

抗真菌肽对真菌作用机制研究进展*

张杰 张双全**

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省分子医学生物技术重点实验室, 南京 210097)

摘要 20世纪90年代初, Iijima等从麻蝇幼虫血淋巴分离出一种具有抗真菌活性、能抑制 *C.albicans* 生长的蛋白质. 到目前为止, 已发现150多种肽具有抗真菌的特性, 随着被发现的抗真菌肽数目不断增多, 人们对抗真菌肽的抗真菌机理也进行了大量的研究, 抗真菌肽对真菌的作用方式主要有: 阻止、破坏真菌细胞壁的合成; 与膜作用, 在质膜上形成孔洞, 使重要的内容物外泄; 与真菌细胞内线粒体、核酸大分子等重要细胞器相互作用; 最终导致真菌的死亡.

关键词 抗真菌肽, 真菌, 作用机理

学科分类号 Q5

真菌是一个具有极大多样性的群体, 目前可培养大约有25 000种, 广泛地分布于各个生态系统中. 真菌几乎可以在所有的物体表面(皮肤、叶子等)上生长, 人类、动物和植物从出生的那一刻起就每时每刻地暴露于真菌中, 并作为它们生长的基质. 就目前所知, 有200种左右的真菌是致病菌. 在过去的几十年中, 由于致病菌对当前所使用的抗真菌药物的抗性不断提高, 以及一些抗真菌药物具有对人体的毒副作用, 能够用来治疗那些受真菌感染病人的药物很少, 随着免疫功能低下而被真菌感染的人群数量不断增加, 研制一种安全、有效的抗真菌药物就显得更加重要^[1,2]. 不同来源的抗真菌肽及一些人工合成的衍生物在临床治疗上有着极大的潜

力, 因此关于抗真菌肽对真菌作用机理的研究已迅速成为医药学领域的热点.

1 抗真菌肽的来源及其分类

抗真菌肽来源非常广泛, 昆虫、两栖类、哺乳类、细菌和真菌及植物体内都有分布, 具有代表性的抗真菌肽(表1~3)如: Cecropins、Drosomycin、ABP-CM4(昆虫类); Magainins、Dermaseptins、Buforins(两栖类); Defensions、Protegrins、Histatins(哺乳类); Ib-AMP₁、Ib-AMP₃等(植物类); Echinocandin B、Iturin A、Nikkomycins、Polyoxin D、Syringomycin E、HP(2-20)(细菌和真菌).

Table 1 Insect and amphibian antifungal peptides

表1 昆虫、两栖类抗真菌肽

| 肽 | 来源 | 氨基酸数目 | 作用方式 | 代表性作用真菌 |
|----------------|-----------------------|-------|-------|----------------------|
| Cecropins A | <i>H.cecropia</i> | 37 | 裂解 | <i>F.oxysporum</i> |
| Cecropins B | <i>H.cecropia</i> | 35 | 裂解 | <i>A.fumigatus</i> |
| Drosomycin | <i>D.melanogaster</i> | 44 | 裂解 | <i>F.oxysporum</i> |
| ABP-CM4 | <i>Bombyx mori</i> | 35 | 裂解 | <i>F.moniliforme</i> |
| Magainin 2 | <i>X.laavis</i> | 23 | 裂解 | <i>C.albicans</i> |
| Dermaseptins A | <i>P.sawagii</i> | 27 | 裂解 | <i>C.neoformans</i> |
| Dermaseptins B | <i>P.sawagii</i> | 34 | 裂解 | <i>C.neoformans</i> |
| Buforin I | <i>Bufo bufo</i> | 39 | 和核酸作用 | <i>C.albicans</i> |
| Buforin II | <i>Bufo bufo</i> | 21 | 和核酸作用 | <i>C.albicans</i> |

*国家自然科学基金资助项目(30271093). **通讯联系人.

