

# ALK抑制剂HG-14-10-04的抗真菌活性及其作用机制研究

刘伟<sup>1</sup>, 刘艳红<sup>1</sup>, 倪萍<sup>1</sup>, 张梦莎<sup>1</sup>, 马怡<sup>1</sup>, 王胜正<sup>2\*</sup>

(1. 陕西科技大学食品科学与工程学院(生物与医药学院), 陕西 西安 710021;

2. 空军军医大学药学院, 陕西 西安 710032)

**摘要:** 侵袭性真菌感染威胁人类尤其是免疫缺陷患者或者是患有严重潜在疾病的住院患者生命健康, 给社会带来沉重的经济负担。耐药菌的出现、生物被膜的形成以及现有抗真菌药物的有限性和不良反应, 增加了临床真菌感染治疗难度, 亟需开发新型抗真菌药物。因此, 本文基于前期的激酶化合物库抗真菌活性筛选研究, 进一步考察了间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK)抑制剂3-[5-氯-2-({2-甲氧基-4-[4-(4-甲基哌嗪-1-基)六氢吡啶-1-基]苯基}氨基)嘧啶-4-基]-1*H*-咪唑(HG-14-10-04, HG)对真菌的生长抑制活性及作用机制。通过微量液基稀释法、菌丝形成、生物被膜形成等实验系统评价HG的体外抗真菌活性。结果显示: 化合物HG对敏感和耐药白念珠菌、克柔念珠菌、新生隐球菌、热带念珠菌、光滑念珠菌和近平滑念珠菌均表现真菌生长抑制和杀菌活性(MIC值为8~16  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); HG能明显抑制真菌菌丝和生物被膜的形成, 并破坏成熟生物被膜; 且与两性霉素B合用表现协同抗真菌作用。通过转录组测序技术、流式细胞术、透射电镜等研究了HG的抗真菌机制。测序分析显示差异表达基因共有1 041个, 其中上调的差异基因有666个, 下调的差异基因有375个。根据GO功能分类结果显示: 上调基因主要涉及核糖体生成、氧化还原等功能, 下调基因主要涉及糖类、糖蛋白、糖脂的合成及其代谢, GPI锚合成, 细胞骨架等功能。此外, HG能明显增加真菌内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平; 诱导细胞坏死; 将细胞周期阻滞于G0/G1期; 改变真菌细胞的超微结构尤其是细胞壁结构。因此, HG对真菌表现较好的生长抑制和杀菌活性, 其机制可能与上调ROS, 改变细胞超微结构尤其是细胞壁结构, 使真菌细胞阻滞于G0/G1期有关, 后期对其进一步的结构优化, 有望为新型抗真菌先导化合物或候选药物的发现提供基础。

**关键词:** 间变性淋巴瘤激酶抑制剂; 抗真菌活性; 生物被膜; 转录组测序; 活性氧; 细胞壁

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2024)12-3282-09

## Antifungal evaluation and mechanism study of ALK inhibitor HG-14-10-04

LIU Wei<sup>1</sup>, LIU Yan-hong<sup>1</sup>, NI Ping<sup>1</sup>, ZHANG Meng-sha<sup>1</sup>, MA Yi<sup>1</sup>, WANG Sheng-zheng<sup>2\*</sup>

(1. School of Food Science and Engineering (School of Biological and Pharmaceutical Science), Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China; 2. School of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

**Abstract:** Invasive fungal infections threaten the lives and health of humans, especially immunodeficient patients or hospitalized patients with serious underlying diseases, and impose a heavy economic burden on society. The emergence of drug-resistant fungi, the formation of biofilms, and the limits and side effects of existing antifungal drugs increase the difficulty of clinical treatment, and there is an urgent need for the development of novel antifungal drugs. Therefore, based on previous kinase chemical library antifungal activity screening studies, this paper further investigates the activity of anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor 3-[5-chloro-2-({2-

收稿日期: 2024-07-20; 修回日期: 2024-09-19.

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(82373733); 陕西省重点研发计划国际合作项目(2024GH-YBXM-18); 陕西科技大学博士科研启动基金项目(2016BJ-52).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-29-84776815, E-mail: wangshengzheng001@163.com

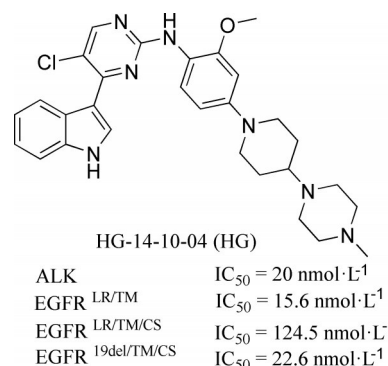
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0695

methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)hexahydropyridin-1-yl]phenyl}amino)pyrimidin-4-yl]-1*H*-indole (HG-14-10-04, HG) against various fungi and elucidates its mechanism of action. The *in vitro* antifungal activity of HG was evaluated by micro liquid-dilution method, time-killing curve, mycelium formation and biofilm formation assays. The results showed that HG exhibited inhibitory and even fungicidal effects against sensitive and resistant *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis* (MICs = 8 – 16  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); HG significantly inhibited the mycelium and biofilm formation, and destroyed the mature biofilm; and it exhibited synergistic antifungal effects with amphotericin B. The antifungal mechanism of HG was investigated by flow cytometry and transmission electron microscopy, *etc.* Sequencing analysis showed a total of 1 041 differentially expressed genes, of which 666 were up-regulated and 375 were down-regulated. According to the GO functional classification results, the up-regulated genes were mainly involved in ribosome production, oxidation-reduction and other functions, while the down-regulated genes were mainly involved in the synthesis of carbohydrate, glycoproteins, glycolipids and their metabolism, GPI anchor synthesis, and cytoskeleton and other functions. In addition, HG could significantly increase the level of reactive oxygen species (ROS), induce the fungal necrosis, block the cell cycle at the G0/G1 phase, and change the ultrastructure of the fungi, especially the structure of the fungal cell wall. Therefore, the enhanced inhibitory and fungicidal activity of HG may be related to the elevation of ROS, alteration of cellular ultrastructure (especially cell wall structure) and cell cycle arrest at the G0/G1 phase. Further optimization of its structure will provide a basis for the discovery of novel antifungal drugs or lead compounds.

