提供信息[7]. 本研究组已经用 cDNA 芯片技术分析了红色毛癣菌在酮康唑(Ketoconazole)、两性霉素 B(Amphotericin B, AMB)、依曲康唑(Itraconazole)和一种新合成的脂肪酸合成酶抑制剂 PHS11A 作用后的表达谱[8~10]. 这些研究不但分析了红色毛癣菌在这些抗真菌药物作用下的基因表达变化, 而且鉴定出药物已知作用机

引用格式: 赵蓉, 宾文, 刁有江, 等. 氟胞嘧啶作用后的红色毛癣菌表达谱特征分析. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2009, 39(7): 699—710

制的重要靶基因, 并为研制更有效的抗真菌药物提供了新的潜在候选药物作用靶标.

5-氟胞嘧啶是最早发现的抗真菌药物之一, 19 世纪开始应用于临床. 该药作用于酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、曲霉(*Aspergillus*)、暗色真菌(*Dematiaceous fungi*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)和新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)的药物机制已经研究得比较清楚[11~13], 但是其作用于红色毛癣菌的药物机制还不是很清楚. 本研究利用 cDNA 芯片技术分析了 5-氟胞嘧啶作用下的红色毛癣菌基因表达特征, 这将扩展 5-氟胞嘧啶作用机理和耐药机制的相关信息, 并将得到第 1 个 5-氟胞嘧啶作用下的红色毛癣菌表达谱.

1 材料与方法

1.1 菌株和试剂

红色毛癣菌 BMU01672 临床分离株由北京大学真菌和真菌病研究中心提供. 经形态学鉴定[14]及对其核糖体 18S rRNA 和内转录间隔区(internal transcribed spacer regions, ITS)PCR 扩增、测序鉴定为红色毛癣菌[15]. 马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)、酵母提取物、蛋白胨和 D-葡萄糖为 Difco 公司产品. 5-氟胞嘧啶和二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自 Sigma 公司, 不同药物储存浓度用 DMSO 配制.

1.2 cDNA 芯片

EST 文库已经建立, 所有序列已经递交到 GenBank[4]. 有关 GenBank 登录号、contig 和 EST 注释等信息可从红色毛癣菌 TrED 数据库获得(http://www.mgc.ac.cn/TrED)[5]. 本实验最终获得了含有 10000 个点的红色毛癣菌 cDNA 芯片, 其中含红色毛癣菌 EST 8997 条, 有 1003 个对照, 包括空白对照、阴性对照和阳性对照. 每个样品有两个重复, 样品用 Cartesian® arrayer 点样在已包被的甲硅烷(Gamma Amino Propyl Silane, GPASⅡ)玻璃片上(购自 Corning 公司), 玻片杂交前要预封闭[16].

1.3 最低抑菌浓度(MIC)的测定

美国临床实验室标准化委员会(National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS)提出用丝状真菌肉汤稀释法作为抗真菌药物敏感性实验参考方法, 修订为 M38-A[17]. RPMI-1640 培养基购自 GIBCO 公司(含谷氨酰胺, 不含碳酸氢钠), 缓冲液体系是 pH 7.0, 0.165 mol/L 3-吗啉基丙磺酸(morpholine-propanesulfonic acid, MOPS)(Sigma 公司). 5-氟胞嘧啶药物浓度范围是 0.01~64.0 μg/mL, 用光学显微镜观察计数孢子数. 红色毛癣菌菌落接种于 PDA 斜面, 28℃ 培养 7 天以产生孢子, 用适量生理盐水(0.85%)冲洗斜面, 然后用无菌棉拭子轻轻刮碰菌丝, 使孢子游离, 将含有孢子和菌丝的混合物用 Whatman model 40(孔径 8 μm)滤纸过滤, 阻隔菌丝滤过孢子. 滤过的液体转到无菌试管中用生理盐水调整体积为 5 mL. 根据 NCCLS M38-A 参考方法准备微量稀释板. 接种量调整为 0.4×10^4~5.0×10^4 克隆形成单位(colony-forming unit, CFU)/mL. 微量稀释板在 28℃培养 168 h 后观察[18]. MIC 定义为与对照组相比, 有 80%的菌体生长受到抑制时的最低药物浓度. 每个 MIC 实验重复 2 次, 近平滑念珠菌(ATCC22019)和克鲁斯念珠菌(ATCC 6258)作为药敏质控菌株[19].

1.4 芯片实验中药物作用

红色毛癣菌 BMU 01672 接种于 PDA 斜面, 28℃ 培养 7~15 天. 孢子和菌丝混合物用 Whatman model 40 滤纸过滤, 滤过液用 RPMI 培养基获得接种浓度为 1.0×10^6 CFU/mL. 一次芯片实验中需要 6 瓶 100 mL 培养物(3 瓶用于 5-氟胞嘧啶作用组, 3 瓶用于质量控制组). 所有药物作用都在同一天进行, 使用相同的培养条件以减少实验误差. 最终接种浓度为 1.0×10^4 CFU/mL. 培养物在 28℃ 以 150 r/min 速度孵育达到半饱和状态(3 天)时, 加 5-氟胞嘧啶于其中 3 瓶培养基中, 浓度为 0.5 倍 MIC(即 32 μg/mL), 每瓶加入 100 μL. 质量控制组 3 瓶培养液中各加入 100% DMSO 100 μL. 继续孵育 24 h 后收获, 用 Whatman No.1 滤纸过滤, 无菌蒸馏水清洗, 快速冷冻于液氮中准备提取 RNA.

1.5 总 RNA 提取、mRNA 富集和反转录

冷冻后的红色毛癣菌放入盛有液氮的研钵中, 用力研磨直至样品被研成粉末以破碎细胞. 总 RNA

分离使用 RNeasy®Plant Mini Kit(Qiagen). RNA 浓度和纯度用分光光度计在 230, 260, 280 和 320 nm 处测量光吸收率. 用琼脂糖凝胶电泳来检测 RNA 纯度和完整性. mRNA 分离、纯化使用 Oligotex mRNA Mini Kit(Qiagen). 反转录合成使用 Super-script™IIRT (Invitrogen). 纯化 cDNA 使用 Qia quick PCR purification Kit(Qiagen).

