

抑制侵袭性真菌的新型分子及其作用靶点研究进展

郭希¹, 赖莘秀¹, 杨媚滢¹, 李峤桢¹, 王思行¹, 宋章永^{1,2*}

(西南医科大学 1. 基础医学院 病原微生物教研室; 2. 公共实验技术中心分子生物学技术平台, 四川 泸州 646000)

摘要: 目前药物治疗侵袭性真菌感染受其严重的毒副作用及耐药性菌株等挑战, 故研发安全、高效的新型抗真菌药物对于解决现状具有重要意义。本文从侵袭性真菌作用靶点着手, 在小分子物质和次生代谢产物等方面挖掘涉及真菌生物膜、细胞壁、关键代谢酶及线粒体等作用靶点及其机制, 以期防治侵袭性真菌的新药研发提供借鉴。

关键词: 侵袭性真菌; 靶点; 小分子抑制剂; 分子机制

中图分类号: R735.1 文献标志码: A

Research progress on novel molecules and new targets for the control of invasive fungi

GUO Xi¹, LAI Xin-xiu¹, YANG Mei-yan¹, LI Qiao-zhen¹, WANG Si-hang¹, SONG Zhang-yong^{1,2*}

(1. Department of Pathogenic Biology, School of Basic Medical Sciences; 2. Molecular Biotechnology Platform, Public Center of Experimental Technology, South-west Medical University, Luzhou 646000, China)

Abstract: At present, the drug treatment for invasive fungal infection is challenged by serious adverse effects and drug resistance. Therefore, the research and development of safe and effective new antifungal drugs is a great importance to support the clinical treatment of invasive fungal diseases. This article reviewed new targets of invasive fungi, and explores the underlying mechanisms of fungal biofilm formation, cell wall, key metabolic enzymes, mitochondria in the aspects of small molecule inhibitors and secondary metabolites, which may provide reference for the research and development of new drugs.

Key words: invasive fungi; target; small molecule inhibitors; molecular mechanism

广谱抗生素使用、免疫抑制剂滥用、艾滋病感染及血液系统恶性肿瘤等因素, 造成以白色念珠菌 (*Candida albicans*)、新生隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*) 和烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) 为代表的侵袭性真菌感染率和致死率日益增长, 严重威胁着人类健康。但现有抗真菌药物种类少、毒副作用强以及临床耐药甚至超级耐药菌株的涌现, 均使得现有的抗真菌药物治疗受到挑战。

真菌细胞和哺乳动物细胞具有相似的真核生物特征, 故药物新靶点探究核心是提高侵袭性真菌药物靶点的特异性, 减少毒副作用^[1-2]。在现代生命科学技术发展和对侵袭性真菌致病机制逐步深入的研究背景下, 本文拟探讨小分子物质和次生代谢产物等对真菌生物膜、细胞壁、线粒体及生化代谢等相关靶点作用机制, 总结出靶向治疗侵袭性真菌的潜在功能药物。

收稿日期: 2020-05-04 修回日期: 2020-08-24

基金项目: 四川省科技厅项目(2019YJ0407); 泸州市科技局项目(2018-JYJ-32, 2019-RCM-94); 大学生创新创业训练项目(S201910738107)

* 通信作者 (corresponding author): szy83529@163.com

1 临床现有药物靶点

目前临床常用药物靶点主要有3类:1)合成的广谱抗真菌唑类药物抑制 14α -羊毛脂醇脱甲基酶阻止麦角甾醇的合成;2)棘白菌素类药物非竞争性抑制 β -1,3-葡聚糖合成酶,干扰细胞壁 β -1,3-葡萄糖的合成;3)细菌次生代谢产物多烯类药物(如两性霉素B)与麦角固醇结合,改变细胞膜通透性,引起细胞内物质外渗。但部分临床真菌的天然耐药性、药物靶点基因突变造成的唑类耐药菌株、棘白菌素类受限的给药方式、多烯类毒副作用大等因素使得这3类药物的临床应用受到挑战。

