

白色念珠菌 - 细菌混合感染脓毒症患者中外泌体对细菌耐药机制研究

孟繁晓, 徐喜媛*, 王宏燕

包头医学院内蒙古包钢医院呼吸与危重症医学科, 内蒙古 包头

收稿日期: 2025年6月9日; 录用日期: 2025年7月2日; 发布日期: 2025年7月9日

摘要

目的: 探讨白色念珠菌外泌体在细菌 - 真菌混合感染脓毒症患者中对细菌耐药性的影响及其机制。方法: 收集6例脓毒症患者肺泡灌洗液(3例单纯细菌感染, 3例混合感染), 通过宏基因组测序(mNGS)筛选样本; 采用超速离心法提取外泌体, 透射电镜和纳米流式鉴定其特性; 通过蛋白质组学分析差异蛋白表达。结果: 混合感染组中, 白色念珠菌外泌体蛋白TSA1_CANAL (过氧化物还原酶)和ADH1_CANAX (醇脱氢酶)表达显著升高。结论: 白色念珠菌外泌体通过上调氧化应激相关蛋白表达, 特异性增强大肠杆菌对 β -内酰胺类抗生素的耐药性, 提示真菌 - 细菌互作在脓毒症治疗中具有重要临床意义, 为优化抗感染策略提供了新靶点。

关键词

白色念珠菌, 外泌体, 大肠杆菌, 耐药性, 细菌 - 真菌共感染, 脓毒症

Study on the Role of Exosomes in Mechanisms of Bacterial Antibiotic Resistance in Patients with Sepsis Caused by *Candida albicans*-Bacterial Co-Infection

Fanxiao Meng, Xiyuan Xu*, Hongyan Wang

Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, Inner Mongolia Baogang Hospital, Baotou Medical College, Baotou Inner Mongolia

Received: Jun. 9th, 2025; accepted: Jul. 2nd, 2025; published: Jul. 9th, 2025

*通讯作者。

文章引用: 孟繁晓, 徐喜媛, 王宏燕. 白色念珠菌-细菌混合感染脓毒症患者中外泌体对细菌耐药机制研究[J]. 临床医学进展, 2025, 15(7): 537-547. DOI: 10.12677/acm.2025.1572021

Abstract

Objective: To explore the effects of *Candida albicans* exosomes on bacterial drug resistance and its mechanism in patients with bacterial-fungal mixed infection sepsis. **Methods:** Alveolar lavage fluid (3 simple bacterial infections and 3 mixed infections) in sepsis patients were collected, and samples were screened by metagenomic sequencing (mNGS). Exosomes were extracted by ultracentrifugation, and their characteristics were identified by transmission electron microscopy and nanoflow. Differential protein expression was analyzed by proteomics. **Results:** In the mixed infection group, the expression of *Candida albicans* exosome proteins TSA1_CANAL (peroxide reductase) and ADH1_CANAX (alcohol dehydrogenase) was significantly increased. **Conclusion:** The *Candida albicans* exosomes specifically enhance the resistance of *E. coli* to β -lactam antibiotics by up-regulating the expression of oxidative stress-related proteins, suggesting that fungal-bacterial interactions are of great clinical significance in the treatment of sepsis and provide a new target for optimizing anti-infection strategies.

Keywords

Candida albicans, Exosomes, *Escherichia coli*, Antibiotic Resistance, Bacterial-Fungal Co-Infection, Sepsis

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

脓毒症(sepsis)是由感染引起的全身性炎症反应综合征,通常伴随有多脏器功能障碍,其临床表现为高热、低血压、器官功能衰竭等,且病程急剧,死亡率高。根据世界卫生组织的数据,脓毒症每年影响全球数百万人,并且是导致死亡的主要原因之一。特别是在ICU(重症加强护理病房)中的脓毒症患者,死亡率较高,且随着病情进展,治疗难度增大。研究表明,脓毒症的高死亡率与早期诊断和治疗的延误密切相关。因此,脓毒症早期识别和及时干预是降低死亡率的关键[1]。

真菌感染作为一种常见的院内感染类型,尤其在免疫功能低下的患者中表现得尤为突出。念珠菌属是其中最为常见的致病菌之一,且其在危重症患者中的感染率逐年上升,尤其在长时间住院、使用抗生素、接受化疗或器官移植等高风险人群中,念珠菌感染的发生率明显增高。更为严重的是,侵袭性念珠菌感染常常与死亡率的增加密切相关[2]。在脓毒症的临床治疗中,细菌感染与真菌感染的混合存在并不少见。当机体免疫功能受损或存在病理因素时,定植的微生物可能引发感染,特别是在脓毒症患者中,细菌与真菌的混合感染变得尤为常见。临床观察发现,细菌和真菌在脓毒症中可能相互作用,形成共生关系或相互促进,使得病情进一步复杂化。

