

白念珠菌凋亡诱导研究进展

施高翔 严园园 邵菁 汪天明 汪长中*

(安徽中医学院 中西医结合临床学院 安徽 合肥 230038)

摘要:近年来,白念珠菌为主的真菌感染病例日渐增多,新型抗真菌药物研发成为热点。在原有抗真菌机制的基础上,通过诱导凋亡抗真菌成为目前探寻抗真菌药物作用机制的一个新趋向。本文对目前国内外关于药物诱导白念珠菌凋亡研究做一综述。

关键词:白念珠菌, 凋亡, 药物诱导

Advances in apoptosis induction in *Candida albicans*

SHI Gao-Xiang YAN Yuan-Yuan SHAO Jing WANG Tian-Ming WANG Chang-Zhong*

(School of Integrated Traditional Chinese & Western Medicine, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230038, China)

Abstract: In recent years, fungal infections caused by *Candida albicans* are increasing, and the development of novel antifungal drugs becomes a hotspot. On basis of antifungal mechanism, the induction of fungus apoptosis has become a new trend for the search of antifungal agents. In this paper, we review comprehensively the drug-induced apoptosis in *C. albicans*.

Keywords: *Candida albicans*, Apoptosis, Drug induction

近年来,随着广谱抗生素、免疫抑制剂的大量应用以及艾滋病人的不断增多,白念珠菌作为条件致病性真菌所引起的机会性感染病例日益增多。在院内获得性感染中,由念珠菌所引起的占第4位,其致死率达40%,其中尤以白念珠菌感染率最高,在机体免疫功能低下者,白念珠菌可导致严重甚至是致死性的系统性感染^[1]。尽管目前临床上常见的抗真菌药物对大多数白念珠菌有抑制或杀灭作用,但因抗真菌药物的不规范使用、白念珠菌产生生物膜等原因,白念珠菌严重的耐药性日益凸显,加之传统抗真菌药物对肝肾等脏器往往具有较强的毒

副作用,因此能否找到新型有效抗白念珠菌方法成为近年来抗真菌药物研发热点之一。目前,通过药物诱导凋亡成为抗白念珠菌的一个重要方向,本文着重就当前国内外关于药物等多种因素诱导白念珠菌凋亡研究做一综述。

1 凋亡

凋亡(Apoptosis)是真核生物在一定生长发育阶段必然经历的一种有系列酶参与的、高度有序的、受到特定基因精密调控的程序性死亡过程,与多种生命过程密切相关,对于维持细胞的动态平

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81073127); 安徽省自然科学基金项目(No. 090413092); 安徽省高校省级自然科学研究重点项目(No. KJ2010A220)

*通讯作者: Tel: 86-551-65169204; 邮箱: ahwcz63@sina.com

收稿日期: 2013-04-09; 接受日期: 2013-05-16; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-07-09

衡、消除受损伤的细胞等过程有重要作用^[2]。近年来发现,白念珠菌与其他真核细胞如哺乳类细胞等一样,在一定环境刺激或药物作用下,也发生凋亡现象,引发细胞活性氧(ROS)累积、Caspase 酶激活、线粒体膜电位改变、核固缩或裂解、膜磷脂酰丝氨酸(PS)外翻等典型凋亡特征的变化^[3]。