**Key words:** anaplasticlymphoma kinase inhibitor; antifungal activity; biofilm; transcriptome sequencing; reactive oxygen species; cell wall

侵袭性真菌感染是威胁人类尤其是免疫缺陷患者或者是患有严重潜在疾病的住院患者生命健康的主要因素之一,给社会带来沉重的经济负担<sup>[1]</sup>。临床常见的可引起侵袭性感染的真菌主要为白念珠菌、烟曲霉菌和新生隐球菌,分别造成约 20%~40%、50%~90% 和 20%~70% 的死亡率<sup>[2,3]</sup>。目前,临床可选用的抗深部真菌感染药物数量比较有限,按照作用机制主要分为 4 类:抑制细胞膜麦角甾醇合成的三唑类如氟康唑、伊曲康唑、伏立康唑、泊沙康唑等;与细胞膜麦角甾醇结合增加细胞膜通透性的多烯类如两性霉素 B 及其类似物;抑制细胞壁  $\beta$ -1,3-葡聚糖合成的棘白菌素类如卡泊芬净、米卡芬净、阿尼芬净等;以及抑制核酸合成的 5-氟胞嘧啶<sup>[4,5]</sup>。各种耐药菌的出现、生物被膜的形成以及现有抗真菌药物的有限性和不良反应,使得治疗真菌感染尤其是侵袭性真菌感染愈发棘手,成为临床的一大难题<sup>[6-8]</sup>。因此,研发新结构类型、全新作用机制的抗真菌药物是解决该难题的策略之一。

本课题组前期研究通过对激酶化合物库筛选发现间变性淋巴瘤激酶 (anaplasticlymphoma kinase, ALK) 抑制剂 3-[5-氯-2-(2-甲氧基-4-[4-(4-甲基哌嗪-1-基)六氢吡啶-1-基]苯基)氨基]嘧啶-4-基]-1*H*-吡啶 (HG-14-10-04, HG) 表现出较好的体外抗真菌活性<sup>[9]</sup>。如图 1 所示,化合物 HG 对 ALK 和多种突变表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 表现强抑制作用,目前处于临床前研究阶段,主要用于抗肿瘤药



**Figure 1** Chemical structure of HG. EGFR: Epidermal growth factor receptor; ALK: Anaplasticlymphoma kinase

物研发<sup>[10,11]</sup>。为验证 ALK 抑制与抗真菌活性的相关性,本研究进一步筛选了 8 个 ALK 抑制剂的抗真菌作用,包括 NVP-TAE684、brigatinib、belizatinib、ASP3026、ALK-IN-1、MS4078、alectinib 及其盐酸盐类化合物,但在 64  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度下均未表现明显的抗真菌活性。本研究进一步通过同源性搜寻,未发现真菌中含有与 ALK 类似的基因。基于以上研究,本课题组认为化合物 HG 具有抗真菌活性的特异性,其抗真菌活性与其化学结构特征有关,而与 ALK 的抑制活性无关。为研究 HG 的抗真菌活性特点和作用机制,本文进一步通过微量液基稀释法、时间-杀菌曲线、菌丝形成、生物被膜形成等实验方法系统评价了 HG 的抗真菌和抑制真菌生物被膜形成活性,并采用转录组测序技术、流式细胞技术和透射电镜考察了该化合物的抗真菌作用机制。

## 材料与方法

**实验菌种和试剂** 白念珠菌 SC5314、临床分离的氟康唑 (fluconazole, FLC) 耐药白念珠菌 103、标准菌株光滑念珠菌 ATCC1182、近平滑念珠菌 ATCC22019、克柔念珠菌 ATCC2340、热带念珠菌 2718、新生隐球菌 32609 (光滑念珠菌和克柔念珠菌惠赠于安徽中医药大学汪长中教授, 其余菌株来自长海医院检验科和海军军医大学姜远英教授课题组)。化合物 HG (Chemstan 公司, CAS 号: 1356962-34-9); 氟康唑 (Sigma 公司); 两性霉素 B (上海毕得医药科技有限公司); 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒 (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); RPMI 1640 (Gibco 公司)。

**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); GP-9080 型隔水式培养箱、THZ-98C 型恒温振荡箱 (上海一恒科学仪器有限公司); Varioskan flash 全波长多功能读数仪 (赛默飞世尔科技有限公司); 流式细胞仪 (美国 Beckmen 公司); 透射电镜 JEM-1400 (日本日立公司)。

**微量液基稀释法**<sup>[12]</sup> 该实验依据的是美国临床实验室标准化委员会 (clinical and laboratory standards institute, CLSI) M27-A3 方案。将实验各菌株 35 或 37 °C, 200 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养 16 h, 然后用 RPMI 1640 培养基调整菌浓度至约 10<sup>3</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>, 吹打混匀。取无菌 96 孔板, 每排 1 号孔加 100 μL RPMI 1640 液体培养基作空白对照, 2~11 号加入配置好的菌液及受试药物, 且使得各孔的药物终浓度依次为 64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125 μg·mL<sup>-1</sup>。12 号孔只加菌液不加药物作阳性对照。35 或 37 °C 恒温培养, 培养 24 或 72 h 后进行观察记录, 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 μg·mL<sup>-1</sup> 记为“> 64 μg·mL<sup>-1</sup>”; 等于或低于最低浓度时均记为“≤ 0.125 μg·mL<sup>-1</sup>”。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。

**棋盘式微量液基稀释法**<sup>[13]</sup> 棋盘式微量稀释法是体外真菌药敏实验的延伸, 将两种药物一起作用于 96 孔板上, 以二维棋盘的纵横两个方向分别进行二倍的倍比稀释。实验菌株培养、浓度调整同上操作。取无菌 96 孔板, 每排 1 号孔作为空白对照, 加入 100 μL

RPMI 1640 液体培养基; 2~11 号加入配置好的菌液及两个受试药物, 使得横向各孔的两性霉素 B (amphotericin B, AmB) 终浓度依次为 16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.062 5、0.03 μg·mL<sup>-1</sup>; 而纵向各孔 HG 的终浓度依次为 8、4、2、1、0.5、0.25 μg·mL<sup>-1</sup>。12 号孔只加菌液不加药物作阳性对照。放入 35 或 37 °C 培养箱培养, 24 和 72 h 后进行观察记录。