微生物混合感染对微生物耐药性的影响机制复杂,涉及多个层面的相互作用。混合感染环境中,微生物通过信号分子相互传递信息,并协调基因表达,增强微生物群体适应性[3]。混合感染更易于形成生物膜,生物膜中的微生物之间形成复杂的群落结构,产生屏障效应,使抗生素扩散受限,局部药物浓度降低;菌群生长减缓,细胞代谢状态改变,微生物进入休眠状态,抗菌药物作用位点降低或消失;微生物共生结构易于通过质粒、转座子或整合子等基因元件传播耐药基因,进一步扩大耐药菌株比例;信号

分子不仅调控毒力因子表达,也能诱导耐药机制的启动,如外排泵的激活、耐药基因的表达增加等,进一步导致抗菌药物的疗效降低[4]。

近年来,微生物外泌体(Extracellular Vesicles, EVs)在细菌耐药性研究领域取得了一系列重要进展,尤其在抗生素耐药机制方面, EVs 发挥了多种潜在作用。首先, EVs 可作为诱饵或膜靶与抗生素发生直接结合。当某些抗生素,如作用于细菌细胞膜磷脂的药物进入环境后,可被来源于细菌膜结构的 EVs 所结合,从而降低抗生素对细菌本身的杀伤效应。此外, EVs 还可能在形成过程中主动封装抗生素。另一方面, EVs 可以通过将抗生素降解酶运输至细胞外环境,并利用膜上的孔蛋白吸收抗生素并对其进行降解,显著降低了细胞周围抗生素的有效浓度。EVs 还可携带耐药基因,并在不同菌株之间转移这些基因,进一步推动细菌耐药性的传播[5]。此外,近年来的研究还揭示了细菌与细菌之间,以及细菌与真菌之间广泛存在的共养关系和协同作用。这种跨物种的相互作用可能导致细菌和真菌同时获益,或增强其中一方的竞争力,影响微生物群落结构与功能,进而显著改变微生物对抗生素的敏感性和耐药性[6] [7]。

进一步来说,细菌和真菌之间的相互作用可以通过多种机制来影响病原的毒力、致病性及耐药性[8]。在既往的体外研究中,已经初步揭示了念珠菌-细菌的共生,通过形成生物膜或外排某些物质,使得细菌的生存竞争力增强[9]。事实上,各种研究已经使用“组学”技术在亚细胞水平上探测细菌-真菌相互作用期间发生的变化[10],并取得了丰硕的研究成果。

本研究通过探究白色念珠菌外泌体对细菌耐药性的影响并收集诊断为单细菌感染和细菌-真菌混合感染的脓毒症患者的临床样本以及深入分析白色念珠菌外泌体对细菌耐药性的影响为真菌与细菌共感染时优化抗生素的使用提供理论基础,揭示白色念珠菌外泌体在细菌耐药性中的作用机制,为开发新型抗生素提供新的靶点和思路。

2. 研究材料与方法

2.1. 临床实验

2.1.1. 研究对象

筛选来源于内蒙古包钢医院 2023 年至 2025 年在 MICU 接受治疗的重症肺炎患者共计 6 例,实验组对照组各 3 例:

纳入标准:根据重症监护医学会(SCCM)/欧洲重症监护医学会(ESICM)发布的脓毒症 Sepsis3.0 最新指南[11],诊断标准为:肯定感染,并存在感染导致的序贯性器官衰竭评分(SOFA)较基线升高 ≥ 2 患者,患者的肺泡灌洗液标本均通过支气管镜检查获取,操作及收集到的样本符合《支气管肺泡灌洗液细胞形态学检验中国专家共识(2023)》[12]。经宏基因组高通量测序(mNGS)诊断,其中单纯细菌感染列为对照组,细菌混合有白色念珠菌感染的列为实验组。

排除标准:1) 年龄 <18 岁或 >90 岁;2) 怀孕或者哺乳期妇女;3) 恶性肿瘤、器官移植后、血液系统疾病及其他免疫抑制状态患者(如长期使用免疫抑制剂、HIV 感染艾滋病期等);4) 入院时预期生存期有限(<48 小时)及终末期器官衰竭的极危重患者。

本实验研究通过了内蒙古包钢医院医学伦理委员会审查(2022-MER-009)。

2.1.2. 实验方法

获取白色念珠菌上清液的过程遵循严格的操作步骤。首先,将活化后的白色念珠菌菌液按照 1:100 的比例接种于 LB 培养基中,并在 37℃、220 rpm 的摇床上培养过夜。次日培养液经过多次低速离心(12,000 rpm, 5 min, 4 次, 10 min 1 次)去除细胞悬浮物,获取上清液。该上清液进一步经过 0.22 μm 滤膜过滤,确保无菌性。过滤后的上清液分装存储在-80℃冰箱中,以备后续冻干使用。

超速离心法提取外泌体：在 37℃ 中速融样本，将样本移动至一个新的离心管内，2000 g，4℃，30 min 离心(Beckman, Microfuge 20 R)；小心地将上清液移至新的离心管中，10,000 × g，4℃，45 min 再次离心，以去除较大的囊泡；取上清，经 0.45 μm 滤膜过滤，收集过滤液；将过滤液移至新的离心管中，选择超速转子(Hitachi, CP100MX)，4℃，100,000 × g 离心 70 min。去除上清，用 10 ml 预冷的 1 × PBS (Beyotime, C0221A)重悬后，选择超速转子，再次 4℃，100,000 × g，超速离心 70 min。去除上清，用 200 μL 预冷的 1 × PBS 重悬，取 20 μL 透射电镜观察，10 μL 粒径分析，剩余外泌体于-80℃ 保存以备后续蛋白组学分析使用。