1.6 标记、杂交

荧光标记反应使用 BioPrime®DNA labeling system(Invitrogen), 其中药物处理组用 Cy5 标记, 质量控制组用 Cy3 标记. 用 Qia quick PCR purification Kit(Qiagen)纯化标记产物. 将 Cy5 与 Cy3 标记产物混合后 65℃杂交过夜, 芯片洗涤后用 GenePix 4000B 扫描仪(Axon Instruments)检测. Cy5 和 Cy3 标记 DNA 样品分别用波长 635 和 532 nm 进行扫描.

1.7 数据分析

用 GenePix 6.0 软件(Axon Instruments)定量分析芯片杂交结果的图像. 分析前先将信号标准化, 算法为 locally weighted scatter-plot smoothing regression (LOWESS)algorithm[20], 使用 MIDAS 软件包(http://www.tigr.org/software/tm4)[21], 参数设为 0.33. 本实验判定基因差异性表达的标准为: 3 次独立实验中 3 套 RNA 样品的平均表达水平至少在 1.5 倍以上, 而且 3 次实验的基因表达变化都是相同方向(上调或下调).

1.8 实时定量 RT-PCR 检测

用于验证芯片实验结果的可信性. RNA 来源是芯片实验中保存的来自质量控制组和药物处理组样品的 RNA. 使用 SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR(Invitrogen)合成一链. 每次实验重复 3 次, 使用 7000Sequence Detection System(Applied Biosystems)进行检验. 用 18S rRNA 作为内参对照, 使用 SYBR green PCR Master Mix(Applied Biosystems). 被检测基因和 18S rRNA 的引物设计使用 Primer Express®软件(Applied Biosystems), 引物序列见表 1. 反应条件为: 95℃ 10 min, 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 共 40 个循环. 系统软件监测每个循环中的 SYBR green I 荧光染料的变化, 计算每个反应的阈值循环数(C_T):

样品 C_T–18S rRNA $C_T = \Delta C_T$,

每个样品 ΔC_T–控制组 $\Delta C_T = \Delta\Delta C_T$.

基因表达水平为 $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

表 1 实时定量 RT-PCR 检测的基因及其引物序列

目的基因	引物序列(5′→3′)[a)]	扩增长度/bp
18S	CGCTGGCTTCTTAGAGGGACTAT(F)	51
	TGCCTCAAACTTCCATCGACTT(R)	
CDC21	GTCCCAGACTTGATTGAGATGT(F)	50
	CAACCCTGACCGCCTAAA(R)	
CYP2A	GCTTCGTTCCGTTCTTTGG(F)	117
	CATGGGTATTGGACTGCTGAT(R)	
MET32	GCTGGAAACATAACTTTGACTGC(F)	170
	CCCAAGGACCCCTGAATCT(R)	
YCF1	TGTCGTCTCGCACCATCA(F)	151
	AGTCGGTAGACAGCAGGGTAT(R)	
DW701891	GCCCTTTTACTACTATCCATCCG(F)	85
	CCGTTTATTGGCACCTATTACC(R)	
RPS30B	GGTGGAAAGCGAAAGATGA(F)	76
	AAACGAGGCGTGAAGAGC(R)	
RHO2	GAAGGGCACTTTCCCAGAG(F)	119
	GGGCGAAGACGGTCATAA(R)	

a) F 指正向引物, R 指反向引物

1.9 芯片结果递交情况

本研究的芯片实验相关结果已经递交到 Gene Expression Omnibus(GEO), 登录号为 GSE12861.

2 结果

2.1 MIC 测定

通过 5-氟胞嘧啶的药物敏感性实验, 检测到该药作用于红色毛癣菌 01672 的 MIC 浓度为 64 μg/mL. 质量控制菌株为近平滑念珠菌(ATCC 22019)和克鲁斯念珠菌(ATCC 6258)[19].

2.2 cDNA 芯片

利用 cDNA 芯片技术得到 5-氟胞嘧啶处理后的红色毛癣菌差异性表达基因功能分类情况见表 2.

2.3 芯片基因差异性表达

本实验观察到 474 个基因在 5-氟胞嘧啶作用下发生差异性表达, 其中 41.35%(196)表达上调, 58.65%(278)表达下调. 5-氟胞嘧啶作用后特异变化基因的功能分类和与总基因的对比情况见表 2.

本研究获得的差异性表达基因所占比例最大的是未知功能基因, 占 51.05%, 表明此类基因在以前的功能研究中未被鉴定, 与所有已发现蛋白基因没有同源性. 其他差异性表达基因功能分类所占的比例是: 翻译后修饰、蛋白折叠和分子伴侣 5.27%, 转录 3.59%, 信号传导 3.59%, 糖类转运与代谢 3.38%, 次级代谢产物合成、转运与分解代谢 3.16%, 氨基酸转运与代谢 2.95%.

在上调基因中, 所占百分比最大的是信号传导

表 2 5-氟胞嘧啶处理后的差异性表达基因功能分类及与总基因的对比 a)

功能分类	芯片上基因数目(%)	差异性表达基因数目(%)	上调基因数目(%)	下调基因数目(%)
氨基酸转运与代谢	230(2.56)	14(2.95)	5(2.55)	9(3.24)
糖类转运与代谢	226(2.51)	16(3.38)	6(3.06)	10(3.60)
细胞周期、细胞分裂和染色体分离	89(0.99)	7(1.48)	3(1.53)	4(1.44)
细胞壁/细胞膜/细胞外膜合成	37(0.41)	7(1.48)	6(3.06)	1(0.36)
染色质结构和动力学	67(0.74)	4(0.84)	3(1.53)	1(0.36)
辅酶转运和代谢	75(0.83)	7(1.48)	1(0.51)	6(2.16)
细胞骨架	125(1.39)	4(0.84)	2(1.02)	2(0.72)
防御机制	40(0.44)	6(1.27)	4(2.04)	2(0.72)
能量产生与转换	255(2.83)	10(2.11)	3(1.53)	7(2.52)
细胞外结构	25(0.28)	3(0.63)	3(1.53)	0
预测功能	509(5.66)	49(10.34)	21(10.71)	28(10.07)
无机离子转运和代谢	113(1.26)	12(2.53)	9(4.59)	3(1.08)
细胞内运输、分泌和液泡转运	249(2.77)	5(1.05)	4(2.04)	1(0.36)
脂质运输与代谢	180(2.00)	10(2.11)	2(1.02)	8(2.88)
核结构	33(0.37)	1(0.21)	1(0.51)	0
核苷酸运输与代谢	69(0.77)	6(1.27)	4(2.04)	2(0.72)
翻译后修饰、蛋白折叠和分子伴侣	467(5.19)	25(5.27)	11(5.61)	14(5.04)
DNA 复制、重组与修复	83(0.92)	5(1.05)	0	5(1.80)
RNA 加工和修饰	182(2.02)	9(1.90)	1(0.51)	8(2.88)
次级代谢产物合成、转运与分解代谢	105(1.17)	15(3.16)	3(1.53)	12(4.32)
信号传导	243(2.70)	17(3.59)	12(6.12)	5(1.80)
转录	191(2.12)	17(3.59)	6(3.06)	11(3.96)
翻译、核糖体结构和生物发生	456(5.07)	9(1.90)	7(3.57)	2(0.72)
未知功能	5,654(62.84)	242(51.05)	93(47.45)	149(53.60)
总计	8,997	474	196	278