2 生物膜及菌丝形成靶点

2.1 靶向生物膜及菌丝形成的物质

生物膜是指真菌黏附于惰性或活性实体的接触表面,分泌多糖基质、纤维蛋白、脂质蛋白等物质,将其自身包绕其中而形成的大量真菌聚集膜样物。生物膜的形成是侵袭性真菌反复感染、慢性持续感染、产生耐药性的重要原因,其主要组成为菌丝。针对生物膜和菌丝形成的靶点药物开发是新药研发的重要方向。

2.1.1 影响信号通路调控生物膜形成的物质:某些物质通过调控信号通路影响侵袭性真菌生物膜和菌丝的形成进而发挥抗真菌作用。例如大黄素是蛋白激酶CK2的天然抑制剂,通过抑制白色念珠菌菌丝发育及生物膜形成发挥作用,但对成熟的生物膜作用较弱^[3]。粉防己碱以剂量依赖方式对白色念珠菌的酵母-菌丝形态转变和生物膜形成起抑制作用,这与调控Ras1p-cAMP-PKA通路基因表达下调有关^[4]。

2.1.2 影响菌丝形成基因表达的物质:基于具有良好的空间分散性、成药性能以及药物代谢动力学性质的小分子物质更易衍生出性质优良的抗真菌药物,部分小分子物质可针对菌丝形成基因发挥抗真菌作用。BH3I-1及其衍生物作用于白色念珠菌菌丝增殖特异基因*RFG1*、*NRG1*和*UME6*,抑制白色念珠菌菌丝的增殖与形态发生^[5];具有抗菌和抗癌作用的糖脂生物表面活性剂-槐糖脂可下调念珠菌菌丝特异基因*HWPI*、*ALS1*、*ALS3*、*ECE1*和*SAP4*的表达,并阻止真菌黏附从而抑制生物膜形成^[6]。

2.1.3 影响真菌附着与致病的物质:“Filastatin”是

一种对白色念珠菌附着至非活性表面(如聚苯乙烯塑料)和致病过程有显著抑制作用的化合物,对人体细胞系无毒,但其抑菌机制尚未明确。因此,“Filastatin”可作为潜在的保护性材料应用于医疗器械表面预防真菌感染^[7]。与“Filastatin”有类似功能的防腐剂葡萄糖酸氯己定,对生物膜的抑制作用体现在改变细胞渗透性引起微生物溶解和抑制接触面的黏附^[8]。

2.2 细菌代谢产物靶向生物膜及菌丝形成抑制物

细菌与真菌往往有着共同的寄生环境,两者相互影响。益生菌对白色念珠菌的抑制作用是依靠其代谢物的消旋来影响白色念珠菌在宿主表面定植和菌丝形成。如乳酸杆菌的培养上清液中发现的一些蛋白质分子、过氧化氢及低分子化合物(抑菌素、羧酸、脂肪酸)等代谢物,可抑制白色念珠菌酵母-菌丝的转变以及黏附^[9]。卷曲乳酸杆菌的上清液中也发现可显著下调菌丝特异基因*ALS3*、*HWPI*、*ECE1*表达和上调负转录调节基因*NRG1*的功能物质^[10]。

除益生菌外,包括芽孢杆菌在内的土壤细菌,除有效阻断新生隐球菌的关键毒力因子——黑色素和荚膜合成外,也对真菌生物膜形成及菌丝增殖有显著的抑制作用^[11]。另外,粪肠球菌素ENTV主要依赖于真菌的生物信号即Fsr群体感应系统发挥抑制作用^[12]。

3 细胞壁合成相关靶点

包括 β -1,3-葡聚糖和 β -1,6-葡聚糖在内的多糖是真菌细胞壁的重要组成成分。以抗真菌细胞壁的功能物质作用机制探究真菌细胞壁作用新靶点,旨在找到特异性高和副作用小的抗真菌药物(表1)。