外泌体样品透射电镜观察：吸取样品 10 μL 滴加于铜网上沉淀 1 min，滤纸吸去浮液醋酸双氧铀(中镜科仪，1722586) 10 μL 滴加于铜网上沉淀 1 min，滤纸吸去浮液，常温干燥数分钟。80 kv 进行电镜检测成像(Hitachi, HT-7700)并获得透射电镜成像结果。

外泌体样品粒径分析(纳米流式)：将外泌体取出 10 μL 稀释到合适倍数。先用标准品进行仪器性能测试合格后方可进行外泌体样品上样，注意需进行梯度稀释避免样本堵塞进样针。(粒径分析仪 NanoFCM, N30E)待样本完成检测即可获得仪器检测外泌体的粒径和浓度信息。

前处理方法：

冻干复溶：取 2 ml 样品冻干后，加入 100 μL 8 M Urea 涡旋溶解。

还原烷基化：取 50 μg 蛋白溶液，用 50 mM NH₄HCO₃ 补至 100 μL。加入 1 μL 1 M DTT (终浓度 10 mmol/L)，56℃ 水浴还原 1 h。加入 2 μL 1 M IAM (终浓度 20 mmol/L)，暗处室温反应 40 min。加入 1 μL 1 M DTT (终浓度 10 mmol/L)中和残留 IAM。

SP3 富集：Beads 制备：将两种磁珠按 1:1 混合，磁分离弃上清；清洗：用 1 ml 超纯水洗 3 次，配成 100 μg/μL 储液(4℃ 保存)。结合：取 100 μg 样本 + 10 μL beads + 110 μL 无水乙醇，室温混悬 15 min。磁分离，转移上清(标注 binding SQ，-80℃ 保存)。清洗：用 500 μL 80%乙醇洗 3 次，干燥至磁珠无液体反光。加入 300 μL 50 mM NH₄HCO₃，1000 rpm 震荡至磁珠分散；加 8 μL trypsin (0.25 μg/μL)，37℃、1000 rpm 酶切过夜(14 h~18 h)。磁分离，转移上清，记录体积。冻干：管口扎 6~8 孔，冻干机抽干。

C18 脱盐：用 C18 Stage-Tip 脱盐，45℃ 真空干燥。

上机条件：

① 液相色谱条件

预柱：PEPMAP NEO C18 300 μm × 5 mm；分析柱：150 μm i.d. × 170 mm, packing: Reprosil-Pur 120 C18-AQ 1.9 μm；流动相 A：0.1% FA；流动相 B：0.1% FA，80% ACN；流速：600 nL/min；每个组分分析时间：66 min。

具体色谱条件见表 1：

Table 1. Chromatographic conditions of proteomics
表 1. 蛋白组学液相色谱条件

时间(min)	B 相
0	4%
2	8%
35	28%
55	40%
56	95%
66	95%

② 质谱条件

一级质谱参数: 1) Resolution: 120,000; 2) AGCtarget: 100%; 3) MaximumIT: 50 ms; 4) Scanrange: 380 to 1000 m/z;

二级质谱参数: 1) Activation Type: HCD; 2) Collision Energy: 30; 3) Resolution: 30,000; 4) MaximumIT: 54 ms;

经过质谱采集获得原始下机数据。

搜库条件:

质谱原始文件使用 DIA-NN 分别检索目标蛋白数据库, 检索参数如下:

1) 固定修饰(Fixed modifications): Carbamidomethyl (C)。2) 可变修饰(Variable modifications): Oxidation (M); Acetyl (Protein N-term)。3) 酶(Enzyme): Trypsin。4) 数据库(Database): uniprotkb_Candida_albicans_id_5476_2025_03_03; uniprotkb_proteome_Homo_sapiens(9606)_revi_2024_05_20。5) 遗漏酶切位点(Maximum Missed Cleavages): 2。6) 一级质谱偏差(Peptide Mass Tolerance): 20 ppm。7) 二级质谱偏差(Fragment Mass Tolerance): 0.02 Da。

2.1.3. 数据处理

首先筛选出在混合感染条件下表达且在单纯细菌感染条件下不表达的特异性白色念珠菌蛋白。随后, 通过白色念珠菌外泌体的蛋白与其和细菌共培养的蛋白质组学分析, 进一步验证这些候选蛋白在不同培养条件下的表达水平差异, 以确认其在混合感染环境中的特异性分泌特征, 即这些蛋白在白色念珠菌单独培养时即可检测到, 但其表达水平在与细菌共培养时升高, 提示这些蛋白可能在混合感染条件下发挥特异的生物学功能。热图的制作使用 R software (version 4.4.1., R Core Team)。