2 诱导白念珠菌凋亡的因素

国内外学者从环境刺激、人工合成化合物、天然产物到机体组成成分等各种因素对白念珠菌凋亡诱导进行了一系列研究。

2.1 乙酸与 H₂O₂ 的诱导

2003 年,Phillips A. J.等^[4]将乙酸与 H₂O₂ 作为诱导白念珠菌凋亡的环境刺激因素,探讨一定剂量的 H₂O₂ 与乙酸对白念珠菌凋亡影响,分别以 0–120 mmol/L 乙酸和 0–50 mmol/L H₂O₂ 处理细胞 200 min, 结果发现, 40–60 mmol/L 乙酸和 5–10 mmol/L H₂O₂ 对细胞造成胞膜 PS 外翻、DNA 碎裂、ROS 水平提高等典型的凋亡征象。但当乙酸和 H₂O₂ 分别超过 60 和 10 mmol/L 时,凋亡减少,而坏死增多。表明诱导剂量超出一定阈值则会由凋亡转为坏死占优势,效应呈剂量依赖性。在国内杨丞喆等^[5]的研究中,以 30–150 mmol/L 乙酸处理细胞时,120 mmol/L 乙酸所致的凋亡率最高,早、晚期凋亡率分别为 67.11% 和 14.43%, 不同于 Phillips A. J. 等凋亡诱导实验中乙酸的最佳浓度 (60 mmol/L), 推测可能是各自实验中不同遗传背景的菌株所构成的差异。乙酸与 H₂O₂ 现成为诱导白念珠菌凋亡的模式刺激,也常作为此类凋亡研究中的阳性对照。

2.2 抗真菌抗生素诱导白念珠菌凋亡

多烯类抗生素两性霉素 B (Amphotericin B, AmB) 通过与真菌细胞膜上的麦角固醇结合,造成膜通透性增加、胞内容物外漏而导致真菌死亡。Phillips A. J. 等^[4]在研究 H₂O₂ 与乙酸对白念珠菌凋亡影响的同时还考察了 AmB 对白念珠菌的凋亡诱导作用,单细胞荧光细胞毒性试验发现,8 mg/L

的 AmB 能引起 57% 细胞内 ROS 产生增多、染色质凝集等凋亡特征,而 16 mg/L 的 AmB 则引起大多数细胞坏死,出现超微结构改变和胞内 ROS 水平降低的变化,即表明 AmB 同乙酸与 H₂O₂ 一样,诱导凋亡和坏死存在效应的剂量依赖关系。

Al-Dhaheri R. S. 等^[6]观察了 AmB 对生物膜状态下的白念珠菌凋亡的影响。50 mg/L 的 AmB 处理生物膜细胞 24 h 后,用以检测 Caspase 酶活性的 SR-FLICA 荧光所着色的生物膜细胞达 93%,被 D₂R (二门冬酰胺-罗丹明 110, Caspase 的一种底物) 着色的细胞高至 96%。加入 2.5 mmol/L 的泛 Caspase 抑制物 Z-VAD-FMK 后能提高细胞存活数 11.5 倍。Caspase-1, -2, -3, -5, -6, -8 和 -9 的特异性抑制剂本身并不影响生物膜细胞活力,但当与 AmB 共同作用于生物膜时,其中 Caspase-1, -2, -3, -5 和 -9 抑制剂能显著提高生物膜细胞存活数;组蛋白去乙酰化酶(Histone deacetylase, HDAC)抑制剂能增强 AmB 对生物膜细胞的作用,其中的丁酸钠或丙戊酸钠与 AmB 联用则可完全清除生物膜细胞。Phillips A. J. 和 Al-Dhaheri R. S. 的这两项研究表明,AmB 对白念珠菌,无论是游离菌还是生物膜状态,均可诱导凋亡。

卡泊芬净(Caspofungin, CAS)是 2001 年美国批准的第一个棘白菌素类抗真菌药,CAS 通过抑制细胞壁(1,3)- β -D-葡聚糖合成而导致细胞坏死的方式杀死白念珠菌。Hao 等^[7]对 CAS 能否诱导白念珠菌凋亡也进行了研究,当白念珠菌标准株 SC5314 分别以 1/2、1、4 MIC 的 CAS 干预 3 h 时,3 个浓度的 CAS 均可引起早期和晚期凋亡率的显著提高。另外证实,1/2、1 MIC 的 CAS 即可引起细胞内 ROS 升高、线粒体膜电位降低、DNA 损伤、染色质凝固、Metacaspase (存在于白念珠菌中的 Caspase 同系物)酶活化等典型凋亡征象的出现,表明亚抑菌浓度(1/2 MIC)的 CAS 即虽不足以直接引起白念珠菌坏死但可通过诱导凋亡而发挥其抗真菌作用。