药物联用的效果评价: 评价联合用药的两种药物相互作用方式的主要参数是部分抑菌浓度指数 (fractional inhibitory concentration index, FICI)。抑菌浓度分数 (FIC) 是每个药物联合抑菌时所需要 MIC 和单用时 MIC 的比值, FICI 是两种药物 FIC 之和。当 FICI ≤ 0.5 时相互作用是协同作用, FICI 越小, 协同作用越强; 0.5 < FICI ≤ 1 时为相加作用; 1 < FICI ≤ 4 时为无关作用; 而当 FICI > 4 时, 两药则为拮抗作用。

**时间-杀菌曲线测定** 挑取实验各菌株 35 °C、200 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养 16 h。离心收集菌体, 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤, RPMI 1640 培养基调整菌浓度至 1×10<sup>5</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>。将菌液分装, 加不同浓度的化合物, 振荡培养, 在 0、6、12、24 h 时间点, 从各玻璃管分别取样, 按照 10、100 和 1 000 倍等不同倍数稀释菌液, 取 100 μL 菌液涂铺于沙氏琼脂培养基 (Sabouraud's agar, SDA) 平板, 静置培养 48 h 后, 数克隆数并计算<sup>[12]</sup>。

**菌丝形成实验** 挑取白念珠菌克隆振荡培养 16 h。离心去上清, PBS 清洗 3 次。用培养基 RPMI 1640+10% 胎牛血清混匀, 调整菌液至 1×10<sup>6</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>, 取 1 mL 菌液于 6 孔板, 加药混匀, 37 °C 静置培养, 4 h 后观察并拍照。

**生物被膜形成检测** 挑取白念珠菌克隆振荡培养 16 h。离心收集菌体, PBS 洗涤, RPMI 1640 培养基调整菌液至 1×10<sup>6</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>。无菌 96 孔板 (美国 Corning 公司) 中加入菌悬液 100 μL, 37 °C 培养 90 min 后, PBS 清洗 3 次, 再加入 RPMI 1640 以及含药的培养基, 37 °C 培养 24 h 后, 弃上清液, PBS 清洗 3 次, 避光加入 150 μL XTT (0.5 mg·mL<sup>-1</sup>)/甲萘醌 (1 μmol·L<sup>-1</sup>) 混合溶液, 37 °C 避光静置孵育 3 h, 吸取 70 μL 上清液至新的普通 96 孔板中, 用 Varioskan flash 全波长多功能读数仪于 495 nm 处测吸光度值 (*A*)。成熟生物被膜的检测: 无菌 96 孔板 (美国 Corning 公司) 中加入菌悬液 100 μL, 37 °C 培养 90 min 后, PBS 洗 3 次, 再加入新鲜 PRMI 1640 培养基, 37 °C 培养 24 h 后, 再用 PBS 洗 3 次, 加入新鲜 PRMI 1640 以及含药的培养基, 后续操作同生物被膜形成检测<sup>[14]</sup>。生物被膜形成率 = 100% × (药物 *A*<sub>495 nm</sub> - 空白孔 *A*<sub>495 nm</sub>)/(未加药物 *A*<sub>495 nm</sub> - 空白

孔 $A_{495\text{ nm}}$ )<sup>[15]</sup>。

**转录组测序** 挑取白念珠菌克隆振荡培养 16 h。离心收集菌体, PBS 洗涤, RPMI 1640 培养基调整菌液至约  $5 \times 10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup>。加药 HG (MIC) 作用 6 h, 离心收集菌体, PBS 重复清洗 3 次, 菌沉淀加入液氮, 并干冰保存。送样至诺禾致源生物信息科技有限公司测序分析。转录组数据保存在 NCBI 的 GEO 基因表达的综合数据库中, 登录号为 GSE274242。

**细胞内活性氧实验** 挑取白念珠菌克隆振荡培养 16 h。离心收集菌体, PBS 洗涤, RPMI 1640 培养基调整菌液至约  $1 \times 10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup>。加药 HG 作用 6 h (35 °C、200 r·min<sup>-1</sup> 培养), 离心收集沉淀, PBS 清洗, 离心去上清, 按照细胞 ROS 检测试剂盒说明书操作, 加入探针 2, 7-二氯荧光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH2), 在 ROS 作用下 DCFH2 转化为具有绿色荧光的 2',7'-二氯荧光素 (2',7'-dichlorofluorescein, DCF), 荧光信号用流式细胞仪检测<sup>[16]</sup>。

**细胞凋亡实验** 挑取白念珠菌克隆振荡培养 16 h。离心, PBS 清洗, RPMI 1640 培养基调整菌液至约  $1 \times 10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup>。加 HG 后 35 °C、200 r·min<sup>-1</sup> 培养 6 或 16 h, 离心收集菌, PBS 清洗, 加入 2% 蜗牛酶 37 °C 孵育 1 h, 离心去上清, PBS 清洗, 按照细胞凋亡检测试剂盒说明书操作, 用流式细胞仪检测<sup>[17]</sup>。

**细胞周期实验** 挑取白念珠菌克隆振荡培养 16 h。离心收集菌体, PBS 洗涤, RPMI 1640 培养基调整菌液至约  $1 \times 10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup>。加 HG 后 35 °C、200 r·min<sup>-1</sup> 培养 12 h, 离心收集沉淀, PBS 清洗, 加入 2% 蜗牛酶 37 °C 孵育 1 h, 离心去上清, PBS 清洗, 按照细胞周期检测试剂盒说明书操作, 用流式细胞仪检测<sup>[17]</sup>。

**透射电镜实验** 挑取白念珠菌克隆振荡培养 16 h, 离心收集菌体, PBS 洗涤, RPMI 1640 培养基调整菌液至约  $1 \times 10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup>。加 HG 后, 35 °C、200 r·min<sup>-1</sup> 培养 12 h。离心收集菌体, PBS 清洗, 菌沉淀加固定液后置于 4 °C 冰箱, 漂洗, 再进行固定、漂洗、梯度脱水、包埋、切片、染色, 透射电镜观察拍照。

**统计学方法** 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行

数据处理和作图, 结果以  $\bar{x} \pm s$  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 HG 抗真菌活性研究