2.2. 白色念珠菌培养上清液中外泌体的提取及鉴定

超速离心法提取外泌体: 在 37℃ 中速融样本, 将样本移动至一个新的离心管内, 2000 g, 4℃, 30 min 离心(Beckman, Microfuge 20 R); 小心的将上清液移至新的离心管中, 10,000 × g, 4℃, 45 min 再次离心, 以去除较大的囊泡; 取上清, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 收集过滤液; 将过滤液移至新的离心管中, 选择超速转子(Hitachi, CP100MX), 4℃, 100,000 × g 离心 70 min。

去除上清, 用 10 ml 预冷的 1 × PBS (Beyotime, C0221A)重悬后, 选择超速转子, 再次 4℃, 100,000 × g, 超速离心 70 min。去除上清, 用 200 μL 预冷的 1 × PBS 重悬, 取 20 μL 透射电镜观察, 10 μL 粒径分析, 剩余外泌体于-80℃ 保存以备后续蛋白组学分析使用。

外泌体样品透射电镜观察: 吸取样品 10 μL 滴加于铜网上沉淀 1 min, 滤纸吸去浮液 醋酸双氧铀(中镜科仪, 1722586) 10 μL 滴加于铜网上沉淀 1 min, 滤纸吸去浮液, 常温干燥数分钟。80 kv 进行电镜检测成像(Hitachi, HT-7700)并获得透射电镜成像结果。

外泌体样品粒径分析(纳米流式): 将外泌体取出 10 μL 稀释到合适倍数。先用标准品进行仪器性能测试合格后方可进行外泌体样品上样, 注意需进行梯度稀释避免样本堵塞进样针。(粒径分析仪 NanoFCM, N30E)待样本完成检测即可获得仪器检测外泌体的粒径和浓度信息。

2.3. 外泌体蛋白提取质检

蛋白提取: 加 100 μL 8 M 尿素至沉淀, 冰上超声(3 s 开/3 s 停, 共 10 min)。于 4℃、12,000 × g 离心 10 min, 取上清至预冷 EP 管。

BCA 测浓度: 取 6 μL 样品, 5 倍体积稀释后待测。分别取 25 μL 标准品/样品 + 200 μL BCA 工作液 (A:B = 50:1), 37℃ 孵育 30 min。冷却至室温后测 562 nm 吸光度, 制标准曲线计算浓度。

SDS-PAGE: 取 5 μ L 样品 + 4:1 体积 5 $\times$ 上样缓冲液, 沸水煮 5 min。上样: 5 μ L Marker/样品至 12% SDS-PAGE 凝胶。电泳: 80 V 15 min $\rightarrow$ 120 V 60 min。考染: 胶浸考马斯亮蓝染液, 室温染色 30 min。蒸馏水洗涤, 60 rpm 摇床脱色(每 20 min 换水至背景洁净)。

银染所有步骤在 60 rpm~70 rpm 摇床进行, 试剂体积 30 mL (显色终止后水洗除外)。

固定: 凝胶放入 30 ml 固定液中, 室温 20 min (或过夜进一步降背景)。洗涤: 30%乙醇 30 ml 10 min $\rightarrow$ 弃乙醇加水 30 ml 10 min。增敏: 弃水银染增敏液(1 $\times$), 2 min。水洗: 2 次(每次 1 min; 第二次可用 200 mL 水)。银染: 银溶液(1 $\times$), 10 min。水洗: $\leq$ 1.5 min (严格计时)。显色: 显色液, 室温 3 min~10 min (至条带清晰)。终止: 银染终止液(1 $\times$), 10 min。水洗: 纯净水 30 ml, 2 min~5 min。

所用关键试剂、设备、耗材见表 2:

Table 2. Equipment and consumables for quality detection of *Candida albicans* exosome protein

表 2. 白色念珠菌外泌体蛋白质量检测所用设备及耗材

名称	品牌
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5 $\times$)	Servicebio
Prestained Protein Marker II (10~200 kD)	Servicebio
BeyoBlue™ 考马斯亮蓝超快染色液	Servicebio
Tris	Solarbio
过硫酸铵(APS)	百灵威
十二烷基硫酸钠(SDS)	Aladdin
超纯水	屈臣氏
30% Acrylamide	Servicebio
N,N,N,N-四甲基乙二胺(TEMED)	Macklin
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Beyotime
分析天平	梅特勒 - 托利多仪器(上海)有限公司
高速冷冻离心机	BECKMAN COULTER
漩涡混合器	SCILOGEX
电热恒温培养箱	天津市泰斯特仪器有限公司
平板电泳仪	Bio-Rad
凝胶成像系统	ALPHA Innotech

3. 结果

3.1. 蛋白组学

我们通过液相色谱对混合感染组与单一细菌感染组的肺泡灌洗液样本以及实验室中培养的白色念珠菌上清液提取的外泌体进行了蛋白质组学分析。

结果显示, 共计鉴定到 2 个蛋白在混合感染组中的表达量较白色念珠菌外泌体中的表达量显著升高, 见图 1。

借助 UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 数据库[13]进一步分析表明, TSA1_CANAL 为巯基特异性过氧化物酶, 可催化过氧化氢和有机氢过氧化物分别还原为水和醇。通过解毒过氧化物在细胞抵御氧化应激

