

5碘代杀结核菌素的抗真菌及作用机制研究

刘伟¹, 王苗苗¹, 韩研春¹, 倪萍¹, 温芝潼¹, 袁林¹, 王胜正^{2*}

(1. 陕西科技大学药理学系, 陕西 西安 710021; 2. 中国人民解放军空军军医大学药学院, 陕西 西安 710027)

摘要: 侵袭性真菌感染的高发生率和死亡率使其成为临床的一大棘手难题。真菌耐药性的出现进一步增加其治疗难度。因此, 开发新型抗真菌药物是解决该难题的策略之一。蛋白激酶类抑制剂在肿瘤、糖尿病和风湿病等领域被广泛研究, 但在抗真菌领域研究较少。本研究经前期筛选 100 个结构多样的蛋白激酶类小分子抑制剂的抗真菌活性, 发现 12 个化合物表现不同程度的抗真菌活性, 其中 5 碘代杀结核菌素 (5-Itu) 的抗真菌活性较优 (最小抑菌浓度范围为 2~4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。同时, 体外活性评价实验发现该化合物还具有良好的杀菌、抗生物被膜和抑制菌丝形成的活性。作用机制研究显示, 5-Itu 可改变细胞膜甾醇成分和超微结构, 增加细胞膜通透性, 诱导细胞凋亡。因此对其进一步研究, 有望发现新型的抗真菌先导化合物。

关键词: 5 碘代杀结核菌素; 抗真菌; 抗生物被膜; 腺苷激酶抑制剂; 作用机制

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)04-1024-07

Activities of 5-iodotubercidin against pathogenic fungi and its mode of actions

LIU Wei¹, WANG Miao-miao¹, HAN Yan-chun¹, NI Ping¹, WEN Zhi-tong¹,
YUAN Lin¹, WANG Sheng-zheng^{2*}

(1. Faculty of Pharmacy, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China;

2. School of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an 710027, China)

Abstract: Invasive fungal infections are a tricky problem with high morbidity and mortality. The emerging of drug resistance worsens this problem. Therefore, developing novel antifungal agents is an urgent need to break these hurdles. Although protein kinase inhibitors have been extensively investigated in various fields such as cancer, diabetes, rheumatosis and so on, they are less explored in fungal infection. Previously, we found 12 protein kinase inhibitors with different antifungal activities, among them 5-iodotubercidin (5-Itu) was found to be the most potent antifungal agent with minimal inhibitory concentrations ranging from 2 to 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Moreover, 5-Itu displayed potent fungicidal effect, inhibition of hyphal formation and anti-biofilm activity. The mechanistic studies indicated that 5-Itu changed membrane sterol compositions and ultrastructures, increased the cell membrane permeability and induced apoptosis. Therefore, it needs to further study 5-Itu for the discovery of promising antifungal lead compounds.

Key words: 5-iodotubercidin; antifungal; anti-biofilm; adenosine kinase inhibitor; mode of action

近年来, 由于艾滋病、器官移植和恶性肿瘤患者等

人数的增加, 以及生物医学材料如静脉插管、心脏支架、气管插管和导尿管等越来越多地应用于人体, 国内外研究报道, 真菌感染尤其是侵袭性真菌感染的发生率和死亡率呈逐渐上升趋势。临床统计分析发现, 大多数医院深部真菌感染是由念珠菌引起的, 其中白念珠菌构成比最高, 其次为光滑念珠菌、近平滑念珠菌、

收稿日期: 2021-10-14; 修回日期: 2021-11-20.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81701981); 陕西重点研究计划一般项目 (2020SF-205); 大学生创新创业训练项目 (201910708013).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-29-84776815,

E-mail: wangshengzheng001@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1484

热带念珠菌和克柔念珠菌^[1]。目前临床上可供选择的抗深部真菌感染药物种类有限, 主要为多烯类如两性霉素 B, 三唑类如氟康唑 (fluconazole, FCZ)、伊曲康唑、伏立康唑, 棘白菌素类如卡伯芬净、阿尼芬净、米卡芬净等。并且它们还存在如毒副作用大、不便利的给药途径、易产生耐药性等问题, 进一步增加了深部真菌感染的治疗难度。近几十年来抗真菌新药的开发依旧很缓慢, 再加上耐药现象的出现, 使临床可选择的抗真菌药物变得更加有限。因此, 开发新结构类型、作用于新靶点的抗真菌药物是解决临床真菌感染治疗难题的重要策略之一。