3.1 影响细胞壁损伤的次生代谢产物

植物的天然劳森能在较低浓度水平上抑制尖孢霉增殖,作用机制除直接损伤真菌细胞壁外,还能改变膜通透性、激活氧化应激系统、诱导自噬相关基因(*ATG1*和*ATG8*)的上调表达等发生累积效应进而发挥抗真菌作用^[13]。皂苷同样也能直接损伤细胞壁从而抑制白色念珠菌增殖,主要机制是使细胞壁产生不稳定性和减少酵母黏附^[14]。

参与真菌繁殖、侵袭和免疫逃逸的分泌型天冬氨酸蛋白酶(secretory aspartic proteinase, SAP)是真菌重要毒力因子,可作为潜在的药物作用靶点。体外研究证实对从放线菌培养物中分离出来的胃抑霉素A进

行 P2 和 P3 位点结构改造, 所得产物对白色念珠菌 SAP1、SAP3、SAP5 和 SAP6 表现出较强的抑制力^[15]。

3.2 影响细胞壁形成的相关基因突变

KTR 基因缺失影响其编码的 1,2-甘露糖基转移酶活性, 导致细胞壁半乳糖聚糖的缺失。另外 SSDA 基因突变影响几丁质合成酶的亚细胞定位继而影响细胞壁合成, 这两种基因突变都能达到抑制真菌增殖的目的^[16]。

3.3 影响细胞壁形成的相关信号通路

钙调磷酸酶调节的信号通路调节 β -葡聚糖和几丁质的生物合成, 在真菌细胞应激反应时影响细胞壁完整性。单独使用钙调磷酸酶抑制剂(环孢素 A 或他克莫司)对烟曲霉的增殖具有抑制作用^[17]。因此阻断钙调磷酸酶信号通路被认为是一种新的抗深部真菌病策略。

4 抑制线粒体相关靶点

喹诺酮类化合物可引起线粒体膜电位的下降, 诱导 DNA 损伤并使细胞周期停留在 G₂/M 期, 最终导致细胞凋亡。除此之外, 喹诺酮类化合物还可通过影

响氧化还原循环、蛋白质巯基的芳基化、诱导 DNA 链断裂及生物还原烷基化等机制导致真菌细胞产生毒性^[18]。卤代水杨酰胺[N1-(3,5-二氯苯基)-5-氯-2-羟基苯甲酰胺]可通过破坏真菌线粒体蛋白转位发挥作用, 而其类似物氯硝柳胺会导致真菌线粒体对细胞核出现逆行反应, 因此其可用作抑制白色念珠菌侵袭肠上皮细胞的新型真菌抑制剂^[19]。

小檗碱可与氟康唑联用产生协同抗耐药真菌作用, 对耐药性白色念珠菌的协同抗菌效果尤其显著。其作用机制是通过增强三羧酸循环和抑制线粒体 ATP 合酶活性这两条途径使得内源性活性氧生成, 导致耐药菌株的氧化损伤^[20]。真菌产生的胶质毒素也能够抑制其他真菌病原体在人体内累积, 相关机制与小檗碱产生的氧化损伤类似, 在相应菌体中产生过氧化氢和超氧化物, 导致真菌细胞内的单链和双链脱氧核糖核酸断裂^[21]。