中发挥作用，并作为过氧化氢介导的信号事件的传感器。还参与菌丝细胞壁的正确组成[14]。ADH1_CANAX 是一种醇脱氢酶，以醇为底物催化生成了还原型辅酶(NADH)、醛和氢离子。

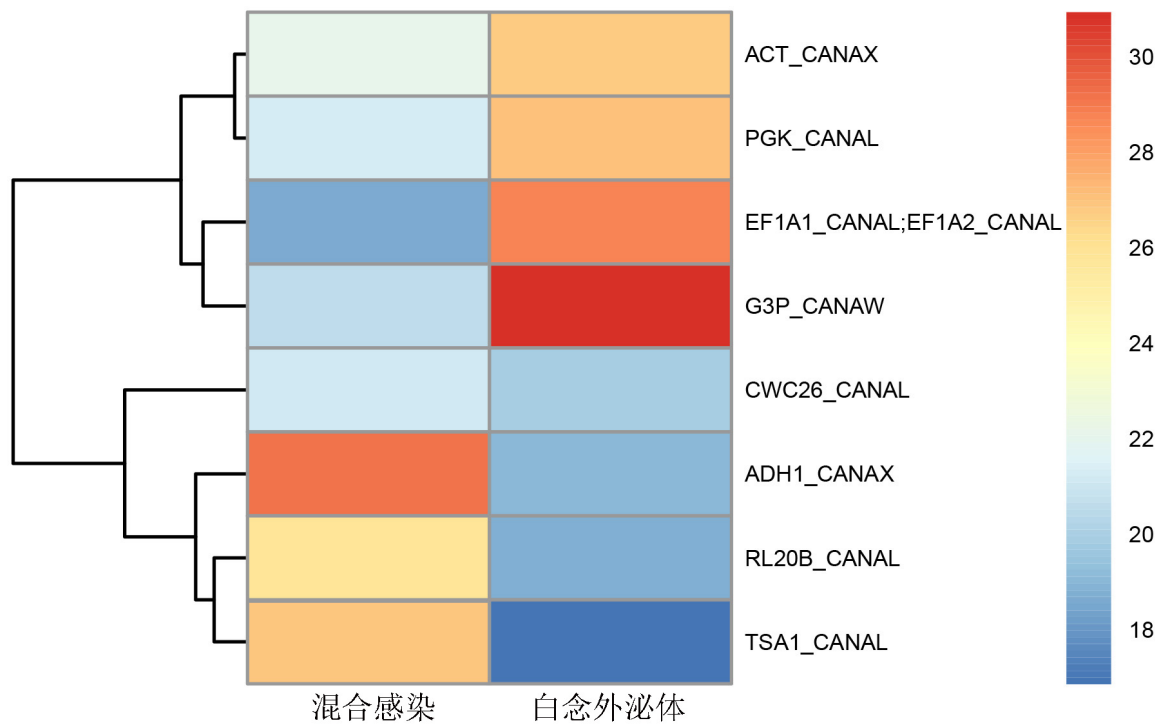


Figure 1. Hotspot map of protein spectrum
图 1. 蛋白质谱热点图

本热图展示了白色念珠菌特定蛋白的表达水平变化。颜色梯度从蓝色(低表达)到红色(高表达)，表示不同实验条件下的蛋白丰度。

TSA1_CANAL 和 ADH1_CANAX 在实验组表达水平显著升高，提示混合感染可能增强了白色念珠菌生存环境中微生物的氧化应激防御能力。G3P_CANAW 实验组中表达下降，而在对照组中显著上调。这可能表明混合感染导致白色念珠菌的糖酵解代谢受到抑制。EF1A1_CANAL 在实验组表达下降，表明混合感染可能抑制白色念珠菌的蛋白合成及代谢适应性。其他蛋白如 RL20B_CANAL 和 CWC26_CANAL 也在 B 组中表现出一定程度的表达变化，可能涉及基因表达调控及核糖体功能调整。

3.2. 微生物实验

3.2.1. 通过差异超速离心法成功分离白色念珠菌上清液中的外泌体

纳米流式分析显示，囊泡群体的主峰直径分布在 60 nm~10 nm 范围内，平均粒径 79.4 nm，浓度 3.02 E+9 Particles/ml，符合典型外泌体尺寸特征。透射电镜观察到清晰的囊泡双层膜结构，见图 2。

3.2.2. 白色念珠菌外泌体蛋白质检结果

- 1) BCA 蛋白定量检测绘制标准曲线，该曲线拟合度较高，具有良好的线性关系：蛋白浓度(μg/mL): $y = 1502.1; x = 12.289; R^2 = 0.9956$ 。
- 2) 蛋白定量结果：样本体积 90 μL，样本浓度 0.41 mg/ml，蛋白总量 36.50 μg。
- 3) SDS-PAGE 胶图分子量 23 kDa 处可见高峰度蛋白，见图 3。