咪康唑通过抑制细胞色素 P450 酶活性, 影响麦角固醇合成通路而发挥抗真菌作用。Vandenbosch D.等^[8]观察了咪康唑对白念珠菌产生 ROS 及凋亡的影响。结果, 5 $\mu\text{mol/L}$ 的咪康唑对白念珠菌生物膜所产生的 ROS 释放有明显促进作用, 10 株白念珠菌中有 3 株 ROS 的升高甚至超过对照 100 倍。但在针对 SC5314 标准株的游离菌与生物膜的凋亡实验中, 却未观察到明显的咪康唑所引起的细胞凋亡, 而是发现大多数细胞出现坏死, 表明 ROS 累积并非咪康唑发挥杀菌活性的唯一机制, 可能尚有其他机制存在。

2.3 蛋白激酶抑制剂诱导白念珠菌凋亡

星状孢子素(Staurosporine, STS)是链霉菌产生的一种生物碱, 为蛋白激酶抑制剂, 可通过线粒体途径诱导凋亡, STS 及其衍生物已用于肿瘤治疗^[9]。鱼藤酮(Rotenone)主要存在于苦楝藤属植物鱼藤的根皮部, 是线粒体复合酶 I 抑制剂, 也具有诱导凋亡作用, 对人畜毒性低, 被广泛用作杀虫剂^[10]。Ana Castro 等^[11]尝试将 STS 与鱼藤酮联合用于抗真菌活性研究, 以 15 $\mu\text{mol/L}$ 的 STS 与 100 mg/L 的鱼藤酮联用, 对粗糙脉孢菌和白念珠菌等真菌发挥协同抗菌效应, 造成胞内谷胱甘肽耗竭和 ROS 产生增多等而介导菌细胞凋亡。

2.4 生物体蛋白诱导白念珠菌凋亡

自从 1980 年在美国天蚕体内发现第一个动物来源的抗菌肽以来, 有关抗菌肽的研究引起了学者们的极大兴趣。抗菌肽一般是含 11–50 个氨基酸残基的带正电荷的小分子多肽, 具有抗菌抗肿瘤等活性^[12]。Coprinsin 是一种分离自蜚螂的防御素样多肽, Lee 等^[13]研究了 Coprinsin 抗真菌作用及机制, 以 1、2 MIC 的 Coprinsin 处理白念珠菌细胞, 所致线粒体膜电位分别降低 2.17%和 41.10%, 早期凋亡率分别是 24.17%和 28.76%。同时证实 Coprinsin 可以增加胞内 ROS 水平, 导致线粒体膜电位降低、细胞色素 C 释放和 Caspase 酶的活化。且细胞毒实验 Coprinsin 没有溶血副作用, 表明其几乎无毒性。

蜂毒肽(Melittin)是蜜蜂毒腺分泌的蜂毒中的一种广谱抗菌肽, 具有抗菌、抗肿瘤、抗 HIV 等多种生物学功能^[14]。Park C.等^[15]将 1 MIC 的蜂毒肽作用于白念珠菌 2.5 h, 结果有 7.8%菌细胞呈 DHR-123 阳性, 提示出现胞内 ROS 累积; 当菌细胞以 1/2 MIC 的蜂毒肽处理时, 12%细胞呈 Annexin V 阳性和 PI 阴性, 而当以 1 MIC 处理时, 则导致 40.2%细胞呈 PI 阳性, 当以 2 MIC 处理时, PI 阳性细胞更是达到 76%。表明在亚抑菌浓度(1/2 MIC)下, 细胞主要呈现凋亡效应, 而当药物浓度达到或超过 MIC 时, 以 PI 阳性所标志的细胞坏死占主导地位。可见, 药物所致凋亡或坏死与用药浓度密切相关。