a) 括号内的数据为百分比

6.12%, 接下来是翻译后修饰、蛋白折叠和分子伴侣 5.61%, 无机离子转运和代谢 4.59%. 在下调基因中, 所占百分比最大的是翻译后修饰、蛋白折叠和分子伴侣 5.04%, 其次是次级代谢产物合成、转运与分解代谢 4.32% 和转录 3.96%, 结果见表 2.

5-氟胞嘧啶作用后的红色毛癣菌 474 个差异性表达的基因中, 部分已知生物学功能或推测功能的基因见表 3.

2.4 实时定量 RT-PCR

实时定量 RT-PCR 检测芯片结果中的 7 个基因 (*CDC21*, *CYP2A*, *DW701891*, *MET32*, *RHO2*, *RPS30B*, *YCF1*), 这些基因中不但有已知的 5-氟胞嘧啶药物作用靶点基因(如 *CDC21*), 而且有本研究新发现的基因(如 *YCF1* 和 *RHO2*). 实时定量 RT-PCR 与芯片结果对比见图 1. 两种方法相关性高(r=0.86, P < 0.05), 证实了芯片数据的可信性. 挑选的 7 个基因中, 4 个基因表达上调, 3 个基因表达下调.

3 讨论

DNA 复制必需的原料是三磷酸脱氧胸腺嘧啶核苷(deoxythymidine triphosphate, dTTP), 由三磷酸脱氧尿苷(deoxy-uridine triphosphate, dUTP)合成. dUTP 分解代谢为一磷酸脱氧尿苷(deoxy-uridine monophosphate, dUMP), 再与四氢叶酸反应生成三磷酸脱氧腺苷(deoxyadenosine triphosphate, dTMP)和二氢叶酸, 这个反应由胸苷酸合酶(thymidylate synthase, TS)催化, 最后生成 dTTP. 5-氟胞嘧啶进入真菌细胞后, 代谢成氟脱氧尿嘧啶(fluorodeoxyuridine monophosphate, FdUMP)[22], 可抑制胸苷酸合成酶的活性, 减少 dTTP 的生成, 从而阻止 DNA 合成. 因此胸苷酸合成酶是 5-氟胞嘧啶的主要靶酶. 本研究观察到编码胸苷酸合成酶的基因 *CDC21* 出现差异性表达(表 3). *CDC21* 基因出现明显下调表达(2.1 倍), 这个结果与以前 5-氟胞嘧啶作用白色念珠菌的报道有所不同[23]. 而且基因 *DW685130* 编码核糖核酸酶 G 和 E, 是 DNA 复制过程中的关键酶, 也出现了表达下调的现象, 其原因有待进一步研究. 可能 5-氟胞嘧啶对红色毛癣菌的药物作用机制是特异性抑制了 DNA 生物合成过程中药物作用靶点基因的表达. 胸苷酸合成酶可调节 DNA 合成和细胞核分裂, 是抗真菌效应的