Figure 2. Electron micrograph of exosomes
图 2. 外泌体电镜照片

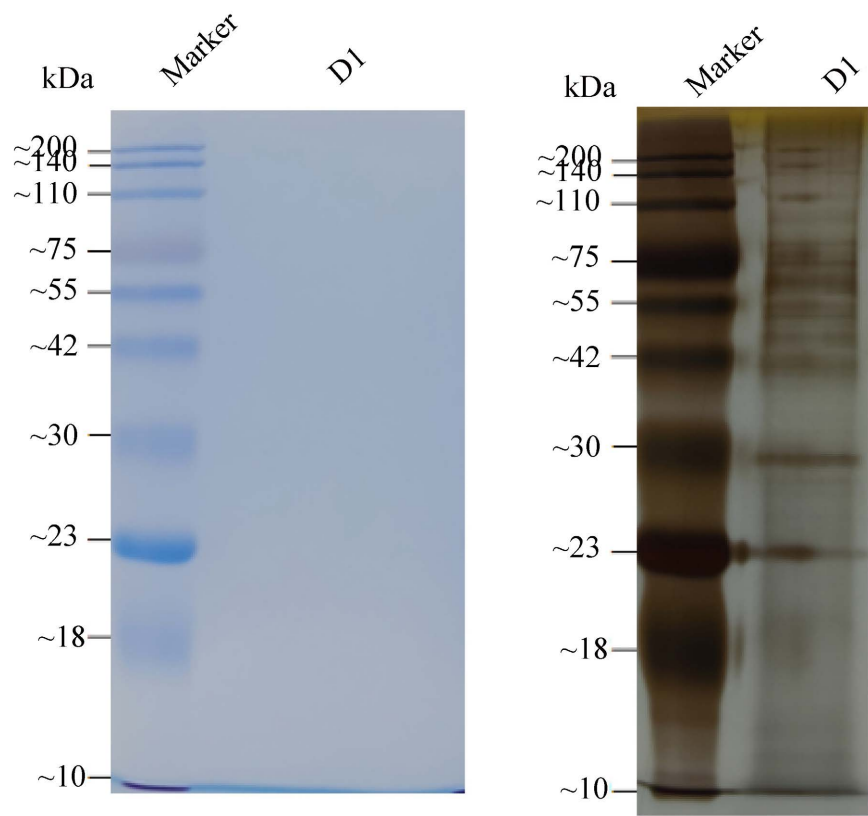


Figure 3. SDS-PAGE gel diagram
图 3. SDS-PAGE 胶图

4. 讨论

本研究主要探讨了白色念珠菌外泌体对大肠杆菌耐药性的影响,并通过临床数据分析了细菌-真菌共感染中,细菌对抗生素耐药性变化的潜在影响。

针对入住监护室超过 24 小时的患者为研究对象,取得肺泡灌洗液后提取[9];且肠杆菌科在 ARDS (急性呼吸窘迫综合征)标本中的相对丰度远高于非 ARDS 标本。严重的侵袭性真菌感染(IFI)在危重症患者中变得越来越频繁。其中感染率最高的即为念珠菌属,大约占比 80% [15] [16]。基于上述临床证据,本研究选择念珠菌属中最具有代表性的白色念珠菌标准菌株作为模式微生物进行后续实验。

宏基因组下一代测序(mNGS)是一种将高通量测序与生物信息学分析相结合的新方法;其优点包括微生物检测时间短,通过临床样本的 DNA 或 RNA 基因测序一次准确检测细菌、真菌、病毒和寄生虫等多种病原体[17]。相比传统检测手段如血培养等可以获得更高的阳性率[18]。而 BALF 作为下呼吸道感染的“金标准”样本,其通过支气管镜直接获取病灶区域分泌物,在相同的检测手段下,痰液或气道内抽吸物获得的标本始终会检出更多的可疑病原体[19]并造成干扰。综合以上,以 BALF 为标本进行 mNGS 检测是目前临床应用中敏感性/特异性均表现优异的病原学检测方法。

外泌体作为细胞间通讯的载体,近年来被认为在微生物之间的信息传递、耐药性形成及毒力调控中扮演了重要角色[20]。

在本研究中,我们发现白色念珠菌的外泌体可能通过额外表达某些特定的蛋白质影响大肠杆菌的抗生素耐受性,尤其是在 β -内酰胺类抗生素的作用下。

TSA1_CANAL 属于白色念珠菌中的过氧化物还原酶,保护细胞免受氧化应激的损伤。通过清除过氧化物,维持细胞内的氧化还原平衡,确保细胞的正常生长和生存。研究表明,还原蛋白缺失白色念珠菌表现出了显著减弱的毒力和发育能力[21]。ADH1_CANAX 参与醇类物质的代谢,虽然 ADH1 的主要功能与代谢有关,但其在氧化应激响应中的作用也不容忽视[22] [23]。在共培养条件下,白色念珠菌中 ADH1 表达的上调可能增强了其代谢活性,促进了对环境中醇类或其他代谢产物的处理。这种代谢调节可能间接影响培养环境的氧化还原状态,进一步有利于大肠杆菌的生存和适应。

已有研究发现, β -内酰胺类抗生素不仅能够通过抑制细菌细胞壁的合成,干扰细菌细胞的完整性从而发挥抗菌作用,同时还能够显著干扰细菌正常的代谢活动,使细菌细胞内活性氧(ROS)水平明显增加,从而诱导显著的氧化应激反应。进一步的研究表明,这种增强的氧化应激状态会导致细菌 DNA 和 RNA 发生明显的氧化损伤,从而加剧了细菌细胞的损伤程度,最终导致细菌死亡或生长受到抑制[24] [25]。