**1.1 HG 对真菌的生长抑制活性** 如表 1 所示, HG 对测试的 7 种真菌均具有生长抑制活性。其中 HG 对热带念珠菌 2718 的 MIC 值为  $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 对耐药白念珠菌 103、敏感白念珠菌 SC5314、新生隐球菌 32609、光滑念珠菌 ATCC1182、克柔念珠菌 ATCC2340 和近平滑念珠菌 ATCC22019 的 MIC 值为  $16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**Table 1** Minimal inhibit concentration (MIC) of HG against fungi. FLC: Fluconazole

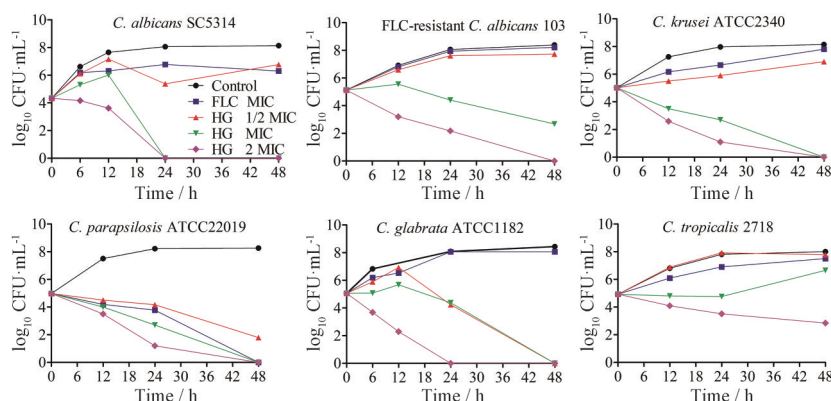
Strain	MIC/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	
	FLC	HG
<i>C. albicans</i> SC5314	0.5	16
FLC-resistant <i>C. albicans</i> 103	> 64	16
<i>C. neoformans</i> 32609	1	16
<i>C. krusei</i> ATCC2340	> 64	16
<i>C. parapsilosis</i> ATCC22019	2-4	16
<i>C. glabrata</i> ATCC1182	> 64	16
<i>C. tropicalis</i> 2718	> 64	8

由表 2 所示, 单用 AmB 和 HG 对热带念珠菌 2718 的 MIC 值分别为 1 和  $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 两药合用后, AmB 和 HG 对热带念珠菌 2718 的 MIC 值分别为 0.125 和  $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , FICI 值为 0.625, 提示两药合用对热带念珠菌 2718 表现为相加作用。对另外 6 株菌 (敏感白念珠菌 SC5314、耐药白念珠菌 103、克柔念珠菌 ATCC2340、新生隐球菌 32609、光滑念珠菌 ATCC1182 和近平滑念珠菌 ATCC22019), 单用 AmB 的 MIC 值范围为  $0.5 \sim 1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , HG 的 MIC 值范围为  $8 \sim 16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 两药联用后, AmB 和 HG 的 MIC 值分别降至  $0.0625 \sim 0.125$  和  $0.5 \sim 4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , FICI 值范围是 0.25~0.50, 均  $\leq 0.5$ , 这提示: HG 与 AmB 合用后, 对 6 株菌 (敏感白念珠菌和耐药白念珠菌、克柔念珠菌 ATCC2340、新生隐球菌 32609 和近平滑念珠菌 ATCC22019) 均具有协同作用。

如图 2 所示, 当浓度为 MIC 值 ( $8$  或  $16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的

**Table 2** Combination of HG and AmB against various fungi. AmB: Amphotericin B; FICI: Fractional inhibitory concentration index

Strain	Alone MIC/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$		Combination MIC/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$		FICI	Interaction
	AmB	HG	AmB	HG		
<i>C. albicans</i> SC5314	0.5	16	0.0625	4	0.25	Synergism
FLC-resistant <i>C. albicans</i> 103	0.5	16	0.125	4	0.5	Synergism
<i>C. krusei</i> ATCC2340	1	16	0.0625	4	0.313	Synergism
<i>C. neoformans</i> 32609	0.5	16	0.125	0.5	0.281	Synergism
<i>C. tropicalis</i> 2718	1	8	0.125	4	0.625	Addition
<i>C. glabrata</i> ATCC1182	0.5	16	0.0625	4	0.250	Synergism
<i>C. parapsilosis</i> ATCC22019	0.5	16	0.125	4	0.500	Synergism

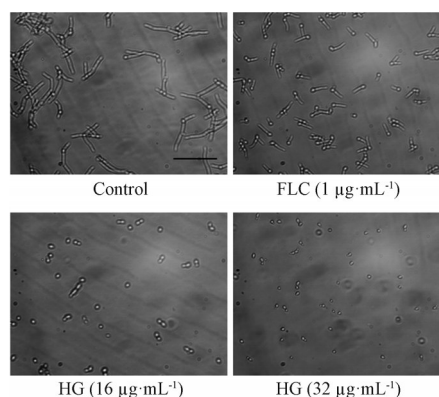


**Figure 2** Time killing curves of various fungi treated with or without different concentrations of HG or fluconazole (FLC)

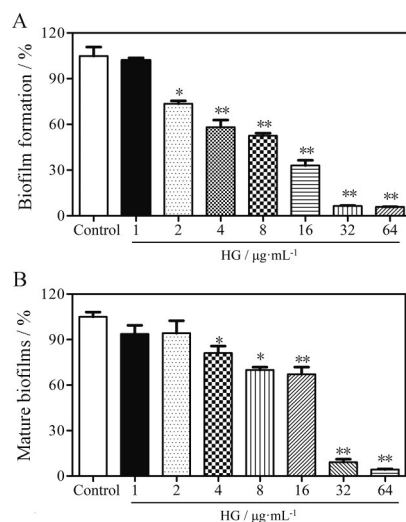
HG作用于多株真菌(敏感或耐药白念珠菌、光滑念珠菌 ATCC1182、热带念珠菌 2718、克柔念珠菌 ATCC2340、近平滑念珠菌 ATCC22019) 24 h 后, 其存活菌落数与不加药组相比均减少了超过  $1 \times 10^3$  CFU·mL<sup>-1</sup>, 尤其对敏感白念珠菌 SC5314, 未观察到存活菌落数, 提示在浓度为 MIC 值的 HG 对敏感或耐药白念珠菌、光滑念珠菌 ATCC1182、热带念珠菌 2718、克柔念珠菌 ATCC2340、近平滑念珠菌 ATCC22019 具有很强的杀真菌活性<sup>[18]</sup>。当浓度为 2 MIC 值下, HG 作用 48 h 后对测试的 6 株真菌表现更强的杀真菌活性, 除热带念珠菌 2718 外, 其余真菌未观察到存活菌落数。在较低浓度 (1/2 MIC) 下, HG 对近平滑念珠菌 ATCC22019 和光滑念珠菌 ATCC1182 仍表现杀真菌活性, 但对敏感或耐药白念珠菌、克柔念珠菌 ATCC2340 和热带念珠菌 2718 表现抑制真菌生长活性, 与氟康唑在 MIC 浓度下相当。以上结果表明, HG 在较高的浓度下表现明显的杀真菌活性, 在低浓度下表现抑制真菌活性。