随着蛋白激酶在各类疾病过程中重要作用的发现, 蛋白激酶被认为是继 G 蛋白偶联受体之后第二大类药物作用靶标。据统计, 目前处在临床研究的候选药物中, 约 20%~30% 的药物为蛋白激酶类抑制剂^[2]。虽然蛋白激酶类抑制剂在肿瘤、糖尿病和风湿病等领域被广泛研究^[3], 在抗细菌感染方面近年也有许多研究报道, 但在抗真菌感染领域研究还较少。病原真菌属于真核生物, 它的许多蛋白激酶信号通路在哺乳动物细胞中存在高度保守。因此作用于哺乳动物细胞的蛋白激酶抑制剂很有可能对真菌中同源的蛋白激酶也存在抑制作用。研究报道, 如非特异性的蛋白激酶 C 抑制剂星形孢菌素、乙酰 CoA 合成酶抑制剂塞来昔布衍生物 AR-12、酪蛋白激酶 2 抑制剂 CX-4945 和大黄素、磷脂酰肌醇-3-激酶抑制剂苯并咪唑衍生物、磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 抑制剂 KP-372-1、糖原合成酶激酶 3 抑制剂 NP031112 和 TDZD-8 等对肿瘤和病原真菌均表现良好的抑制活性^[4-9], 这证实了该观点的可行性。此外, 蛋白激酶在真菌与哺乳动物细胞中虽存在相似性, 但彼此也有一定差异。如人源磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 (phosphoinositide dependent protein kinase 1, PDK1) 是一个具有血小板同源结构域、长为 556 个氨基酸的蛋白, 它在白念珠菌的同源蛋白 Pkh1 是一个长为 944 个氨基酸但没有血小板同源结构域的蛋白, 且两者酶活性部位仅存在 50% 的相似性^[10]。因此, 本研究从哺乳动物细胞蛋白激酶抑制剂中寻找具有抗真菌活性的先导化合物, 以期发现作用于新靶点的抗真菌先导化合物或候选药物。

本研究前期通过搜寻蛋白激酶类抑制剂的小分子化合物库, 挑选了 100 个结构多样的哺乳动物细胞蛋白激酶类小分子抑制剂, 发现有 12 个化合物表现了不同程度的抗真菌活性, 其中 5 碘代杀结核菌素 (5-iodotubercidin, 5-Itu, 化学结构见图 1) 的抗真菌活性较优。5-Itu 为广泛的激酶抑制剂, 尤其对腺苷激酶抑制活性最强。5-Itu 具有多种药理活性, 如可通过抑

制胰岛瘤细胞相关蛋白 1 的表达、降低环磷酸腺苷水平而发挥抑制神经母细胞瘤增殖的作用; 以依赖或不依赖抑制组蛋白 H3 磷酸化激酶 Haspin 活性的方式影响胚胎干细胞的自我复制和分化; 通过抑制环磷酸腺苷效应元件结合蛋白的磷酸化、增加蛋白激酶 B 和细胞外信号调节酶磷酸化而发挥抑制黑色素形成的作用; 通过激活 p53, 其代谢物插入 DNA 引起 DNA 断裂等发挥体内抗肿瘤活性; 通过抑制乙酰辅酶 A 羧化酶活性而发挥抑制脂肪酸和胆固醇合成的作用等^[11-15]。本研究基于前期发现, 进一步通过微量液基稀释法、时间-杀菌曲线实验、菌丝和生物被膜形成实验等评价了 5-Itu 的体外抗真菌和抗生物被膜活性。通过气相色谱-质谱联用 (GC/MS)、透射电镜 (TEM) 和流式细胞技术初步探索了其抗真菌作用机制。

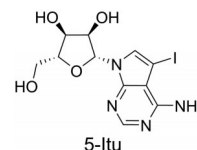


Figure 1 Chemical structure of 5-iodotubercidin (5-Itu)

材料与方法

实验菌株 耐药白念珠菌 103、白念珠菌 SC5314、光滑念珠菌、近平滑念珠菌、克柔念珠菌、热带念珠菌、新生隐球菌 (上海市长海医院检验科)。

实验试剂和培养基 12 个化合物 (CAS 号分别为: 24386-93-4、742112-33-0、950736-05-7、1219168-18-9、1356962-34-9、336113-53-2、307543-71-1、837422-57-8、1229582-33-5、1228013-15-7、110448-33-4 和 1421227-52-2, Aladdin 公司); 氟康唑 (Sigma 公司); 钙黄绿素乙酰氧基甲酯、细胞凋亡检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); 蜗牛酶 (生工生物工程股份有限公司); 二甲基亚砜、碳酸氢钠及氢氧化钠 (天津市天力化学试剂有限公司); 蛋白胨 (北京奥博星生物技术有限责任公司); 葡萄糖 (天津市科密欧化学试剂有限公司); 3-(N-吗啡啉) 丙磺酸/MOPS (上海源叶生物科技有限公司); RPMI 1640 (Gibco 公司)。