植物防御素是一类分子量小、呈碱性、富含半胱氨酸的短肽, 是植物固有免疫的基本组分之一, 具有广谱抗菌活性^[16]。HsAFP1 是从植物珊瑚钟(*Heuchera sanguinea*)种子中分离的一种植物防御素, 能抑制白念珠菌、克柔念珠菌、黄曲霉等真菌^[17]。Aerts 等^[17]以 5 mg/L 的 HsAFP1 处理白念珠菌 2.5 h, 结果细胞内 ROS 水平、DNA 片段化水平、Annexin V 与 PI 双染所显示的早、晚期凋亡率均明显升高。鉴于其高效的抗真菌活性及对人体无毒, 有望开发为新型的抗真菌药物。

乳铁蛋白(Lactoferrin)是存在于血液、唾液、泪液等体液中的一种铁螯合蛋白, 不仅参与免疫调节, 还具有抗菌功能^[18]。人类乳铁蛋白(Human lactoferrin, hLf)可以诱导白念珠菌细胞产生类似细胞凋亡的特征, 包括 PS 外翻、核染色质凝集、DNA 降解和 ROS 产生增加等。Andrés M. T.等^[19]以 5 $\mu\text{mol/L}$ 的重组 hLf 处理白念珠菌细胞, 作用 3 h 后, 反映 DNA 断裂的 TUNEL 阳性细胞占 56%, 反映 PS 外翻的 Annexin V 阳性细胞占 23%, 反映胞内 ROS 产生的罗丹明-123 染色细胞数达 38%, 指标均显著高于未处理对照组。另外, hLf 处理白念珠菌细胞 15–180 min, 15 min 后即观察到线粒体膜电位降低, 且效应呈时间依赖性。值得注意的

是, hLf 诱导的凋亡过程中出现了经 K^+ 通道所介导的 K^+ 外排, 胞内钾氯离子减少会导致细胞皱缩从而有利于凋亡发生, 钾通道阻滞剂四乙胺则可拮抗 K^+ 的外流而阻止凋亡。表明真核细胞凋亡的这种生物学特征在低至酵母高至人类的物种进化过程中具有一定的保守性, 也凸显了凋亡在生命进化中的重要生物学意义。

2.5 中药及有效成分诱导白念珠菌凋亡

国内外学者近年来还致力于天然产物尤其是中药诱导白念珠菌凋亡的研究。

传统中药蒺藜具有降压、利尿、抗真菌、抗肿瘤等功效。TTS-12 是从刺蒺藜中提取的甾体皂苷类化合物, 黄杉等^[20]研究了 TTS-12 对白念珠菌的影响, 4 mg/L 的 TTS-12 作用于白念珠菌 8 h 后, 染色质固缩、凝集, 胞质中产生空泡, 显示出凋亡征象。另检测出, 8 mg/L 的 TTS-12 可诱导 58% 的细胞凋亡, 对白念珠菌细胞内 ROS 产生的促进作用具有剂量依赖性, 且随着时间的延长对 ROS 产生的促进作用也随之增强。在另一项实验中^[21], 该课题组通过基因芯片技术证实, 8 mg/L 的 TTS-12 对白念珠菌标准株 SC5314 作用 3 h, 引起 *ACS1* 等麦角固醇生物合成直接相关的基因表达下调。综合来看, TTS12 具有开发成新型抗真菌药的潜力。

黄芩素(黄芩苷元, Baicalein, BE)是从唇形科植物黄芩的干燥根中提取的有效成分之一。Dai 等^[22]用 4、8 mg/L 的 BE 作用白念珠菌 12 h, 发现分别引起 10%、20% 的白念珠菌凋亡; 8 mg/L BE 处理的细胞内出现染色质凝固; 32 mg/L BE 处理的细胞内 ROS 与对照组相比增加 4 倍。8 mg/L BE 处理细胞 3 h, 出现 *CAPI*、*SOD2*、*TRR1* 等氧化还原相关的基因表达的上调, 尤其是 *CAPI* 上调最显著, 达 24 倍。16 mg/L BE 作用 12 h 后, JC-1 荧光染色显示线粒体膜电位降低一半。表明 BE 可通过诱导凋亡方式干预白念珠菌。该课题组 FU 等^[23]进一步观察了 BE 联合 AmB 对白念珠菌