5 其他作用靶点

5.1 海藻糖代谢相关靶点

在高温、高寒、高渗透压及干燥失水等恶劣环境

表 1 具有新靶点的抗真菌化合物

Table 1 The Antifungal compounds with novel target

化合物分类	名称	分子靶点	作用机制	参考文献
小分子物质	BH31-3 及其衍生物	基因 <i>RFG1</i> 、 <i>NRG1</i> 、 <i>UME6</i>	抑制菌丝增殖和形态发生	[5]
	槐糖脂	基因 <i>HWPI</i> 、 <i>ALS1</i> 、 <i>ALS3</i> 、 <i>ECE1</i> 、 <i>SAP4</i>	抑制生物膜形成	[6]
	“Filastatin”	生物膜	抑制真菌黏附及致病	[7]
	葡萄糖酸氯己定	生物膜	抑制接触面的黏附	[8]
	喹诺酮类化合物	线粒体	细胞凋亡	[18]
	卤代水杨酰胺	线粒体	破坏线粒体蛋白转位	[19]
	二溴喹啉化合物	金属离子	扰乱金属离子稳态导致细胞凋亡	[27]
次生代谢产物	乳酸杆菌代谢产物	生物膜及菌丝	影响酵母-菌丝转变及黏附	[9]
	卷曲乳酸杆菌代谢产物	基因 <i>ALS3</i> 、 <i>HWPI</i> 、 <i>ECE1</i> 、 <i>NRG1</i>	影响定植及菌丝形成	[10]
	芽孢杆菌代谢产物	生物膜及菌丝	影响定植	[11]
	粪肠球菌素 ENTV	Fsr 群体感应系统	影响定植及菌丝形成	[12]
	天然劳森	细胞壁	直接损伤细胞壁	[13]
	皂苷	细胞壁	使细胞壁产生不稳定性	[14]
	胃抑霉素 A	分泌型天冬氨酸蛋白酶	细胞影响壁形成	[15]
	胶质毒素	线粒体	氧化损伤脱氧核糖核酸	[21]
	环孢素 A	钙调磷酸酶信号通路	影响细胞壁形成	[17]
	小檗碱	三羧酸循环途径及线粒体 ATP 合酶	细胞氧化损伤	[20]
	紫草素	细胞膜	细胞内钙流失导致菌体死亡	[26]
	大黄素	蛋白激酶 CK2	抑制菌丝及生物膜形成	[3]
	粉防己碱	Ras1-cAMP-PKA 通路	抑制菌丝形态转变及生物膜形成	[4]

条件下,海藻糖汇集于真菌细胞表面形成独特的保护膜,有效地保护蛋白质分子不变性,从而维持真菌的生命过程和生物学特征。白色念珠菌中海藻糖-6-磷酸合酶基因1(*TPS1*)的破坏会导致菌丝形成受损和感染性降低;而 *TPS2* 基因的破坏导致海藻糖-6-磷酸(T-6-P)的累积,高浓度的 T-6-P 具有细胞毒性,因此,海藻糖合成 *TPS1* 和 *TPS2* 基因可作为潜在的药物治疗靶点^[22]。

5.2 氨基酸与蛋白质代谢相关靶点

感染期间,真菌会呈现特有的氨基酸代谢过程,例如:缺乏 CPCA(氨基酸饥饿时的转录激活剂)和 AREA(当优选的氮源不可用时被激活的氮代谢阻遏剂)时会损害烟曲霉的毒力,使得氨基酸的代谢受阻,从而影响烟曲霉的毒力^[23],因此特有的氨基酸代谢关键基因可作为潜在的药物靶点。

而真菌中的 *Bdl* 基因突变导致 BET 蛋白(bromodomain and extira-terminal)两个相关结构域的灭活,使得其在体外生存能力丧失和对小鼠致病毒力降低。二苯并噻二酮化合物就利用此特点发挥抑菌作用。这些发现使得高度选择性的 BET 蛋白抑制剂有望成为抗真菌治疗新策略,并确定 *Bdl* 基因可作为新作用靶点^[24]。

5.3 针对金属离子稳态的相关靶点

真菌细胞内锌离子的螯合可导致其凋亡,如变形虫可能通过降低病原体锌的利用率来减少真菌细

胞的增殖^[25]。紫草素通过破坏白色念珠菌细胞膜的完整性,导致细胞内钙离子的流失进而引起菌体死亡^[26]。二溴喹啉化合物也通过扰乱体内金属离子稳态而发挥抗真菌作用^[27],因此有针对性的调控菌体内金属离子失衡也可作为潜在的药物治疗靶点。