细菌-真菌共感染会加剧脓毒症临床表现,显著降低传统抗生素疗效。本研究证实混合感染影响脓毒症的临床治疗反应,并为治疗策略提供新依据。混合感染组中两种蛋白的显著上调,提示其可能参与病原体互作及耐药性诱导,是后续机制研究的候选靶标。差异蛋白的鉴定结果支持了“白色念珠菌外泌体可增强混合感染中大肠杆菌耐药性”的假设,为细菌耐药性机制研究奠定基础。

本研究的局限性:纳入单纯白色念珠菌感染脓毒症患者的样本作为额外对照组,将更有利于精确界定白色念珠菌外泌体在特定感染背景下的独立作用及其对宿主基线状态的影响,但单纯白色念珠菌感染的标本收集难度更大。本研究主要基于体内模型和患者样本分析得出关联性结论。为了更直接地证实白色念珠菌外泌体对大肠杆菌耐药性的因果性影响,理想的方案应包括体外实验,例如将分离纯化的白色念珠菌外泌体与大肠杆菌进行共培养,并系统评估共培养前后细菌对抗生素敏感性(如 MIC 值变化)及相关耐药表型的改变。本研究基于前期线索和模型特点,重点探讨了氧化应激这一潜在通路,并观察到相关指标的变化。然而,这并不意味着排除了外排泵基因表达、 β -内酰胺酶等关键酶活性、或靶基因突变等其他重要耐药机制是否在白色念珠菌外泌体影响下发生协同变化等其他机制参与的可能性。虽然本研究通

过采用肺泡灌洗液(BALF)作为标本并结合 mNGS 技术提高了病原体检测的敏感性和特异性,但仍可能存在因样本类型单一性、患者个体差异或取材方式差异带来的偏倚。未来的研究应纳入更全面的对照组体系,辅助体外共培养实验提供进一步数据支撑,进一步探讨其他常见耐药性变化机制是否参与到了真菌细菌混合感染中,进一步增加临床样本量,并结合其他多种标本类型和检测技术,以获得更加全面和准确的病原体检测数据,以深入解析上述问题。

本研究揭示了白色念珠菌外泌体在真菌-细菌共感染中增强大肠杆菌耐药性的机制。基于临床肺泡灌洗液的 mNGS 与蛋白组学分析,发现外泌体通过差异表达蛋白(如 TSA1、ADH1)调控细菌氧化应激状态,逆转 β -内酰胺类抗生素诱导的 ROS 积累及核酸氧化损伤,从而提升细菌耐药性。该发现为真菌-细菌互作机制提供新证据,并为脓毒症混合感染的精准治疗提供潜在生物标志物与药物靶点。

基金项目

航天医疗健康科技集团重点项目(2022YK03)。

参考文献

- [1] Rhodes, A., Evans, L.E., Alhazzani, W., Levy, M.M., Antonelli, M., Ferrer, R., *et al.* (2017) Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Medicine*, **43**, 304-377. <https://doi.org/10.1007/s00134-017-4683-6>
- [2] Kelly, B.T., Pennington, K.M. and Limper, A.H. (2020) Advances in the Diagnosis of Fungal Pneumonias. *Expert Review of Respiratory Medicine*, **14**, 703-714. <https://doi.org/10.1080/17476348.2020.1753506>
- [3] Sionov, R.V. and Steinberg, D. (2022) Targeting the Holy Triangle of Quorum Sensing, Biofilm Formation, and Antibiotic Resistance in Pathogenic Bacteria. *Microorganisms*, **10**, Article 1239. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061239>
- [4] 李昕, 曾洁, 王岱, 等. 细菌耐药耐受性机制的最新研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2020, 45(2): 113-121.
- [5] Jiang, B., Lai, Y., Xiao, W., Zhong, T., Liu, F., Gong, J., *et al.* (2024) Microbial Extracellular Vesicles Contribute to Antimicrobial Resistance. *PLOS Pathogens*, **20**, e1012143. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012143>
- [6] Semenec, L., Cain, A.K., Dawson, C.J., Liu, Q., Dinh, H., Lott, H., *et al.* (2023) Cross-Protection and Cross-Feeding between *Klebsiella Pneumoniae* and *Acinetobacter Baumannii* Promotes Their Co-Existence. *Nature Communications*, **14**, Article No. 702. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36252-2>
- [7] Dolan, S.K., Duong, A.T. and Whiteley, M. (2024) Convergent Evolution in Toxin Detection and Resistance Provides Evidence for Conserved Bacterial-Fungal Interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **121**, e2304382121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2304382121>
- [8] Allison, D.L., Willems, H.M.E., Jayatilake, J.A.M.S., Bruno, V.M., Peters, B.M. and Shirliff, M.E. (2016) *Candida*-Bacteria Interactions: Their Impact on Human Disease. *Microbiology Spectrum*, **4**, 1-26. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0030-2016>
- [9] Kong, E.F., Tsui, C., Kucharíková, S., Andes, D., Van Dijck, P. and Jabra-Rizk, M.A. (2016) Commensal Protection of *Staphylococcus aureus* against Antimicrobials by *Candida albicans* Biofilm Matrix. *mBio*, **7**, 1-12. <https://doi.org/10.1128/mbio.01365-16>
- [10] Moretti, M., Grunau, A., Minerdi, D., Gehrig, P., Roschitzki, B., Eberl, L., *et al.* (2010) A Proteomics Approach to Study Synergistic and Antagonistic Interactions of the Fungal-Bacterial Consortium *Fusarium oxysporum* Wild-Type MSA 35. *Proteomics*, **10**, 3292-3320. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900716>
- [11] Seymour, C.W., Liu, V.X., Iwashyna, T.J., Brunkhorst, F.M., Rea, T.D., Scherag, A., *et al.* (2016) Assessment of Clinical Criteria for Sepsis. *Journal of the American Medical Association*, **315**, Article 762. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0288>
- [12] 君安医学细胞平台专家委员会. 支气管肺泡灌洗液细胞形态学检验中国专家共识(2023) [J]. 现代检验医学杂志, 2023, 38(3): 11-16+23.
- [13] UniProt Consortium (2024) UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Research*, **53**, D609-D617.
- [14] Urban, C., Xiong, X., Sohn, K., Schröppel, K., Brunner, H. and Rupp, S. (2005) The Moonlighting Protein Tsa1p Is Implicated in Oxidative Stress Response and in Cell Wall Biogenesis in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*, **57**,