**1.2 HG 对白念珠菌菌丝形成的影响** 如图 3 所示, 空白组的白念珠菌形成明显的菌丝, 氟康唑在 1 μg·mL<sup>-1</sup> 浓度下, 不能明显抑制菌丝的形成。而白念珠菌经 16 或 32 μg·mL<sup>-1</sup> HG 处理 4 h 后, 真菌细胞仍表现酵母形态, 且细胞体积随 HG 浓度增大而变小。该实验表明化合物 HG 能够明显抑制白念珠菌菌丝的形成。

**1.3 HG 对白念珠菌生物被膜的影响** 如图 4 所示, HG 能够抑制生物被膜的形成, 相较于空白对照组, HG 处理组的生物被膜形成率呈现剂量依赖性下降, HG 在浓度为 2 μg·mL<sup>-1</sup> 时, 形成率为 73.55% ± 3.21%, 浓度为 16 μg·mL<sup>-1</sup> 时, 形成率为 33.05% ± 5.82%; HG 能够破坏已经形成的生物被膜, 在浓度为 4 μg·mL<sup>-1</sup> 时, 成熟生物被膜百分率为 81.18% ± 7.89%, 浓度为 16 μg·mL<sup>-1</sup> 时, 成熟生物被膜百分率为 67.14% ± 8.21%, 与空白组相比均具有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。由此可知, HG 能



**Figure 3** Effect of HG on hyphal formation of *C. albicans* SC5314. Representative graphs of *C. albicans* SC5314 treated with or without different concentrations of HG or FLC for 4 h at 37 °C. Magnification: 400×. Scale bar = 50 μm

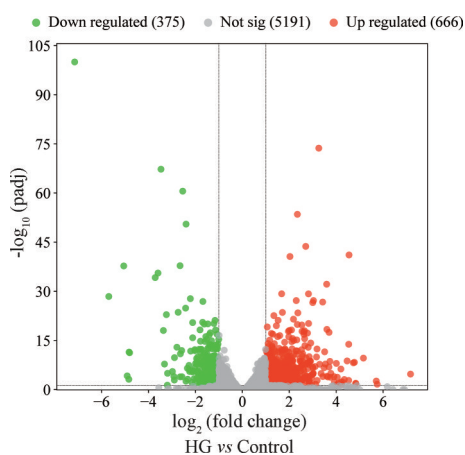


**Figure 4** Effect of HG on biofilm formation (A) or mature biofilm (B) of *C. albicans* SC5314. Biofilms were tested by the XTT reduction assay, and the anti-biofilm activities were evaluated by the percentage of viable cells treated with different drugs relative to the control.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control

明显抑制白念珠菌生物被膜的形成, 且能损伤成熟生物被膜。

## 2 HG 抗真菌机制研究

**2.1 HG 对白念珠菌基因表达的影响** 如图5所示, HG 作用于白念珠菌 6 h 后, 测序分析显示, 与空白组相比, 给药组差异表达基因共有 1 041 个, 其中上调的差异基因有 666 个, 下调的差异基因有 375 个。



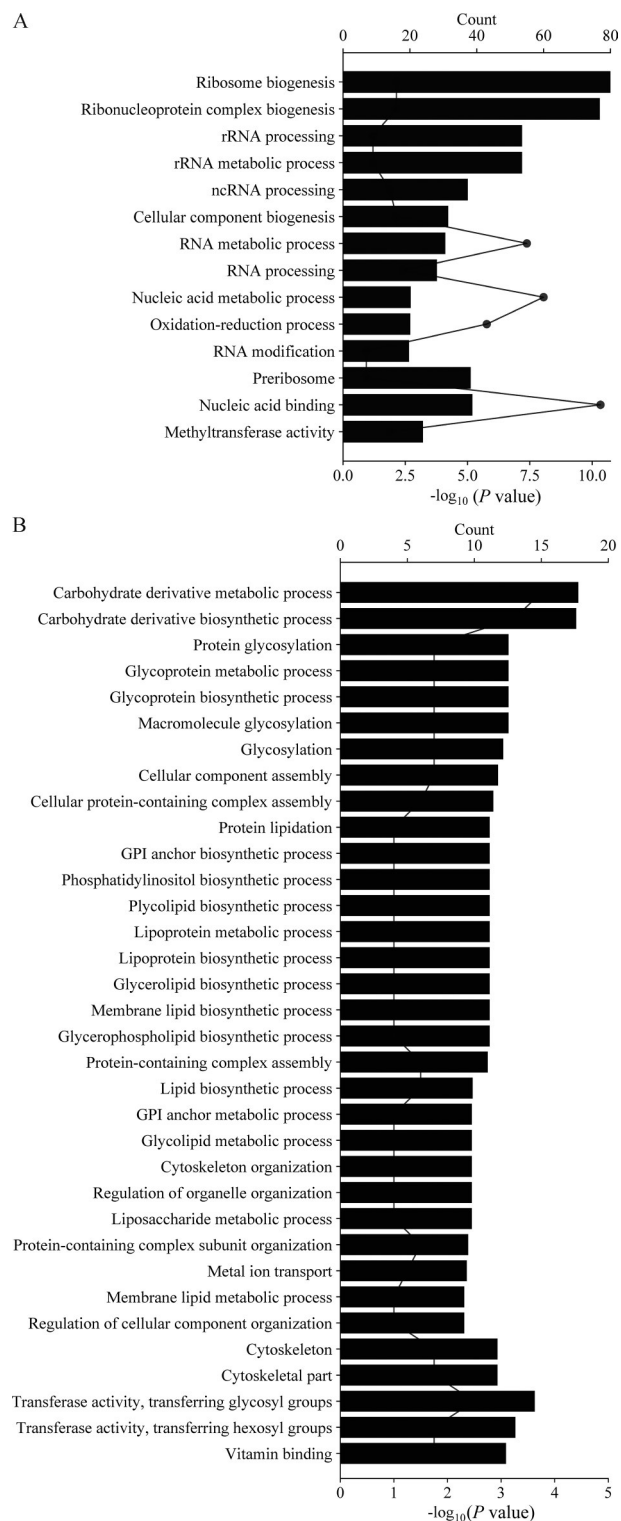
**Figure 5** Volcano plot of differentially expressed genes after  $16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  HG treatment on *C. albicans*, each dot represents a gene, red dots are up-regulated genes, green dots are down-regulated genes, and grey dots are undifferentiated genes