SDA 平板 (40 g 葡萄糖、10 g 蛋白胨加三蒸水至 1 000 mL 搅拌溶解, 加 18 g 琼脂粉混匀, 121 °C 高温灭菌 20 min, 倒平皿 4 °C 储存); YPD 培养液 (酵母提取物 10 g、蛋白胨 20 g、葡萄糖 20 g 加三蒸水至 1 000 mL, 混匀分装, 121 °C 高压灭菌 20 min, 4 °C 保存); RPMI 1640 液体培养液 (RPMI 1640 10 g、NaHCO₃ 2.0 g、MOPS 34.5 g 加三蒸水溶解, 用 NaOH 调 pH 至 7.0, 加水至 1 000 mL, 除菌, 4 °C 保存)。

实验仪器 SW-CJ-JFD型洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); THZ-98C型恒温振荡箱、GP-9080型隔水式培养箱(上海一恒科学仪器有限公司); 流式细胞仪(美国 Beckman 公司); GC/MS(Thermo Fisher 公司); 透射电镜(日本日立公司)。

微量液基稀释法 将实验各菌株培养过夜, RPMI 1640 培养基调整每毫升菌浓度至约 $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$ 个, 混匀。取无菌 96 孔板, 每排 1 号孔加等量 RPMI 1640 液体培养基作空白对照, 12 号孔不加药物作阳性对照。对 2~11 号孔进行倍比稀释, 保证各孔的药物终浓度依次为 64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 且孔中 DMSO 的含量均低于 1%。35 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养, 于 24 或 72 h 进行观察记录, 得对应最小抑菌浓度 (minimal inhibit concentration, MIC)。MIC 值选用记录方法: 当 MIC 值高于 64 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 记为“> 64 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ”; 等于或低于最低浓度时均记为“ $\leq 0.125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ”。上述实验均平行操作两次, 当观察所得 MIC 值能准确重复或只差一个浓度时视为有效结果, 并取较高浓度为最终确定值, 否则重新实验直到数据符合要求。

时间-杀菌曲线实验 挑取白念珠菌克隆培养过夜。离心收集菌体, PBS 洗涤, RPMI 1640 培养基调整每毫升菌浓度至 1×10^5 个。将菌液分装, 加不同浓度的化合物, 振荡培养, 不同时间点取出菌液, 用 PBS 稀释不同的浓度, 取稀释液分别涂铺 SDA 平板, 35 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 48 h 后, 数克隆数并计算 CFU 数目。

生物被膜实验 挑取白念珠菌克隆培养过夜。离心收集菌体, PBS 洗涤, RPMI 1640 培养基调整每毫升菌浓度至 1×10^6 个。菌悬液 100 μL 加入 96 孔板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 黏附 90 min 后, PBS 洗 3 次, 再加入新鲜 RPMI 1640 以及含药的培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后, 用 XTT 染色并检测生物被膜的量。成熟生物被膜的检测: 调整每毫升菌浓度至 1×10^6 个。菌悬液 100 μL 加入 96 孔板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 黏附 90 min 后, PBS 洗 3 次, 再加入新鲜 RPMI 1640 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后, 再用 PBS 洗 3 次, 加入新鲜 RPMI 1640 以及含药的培养基, 用 XTT 染色并检测成熟生物被膜的量。

菌丝形成实验 挑取白念珠菌克隆培养过夜。离心去上清, PBS 洗 3 次。用培养基 RPMI 1640 + 10% FBS 重悬, 调整每毫升菌浓度为 1×10^6 个, 取 1 mL 于 6 孔板, 加药混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养, 于 3 h 观察并拍照。

细胞膜通透性实验 挑取白念珠菌克隆培养过夜。离心去上清, PBS 洗 3 次。调整每毫升菌浓度为 1×10^7 个, 加 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 钙黄绿素乙酰氧基甲酯 (calcein AM) 孵育 2 h。PBS 清洗 3 次, 调整每毫升菌液浓度为 1×10^6 个, 加药 5-Itu (4 和 8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 或不加药孵育 3 h。