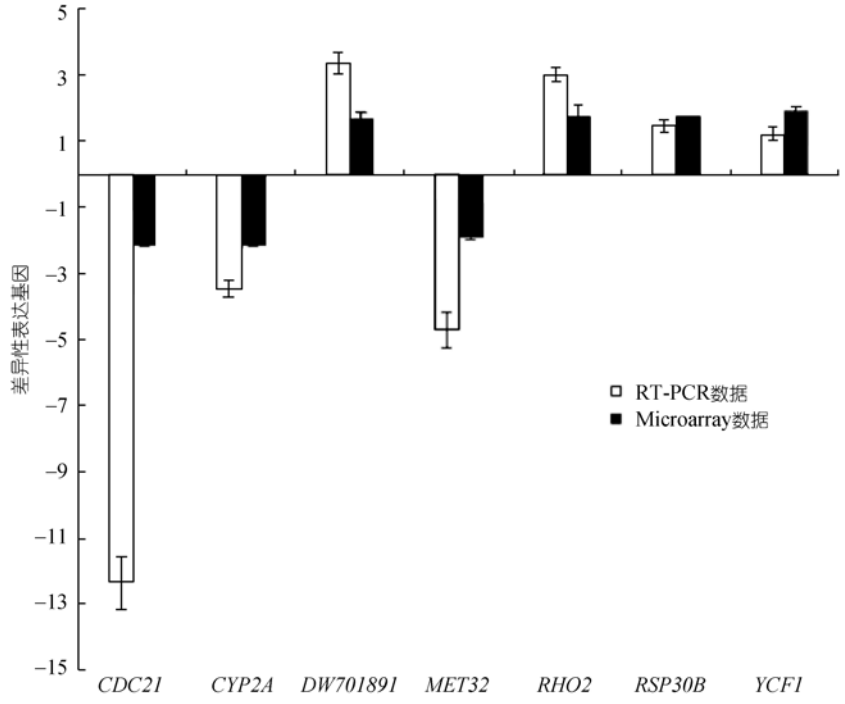


图 1 实时定量 RT-PCR 与芯片实验基因表达水平比较

表 3　5-氟胞嘧啶作用后的部分差异性表达的基因

GenBank 登录号	基因缩写	功能注释	相对倍数诱导/抑制 [a)]
核苷酸转运与代谢			
DW683900	*CDC21*	胸苷酸合酶	−2.10
DW678497	*ISN1*	5′ 核苷酸酶	+0.75
DW707735	*TPK1*	蛋白激酶活性; 核苷酸结合	+0.93
EL790053		核苷磷酸酶	+0.65
DW685130		核糖核酸酶 G 和 E	−1.73
DW697304		锌指核酸结合蛋白	+0.66
信号传导			
EB801638	*BCK1*	推测的丝裂原活化蛋白激酶 MAP3K(Bck1)	−1.56
DW700523	*KIN82*	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	+0.89
EL786956	*PLP2*	保守的类光传感因子蛋白	−1.66
EL789333	*RHO1*	Rho 蛋白信号转导调节	+0.61
DW689689	*RHO2*	Ras-相关小鸟苷三磷酸酶, Rho 类型	+0.80
DW697760	*SLN1*	感觉传导组氨酸激酶	+0.78
DW698994		酪蛋白激酶(丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸蛋白激酶)	+0.74
DW688331		G-蛋白连结的受体蛋白质, 信号通路	+0.67
翻译后修饰、蛋白折叠、分子伴侣			
DW689141	*Hsp12p*	热休克蛋白 Hsp12,	−2.25
DW685811	*Hsp40*	分子伴侣(DnaJ 超家族)	−3.17
DW696046	*HSP70*	分子伴侣 HSP70/HSC70, HSP70 超家族	+0.75
DW681070	*MDN1*	AAA+-型三磷酸腺苷酶	+0.63
DW691353		线粒体途径肽酶, beta 亚单位, 及相关酶(胰岛素酶超家族)	+1.19
DW684944	*PIM1*	线粒体 ATP-依赖的蛋白酶 PIM1/LON	−1.73
DW690909	*RBL2*	Beta-微管蛋白折叠因子辅助因子 A	−1.67
DW680289	*UFD2*	E3 泛素蛋白连接酶	−2.11
DW688351		多功能分子伴侣(14-3-3 家族)	−1.55
DW406854		枯草杆菌蛋白酶相关蛋白酶/空泡蛋白酶 B	−1.61
转录			
DW708254	*CTI6*	FOG: TPR 重复	+0.86
DW690474	*E2F1*	转录因子	−1.75
DW690333	*RPC34*	RNA 多聚酶Ⅲ, 亚单位 C34	−1.51
R006419	*SKO1*	bZIP 转录因子	−1.84
DW703302	*SPT15*	转录因子 r MBF1	−1.55
EL785951	*SUB1*	转录共激活物 p100	+0.59
DW699229		钙反应性转录共激活物	−1.57
DW406772		NAD(P)H: 醌氧化还原酶	−1.93
DW707891		转录调节子	+0.75
DW709093		转录调节子, AraC 家族	+0.71
DW683010		转录调节子, LuxR 家族	−1.54
RNA 加工和修饰			
DW681165	*SGN1*	RNA 识别基序基序(RRM)包含蛋白	−2.17
DW686135	*RIM4*	RNA 结合蛋白	−2.11
DW689367	*NOP1*	(核仁)纤维蛋白和相关核仁 RNA 结合蛋白	−1.84
DW690252	*PRP22*	ATP-依赖的 RNA 解旋酶	−1.77
DW690795		与 poly(A) 结合蛋白相互作用的蛋白	−1.61
无机离子转运与代谢			
DW689541	*CTR1*	铜转运子	+0.70
DW703449	*ECM17*	亚硫酸盐还原酶(铁氧还原蛋白)	+0.59
EB801680	*MET3*	三磷酸腺苷硫酸化酶(硫酸腺苷酰转移酶)	+1.28
DW689139	*PMR1*	Ca^{2+}运输三磷酸腺苷酶	+0.65

续表 3

GenBank 登录号	基因缩写	功能注释	相对倍数诱导/抑制 a)
无机离子转运与代谢			
EL787943	*SMF2*	Fe^{2+}/Zn^{2+}运输子	–1.65
DW701891		钙通道亚单位 Mid1	+0.78
DW692468		Na^{+}/K^{+}三磷酸腺苷酶, alpha 亚单位	+0.75
DW679720		电压门控性 Ca^{2+}通道, alpha1 亚单位	–1.88
次级代谢产物的生物合成、转运及分解代谢			
DW691247	*CCP1*	细胞色素 c 过氧化物酶	–1.75
EL789589	*CPR3*	细胞色素 P450 CYP3/CYP5/CYP6/CYP9 亚家族	–2.09
DW708105	*CYP2A*	细胞色素 P450 CYP2 亚家族	–2.10
DW681149	*GSH2*	谷光苷肽合成酶	–1.87
DW693886	*PDR10*	多药性/信息素输出子, ABC 超家族	–1.50
DW685441		氧化还原酶, 2OG-Fe(Ⅱ)氧酶家族	–1.98
DW682490		谷光苷肽依赖甲醛激活, GFA	–1.58
EL793455		铁/维生素 C 氧化还原酶	–2.05
氨基酸转运与代谢			
DW684772	*NPR1*	氨基酸运输子	+0.65
DW700510	*RIB2*	推测的核黄素特异性脱氨基酶	–2.23
EL788337	*NFS1*	半胱氨酸脱硫酶 NFS1	–1.86
DW693274		鸟氨酸转移酶	–1.68
DW688359		二氢吡咯-5-羧酸还原酶,5-羧酸吡咯啉还原酶	–1.55
DW702192	*PAA1*	二氨乙酰转移酶	+0.81
DW691077	*PDC5*	硫胺素焦磷酸盐需要的酶	–2.23
脂类运送与代谢			
DW685435	*PXA1*	过氧化物酶长链脂酰辅酶 A 运输子, ABC 超家族	–2.01
DW698808	*VHT1*	$H^{+/}$寡肽共运输体	–1.68
DW706163		铁硫簇装配辅助蛋白 Isa2	–1.90
EL793132	*ZTA1*	类固醇单氧合酶输入/氧化还原酶活性	–1.59
EL793782	*OLE1*	脂肪酸去饱和酶	–1.57
EB801533	*SCS7*	神经鞘脂脂肪酸羟化酶	+0.60
DW704249	*ERG27*	固醇还原酶/核纤层蛋白 B 受体	+0.73
翻译、核糖体结构及生物发生			
EL787685	*RPS30B*	40S 核糖体 S30 蛋白质融合作用	+0.79
DW678994	*RPL8A*	60S 核糖体蛋白质 L14/L17/L23	–1.73
DW687528		翻译起始因子 5B(eIF-5B)	–1.59
EL787403	*RIA1*	延伸因子 2	+0.61
DW695092	*SSD1*	体外 3′-5′ 核糖核酸外切酶复合物, 亚单位 Rrp44/Dis3	+1.08
与耐药相关基因			
EB801596	*MFS*	预测运输子(主要运输超家族)	–2.99
EL786044	*SNQ2*	ABC 运输子 7	+0.84
EL786046	*SEO1*	主要运输超家族透酶	+0.84
DW704754	*YCF1*	多耐药相关蛋白/盐酸米托蒽醌耐药蛋白, ABC 超家族	+0.93
预测功能			
EB801596	*MFS*	预测的运输子(主要运输超家族)	–2.99
DW685862	*MET32*	C_2H_2 型锌指蛋白	–1.88
DW697720		FK506 抑制子 Sfk1	–1.79
DW707547	*AZF1*	锌指蛋白	–1.79

a) +: 诱导; –: 抑制

主要体现者[24], 并且是 DNA 合成中胸腺嘧啶核苷的唯一来源, 因此该酶对于 DNA 复制、细胞生长和细胞发育非常重要[25]. 这些下调表达的基因提示: 在 5-氟胞嘧啶作用下, 红色毛癣菌的生长和核酸代谢途径可能受到了抑制.