的凋亡作用, 当 2 mg/L BE 与 0.5 mg/L 的 AmB 联合作用于白念珠菌 0610215 菌株 4 h, 凋亡率为 61%, 而两药单独作用所致凋亡率分别是 7% 和 15%; 而且两药联用所致的 ROS 累积、Caspase 酶活性及 *CaMCA1* 基因表达量分别超过 AmB 单独作用所产生的 3 倍、3 倍和 5 倍, 表明两药联合对诱导白念珠菌凋亡具有明显协同效应。冯鑫等^[24]发现黄芩的另一有效组分黄芩苷对白念珠菌凋亡的诱导效应。实验表明, 10 μ mol/L 的黄芩苷可提高细胞内 ROS 水平, 100 和 1 000 μ mol/L 时还可诱导细胞核固缩与碎裂, 并降低线粒体膜电位。该课题组在另一项实验中发现, 一定浓度的穿心莲内酯对于生物膜状态的白念珠菌也有诱导凋亡功效, 且诱导凋亡的剂量对人体细胞毒作用很弱^[25]。

羽苔素 E (Plagiochin E) 是从苔类植物地钱 (*Marchantia polymorpha* L.) 中分离的双联苄类化合物。Wu 等^[26]检出羽苔素 E 对白念珠菌具有较强的抗真菌活性, MIC 为 16 mg/L, 且能通过提高耐药真菌细胞内氟康唑药物浓度而逆转真菌耐药。以 8–64 mg/L 的羽苔素 E 作用于细胞 12 h, 导致细胞线粒体膜电位的超极化程度呈剂量依赖性增强; 胞内 ROS 累积增加, 且产生的 ROS 可被抗氧化剂半胱氨酸所抑制; 16 mg/L 的羽苔素 E 作用 12 h, 引起 Metacaspase 的激活, 细胞色素 C (CytC) 释放增加; 并观测到染色质凝固、DNA 断裂、PS 外翻等典型的凋亡特征。实验还观察到, 羽苔素 E 能抑制真菌细胞壁中几丁质的合成。因此, 上述研究表明羽苔素 E 有望进一步被开发成良好的抗真菌药。

姜黄素(Curcumin, CUR)是一种从姜黄根茎中提取得到的黄色色素, 具有抗氧化、抗癌、抗菌等作用^[27]。Sharma M. 等^[28]以 185 mg/L 的 CUR 处理白念珠菌标准株 SC5314 菌细胞 4 h, 胞内 ROS 增多, 参与氧化应激维持的相关基因 (*CAPI*, *CaIPF7817*, *GRP2*, *CAT1*, *SOD2*) 的转录水平也升高; 同时, 发现 PS 外翻的细胞数增加, 占 22.88%, 而对照组仅 3.17%, 如果细胞以抗氧化剂

吡咯烷二硫代氨基甲酸或抗坏血酸预先处理,则 PS 外翻率分别降至 2.28% 和 3.77%; 另外证实,编码 Metacaspase1 的 *CaMCA1* 基因的转录水平也有所升高,这些均表明姜黄素可以通过凋亡方式发挥其抗真菌作用。在 Sharma M. 等^[29]的另一项实验中,发现姜黄素与氟康唑或 AmB 有协同抗真菌作用,联合干预下的 MIC₈₀ 比氟康唑或 AmB 单用时的要降低 10–35 倍, FICI 在 0.09–0.50 之间,显示出显著的协同效应; 姜黄素-氟康唑、姜黄素-AmB 联用分别导致细胞 ROS 升高 16 倍和 26 倍; 细胞凋亡率分别达 17.60% 和 18.46%, 也远超出各药单用时的凋亡率; 且升高的 ROS 和凋亡率均可被抗氧化剂抗坏血酸所逆转。充分表明姜黄素单独或与氟康唑、AmB 联用均可诱导白念珠菌凋亡。