如图6所示, 根据GO功能分类结果显示: 上调基因主要涉及核糖体生成(如 *MPP10*、*NOPI*、*TSR1*、*UTP13*、*UTP21* 等基因)、氧化还原(如 *YHB1*、*FRE10*、*ALK2*、*GDH3* 等基因)等功能; 下调基因主要涉及糖类、糖蛋白、糖脂的合成及其代谢(如 *PMM1*、*MNN12*、*MNN1*、*KTR4*、*OST1*、*MNT1* 等基因)、糖基磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylinositol, GPI) 锚合成(如 *GPII* 基因)、细胞骨架(如 *ARC19*、*ARC18*、*ARC35* 等基因)等功能。

**2.2 HG 对白念珠菌细胞内 ROS 的影响** 如图7所示,  $16$  和  $32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  HG 分别作用于白念珠菌 6 h 后,  $44.5\% \pm 7.1\%$  和  $76.8\% \pm 1.6\%$  的细胞显示 DCF 荧光染色阳性, 与空白组相比呈显著性差异 ( $P < 0.05$ )。结果表明, HG 能够诱导白念珠菌细胞内 ROS 水平升高。

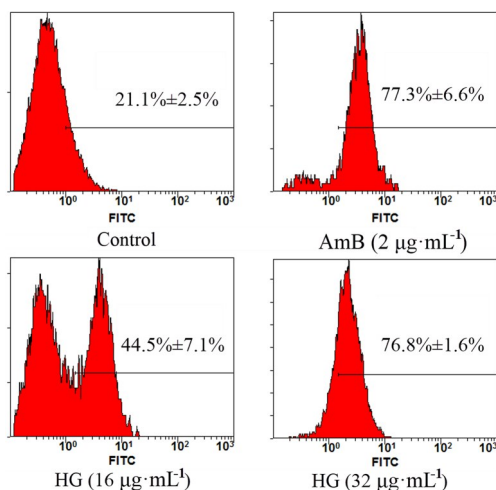
**2.3 HG 引起白念珠菌细胞凋亡** 由图8所示, 化合物HG作用白念珠菌 6 h 后, 能够诱导部分菌发生细胞凋亡, 在HG浓度为  $16$  和  $32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, 凋亡细胞(早期凋亡+晚期凋亡)比例分别为  $3.8\% \pm 2.2\%$  和  $8.1\% \pm 2.5\%$ 。

由图9所示, 化合物HG作用白念珠菌 16 h 后, 能够诱导菌发生细胞坏死, 且随着HG浓度的增大, 细胞坏死比例呈剂量依赖性增加。在HG浓度为  $8$ 、 $16$  和  $32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, 细胞坏死比例分别为  $30.1\% \pm 12.3\%$ 、 $78.3\% \pm 6.5\%$  和  $88.1\% \pm 7.2\%$ 。

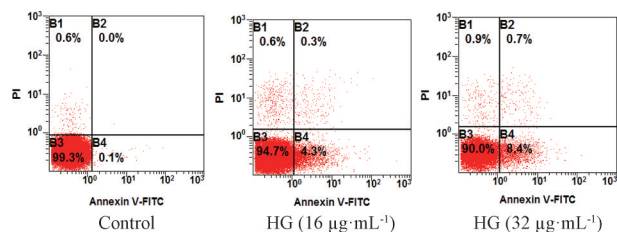


**Figure 6** GO-term analysis results showing the significant biological process terms for 1 041 specifically differentially expressed genes in response to the treatment with  $16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  HG for 6 h. A: Up-regulated biological processes; B: Down-regulated biological processes

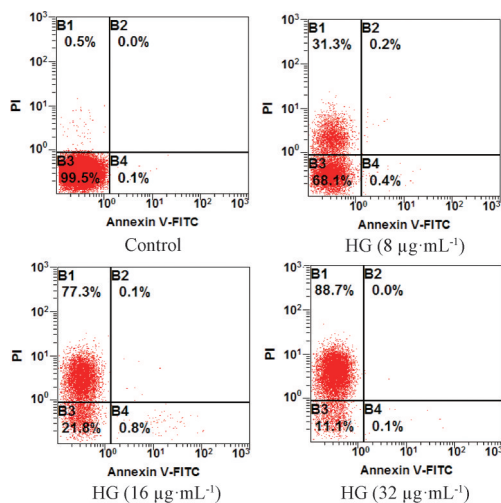
**2.4 HG 对白念珠菌细胞周期的影响** 由图10所示, 用不同浓度的HG ( $16$  或  $32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 作用白念珠菌后,



**Figure 7** Flow cytograms for the detection of intracellular reactive oxygen species (ROS) levels in *C. albicans* following treatment with AmB or HG for 6 h, using DCFH2