PBS 清洗 3 次, 流式细胞仪检测。

细胞凋亡检测 挑取白念珠菌克隆培养过夜。再将菌以 1:100 比例转移至新鲜的 YPD 培养基及含药培养基中, 35 $^{\circ}\text{C}$ 、200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养, 离心收集, PBS 清洗, 加入蜗牛酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 离心去上清, PBS 清洗, 按照细胞凋亡试剂盒说明书操作, 孵育, 上流式细胞仪检测。

透射电镜实验 挑取白念珠菌克隆于 YPD 中培养过夜, 再将菌以 1:100 比例转移至 100 mL 新鲜的 YPD 培养基及含药培养基中, 35 $^{\circ}\text{C}$ 、200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养至菌处于对数生长期, 离心收集, PBS 清洗, 收集菌沉淀, 加 2.5% 戊二醛固定液置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 漂洗, 再加 1% 锇酸固定, 漂洗, 梯度脱水, 包埋, 切片, 柠檬酸铅和醋酸铀双染, 透射电镜观察拍照。

GC/MS 检测细胞膜甾醇成分 挑取白念珠菌克隆培养过夜。再将菌以 1:100 比例转移至新鲜的 YPD 培养基及含药培养基中, 35 $^{\circ}\text{C}$ 、200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养, 离心收集, PBS 清洗, 去上清, 称各菌湿重约 0.5 g, 加 PBS 2.5 mL 和新鲜配制的皂化剂 (含 15% NaOH 的 90% 乙醇溶液) 6 mL, 混匀, 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴皂化 60 min。加石油醚 (沸程 30~60 $^{\circ}\text{C}$) 6 mL 提取 3 次, 合并提取液, 加水 6 mL 洗涤, 弃去水层, 醚层于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴挥干, 得未皂化脂, 加环己烷使溶液体积为 1 $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 湿菌, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。送样 GC/MS 检测。检测分析条件为: 氦气, 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 质谱, 离子源 EI, 250 $^{\circ}\text{C}$; 质量范围: m/z 41~500; 进样口温度, 250 $^{\circ}\text{C}$; 传输线温度, 250 $^{\circ}\text{C}$; 进样体积, 1 μL ; 延迟时间, 3 min; 升温程序: 100~300 $^{\circ}\text{C}$, 30 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 。实验重复两次。

统计学方法 计量资料以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 不同处理组间的比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结果

1 12 个化合物的抗真菌活性

如表 1 所示, 初步筛选到 12 个化合物对耐药白念珠菌 103 和敏感白念珠菌 SC5314 均表现不同程度的抑制活性, 其中 5-Itu 对这两种真菌的抑制作用最优, MIC 值范围为 2~4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2 5-Itu 对多种真菌表现抑制活性

如表 2 所示, 5-Itu 对多种真菌 (包括敏感白念珠菌 SC5314、耐药白念珠菌 103、热带念珠菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌、克柔念珠菌和新生隐球菌) 的 MICs 范围为 2~4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 说明 5-Itu 具有较广谱的抗真菌活性。

3 5-Itu 具有杀真菌活性

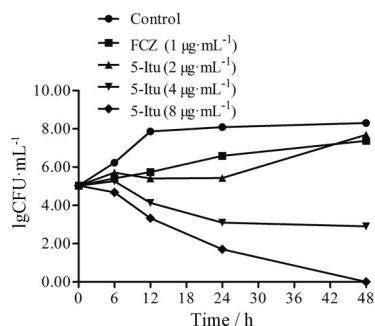
如图 2 所示, 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 5-Itu 作用真菌 24 h 后, 与空白组相比, 存活的菌数减少了 $4.57 \times 10^2 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

Table 1 Minimal inhibitory concentrations (MICs) of 12 compounds against fungi

CAS	MIC/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$		Target
	103	SC5314	
24386-93-4	2	4	Adenosine kinase
742112-33-0	8	8	3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1
950736-05-7	8	16	B-rapidly accelerated fibrosarcoma kinase
1219168-18-9	16	16	Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase
1356962-34-9	16	32	Anaplastic lymphoma kinase
336113-53-2	32	16	Kinesin spindle protein
307543-71-1	32	64	Inositol-requiring enzyme 1
837422-57-8	64	32	Lymphocyte specific kinase
1229582-33-5	64	32	Mixed lineage kinase
1228013-15-7	64	64	DNA-dependent protein kinase, mammalian target of rapamycin
110448-33-4	64	64	Myosin light chain kinase
1421227-52-2	64	> 64	Erb3 binding protein-1
Fluconazole (FCZ)	> 64	0.5	Sterol 14 α -demethylase