- 1318-1341. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04771.x>
- [15] Bassetti, M., Garnacho-Montero, J., Calandra, T., Kullberg, B., Dimopoulos, G., Azoulay, E., *et al.* (2017) Intensive Care Medicine Research Agenda on Invasive Fungal Infection in Critically Ill Patients. *Intensive Care Medicine*, **43**, 1225-1238. <https://doi.org/10.1007/s00134-017-4731-2>
- [16] Dickson, R.P., Schultz, M.J., van der Poll, T., Schouten, L.R., Falkowski, N.R., Luth, J.E., *et al.* (2020) Lung Microbiota Predict Clinical Outcomes in Critically Ill Patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **201**, 555-563. <https://doi.org/10.1164/rccm.201907-1487oc>
- [17] Church, D.L., Cerutti, L., Gürtler, A., Griener, T., Zelazny, A. and Emler, S. (2020) Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology Reviews*, **33**, Article 73. <https://doi.org/10.1128/cmr.00053-19>
- [18] Sun, L., Zhang, S., Yang, Z., Yang, F., Wang, Z., Li, H., *et al.* (2022) Clinical Application and Influencing Factor Analysis of Metagenomic Next-Generation Sequencing (mNGS) in ICU Patients with Sepsis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **12**, Article 905132. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.905132>
- [19] (2005) Guidelines for the Management of Adults with Hospital-Acquired, Ventilator-Associated, and Healthcare-Associated Pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **171**, 388-416. <https://doi.org/10.1164/rccm.200405-644ST>
- [20] Tsatsaronis, J.A., Franch-Arroyo, S., Resch, U. and Charpentier, E. (2018) Extracellular Vesicle RNA: A Universal Mediator of Microbial Communication? *Trends in Microbiology*, **26**, 401-410. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.02.009>
- [21] da Silva Dantas, A., Patterson, M.J., Smith, D.A., MacCallum, D.M., Erwig, L.P., Morgan, B.A., *et al.* (2010) Thioredoxin Regulates Multiple Hydrogen Peroxide-Induced Signaling Pathways in *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biology*, **30**, 4550-4563. <https://doi.org/10.1128/mcb.00313-10>
- [22] Wang, Z., Zhang, Q., Zhang, H. and Lu, Y. (2024) Roles of Alcohol Dehydrogenase 1 in the Biological Activities of *Candida albicans*. *Critical Reviews in Microbiology*, **51**, 484-498. <https://doi.org/10.1080/1040841x.2024.2371510>
- [23] Jiang, Z., Kan, J., Wang, D., Lv, Y., Kong, C., Wu, L., *et al.* (2025) Inhibition of GRK2 Reduced Doxorubicin-Induced Oxidative Stress and Apoptosis through Upregulating Adh1. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **497**, Article 117261. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2025.117261>
- [24] Ye, D., Sun, J., Jiang, R., Chang, J., Liu, Y., Wu, X., *et al.* (2024) β -Lactam Antibiotics Induce Metabolic Perturbations Linked to ROS Generation Leads to Bacterial Impairment. *Frontiers in Microbiology*, **15**, Article 1514825. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1514825>
- [25] Liu, M., Wang, M., Huang, M., Gao, Q., Zhu, D., Wang, M., *et al.* (2024) Iron Efflux by IetA Enhances β -Lactam Aztreonam Resistance and Is Linked to Oxidative Stress through Cellular Respiration in *Riemerella anatipestifer*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **79**, 1385-1396. <https://doi.org/10.1093/jac/dkae114>