Tel: 025-83598216, E-mail: zhangshuangquan@263.net 收稿日期: 2004-07-29, 接受日期: 2004-09-28

Table 2 Mammalian and plant antifungal peptides

表 2 哺乳类、植物类抗真菌肽

| 肽 | 来源 | 氨基酸数目 | 作用方式 | 代表性作用真菌 |
|--------------------------|------------------------|-------|------------|-------------------------------------------|
| Defensins NP-1~NP-5 | Rabbit granulocytes | 33~34 | 裂解 | <i>C.neoformans</i> <i>A.fumigatus</i> |
| Defensins HNP-1~HNP-3 | Human neutrophils | 29~30 | 裂解 | <i>C.neoformans</i> <i>C.albicans</i> |
| Protegrins1~3 | Human porcine | 16~18 | 裂解 | <i>C.albicans</i> |
| Histatin5 | Human salivary | 24 | ATP流出 | <i>C.albicans</i> |
| Ib-AMP ₃ | <i>I.balsamina</i> | 20 | 破坏 DNA 的合成 | <i>F.moniliforme</i> |
| Ib-AMP ₁ | <i>I.balsamina</i> | 20 | 破坏 DNA 的合成 | <i>C.albicans</i> |

Table 3 Bacterial and fungal antifungal peptides

表 3 细菌、真菌抗真菌肽

| 肽 | 来源 | 结构 | 作用方式 | 代表性作用真菌 |
|----------------|----------------------------|-----------------------|---------|---------------------|
| Echinocandin B | <i>A.nidulans</i> | Lipopeptide | 破坏葡聚糖合成 | <i>C.albicans</i> |
| Iturin A | <i>B.subtilis</i> | Lipopeptide | 裂解 | <i>S.cerevisiae</i> |
| Nikkomycin X | <i>Streptomyces tendae</i> | Peptide-nucleoside | 破坏几丁质合成 | <i>C.immitis</i> |
| Nikkomycin Z | <i>Streptomyces tenda</i> | Peptide-nucleoside | 破坏几丁质合成 | <i>C.immitis</i> |
| Polyoxin D | <i>S.cacaoi</i> | Trinucleoside peptide | 破坏几丁质合成 | <i>C.immitis</i> |
| Syringomycin E | <i>P.syringae</i> | Lipopeptide | 裂解 | <i>C.neoformans</i> |
| HP(2-20) | <i>H.pyloriI</i> | 19~38 | 裂解 | <i>C.albicans</i> |

抗真菌肽对真菌的作用机理有如下几种：a.抗真菌肽对真菌细胞壁的作用，抗真菌肽通过抑制细胞壁的重要组分葡聚糖及几丁质的合成，破坏病原菌细胞壁的合成，达到杀菌的作用，如 Echinocandins、Nikkomycin Z；b.抗真菌肽对真菌细胞膜的作用，抗真菌肽与膜作用，破坏脂膜，如 Cecropins、Magainins 和 Dermaseptins 等；c.抗真菌肽对真菌内细胞器（线粒体及核酸大分子）的作用，如 Histatins、Ib-AMP₁ 及 Buforins。

2 抗真菌肽对真菌细胞壁的作用

真菌的细胞壁保护细胞，抵抗外界恶劣的环境。真菌细胞壁的合成在菌丝的顶端，以一种复杂的排列顺序合成。如 *Neurospora crassa* 和 *C.albicans* 的细胞壁由几丁质、(1,3)-D-葡聚糖、(1,6)-葡聚糖、脂质组成，肽插入蛋白质的基质中，真菌的细胞壁受着明显的内压，当细胞壁受到轻微的破损，就可能导致真菌的裂解。哺乳类动物细胞没有细胞壁只有细胞膜，真菌的细胞壁合成作为药物作用靶