莠萝(*Anethum graveolens* L.) 为伞形科莠萝属一年生草本植物,具有抗菌、抗氧化等活性。曾红等^[30]发现,经 0.625 g/mL 的莠萝子挥发油处理的白念珠菌细胞发生染色质凝集、碎裂,胞膜 PS 外翻,用泛 Caspase 抑制物 Z-VAD-FMK 在原位检测 Caspase 的同系物 Metacaspase, Z-VAD-FMK 标记的细胞占总细胞百分比为 47.84%, 提示莠萝子挥发油激活了细胞内的 Metacaspase。在抗氧化剂半胱氨酸存在的条件下,没有细胞染上绿色,表明半胱氨酸抑制了莠萝子挥发油对 Metacaspase 的活化作用,提示 Metacaspase 的激活与胞内 ROS 累积有关。Cyt C 从线粒体释放是细胞凋亡的关键步骤,莠萝子挥发油能显著降低白念珠菌线粒体的 Cyt C 含量,同时提高细胞浆中 Cyt C 含量。实验揭示,莠萝子挥发油可诱导白念珠菌凋亡,但莠萝子挥发油成分复杂,含 α -香芹酮、柠檬烯、芹菜脑等,其诱导凋亡的有效成分或成分群有待于进一步分离鉴定。

二烯丙基二硫醚(Diallyl disulphide, DADS)是大蒜的主要有效成分之一,具有抑制结肠癌、皮肤癌、乳腺癌和肝癌等肿瘤细胞增殖的作用,并可通过活化 Caspase3 途径而诱导白血病细胞凋亡,通过升高 ROS 诱导神经母细胞瘤凋亡^[31–32]。

Lemar K. M. 等^[33]则观察了 DADS 对真菌的诱导凋亡作用,通过 0.5 mmol/L 的 DADS 来处理细胞 30 min, 2 h 后细胞致死率达 70% (50% 坏死, 20% 凋亡), 4 h 后致死率达 75%。通过双光子共聚焦激光显微镜检测到,线粒体膜电位和还原型谷胱甘肽(GSH)明显降低、ROS 水平升高,并进一步证实谷胱甘肽转硫酶(GST)是 DADS 在胞内作用的一个靶点。此外证实,线粒体电子传递链复合酶 II–IV 中的部分位点和 ATP 合酶也可被 DADS 所阻遏。

综上所述,不少天然产物的抗真菌作用是通过诱导菌细胞凋亡来实现的,这也是近年来基于凋亡机制来筛选或研发抗真菌药物的一个重要方向。

2.6 光动力诱导白念珠菌凋亡

光动力疗法(Photodynamic therapy, PDT)通过一定波长的光辐射、光敏剂与分子氧相互作用所产生的生物学效应用于恶性肿瘤或其他一些疾病的治疗^[34]。四酞菁硅(Silicon phthalocyanine 4, Pc 4)是美国凯斯西储大学研发的第二代光敏剂, Lam M. 等^[35]使用 Pc 4 处理白念珠菌,经共聚焦显微镜检查,发现 Pc 4 主要选择性地分布在包括线粒体在内的细胞器里。以 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 Pc 4 处理游离细胞后,再接受 2.0 J/cm² 的光照射,菌落形成单位(CFU)计数显示,细胞减少 4 个数量级。XTT 法与 FUN-1 荧光探针试验均表明 Pc 4-PDT 损伤真菌的代谢活性。此外,细胞形态学出现胞膜 PS 外翻增加与 DNA 片段化等凋亡的典型特征。该研究提示, PDT 具有作为抗真菌的辅助或替代疗法的潜力。

前文述及,一定剂量的姜黄素可诱导白念珠菌凋亡。Dovigo L. 等^[36]则在小鼠口腔白念珠菌感染模型中研究了以姜黄素作为光敏剂所介导的 PDT 疗效,结果表明, 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素结合 LED 灯照射,均可明显降低白念珠菌活细胞数(CFU/mL),其中 80 $\mu\text{mol/L}$ 组所导致的舌背 CFU 计数减少达 4 个数量级。