具有信号传导功能的基因是被 5-氟胞嘧啶作用诱导表达所占比例最多的一组(表 2). 本研究发现 *RHO1*, *RHO2*, *SLN1*, *DW698994*, *DW688331* 和 *KIN82* 的基因表达发生上调变化(表 3). 对比同类抗真菌药物表达谱研究, *RHO* 基因家族是本研究中新发现的差异性表达的基因. 以前曾有报道, RHO1 蛋白是三磷酸鸟核苷(GTP)结合蛋白, 可调节真菌细胞壁葡聚糖合成酶[26]. 另有实验发现, 酶 Rho1 对于真菌细胞壁和肌动蛋白细胞骨架的极化非常关键[27]. Alpha-葡聚糖是真菌细胞壁的必要结构, 由 *RHO2* 基因通过 1,3-alpha-D-葡聚糖合酶 Mok1 调节其合成[28]. 而且一些研究表明, RHO1 和 RHO2 蛋白是 Ras 相关鸟苷三磷酸酶, 在孢子萌发、菌丝形成和生殖等功能中发挥作用[29,30]. 本实验发现, *RHO1* 基因和 *RHO2* 基因的表达都发生上调变化. 这些被诱导表达的 *RHO* 基因家族信号传导通路提示: 尽管 5-氟胞嘧啶的药物作用可能抑制了细胞生长, 但是红色毛癣菌细胞还是努力生存下来, 并可能修复真菌细胞壁用于防御功能. 要注意的是, 有研究发现在渗透性应激反应中, 啤酒酵母的 *RHO1* 触发了两个截然不同的路径: 激活细胞膜 1,3-beta-葡聚糖合成酶复合物和激活蛋白激酶 C1(protein kinase C1, PKC1)信号传导通路[31]. 后者意味着 Rho1p 蛋白也调控了一个丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)级联通路. 同时本研究发现, 编码 MAPK 上级级联通路, 即丝裂原活化蛋白激酶 MAP3K(MAP kinase kinase kinase, MAP3K)基因 *BCK1* 的表达出现下调变化. 有实验证明, *BCK1* 主要调节细胞完整性、细胞周期、细胞壁构建、生殖和渗透性维持等多方面功能[32]. 5-氟胞嘧啶对于红色毛癣菌生长和活动的抑制可能是 *BCK1* 基因下调表达的原因. *RHO* 家族和 *BCK1* 两个信号传导途径的不同基因表达提示: *BCK1* 信号通路可能发生在红色毛癣菌信号传导机制中占优势地位.

参与翻译后修饰、蛋白折叠和分子伴侣功能的基因, 是在 5-氟胞嘧啶药物作用下出现上调表达基因所占百分比第 2 的部分, 如基因 *Hsp70*, *DW691353* 和 *MDN1*. 同时这类基因也是药物作用下基因表达出现明显下调最大比例的一组, 例如 *Hsp40*, *DW688351* (*14-3-3*), *Hsp12p* 和 *UFD2*(表 3). 这些基因大部分都是分子伴侣, 可以保护蛋白质的天然结构, 调节蛋白折叠、定位和激活. 另外, 它们还参与细胞的应激反应和调节蛋白跨膜转运. 本研究中, *Hsp70* 基因出现了诱导表达. 以往的研究表明, Hsp70 蛋白可在细胞受到压力选择的时候, 通过结合部分未折叠的蛋白来保护细胞, 阻止蛋白凝集[33]. 另外有实验提示: Hsp70 蛋白可能在环境应激反应和适应中扮演重要角色[34]. 本研究结果与此类似, 5-氟胞嘧啶的药物作用导致了红色毛癣菌细胞内的环境应激压力, 因而 *Hsp70* 基因的表达上调可能达到保护细胞内蛋白质的目的. *Hsp40* 基因表达都出现下调变化, 有实验表明, *Hsp40* 联合 PKC 共同影响酿酒酵母细胞壁的完整性[35]. 与这个结果相同, 本研究中真菌生长和细胞壁生物合成可能被 5-氟胞嘧啶抑制, 因此有可能导致 *Hsp40* 基因表达也发生了抑制效应. 编码 14-3-3 的基因 *DW688351* 也出现下调表达. 有研究发现, 14-3-3 蛋白家族参与了许多生物过程, 包括信号传导、细胞代谢、细胞周期调节等[36]. 另有报道, 在 14-3-3 和 PKC 之间有功能联系[37], 提示 14-3-3 蛋白可能与 Hsp40 蛋白功能相似. 这些差异性表达的基因说明蛋白分子伴侣受到了 5-氟胞嘧啶药物的影响.

研究发现, 许多参与转录功能的基因表达出现下调变化, 例如 *E2F1*, *RPC34*, *SKO1* 和 *SPT15* . 有研究报道, 胸苷酸合成酶的转录由 *E2F* 基因家族调控[38]. 本研究验证了这个结果, *E2F1* 基因出现了差异性表达. 要指出的是在同类药物表达谱研究中目前还未见对 *E2F1* 的报道, 它是本研究新发现的基因. 抑制 *E2F1* 将阻止细胞进入 S 期, 而过表达的 *E2F1* 将导致胸苷酸合成酶 mRNA 和蛋白水平的增加[39,40]. *E2F1* 可能在体内调控胸苷酸合成酶基因表达中起着关键作用[39]. 5-氟胞嘧啶的药物作用可能抑制了红色毛癣菌的生长,因此可能自然抑制了 *E2F1* 基因和胸苷酸合成酶的表达. 基因 *RPC34* 编码 RNA 聚酶Ⅲ, 主要负责 tRNA 和 5S rRNA 的合成. *RPC34* 基因出现下调表达提示: 5-氟胞嘧啶可能抑制了红色毛癣菌的转录过程.