Table 2 MICs of 5-Itu against different fungi

Fungi	MIC/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	
	FCZ	5-Itu
FCZ-resistant <i>C. albicans</i> 103	> 64	2-4
<i>C. albicans</i> SC5314	0.5-1	2-4
<i>C. neoformans</i>	1	2-4
<i>C. krusei</i>	> 64	4
<i>C. parapsilosis</i>	2	4
<i>C. glabrata</i>	> 64	4
<i>C. tropicalis</i>	> 64	4

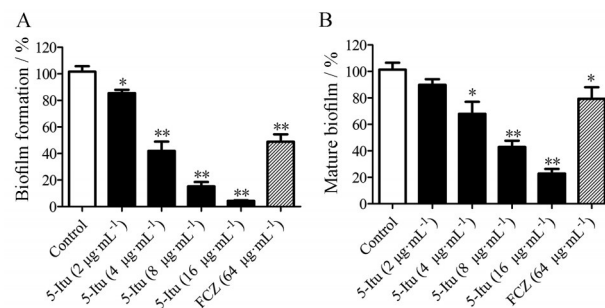
**Figure 2** Time killing curves of *C. albicans* SC5314 treated with or without different concentrations of 5-Itu or FCZ. Aliquots were obtained at the indicated time points and serially dilutions were spread on SDA plates. After 48 h of incubation at 35 °C, the colony was counted

4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 5-Itu 作用真菌 48 h 后, 与空白组相比, 存活的菌数减少了 2.51×10^5 CFU $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 5-Itu 作用真菌 48 h 后, 存活菌数为 0。这结果说明 5-Itu 具有杀真菌作用。

4 5-Itu 能够显著抑制白念珠菌生物被膜的形成, 损伤成熟生物被膜

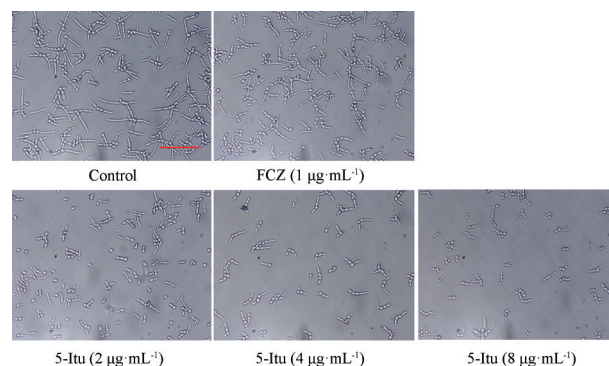
如图 3 所示, 2~16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 5-Itu 均能显著地抑制

白念珠菌生物被膜的形成 ($P < 0.05$), 且呈现浓度依赖性。5-Itu 在浓度为 4、8 和 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 还能明显损伤成熟生物被膜 ($P < 0.05$), 损伤率分别为 33.4%、60.0% 和 70.5%。

**Figure 3** Effects of 5-Itu on biofilm formation and mature biofilms of *C. albicans* in vitro. A: Effects of different concentrations of 5-Itu (2, 4, 8 and 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) on biofilm formation of *C. albicans*; B: Effects of different concentrations of 5-Itu (2, 4, 8 and 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) on mature biofilms of *C. albicans*. Biofilm cells were tested by the XTT reduction assay, and the biofilms were evaluated by the percentage of viable cells treated with different drugs relative to the control. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control

5 5-Itu 能够抑制白念珠菌菌丝的形成

如图 4 所示, 2、4 和 8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 5-Itu 作用白念珠菌 3 h 后, 虽然有部分菌出现较短的菌丝, 但部分菌依然为酵母态。结果说明 5-Itu 能抑制白念珠菌菌丝的形成。

**Figure 4** Inhibitory activity of different concentrations of 5-Itu on hyphal formation of *C. albicans* SC5314. Representative photomicrographs of *C. albicans* SC5314 treated with or without different concentrations of 5-Itu or FCZ for 3 h at 37 °C. Magnification: 400 \times . Scale bar = 50 μm

6 5-Itu 能够显著增加白念珠菌细胞膜的通透性

如图 5 所示, 4 和 8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 5-Itu 作用白念珠菌 3 h 后, 其菌细胞内的钙黄绿素荧光值与空白组相比, 明显降低 ($P < 0.05$), 说明 5-Itu 能增加白念珠菌细胞膜的通透性。