6 问题与展望

近年来,侵袭性真菌感染的高发病率和致死率已是当前面临的一大挑战,探索潜在真菌特异性药物新靶点和开发新型抗真菌药物成为迫切需要。本文以药物作用新靶点为核心,在小分子抑制物和次生代谢产物等方面探究新型药物研发机制,以期寻求特异的治疗药物,但目前主要集中在酵母菌方面的研究,丝状真菌方面的研究相对滞后,且这些研究成果距离临床应用还有一段距离。

随着现代生物技术的发展,相关的后续研究可基于以下几个方面开展:1)深入研究新型抗真菌物质的作用机制,寻找相应的功能物质,为研发新型药物提供更加充分的理论依据;2)优化潜在安全、高效的新型药物的药效动力学及药代动力学,以满足未来抗真菌治疗的需求。3)将计算机辅助技术、基因组学及蛋白质组学技术等充分应用于新型药物的研发,这将有助于推动新一代高效、低副作用的抗真菌药物的研发和临床用药。

参考文献:

- [1] McLellan CA, Vincent BM, Solis NA, *et al.* Inhibiting mitochondrial phosphate transport as an unexploited anti-fungal strategy [J]. *Nat Chem Biol*, 2018, 14:135-141.
- [2] Macdonald D, Thomson DD, Johns A, *et al.* Inducible cell fusion permits use of competitive fitness profiling in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* [J]. *Antimicrob Agents Ch*, 2018, 63. doi: 10.1128/aac.01615-18.
- [3] Janeczko M, Masłyk M, Kubifski K, *et al.* Emodin, a natural inhibitor of protein kinase CK2, suppresses growth, hyphal development, and biofilm formation of *Candida albicans* [J]. *Yeast*, 2017, 34: 253-265.
- [4] Zhao YJ, Liu WD, Shen YN, *et al.* The efflux pump inhibitor tetrandrine exhibits synergism with fluconazole or voriconazole against *Candida parapsilosis* [J]. *Mol Biol Rep*, 2019, 46:5867-5874.
- [5] Goffena J, Toenjes KA, Butler DK. Inhibition of yeast-to-filamentous growth transitions in *Candida albicans* by a small molecule inducer of mammalian apoptosis [J]. *Yeast*, 2018, 35: 291-298.
- [6] Haque F, Alfatah M, Ganesan K, *et al.* Inhibitory effect of sophorolipid on *Candida albicans* biofilm formation and hyphal growth [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 23575. doi: 10.1038/srep23575.
- [7] Fazly A, Jain C, Dehner AC, *et al.* Chemical screening identifies filastatin, a small molecule inhibitor of *Candida albicans* adhesion, morphogenesis and pathogenesis [J]. *PNAS*, 2013, 110: 13594-13599.
- [8] Kohli D, Hugar SM, Bhat KG, *et al.* Comparative evaluation of the antimicrobial susceptibility and cytotoxicity of husk ex-