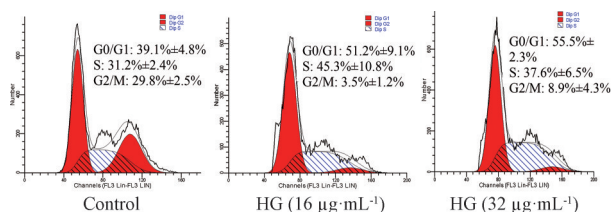


**Figure 8** Flow cytograms for the detection of cell apoptosis in *C. albicans* following treatment with HG for 6 h



**Figure 9** Flow cytograms for the detection of cell apoptosis in *C. albicans* following treatment with HG for 16 h

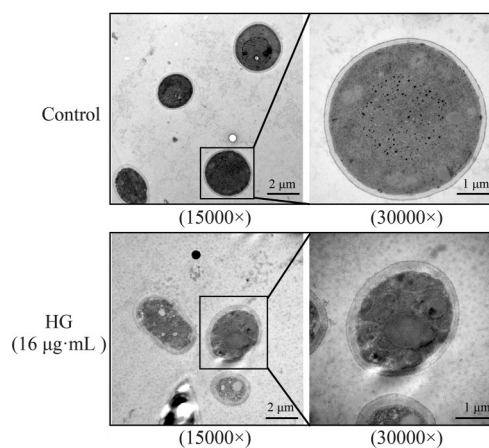
白念珠菌出现细胞周期阻滞在G0/G1期现象。空白组中白念珠菌细胞周期G0/G1期、S期和G2/M期的细胞百分率分别为39.1% ± 4.8%、31.2% ± 2.4%和29.8% ± 2.5%; 16 μg·mL<sup>-1</sup> HG处理组G0/G1期、S期和G2/M期的细胞百分率分别为51.2% ± 9.1%、45.3% ± 10.8%和3.5% ± 1.2%; 而32 μg·mL<sup>-1</sup> HG处理组的G0/G1期、



**Figure 10** Flow cytograms for the detection of cell cycle phase in *Candida albicans* following treatment with HG

S期和G2/M期的细胞百分率分别为55.5% ± 2.3%、37.6% ± 6.5%和8.9% ± 4.3%。

**2.5 HG对白念珠菌超微结构的影响** 如图11所示,空白组的白念珠菌细胞壁和细胞膜完整,细胞质染色较深。与空白组相比,经HG作用后白念珠菌细胞壁质地松散、变厚,细胞膜轮廓不清,细胞质密度下降,并见大的囊泡。结果表明,HG可影响白念珠菌的超微结构,尤其是细胞壁的完整性,提示HG的抗真菌作用可能与其影响真菌细胞壁的结构有关。



**Figure 11** Transmission electron micrographs of the effect of HG on the cell ultrastructures of *C. albicans*

### 讨论

为应对侵袭性真菌感染和日益严重的真菌耐药性,急需研发新结构类型和新作用机制的抗真菌药物。对此,本研究团队对激酶类化合物库进行了抗真菌活性筛选,发现ALK抑制剂HG表现较好的体外抗真菌活性。本文系统评价了化合物HG的抗真菌活性,并对其作用机制进行了初步研究。研究发现HG对多种真菌(敏感和耐药白念珠菌、克柔念珠菌、新生隐球菌、热带念珠菌、光滑念珠菌和近平滑念珠菌)表现出生长抑制或杀真菌作用,且能明显抑制白念珠菌菌丝和生物被膜的形成,并损伤成熟被膜。当HG与AmB联用时,表现出显著的协同抗真菌作用,明显降低了AmB的MIC值。初步的机制研究表明,HG能增

加细胞内 ROS 水平,诱导真菌细胞坏死,将细胞周期阻滞于 G0/G1 期,改变真菌细胞的超微结构,尤其是细胞壁结构。

作为真菌细胞的最外层,细胞壁不仅是真菌区别于哺乳动物细胞特有的结构,而且它在真菌的增殖、存活、酵母-菌丝形态转变、生物被膜形成、免疫逃逸、药物敏感性等过程均发挥了重要作用<sup>[19,20]</sup>。抑制细胞壁的合成或者改变其组成结构会影响真菌的存活、增殖以及致病能力,因此细胞壁一直被认为是开发安全、有效抗真菌药物的理想靶标。本研究中,HG 作用后的白念珠菌差异表达基因如 *PMM1*、*MNN12*、*MNN1*、*KTR4/MNT4*、*OST1*、*MNT1*、*GPII* 均明显下调,基因功能分析发现它们参与了细胞壁甘露糖合成以及蛋白的糖基化等过程。如 *PMM1* 基因编码磷酸甘露糖酶,催化 *N*-或者 *O*-连接甘露糖基化反应,该基因缺失的酿酒酵母菌在 37 °C 生长缺陷<sup>[21]</sup>。*MNN1*、*MNN12*、*KTR4*、*MNT4*、*MNT1* 基因编码甘露聚糖转移酶,参与细胞壁甘露聚糖蛋白合成。文献<sup>[22]</sup>报道 *MNT1* 基因缺失后,白念珠菌的致病力和毒力均明显减弱。*GPII* 基因编码 GPI 锚的合成,GPI 锚定蛋白是细胞壁的组成成分之一。与转录组学结果相符合的是,本文进一步通过透射电镜观察 HG 作用后的白念珠菌,发现细胞壁超微结构发生明显改变,中间层变厚。这提示 HG 可能通过作用细胞壁相关基因,影响细胞壁的正常结构而发挥抗真菌作用,包括抑制真菌生长、菌丝和生物被膜形成,破坏成熟生物被膜,杀灭真菌。

酵母-菌丝形态转变是白念珠菌的主要毒力特征之一。其菌丝形态在感染过程中起着关键作用,可以促进组织渗透、侵袭和逃离免疫细胞<sup>[23]</sup>。本研究发现,HG 作用后的白念珠菌差异表达基因如 *CDC19*、*ERG3* 等发生明显下调,功能分析发现它们发挥丙酮酸激酶和 5,6-甾醇去饱和酶活性,参与能量代谢和细胞膜麦角甾醇合成。文献<sup>[24,25]</sup>报道 *CDC19*、*ERG3* 基因功能缺失后,白念珠菌菌丝形成能力发生缺陷,体内毒力下降。本文通过菌丝形成实验也发现 HG 能明显抑制白念珠菌菌丝形成,其机制可能与下调 *CDC19*、*ERG3* 等基因相关。

此外,转录组学结果还发现 HG 作用后的白念珠菌差异表达基因如 *YHB1*、*FRE10*、*ALK2*、*GDH3* 等发生明显上调,功能分析发现它们参与氧化还原相关功能。如文献<sup>[26,27]</sup>报道,*YHB1* 编码 NO 双加氧酶,负责细胞内 NO 的清除和脱毒,抗真菌药物 AmB 能明显诱导白念珠菌 *YHB1* 的表达,而 AmB 也能明显升高细胞内 ROS。本文通过流式细胞术检测也发现 HG 作用后的白念珠菌细胞内 ROS 明显升高,这提示升高细胞内