位是理想的筛选模型。

在各类真菌中，细胞壁中几丁质、葡聚糖及甘露聚糖三者的含量不同，如几丁质，在酵母中只有 2%，而在一些丝状真菌中达到 58%~61%。即使同一聚糖也有多种酶型，几丁质由几丁质合成酶 (Chs) 合成，有 3 种类型：Chs1、Chs2、Chs3，在 *C.albicans* 中，Chs2、Chs3 起主要作用，可作为抗真菌药物的作用靶点。Polyoxins 和 Nikkomycins 是研究较多的 Chs 的竞争性抑制物，作用于 Chs 的活性位点，在 *S.cerevisiae* 中对 Chs 的抑制强度：Chs3 > Chs1 > Chs2^[3]。Nikkomycin Z 能够抑制 *S.cerevisiae* 的 Chs1 和 Chs3，但不能抑制其 Chs2。Nikkomycin Z 能抑制 *C.albicans* 中的 Chs1、Chs2 及 Chs3。在抑制真菌生长的同时，可以观察到细胞壁中几丁质和隔膜的缺失、细胞裂解，最终导致真菌的死亡^[4]。Polyoxin D 由 *S.cacaoi* 产生，比 Nikkomycin Z 具有更强的杀 *S.cerevisiae* 活性^[5]。

Echinocandins 是(1,3)- β -葡聚糖合成酶的非竞争性抑制物，通过抑制葡聚糖的合成抑制真菌细胞

壁的合成, 现在主要有 3 种 Echinocandins: 卡泊芬净 (caspofungin), 米卡芬净 (micafungin) 和阿尼芬净 (anidulafungin), 都已经进入了临床三期试验^[6].

3 抗真菌肽对真菌细胞膜的作用

微生物细胞质膜是大多数线性、 α 螺旋肽作用的一个重要靶点. 线性肽由不同物种经过数百万年的进化形成, 虽然它们在氨基酸数目、疏水性、电荷分布等不同, 但它们都有相同的空间结构, 线性、正电荷, 在疏水环境中能形成 α 螺旋结构. 线性、 α 螺旋肽与膜作用有两种主要机制: 孔洞模型 (barrel-stave) 和毯式模型 (carpet). 当前许多研究更倾向于毯式模型.

孔洞模型 (barrel-stave) (图 1b) 是描述成束的两亲性 α 螺旋肽形成跨膜孔洞或通路的过程, 它们的疏水面和膜作用、亲水面向内产生孔洞; 成束的疏水性肽也可以有这种作用机制, 两亲性 α 螺旋并不是其必要条件. 其包括以下 4 个步骤: a. 单体以螺旋的方式结合到膜上; b. 在低浓度下, 结合于膜上单体分子之间的相互识别、聚集; c. 聚合体的插入形成孔洞; d. 更多的单体集合增加孔洞的大小, 内容物流出, 导致微生物的死亡. 由于这些肽是插入到靶膜的疏水核心区, 它们和靶膜的作用是通过疏水力相互作用的, 它们的净电荷为中性, 当它们结合到脂膜上, 并不考虑膜的电荷, 所以对病原菌及正常的细胞都有杀伤作用, 即具有溶血性.

毯式模型 (carpet) (图 1a) 是首先用来解释 dermaseptins 杀菌的作用方式, 后来也被用来描述其他的 α 螺旋肽, 如来源于古惜比天蚕的 Cecropins、来源于蛙的 Magainins 和 Dermaseptins 等; 毯式模型描述 α 螺旋肽结合到作用膜的表面, 像毯一样覆盖一部分或全部膜. 只有当 α 螺旋肽达到一定的浓度才会渗透膜, 和孔洞模型不同, α 螺旋肽不插到膜疏水区, 而是结合到膜磷脂头部, 主要有以下 4 个步骤: a. 正电荷 α 螺旋肽单体与负电荷磷脂相结合; b. 全部 α 螺旋肽单体覆盖于膜的表面, 带正电荷氨基酸与带负电荷的磷脂头或水分子得以充分结合; c. 分子的旋转导致疏水残基向膜疏水中心的重新定位; d. 破坏双层膜, 形成胶束, 进行脂膜裂解. 该模型所产生的孔称为螺旋管形孔洞, 有别于孔洞模型中所产生的孔洞^[7-9].