- tract of *Cocos nucifera* and chlorhexidine as irrigating solutions against *Enterococcus faecalis*, *Prevotella intermedia* and *Porphyromonas gingivalis*; an *in vitro* study [J]. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*, 2018, 36: 142-150.
- [9] Wang S, Wang Q, Yang E, *et al.* Antimicrobial compounds produced by vaginal *Lactobacillus crispatus* are able to strongly inhibit *Candida albicans* growth, hyphal formation and regulate virulence-related gene expressions [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 564. doi: 10.3389/fmicb.2017.00564.
- [10] Allonsius CN, Vandenheuevel D, Oerlemans EFM, *et al.* Inhibition of *Candida albicans* morphogenesis by chitinase from *Lactobacillus rhamnosus* GG [J]. *Sci Rep*, 2019, 9: 2900.
- [11] Mayer FL, Kronstad JW. Disarming fungal pathogens: *Bacillus safensis* inhibits virulence factor production and biofilm formation by *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* [J]. *mBio*, 2017, 8. doi: 10.1128/mbio.01537-17.
- [12] Brown AO, Graham CE, Cruz MR, *et al.* Antifungal activity of the *Enterococcus faecalis* peptide EntV requires protease cleavage and disulfide bond formation [J]. *mBio*, 2019, 10. doi: 10.1128/mbio.01334-19.
- [13] Dananjaya SHS, Udayangani RMC, Shin SY, *et al.* *In vitro* and *in vivo* antifungal efficacy of plant based lawsone against *Fusarium oxysporum* species complex [J]. *Microbiol Res*, 2017, 201: 21-29.
- [14] Trigo-Gutierrez JK, Sanitá PV, Tedesco AC, *et al.* Effect of Chloroaluminium phthalocyanine in cationic nanoemulsion on photoinactivation of multispecies biofilm [J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2018, 24: 212-219.
- [15] Cadicamo CD, Mortier J, Wolber G, *et al.* Design, synthesis, inhibition studies, and molecular modeling of pepstatin analogues addressing different secreted aspartic proteinases of *Candida albicans* [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85: 881-887.
- [16] Henry C, Li J, Danion F, *et al.* Two KTR mannosyltransferases are responsible for the biosynthesis of cell wall mannans and control polarized growth in *Aspergillus fumigatus* [J]. *mBio*, 2019, 10. doi: 10.1128/mbio.02647-18.
- [17] Arora P, Meena N, Sharma PK, *et al.* Angiolympoid hyperplasia with eosinophilia and its response to the combination of radiofrequency ablation and topical timolol [J]. *Indian Dermatol Online J*, 2017, 8: 267-270.
- [18] Futuro DO, Ferreira PG, Nicoletti CD, *et al.* The antifungal activity of naphthoquinones: an integrative review [J]. *An Acad Bras Cienc*, 2018, 90: 1187-1214.
- [19] Garcia C, Burgain A, Chaillot J, *et al.* A phenotypic small-molecule screen identifies halogenated salicylanilides as inhibitors of fungal morphogenesis, biofilm formation and host cell invasion [J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 11559. doi: 10.1038/s41598-018-29973-8.
- [20] Xu Y, Wang Y, Yan L, *et al.* Proteomic analysis reveals a synergistic mechanism of fluconazole and berberine against fluconazole-resistant *Candida albicans*: endogenous ROS augmentation [J]. *J Proteome Res*, 2009, 8: 5296-5304.
- [21] Gardiner DM, Waring P, Howlett BJ. The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis [J]. *Microbiology*, 2005, 151: 1021-1032.
- [22] Miao Y, Tenor JL, Toffaletti DL, *et al.* Structural and *in vivo* studies on trehalose-6-phosphate synthase from pathogenic fungi provide insights into its catalytic mechanism, biological necessity, and potential for novel antifungal drug design [J]. *mBio*, 2017, 8. doi: 10.1128/mbio.00643-17.
- [23] Parente-Rocha JA, Bailão AM, Amaral AC, *et al.* Antifungal resistance, metabolic routes as drug targets, and new antifungal agents: an overview about endemic dimorphic fungi [J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017: 9870679. doi: 10.1155/2017/9870679.
- [24] Mietton F, Ferri E, Champeleux M, *et al.* Selective BET bromodomain inhibition as an antifungal therapeutic strategy [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15482. doi: 10.1038/ncomms15482.
- [25] Ribeiro NS, Dos Santos FM, Garcia AWA, *et al.* Modulation of zinc homeostasis in *Acanthamoeba castellanii* as a possible antifungal strategy against *Cryptococcus gattii* [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1626. doi: 10.3389/fmicb.2017.01626.
- [26] 王杨, 陈菲, 谢明杰. 紫草素对白色念珠菌的抑制作用机制 [J]. *微生物学报*, 2018, 10: 1817-1825.
- [27] Mohammad H, Elghazawy NH, Eldesouky HE, *et al.* Discovery of a novel dibromoquinoline compound exhibiting potent antifungal and antivirulence activity that targets metal ion homeostasis [J]. *ACS Infect Dis*, 2018, 4: 403-414.