5-氟胞嘧啶的第 2 条代谢途径是关于三磷酸 5-氟尿嘧啶(5-fluorouridine triphosphate, FURTP), 这个代谢产物替代了尿苷酸插入 RNA 合成[22]. 该途径在体外改变了 tRNA 的氨基酰化, 干扰了 RNA、蛋白质和糖类合成[41~43]. 本研究发现, 参与 RNA 合成途径的基因受到了 5-氟胞嘧啶的影响, 同时基因 *SGN1*, *RIM4*, *NOP1*, *PRP22* 和 *DW690795* 也出现下调表达变化(表 3). 核蛋白为 pre-mRNA 加工和核的输出功能提供空间结构[44], 新 RNA 合成与 RNA 结合蛋白的表达水平紧密相关. 本研究新发现 3 个编码 RNA 结合蛋白的基因发生差异性表达, 即 *SGN1*, *RIM4* 和 *NOP1*. *SGN1* 在 mRNA 翻译过程中有潜在的功能, 负责编码翻译起始蛋白. 有研究表明它在胞质 mRNA 表达中发挥调控作用[45]. 在早期和中期孢子生成基因的表达中需要基因 *RIM4*, 它是减数分裂和重组所需要的基因[46]. *NOP1* 编码核仁纤维蛋白, 即小核仁 RNA-结合蛋白[47]. 这 3 个下调表达的基因提示 5-氟胞嘧啶的药物作用可能抑制了红色毛癣菌 RNA 加工和修饰过程. 基因 *DW690795* 编码可与 poly(A)-结合蛋白相互作用的蛋白, 这个基因的下调表达提示 5-氟胞嘧啶的作用可能影响了转录后的 mRNApoly(A)尾的加工过程.

自从 20 世纪 50 年代发现 5-氟胞嘧啶以来[48], 该药已经广泛应用于治疗癌症和真菌感染. 然而耐药性的普遍产生对于 5-氟胞嘧啶的临床应用是很大的阻碍, 因此临床上为了提高 5-氟胞嘧啶的吸收效率, 常常与两性霉素 B 联合用药[49]. 目前已有关于 5-氟胞嘧啶耐药性机制的研究, 如药靶改变和进入靶点药物的减少[50].

本实验对红色毛癣菌的细胞膜转运系统对于 5-氟胞嘧啶耐药性的潜在机制进行了研究. 芯片结果检测到许多膜转运系统基因发生了差异性表达, 包括无机离子转运基因(如 *SMF2*, *CTR1*)、次级代谢产物转运基因(如 *PDR10*)、氨基酸转运基因(如 *NPR1*)、脂质转运基因(如 *PXA1*, *VHT1*)和可能与耐药性相关的转运基因(如主要运输超家族 *MFS*, *SNQ2*, *YCF1*)(表 3). 这些基因均属于以下 3 类跨膜转运系统蛋白: 通道蛋白(如 *DW701891*), 运输子(如 *MFS*)和泵(即三磷酸腺苷酶, 如 *DW692468*). 有关耐药性的 3 大基因家族分别是 ATP-结合盒(ABC)家族、多药抗性(MDR)家族和多效耐药(PDR)家族. 以往对啤酒酵母的研究曾报道过 7 个多效耐药 PDR 基因, 去除这些基因将使细胞 2~200 倍敏感于抗真菌药物, 而这些蛋白过表达将在体外表现为三磷酸腺苷酶活性和体内相当明显的多效耐药现象[51]. 本研究检测到 3 个基因: *YCF1*, *SNQ2* 和 *PDR10*, 其中 *YCF1* 和 *SNQ2* 基因表达水平受到诱导, 而 *PDR10* 基因表达受到抑制. *YCF1* 是一种空泡谷光苷肽 S−共轭泵[52,53]. 缺失此基因的突变菌株失去了转运化合物到空泡的能力[54]. *YCF1* 通过降低细胞内的药物浓度, 来对各种细胞毒性药物产生耐药性[55]. 本研究发现 *YCF1* 基因的上调表达, 有潜在的可能把 5-氟胞嘧啶药物从红色毛癣菌细胞内泵出, 以降低靶点基因的药物浓度, 可能与 5-氟胞嘧啶的耐药机制有关. 由 *SNQ2* 编码的蛋白有一个区域可与 ATP 结合, 有可能是一个膜相关的 ATP 依赖的透酶[56]. *SNQ2* 是 RNA 水平的多耐药基因, 在许多缺失突变菌株中该基因表达减少[57]. 本研究中 *SNQ2* 的诱导性表达, 可能将 5-氟胞嘧啶渗透出细胞以减少药物在红色毛癣菌细胞中的蓄积, 可能与 5-氟胞嘧啶的耐药性相关. 第 3 个基因 *PDR10* 可能编码多耐药转运子, 但是此基因还参与了次级代谢途径, 后一个功能表现似乎更为明显, 从而掩盖了其可能的耐药功能. 本研究检测到的诱导表达的 *YCF1* 和 *SNQ2* 是 5-氟胞嘧啶药物表达谱中新发现的与耐药性有潜在联系的基因.

参与无机离子运输和代谢功能的基因中, *CTR1*, *ECM17*, *PMR1* 和 *MET3* 的表达都出现上调变化, 基因 *DW701891* 编码钙通道亚单位 Mid1, 与信息素诱导的钙离子摄取和细胞生育力有关, 在 5-氟胞嘧啶作用下出现了诱导性表达, 提示 5-氟胞嘧啶药物作用可能影响了细胞膜通透性, 增加了离子进出红色毛癣菌细胞的频率, 加快了代谢途径. 基因 *CCP1*, *CPR3*, *CYP2A* 是 CYP450 家族成员, 主要催化内源性化合物的生物合成、降解及外源性化合物的生物转化, 这些基因的表达都是下调变化, 提示红色毛癣菌的次极代谢途径受到了 5-氟胞嘧啶的影响. 参与翻译、核糖体结构和合成功能的基因 *RPS30B* 编码 40S 核糖体 S30 蛋白, 该基因表达上调提示可能受到 5-氟胞嘧啶药物的诱导. 另外有部分基因由于只与 clusters of

orthologous groups(COG), gene ontology(GO) 数据库中的少数蛋白基因有同源性, 被归类为推测的一般功能. 在这些推测功能的基因里, 基因 *MET32* 编码 C_2H_2 型锌指蛋白, 基因 *AZF1* 也编码锌指蛋白, 均出现下调性表达. 研究表明, 泛素与不同细胞内的反应有功能上的联系, 其结合域的转录因子是 *MET4*. 作为 *MET4* 的辅助因子, *MET32* 可调控硫代谢和氧化应激反应基因的表达[58]. 基因 *MET32* 在 5-氟胞嘧啶作用下出现抑制性表达, 可能因为药物抑制了硫代谢或氧化应激反应, 但还需要有进一步的研究加以验证. 其他参与了核苷酸代谢、脂质代谢等功能的基因也发生了差异性表达, 结果见表 3.