Magainin 2 是由非洲爪蛙 *Xenopus laevis* 的皮肤分泌产生, 对 *C. albicans* 有很强的杀伤作用, 但

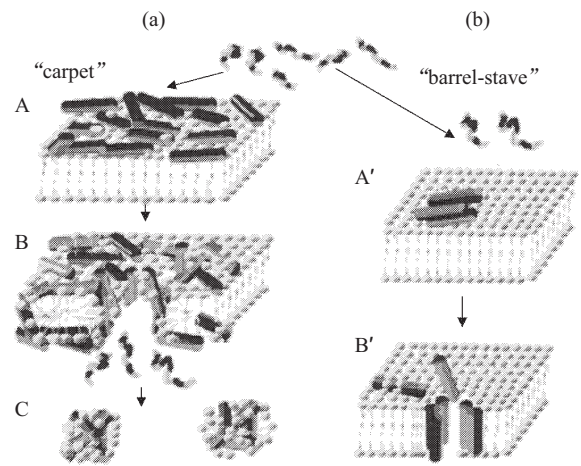


Fig.1 Barrel-stave and Carpet^[8]

图 1 毯式模型和孔洞模型^[8]

(a) 毯式模型中, 肽结合到细胞膜表面, 疏水侧向着膜, 亲水侧向着介质(A), 当肽单体达到一定浓度时, 形成聚合体, 插入膜, 孔洞形成(B), 膜被破坏(C); (b) 孔洞模型中, 肽首先覆盖在膜的表面(A'), 接着插到膜脂中, 更多的单体肽插入, 孔径越来越大, 膜被破坏(B').

不具有溶血性. Ludtke 等^[10]发现 Magainin 2 和膜磷脂头部结合, 作用形成螺旋管形的孔洞. Huang 等^[11]提出了 2 种状态 (two-state) 的模型: 在低 Magainin 2 和脂分子的比例 (P/L) 下, 称为 “S” 态, 肽平行于膜表面, 处于没有活力的状态; 当 P/L 达到一定的域值时, 称为 “I” 态, 肽垂直于膜上, 与磷脂头部相互作用, 形成超分子复合物孔, 导致离子等的流出, 离子的流出降低了质子梯度, 破坏了膜的极性, 阻止了 ATP 的产生及细胞的代谢, 进而导致细胞的死亡. Gallucci 等^[12]发现麦角固醇很可能是 Magainin 2 作用于真菌膜的一个靶点, 在膜缺少磷脂头时, 通过与膜中的酰基链和胆固醇相互作用也可形成通道.

4 抗真菌肽对真菌内细胞器的作用

Histatin5 是人类唾液中的一种阳离子肽, 富含组氨酸, 具有很强的抗真菌活性. 对 *C. albicans* 有很强的杀伤作用. Helmerhorst 等^[13, 14]研究发现其作用机制和典型的孔道形成作用机制不同, 对真菌膜没有亲和力, 不破坏膜质膜; Histatin5 通过真菌细胞膜上的受体或跨膜电势进入细胞内, 与线粒体作用, 在细胞不裂解的情况下导致 ATP 的外流, 释放的 ATP 作为一种细胞溶解的介质, 与细胞表面上推定的嘌呤受体结合^[15], 抑制线粒体的呼吸, 引

起 reactive oxygen species (ROS) 的产生,引发细胞的死亡. Helmerhorst 等^[16]在实验结果基础上,假设了一种 Histatin5 诱使的、真菌细胞自身介导的细胞凋亡机制,其中 ROS 的产生是关键(图 2). 整个假

设包括以下几步: Histatin5 的摄入(通过膜表面受体或跨膜电势); Histatin5 结合于线粒体; 抑制线粒体的呼吸; ROS 的产生; 生物大分子的氧化和细胞完整性丧失导致细胞的死亡.