2.7 白念珠菌自身代谢产物诱导凋亡

在自然状态下,细菌或真菌增殖达到一定密度时分泌一种自诱导信号分子,与相应受体结合,通

过信号转导启动特定基因表达,进而调控毒力因子合成、生物膜形成等诸多生理过程,此即群感效应(Quorum sensing, QS)。

法尼醇(Farnesol)是白念珠菌已知的两种重要QS分子之一,能抑制芽管和生物膜的形成;达到一定浓度时对菌细胞自身具有细胞毒性,实际上是以一种经典凋亡途径触发菌细胞的凋亡。Shirtliff等^[37]以40–200 $\mu\text{mol/L}$ 的法尼醇作用于白念珠菌SC5314标准株24 h,结果显示,ROS累积、线粒体降解、Caspase活化、TUNEL法所显示的凋亡细胞数增多等反应凋亡特征的变化均呈剂量依赖性,同时伴有编码Caspase的*MCA1*基因表达上调,40 $\mu\text{mol/L}$ 的法尼醇作用于细胞4 h后,*MCA1*表达上调3倍,提示法尼醇有助于活化Caspase。其研究揭示,作为白念珠菌代谢产物,法尼醇在细胞达到一定密度时,可以诱导凋亡方式负反馈性抑制菌群过度膨胀,以维持微生态的相对均衡。

在Sharma M.等^[38]研究中,安全浓度内的法尼醇分别与氟康唑/酮康唑/咪康唑/两性霉素B两两联用对唑类耐药株产生协同效应,且导致细胞ROS产生增多;与氟康唑、AMB联用所致的凋亡率分别上升至18.44%和10.44%,抗氧化剂抗坏血酸可部分逆转细胞的凋亡率,显示药物联合所带来的协同凋亡效应。

3 结语

细胞凋亡是真菌及其他真核生物在进化过程中的一个重要的保守性的生理过程,一直是生命科学领域研究的热点。鉴于机会性真菌感染的日益增多,对传统抗真菌药物耐药的菌株越来越常见,如何有效抑制或杀灭耐药菌成为抗感染领域关注的焦点,而药物诱导真菌凋亡不失为一般性抑制或杀灭真菌之外的另一种重要手段或机制。

由于白念珠菌与人体细胞同属真核细胞,必须筛选出以真菌细胞壁为靶点或其他对真菌具有选择性诱导凋亡而对人体细胞毒性低的药物。相对于菌细胞坏死而言,诱导其凋亡所需的药物剂量或环

境刺激强度往往要小些,因而对机体毒副作用也相应小些。通过摸索精确的凋亡诱导剂量,其良好的治疗效果与较低的不良反应即显著的差异毒性是抗真菌感染治疗的理想选择,而联合用药所获得的减毒增效对于诱导凋亡有时也能起到事半功倍的效果。以三氧化二砷和全反式维甲酸诱导白血病细胞凋亡为代表,药物诱导肿瘤细胞凋亡已成为肿瘤治疗的一项重要举措,而通过诱导凋亡进行抗真菌治疗的研究目前尚处于初步阶段。研究表明,有多种信号转导通路及调控因子参与了药物或环境刺激所诱导的真菌凋亡过程,如Ras-cAM P-PKA通路、STRE通路、YCA1通路等^[39–43]。近期,Dai等^[44–45]证实,HSP90通过调节钙调神经磷酸酶(Calcineurin)——Caspase通路而参与了白念珠菌凋亡;并对黄芩素诱导的白念珠菌凋亡进行了深入研究,发现转录因子Cap1p参与了凋亡过程,Cap1p通过调节GLR1(谷胱甘肽还原酶)基因表达和GSH(还原型谷胱甘肽)浓度而发挥其诱导凋亡作用。相信随着凋亡相关通路的不断被发现,有望将凋亡通路作为抗真菌药物作用的靶点,并进一步加大诱导真菌凋亡的药物的探寻,研发出可通过凋亡途径干预真菌的新药。目前真菌凋亡研究仍以体外为主,临床上药物治疗真菌感染是否也可以明确通过诱导凋亡机制来完成的尚需进一步研究和验证。