ROS 水平可能是 HG 抗真菌的作用机制之一。此外,HG 与 AmB 联用后,表现出显著的协同抗真菌作用,这表明 HG 在应对 AmB 耐药性方面具有潜在的应用价值。

综上,HG 对多种真菌表现生长抑制或杀真菌作用,能明显抑制菌丝和生物被膜的形成,损伤成熟生物被膜,其作用机制可能与影响细胞壁、升高细胞内 ROS 有关。然而通过细胞毒性实验发现 HG 对人胚肾成纤维细胞 293T 的  $IC_{50}=2.55 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,因此后期将对其进行化学结构改造、构效关系探索、选择性提升、机制研究,有望发现新型抗真菌先导化合物或候选药物。

**作者贡献:** 刘伟、刘艳红、倪萍、张梦莎、马怡负责完成文中实验部分和数据处理;刘伟负责撰写文章和数据分析;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] Liu W, Yuan L, Wang S. Recent progress in the discovery of antifungal agents targeting the cell wall [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 12429-12459.
- [2] Spallone A, Schwartz IS. Emerging fungal infections [J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2021, 35: 261-277.
- [3] Larcher R, Platon L, Amalric M, et al. Emerging invasive fungal infections in critically ill patients: incidence, outcomes and prognosis factors, a case-control study [J]. *J Fungi (Basel)*, 2021, 7: 330.
- [4] Munzen ME, Goncalves Garcia AD, Martinez LR. An update on the global treatment of invasive fungal infections [J]. *Future Microbiol*, 2023, 18: 1095-1117.
- [5] Puumala E, Fallah S, Robbins N, et al. Advancements and challenges in antifungal therapeutic development [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2024, 37: e0014223.
- [6] Chakrabarti A, Patel AK, Soman R, et al. Overcoming clinical challenges in the management of invasive fungal infections in low- and middle-income countries (LMIC) [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2023, 21: 1057-1070.
- [7] Hon KLE, Chan VP, Leung AK, et al. Invasive fungal infections in critically ill children: epidemiology, risk factors and antifungal drugs [J]. *Drugs Context*, 2024, 13: 2023-9-2.
- [8] Procacci C, Marras L, Maurmo L, et al. Antifungal stewardship in invasive fungal infections, a systematic review [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2024. DOI: 10.1007/5584\_2024\_1798.
- [9] Liu W, Wang MM, Han YC, et al. Activities of 5-iodotubercidin against pathogenic fungi and its mode of actions [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 1024-1030.
- [10] Aquila B, Kamhi V, Peng B, et al. Preparation of substituted pyrimidinamines as ALK kinase inhibitors: US, 20120028924

- [P]. 2012-02-02.
- [11] Chen H, Lai M, Zhang T, et al. Conformational constrained 4-(1-sulfonyl-3-indolyl)-2-phenylaminopyrimidine derivatives as new fourth-generation epidermal growth factor receptor inhibitors targeting T790M/C797S mutations [J]. *J Med Chem*, 2022, 65: 6840-6858.
- [12] Liu W, Sun B, Yang M, et al. Antifungal activity of crude extract from the rhizome and root of *Smilacina japonica* A. Gray [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 5320203.
- [13] Quan H, Cao YY, Xu Z, et al. Potent *in vitro* synergism of fluconazole and berberine chloride against clinical isolates of *Candida albicans* resistant to fluconazole [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50: 1096-1099.
- [14] Manoharan RK, Lee JH, Kim YG, et al. Alizarin and chrysazin inhibit biofilm and hyphal formation by *Candida albicans* [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 447.
- [15] Katragkou A, McCarthy M, Alexander EL, et al. *In vitro* interactions between farnesol and fluconazole, amphotericin B or micafungin against *Candida albicans* biofilms [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70: 470-478.
- [16] Li DD, Chai D, Huang XW, et al. Potent *in vitro* synergism of fluconazole and osthole against fluconazole-resistant *Candida albicans* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61: e00436-00417.
- [17] Liang C, Zhang B, Cui L, et al. Mgm1 is required for maintenance of mitochondrial function and virulence in *Candida albicans* [J]. *Fungal Genet Biol*, 2018, 120: 42-52.
- [18] Roling EE, Klepser ME, Wasson A, et al. Antifungal activities of fluconazole, caspofungin (MK0991), and anidulafungin (LY 303366) alone and in combination against *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* via time-kill methods [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2002, 43: 13-17.
- [19] Latge JP. Tasting the fungal cell wall [J]. *Cell Microbiol*, 2010, 12: 863-872.
- [20] Hopke A, Brown AJP, Hall RA, et al. Dynamic fungal cell wall architecture in stress adaptation and immune evasion [J]. *Trends Microbiol*, 2018, 26: 284-295.
- [21] Smith DJ, Cooper M, DeTiani M, et al. The *Candida albicans* *PMM1* gene encoding phosphomannomutase complements a *Saccharomyces cerevisiae* sec 53-6 mutation [J]. *Curr Genet*, 1992, 22: 501-503.
- [22] Buurman ET, Westwater C, Hube B, et al. Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: 7670-7675.
- [23] Dalle F, Wächtler B, L'Ollivier C, et al. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes [J]. *Cell Microbiol*, 2010, 12: 248-271.
- [24] Chau AS, Gurnani M, Hawkinson R, et al. Inactivation of sterol delta5,6-desaturase attenuates virulence in *Candida albicans* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49: 3646-3651.
- [25] Uhl MA, Biery M, Craig N, et al. Haploinsufficiency-based large-scale forward genetic analysis of filamentous growth in the diploid human fungal pathogen *C. albicans* [J]. *EMBO J*, 2003, 22: 2668-2678.
- [26] Liu TT, Lee RE, Barker KS, et al. Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49: 2226-2236.
- [27] Ullmann BD, Myers H, Chiranand W, et al. Inducible defense mechanism against nitric oxide in *Candida albicans* [J]. *Eukaryot Cell*, 2004, 3: 715-723.