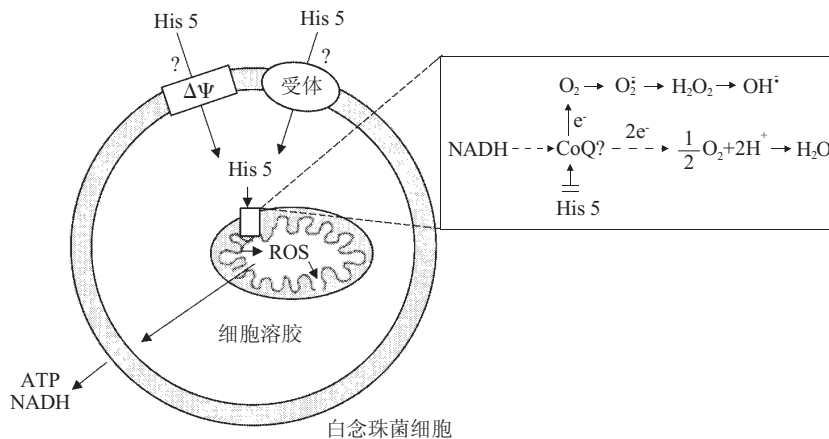


Fig.2 Mechanistic model for the fungicidal activity of histatin5^[16]

图 2 Histatin5 杀真菌过程模型^[16]

通过与细胞膜表面非特异性受体结合或在跨膜电势的推动下,进入 *C.albicans* 内部,结合到线粒体上,抑制其呼吸,可能作用于 CoQ,导致 ROS 的产生;磷脂和生物大分子的氧化导致线粒体膜破坏,质膜破坏,各种核苷酸的流出,细胞死亡.

Ib-AMP₁ 来源于 *Impatiens balsamina*, 富含半胱氨酸,对 *C.albicans* 有很强的杀伤作用. Lee 等^[17]通过激光共聚焦观察发现 Ib-AMP₁ 进入 *C.albicans* 内部直接作用,破坏 DNA 的合成,杀死真菌.

Buforins 是一类来源于 *Bufo bufo garagrizans* 胃组织的一类肽,有 buforin I 和 buforin II 两种. buforin I 含 39 个氨基酸, buforin II 是由 buforin I 产生的, 21 个氨基酸,具有比 buforin I 更强的抗菌活性, buforin II 与核酸有很强的亲和力,其作用靶点是核酸而不是核膜,与核酸结合抑制细胞的功能,导致细胞的死亡^[18-20].

5 抗真菌肽的应用前景与展望

在农业生产上,因抗真菌肽对动植物病原菌有明显抑杀作用,转基因动植物的研究可以对农牧业生产及生物防治和抗菌品种的选育起到一定的指导作用. 现在基因编码的许多抗真菌肽正被农业综合产业用来产生遗传基因修改的植物,能够增加其对真菌抵抗能力. Gao 等^[21]将 alfAFP 转进马铃薯中,在温室和田间对 *V.dahliae* 均表现出很强的抗菌活性. 同时,抗真菌肽及其衍生物正被用来作为治疗人类、动物真菌病的药物,和当前使用的杀菌药物

(抗生素)的作用机理不同,抗真菌肽容易被降解,不易在微生物体内富集,致病菌不易对其产生耐药性,一些来源于真菌的抗真菌肽具有很强的抗真菌特性,但抗真菌肽作为药物也有许多不利因素(有溶血现象,水溶性差等). 通过提高它们的抗真菌特性,减少不利因素,所获得的许多衍生物已处于临床实验阶段,如:从 Echinocandins 衍生出来的 VER-002 (LY303366)、FK463 和 caspofungin (MK-0991)等^[22]. 可以预见,一类新型的抗真菌肽类药物不久将进入临床应用.

参 考 文 献

- 1 Selitrennikoff C P. Antifungal proteins. Applied and Environmental Microbiology, 2001, **67** (7): 2883-2894
- 2 de Lucca A J, Walsh T J. Antifungal peptides: Novel therapeutic compounds against emerging pathogens. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999, **43** (1): 1-11
- 3 Ruiz-Herrera J, San-Blas G. Chitin synthesis as a target for antifungal drugs. Current Drug Targets-Infectious Disorders, 2003, **3**: 77-91
- 4 Kim M K, Park H S, Kim C H, et al. Inhibitory effect of nikkomycin Z on chitin synthases in *Candida albicans*. Yeast, 2002, **19** (4): 341-349
- 5 Sobottka I, Bartscht K, Schafer P, et al. In vitro activity of polyoxin