本研究利用 cDNA 芯片技术分析了 5-氟胞嘧啶作用下的红色毛癣菌基因差异性表达. 得到了第 1 张 5-氟胞嘧啶处理后的红色毛癣菌基因转录谱. 其中参与核苷酸的运输和代谢功能基因 *CDC21* 的差异性表达验证了已经报道的氟胞嘧啶作用机制. 同时发现了几个新的基因, 如参与信号传导功能的基因 *RHO1* 和 *RHO2*, 参与转录功能的基因 *E2F1*, 参与 RNA 加工和修饰功能的基因 *SGN1*, *RIM4* 和 *NOP1*. 另外还发现参与无机离子运输和代谢功能的基因 *DW701891* 出现诱导性表达, 可能与药物作用影响细胞膜通透性有关. 参与次极代谢途径功能的基因 *CYP2A* 出现下调变化. 参与翻译、核糖体结构和合成功能的基因 *RPS30B* 的表达上调. 与潜在耐药机制有关基因 *YCF1*, *SNQ2* 的表达上调. 预测功能的基因 *MET32* 的下调性表达可能与药物作用抑制硫代谢或氧化应激相关. 这些结果为更好了解 5-氟胞嘧啶在红色毛癣菌上的作用机制和潜在耐药性机理的研究提供了有价值的信息, 并为未来新的抗真菌药物的开发提供了线索.

致谢 感谢北京大学医学真菌研究中心的李若瑜教授提供红色毛癣菌菌株 BMU01672.

参考文献

1 Kemna M E, Elewski B E. AUS epidemiologic survey of superficial fungal diseases. J Am Acad Dermatol, 1996, 35: 539—542

2 Elewsk E B. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis and management. Clin Microbiol Rev, 1998, 11: 415—429

3 Cordeiro R A, Brilhante R S, Rocha M F, et al. Antifungal susceptibility and genetic similarity of sequential isolates of *Trichophyton rubrum* from an immunocompetent patient with chronic dermatophytosis. Clin Exp Dermatol, 2006, 31: 122—124

4 Wang L, Ma L, Leng W, et al. Analysis of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* expressed sequence tags. BMC Genomics, 2006, 7: 255—268

5 Yang J, Chen L H, Wang L L, et al. TrED: the *Trichophyton rubrum* Expression Database. BMC Genomics, 2007, 8: 250—256

6 Liu T, Zhang Q, Wang L, et al. The use of global transcriptional analysis to reveal the biological and cellular events involved in distinct development phases of *Trichophyton rubrum* conidial germination. BMC Genomics, 2007, 8: 100—114

7 Agarwal A K, Rogers P D, Baerson S R, et al. Genome-wide expression profiling of the response to polyene, pyrimidine, azole, and echinocandin antifungal agents in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2003, 278(37): 34998—35015

8 Yu L, Zhang W, Wang L, et al. Transcriptional profiles of the response to ketocanazole and amphotericin B in *Trichophyton rubrum*. Antimicrob Agents Ch, 2007, 51(1): 144—153

9 Diao Y J, Zhao R, Deng X M, et al. Transcriptional profiles of *Trichophyton rubrum* in response to itraconazole. Med Mycol, 2008, 47(3): 237—247

10 Zhang W, Yu L, Leng W, et al. cDNA microarray analysis of the expression profiles of *Trichophyton rubrum* in response to novel synthetic fatty acid synthase inhibitor PHS11A. Fungal Genet Biol, 2007, 44(12): 1252—1261

11 Polark A, Wain W H. The influence of 5-fluorocytosine on nucleic acid synthesis in *C.albicans*, Cr, neoformans and *A. fumiguatus*. Chemotherapy, 1977, 23: 243—259

12 Wain W H, Polak A. The effect of 5-fluorocytosine on the synthesis of 80S ribosomes by pathogenic fungi. Sabouraudia, 1981, 19(3): 187—197

13 Whelan W L. The genetic basis of resistance to 5-fluorocytosine in Candida species and *Cryptococcus neoformans*. Crit Rev Microbiol, 1987, 15(1): 45—56