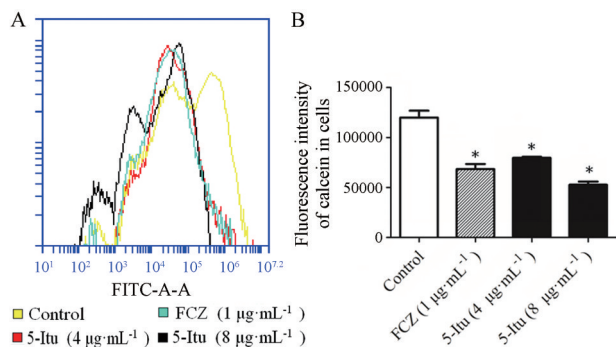


Figure 5 Effects of 5-Itu on cell membrane permeability of *C. albicans* was evaluated by the cellular fluorescence intensities of calcein. A: Flow cytometry histograms of *C. albicans* treated with or without 5-Itu or FCZ; B: The cellular fluorescence intensities of calcein in *C. albicans* treated with or without 5-Itu or FCZ. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs control

7 5-Itu 能够诱导白念珠菌凋亡

Annexin V 是一种钙离子依赖磷脂结合蛋白, 可与细胞凋亡早期细胞膜外翻的磷脂酰丝氨酸结合, 从而检测细胞凋亡。如图 6 所示, 4 和 8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 5-Itu 作用白念珠菌后, Annexin V 阳性菌细胞数明显高于空白组 ($P < 0.05$), 提示 5-Itu 可诱导白念珠菌发生凋亡。

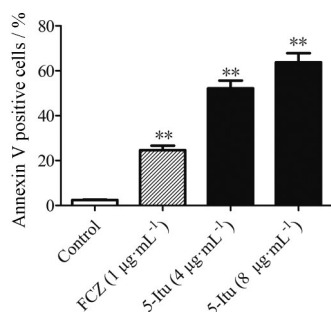


Figure 6 The percentage of Annexin V-positive cells of *C. albicans* treated with 5-Itu (4 and 8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was evaluated. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control

8 5-Itu 能够改变白念珠菌的细胞超微结构

如图 7 所示, 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 5-Itu 作用白念珠菌后, 与空白组相比, 部分菌细胞的细胞质密度明显下降, 并且细胞膜与细胞壁之间出现分离, 中间存在部分内容物, 细胞膜向细胞质方向发生轻微内陷。结果提示, 5-Itu 可能损伤白念珠菌细胞膜和细胞内的超微结构。

9 5-Itu 能够改变白念珠菌细胞膜的甾醇成分

前期结果显示, 5-Itu 能够显著增加细胞膜的通透性, 透射电镜观察发现 5-Itu 能够损伤白念珠菌的细胞膜。因此, 进一步用 GC/MS 考察了 5-Itu 对细胞膜甾醇成分的影响。如表 3 所示, 空白组中麦角甾醇

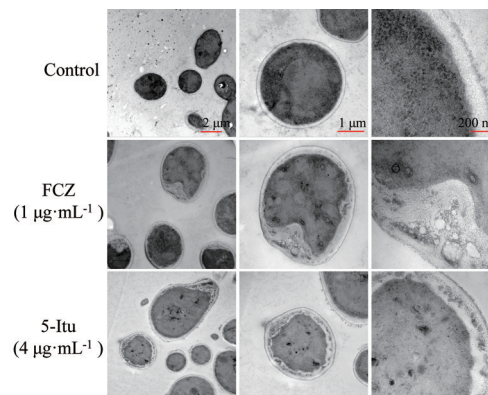


Figure 7 The effect of 5-Itu on the cell ultrastructures of *C. albicans* by transmission electron microscopy. Magnification: 15 000 \times , 30 000 \times , 80 000 \times

(ergosterol) 的百分比含量为 87.2%, 是最主要的甾醇成分。阳性对照药氟康唑 (通过作用于羊毛甾醇-14 α -去甲基化酶抑制麦角甾醇的合成) 组的麦角甾醇百分比含量降为 1.7%, 而羊毛甾醇 (lanosterol) 和其他含有 14 α -甲基的甾醇成分如 obtusifoliol、eburicol、lanost-8-en-3-ol 和 14 α -methyl-5 α -ergosta-8,24(28)-dien-3 α -ol 均发生累积。5-Itu 组的麦角甾醇百分比含量降为 35.6%, 其他甾醇成分如 ergosta-3,5,7,22-tetraene、3 α ,5-cyclo-5 α -ergosta-6,8(14),22-triene 和羊毛甾醇百分比含量均高于空白组。结果说明, 5-Itu 可以改变细胞膜的甾醇成分。