- D and nikkomycin Z against *Encephalitozoon cuniculi*. Parasitol Res, 2002, **88** (5): 451~453
- 6 Wiederhold N P, Lewis R E. The echinocandin antifungals: an overview of the pharmacology, spectrum and clinical efficacy. Expert Opinion, 2003, **12** (8): 1313~1333
- 7 Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipids bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. Biochim Biophys Acta, 1999, **1462**: 55~70
- 8 Shai Y, Oren Z. From "carpet" mechanism to de-novo designed diastereomeric cell selective antimicrobial peptides. Peptides, 2001, **22** (10): 1629~1641
- 9 Papo N, Shai Y. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes?. Peptides, 2003, **24** (11): 1693~1703
- 10 Ludtke S J, He Ke, Heller W T, *et al.* Membrane pores induced by magainin. Biochemistry, 1996, **35** (43): 13723~13728
- 11 Huang H W. Action of antimicrobial peptides: Two-state model. Biochemistry, 2000, **39** (29): 8347~8352
- 12 Gallucci E, Meleleo D, Micelli S, *et al.* Magainin 2 channel formation in planar lipid membranes: the role of lipid polar groups and ergosterol. Eur Biophys J, 2003, **32** (1): 22~32
- 13 Helmerhorst E J, Breeuwer P, Hof W V, *et al.* The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the ENERGIZED mitochondrion. J Biol Chem, 1999, **274** (11): 7286~7291
- 14 Helmerhorst E J, Hof W V, Breeuwer P, *et al.* Characterization of histatin 5 with respect to amphipathicity, hydrophobicity, and effects on cell and mitochondrial membrane integrity excludes a candidacidal mechanism of pore formation. J Biol Chem, 2001, **276** (8): 5643~5649
- 15 Koshlukova S E, Lloyd T L, Araujo M W, *et al.* Salivary histatin 5 induces non-lytic release of ATP from *Candida albicans* leading to cell death. J Biol Chem, 1999, **274** (27): 18872~18879
- 16 Helmerhorst E J, Troxler R F, Oppenheim F G. The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, **98** (25): 14637~14642
- 17 Lee D G, Shin S Y, Kim D H, *et al.* Antifungal mechanism of a cysteine-rich antimicrobial peptide, Ib-AMP1, from *Impatiens balsamina* against *Candida albicans*. Biotechnol Lett, 1999, **21** (12): 1047~1050
- 18 Park C B, Kim M S, Kim S C. A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo gargarizans*. Biochem Biophys Res Commun, 1996, **218** (1): 408~413
- 19 Park C B, Yi K S, Matsuzaki K, *et al.* Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: The proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, **97** (15): 8245~8250
- 20 Kobayashi S, Takeshima K, Park C B, *et al.* Interactions of the novel antimicrobial peptide buforin 2 with lipid bilayers: proline as a translocation promoting factor. Biochemistry, 2000, **39** (29): 8645~8654
- 21 Gao A G, Hakimi S M, Mittanck C A, *et al.* Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. Nat Biotechnol, 2000, **18** (12): 1307~1310
- 22 De Lucca A J, Walsh T J. Antifungal peptides: origin, activity, and therapeutic potential. Rev Iberoam Micol, 2000, **17**: 116~120

Advance in The Research of The Function of Antifungal Peptides Against Fungus*

ZHANG Jie, ZHANG Shuang-Quan**

(Jiangsu Province Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology,
Life Sciences College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract In the early 1990's, Iijima *et al.* separated a protein, which has the activity of antifungal to suppress the growth of *C. albicans*, from the hemp musca larva blood lymph. So far, more than 150 kinds of peptides which are characteristic of antifungal have been discovered. With the number of antifungal peptides discovered increasing, researchers have been studying the mechanism of antifungal peptides. The way the antifungal peptides function is mainly as follows: preventing and damaging the synthesis of cell wall; interacting with the membrane to form pores; causing the important inclusions to release; interacting with the important organelles such as mitochondrion and nucleic acid macromolecules in the fungi cell, leading to the death.

Key words antifungal peptides, fungus, mechanism

*This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30271093).

**Corresponding author . Tel: 86-25-83598216, E-mail: zhangshuangquan@263.net

Received: June 29, 2004 Accepted: September 28, 2004