14 De Hoog G S, Guarro J, Gene J, et al. Atlas of Clinical Fungi. 2nd ed. Utrecht: The Netherlands, and University Rovirai Virgili, 2000
15 Jackson C J, Barton R C, Evans E G. Species indentification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. J Clin Microbiol, 1999, 37(4): 931—936
16 Peng J, Zhang X, Yang J, et al. The use of comparative genomics hybridization to characterize genome dynamics and diversity among the serotypes of *Shigella*. BMC Genomics, 2006, 7: 218—229
17 National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. In: National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. 2002
18 Fernandez-Torres B, Cabanes F J, Carrillo-Munoz A J, et al. Collaborative evaluation of optimal antifungal susceptibility testing conditions for dermatophytes. J Clin Microbiol, 2002, 40(11): 3999—4003
19 Barry A L, Pfaller M A, Brown S D, et al. Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. J Clin Microbiol, 2000, 38(9): 3457—3459
20 Cleveland W S. Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. J Am Stat Assoc, 1979, 74: 829—836
21 Saeed A I, Sharov V, White J, et al. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. Bio Techniques, 2003, 34(2): 374—378
22 Polak A, Scholer H J. Mode of action of 5-fluorocytosine In: E. Drouhet(ed.), Antifungal agents. New York: Marcel Dekker Inc., 1980
23 Liu T T, Lee R E, Barker K S, et al. Genome-wide expression profiling of the response to Azole, Polyene, Echinocandin, and Pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. Antimicrob Agents Ch, 2005, 49(6): 2226—2236
24 Diasio R B, Bennett J E, Myers C E. Mode of action of 5-fluorocytosine. Biochem Pharmacol, 1978, 27(5): 703—707
25 Navalgund L G, Rossana C, Muench A J, et al. Cell cycle regulation of thymidylate synthetase gene expression in cultured mouse fibroblasts. J Biol Chem, 1980, 255(15): 7386—7390
26 Drgonová J, Drgon T, Tanaka K, et al. Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. Science, 1996, 272(5259): 277—279
27 Levin D E. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol R, 2005, 69(2): 262—291
28 Santos B, Gutiérrez J, Calonge T M, et al. Novel Rho GTPase involved in cytokinesis and cell wall integrity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Eukaryot Cell, 2003, 2(3): 521—533
29 Fillinger S, Chaveroche M K, Shimizu K, et al. cAMP and ras signalling independently control spore germination in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. Mol Microbiol, 2002, 44(4): 1001—1016
30 Mosch H U, Kubler E, Krappmann S, et al. Crosstalk between the Ras2p-controlled mitogen-activated protein kinase and cAMP pathways during invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell, 1999, 10(5): 1325—1335
31 Aguiar P H, Santos D N, Lobo F P, et al. Functional complementation of a yeast knockout strain by *Schistosoma mansoni* Rho1 GTPase in the presence of caffeine, an agent that affects mutants defective in the protein kinase C signal transduction pathway. Mem I Oswaldo Cruz, 2006, 101(Suppl1): 323—326
32 Felipe M S, Andrade R V, Arraes F B, et al. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. J Biol Chem, 2005, 280(26): 24706—24714
33 Tutar Y. Heat shock proteins, substrate specificity and modulation of function. Protein Peptide Lett, 2006, 13(7): 699—705
34 Kummasook A, Pongpom P, Vanittanakom N. Cloning, characterization and differential expression of an hsp70 gene from the pathogenic dimorphic fungus, *Penicillium marneffei*. DNA Sequence, 2007, 18(5): 385—394
35 Wright C M, Fewell S W, Sullivan M L, et al. The Hsp40 molecular chaperone Ydj1p, along with the protein kinase C pathway, affects cell-wall integrity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 2007, 175(4): 1649—1664
36 Kakiuchi K, Yamauchi Y, Taoka M, et al. Proteomic analysis of *in vivo* 14-3-3 interactions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem J, 2007, 46(26): 7781—7792
37 Lottersberger F, Panza A, Lucchini G, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* 14-3-3 proteins are required for the G1/S transition, actin cytoskeleton organization and cell wall integrity. Genetics, 2006, 173(2): 661—675
38 DeGregori J, Kowalik T, Nevins J R. Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis and G1/S-regulatory genes. Mol Cell Biol, 1995, 158(8): 4215—4224
39 Wu C L, Classon M, Dyson N, et al. Expression of dominant-negative mutant DP-1 blocks cell cycle progression in G1. Mol Cell Biol, 1996, 16(7): 3698—3706
40 Banerjee D, Schnieders B, Fu J Z, et al. Role of E2F-1 in chemosensitivity. Cancer Res, 1998, 58(19): 4292—4296

41 Giege R, Weil J H. tRNA's from yeast having incorporated 5-fluorouracil arising from *in vivo* deamination of 5-fluorocytosine. Bull Soc Chim Biol, 1970, 52(2): 135—144
42 Polak A. Effects of 5- fluorocytosine on protein synthesis and amino acid pool in *candida albicans*. Sabouraudia, 1974, 12(3): 309—319
43 Polak A, Scholer H J. Mode of action of 5-fluorocytosine and mechanisms of resistance. Chemotherapy, 1975, 21(3-4): 113—130
44 Lee F J, Moss J. An RNA-binding protein gene(RBP1) of Saccharomyces cerevisiae encodes a putative glucose-repressible protein containing two RNA recognition motifs. J Biol Chem, 1993, 268(20): 15080—15087
45 Winstall E, Sadowski M, Kuhn U, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* RNA-binding protein Rbp29 functions in cytoplasmic mRNA metabolism. J Biol Chem, 2000, 275(29): 21817—21826
46 Deng C, Saunders W S. RIM4 encodes a meiotic activator required for early events of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Genet Genomics, 2001, 266(3): 497—504
47 Dandekar T, Tollervey D. Identification and functional analysis of a novel yeast small nucleolar RNA. Nucleic Acids Res, 1993, 21(23): 5386—5390
48 Papamichael D. The use of thymidylate synthase inhibitors in the treatment of advanced colorectal cancer: current status. Stem Cells, 2000, 18(3): 166—175
49 Beggs W H, Andrews F A, Sarosi G A. Combined action of amphotericin B and 5-fluorocytosine on pathogenic yeasts susceptible to either drug alone. Chemotherapy, 1981, 27(4): 247—251
50 Ghannoum M A, Rice L B. Antifungal agents: mode of action, mechanism of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. Clin Microbiol Rev, 1999,12(4): 501—517
51 Rogers B, Decottignies A, Kolaczkowski M, et al. The pleitropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. J Mol Microb Biotech, 2001, 3(2): 207—214
52 Prévéral S, Ansoborlo E, Mari S, et al. Metal(loid)s and radionuclides cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. Role of YCF1, glutathione and effect of buthionine sulfoximine. Biochimie, 2006, 88(11): 1651—1663
53 Li Z S, Szczypka M, Lu Y P, et al. The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. J Bio Chem, 1996, 271(11): 6509—6517
54 Adamis P D, Panek A D, Eleutherio E C. Vacuolar compartmentation of the cadmium-glutathione complex protects *Saccharomyces cerevisiae* from mutagenesis. Toxicol Lett, 2007, 173(1): 1—7
55 Tommasini R, Evers R, Vogt E, et al. The human multidrug resistance-associated protein functionally complements the yeast cadmium resistance factor 1. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(13): 6743—6748
56 Servos J, Haase E, Brendel M. Gene SNQ2 of *Saccharomyces cerevisiae*, which confers resistance to 4-nitroquinoline-N-oxide and other chemicals, encodes a 169 kDa protein homologous to ATP-dependent permeases. Mol Genet Genomics, 1993, 236(2-3): 214—218
57 Akache B, Turcotte B. New regulators of drug sensitivity in the family of yeast zinc cluster proteins. J Biol Chem, 2002, 277(24): 21254—21260
58 Menant A, Baudouin-Cornu P, Peyraud C, et al. Determinants of the ubiquitin-mediated degradation of the Met4 transcription factor. J Biol Chem, 2006, 281(17): 11744—11754