Table 3 The mean percentage of sterol compositions (%) of *C. albicans* SC5314 following FCZ or 5-Itu treatment, as analyzed by GC/MS. ^aND: Not detected

Sterol	Control	FCZ (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	5-Itu (4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Ergosterol	87.2	1.7	35.6
Ergosta-3,5,7,22-tetraene	0.2	ND/ND ^a	15.5
3 α ,5-Cyclo-5 α -ergosta-6,8(14),22-triene	1.8	ND/ND	40.4
Cholesta-8,24-dien-3-ol (3' α ,5' α)-zymosterol)	0.9	ND/ND	0.4
Ergosta-7,22-dien-3-ol	1.2	ND/ND	ND
Lanosterol	1.1	8.0	4.3
Obtusifoliol	ND/ND	21.4	ND
14 α -Methyl-5 α -ergosta-8,24(28)-dien-3 α -ol	ND/ND	15.3	ND
Eburicol	ND/ND	16.4	ND
Lanost-8-en-3-ol	ND/ND	31.5	ND
Unknown	7.6	5.8	3.9

讨论

本研究用不同的方法评价了 5-Itu 对真菌的活性, 结果发现 5-Itu 对各种念珠菌属真菌和新生隐球菌均表现较好的抑制作用, 对白念珠菌还表现杀菌活性。

并且, 5-Itu 能够显著地抑制生物被膜和菌丝的形成, 并明显损伤成熟生物被膜。初步的作用机制研究显示, 5-Itu 能够显著地增加细胞膜的通透性, 损伤细胞膜和细胞内的超微结构, 改变细胞膜的甾醇成分, 诱导细胞凋亡。

生物被膜是真菌在植入人体内的生物材料如中心静脉导管、导尿管、起搏器、假牙等表面形成的一种由酵母态、菌丝态、假菌丝态细胞和胞外基质组成的致密结构, 是真菌毒性和耐药性形成的重要因子。白念珠菌生物被膜的形成与酵母和菌丝型细胞的发育存在密切关系, 受环腺苷酸/蛋白激酶 A (cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A, cAMP/PKA) 信号通路调控^[6]。本研究发现 5-Itu 具有抗白念珠菌生物被膜的活性, 可能与它抑制菌丝形成有关。此外, 文献报道 5-Itu 能够通过诱导细胞内外的腺苷失衡而降低细胞内 cAMP 的含量^[11]。而降低 cAMP 与抗生物被膜作用密切相关^[17]。因此, 进一步还需研究 5-Itu 的抗生物被膜作用是否与 cAMP 信号通路相关。

甾醇是真核细胞膜的重要组成成分。与哺乳动物细胞不同的是, 真菌细胞膜最主要的甾醇成分为麦角甾醇。氟康唑是临床治疗侵袭性真菌感染的一线药物。它会通过抑制麦角甾醇合成通路中的羊毛甾醇-14 α -去甲基化酶而阻断羊毛甾醇的 14 α -去甲基化, 从而造成羊毛甾醇、含甲基的羊毛甾醇类似物的累积和麦角甾醇含量的减少。本研究中, 氟康唑作用白念珠菌后的细胞膜麦角甾醇百分比含量显著减少, 羊毛甾醇和其他含有 14 α -甲基的甾醇成分如 obtusifolol、eburicol、lanost-8-en-3-ol 和 14 α -methyl-5 α -ergosta-8,24(28)-dien-3 α -ol 均发生累积, 这与文献报道结果相似^[18,19]。5-Itu 作用后的白念珠菌细胞膜麦角甾醇百分比含量虽然与空白组相比也有明显下降, 但高于氟康唑药物组。并且, 与氟康唑不同的是, 5-Itu 引起了白念珠菌细胞膜中 3 α ,5-cyclo-5 α -ergosta-6,8(14),22-triene 和 ergosta-3,5,7,22-tetraene 两个甾醇成分的累积, 通过将这两个甾醇组分与麦角甾醇的结构进行比较, 发现它们均缺少了 3-位羟基。目前对于催化这个反应的酶还未见文献报道。本研究发现 5-Itu 可以改变细胞膜甾醇的成分, 但与氟康唑作用机制不同, 5-Itu 可能是通过作用于麦角甾醇合成通路中的上游靶标影响麦角甾醇成分含量, 或者可能直接作用于麦角甾醇引起其结构的改变, 从而损伤细胞膜的超微结构, 引起细胞膜通透性的改变, 这还有待进一步的研究。

综上所述, 5-Itu 对各种真菌表现出良好的抑制甚至是杀菌作用。并且, 5-Itu 能够显著地抑制生物被膜和菌丝的形成, 明显损伤成熟生物被膜。其抗真菌作

用机制可能与影响细胞膜甾醇有关。相关研究结果为新型抗真菌先导化合物的研究和开发提供有益参考。

作者贡献: 刘伟、王苗苗、韩研春、倪萍、温芝潼、袁林负责完成文中实验部分和数据处理; 刘伟负责撰写文章; 王胜正指导实验设计和数据分析, 并修改文章。

利益冲突: 本文的研究内容无任何利益冲突。

References

- [1] Xiao Z, Wang Q, Zhu F, et al. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and mortality risk factors of candidemia among critically ill patients: a retrospective study from 2011 to 2017 in a teaching hospital in China [J]. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2019, 8: 89.
- [2] Eglén RM, Reisine T. The current status of drug discovery against the human kinome [J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2009, 7: 22-43.
- [3] Roskoski R. A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors [J]. *Pharmacol Res*, 2015, 100: 1-23.
- [4] Maslyk M, Janeczko M, Martyna A, et al. CX-4945: the protein kinase CK2 inhibitor and anti-cancer drug shows anti-fungal activity [J]. *Mol Cell Biochem*, 2017, 435: 193-196.
- [5] Baxter BK, DiDone L, Ogu D, et al. Identification, *in vitro* activity and mode of action of phosphoinositide-dependent-1 kinase inhibitors as antifungal molecules [J]. *ACS Chem Biol*, 2011, 6: 502-510.
- [6] Koselny K, Green J, DiDone L, et al. The celecoxib derivative AR-12 has broad-spectrum antifungal activity *in vitro* and improves the activity of fluconazole in a murine model of cryptococcosis [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60: 7115-7127.
- [7] Janeczko M, Maslyk M, Kubinski 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.
- [8] El-Khouly OA, Henen MA, El-Sayed MA, et al. Synthesis, anti-cancer and antimicrobial evaluation of new benzofuran based derivatives: PI3K inhibition, quorum sensing and molecular modeling study [J]. *Bioorg Med Chem*, 2021, 31: 115976.
- [9] Sebastian-Perez V, Manoli MT, Perez DI, et al. New applications for known drugs: human glycogen synthase kinase 3 inhibitors as modulators of *Aspergillus fumigatus* growth [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 116: 281-289.
- [10] Pastor-Flores D, Schulze JO, Bahi A, et al. PIF-pocket as a target for *C. albicans* Pkh selective inhibitors [J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8: 2283-2292.
- [11] Chen C, Breslin MB, Guidry JJ, et al. 5'-Iodotubercidin represses insulinoma-associated-1 expression, decreases cAMP levels, and

- suppresses human neuroblastoma cell growth [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294: 5456-5465.
- [12] Karanika E, Soupsana K, Christogianni A, et al. Haspin-dependent and independent effects of the kinase inhibitor 5-iodotubercidin on self-renewal and differentiation [J]. *Sci Rep*, 2020, 10: 232.
- [13] Kim KI, Jeong HB, Ro H, et al. Inhibitory effect of 5-iodotubercidin on pigmentation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 490: 1282-1286.
- [14] Zhang X, Jia D, Liu H, et al. Identification of 5-iodotubercidin as a genotoxic drug with anti-cancer potential [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e62527.
- [15] Garcia-Villafranca J, Castro J. Effects of 5-iodotubercidin on hepatic fatty acid metabolism mediated by the inhibition of acetyl-CoA carboxylase [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 63: 1997-2000.
- [16] Guo DD, Yue HZ, Wei YJ, et al. Genetic regulatory mechanisms of *Candida albicans* biofilm formation [J]. *Chin J Biotechnol (生物工程学报)*, 2017, 33: 1567-1581.
- [17] Qian W, Yang M, Li X, et al. Anti-microbial and anti-biofilm activities of combined chelerythrine-sanguinarine and mode of action against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* *in vitro* [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2020, 191: 111003.
- [18] Suchodolski J, Muraszko J, Bernat P, et al. A crucial role for ergosterol in plasma membrane composition, localisation, and activity of Cdr1p and H⁺-ATPase in *Candida albicans* [J]. *Microorganisms*, 2019, 7: 378.
- [19] Lv QZ, Qin YL, Yan L, et al. NSG2 (ORF19.273) encoding protein controls sensitivity of *Candida albicans* to azoles through regulating the synthesis of C14-methylated sterols [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 218.