参考文献

- [1] Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2013, 62(Pt 1): 10–24.
- [2] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 205–219.
- [3] Ramsdale M. Programmed cell death in pathogenic fungi[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2008, 1783(7): 1369–1380.
- [4] Phillips AJ, Sudbery I, Ramsdale M. Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(24): 14327–14332.
- [5] 杨丞喆, 宫玮玉, 卢境婷, 等. 口腔白色念珠菌凋亡现象的初步研究[J]. *上海口腔医学*, 2008, 17(5): 492–495.
- [6] Al-Dhaheri RS, Douglas LJ. Apoptosis in *Candida*

- biofilms exposed to amphotericin B[J]. Journal of Medical Microbiology, 2010, 59(Pt 2): 149-157.
- [7] Hao B, Cheng S, Clancy CJ, et al. Caspofungin kills *Candida albicans* by causing both cellular apoptosis and necrosis[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013, 57(1): 326-332.
- [8] Vandenbosch D, Braeckmans K, Nelis HJ, et al. Fungicidal activity of miconazole against *Candida* spp. biofilms[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2010, 65(4): 694-700.
- [9] Zhao C, Yin P, Mei C, et al. Down-regulation of DNA methyltransferase 3B in staurosporine-induced apoptosis and its mechanism in human hepatocarcinoma cell lines[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2013, 376(1/2): 111-119.
- [10] Xiong N, Long X, Xiong J, et al. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-induced toxicity and its potential mechanisms in Parkinson's disease models[J]. Critical Reviews in Toxicology, 2012, 42(7): 613-632.
- [11] Castro A, Lemos C, Falcão A, et al. Rotenone enhances the antifungal properties of staurosporine[J]. Eukaryotic Cell, 2010, 9(6): 906-914.
- [12] Li JF, Zhang J, Xu XZ, et al. The antibacterial peptide ABP-CM4: the current state of its production and applications[J]. Amino Acids, 2012, 42(6): 2393-2402.
- [13] Lee J, Hwang JS, Hwang IS, et al. Coprisin-induced antifungal effects in *Candida albicans* correlate with apoptotic mechanisms[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2012, 52(11/12): 2302-2311.
- [14] Raghuraman H, Chattopadhyay A. Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions[J]. Bioscience Reports, 2007, 27(4/5): 189-223.
- [15] Park C, Lee DG. Melittin induces apoptotic features in *Candida albicans*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, 394(1): 170-172.
- [16] Yang YF, Lyu PC. The proteins of plant defensin family and their application beyond plant disease control[J]. Recent Patents on DNA & Gene Sequences, 2008, 2(3): 214-218.
- [17] Aerts AM, Bammens L, Govaert G, et al. The antifungal plant defensin HsAFP1 from *Heuchera sanguinea* induces apoptosis in *Candida albicans*[J]. Frontiers in Microbiology, 2011, 2: 47. DOI: 10.3389/fmicb.
- [18] Brock JH. Lactoferrin-50 years on[J]. Biochemistry and Cell Biology, 2012, 90(3): 245-251.
- [19] Andrés MT, Viejo-Díaz M, Fierro JF. Human lactoferrin induces apoptosis-Like cell death in *Candida albicans*: critical role of K^+ -channel-mediated K^+ efflux[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008, 52(11): 4081-4088.
- [20] 黄杉, 曹颖璞, 姜远英. 天然化合物 TTS-12对白念珠菌细胞凋亡的影响[J]. 武警医学, 2011, 22(1): 27-30,33.
- [21] 张军东, 徐铮, 曹永兵, 等. 新型抗真菌剂 TTS-12对白念珠菌麦角甾醇生物合成相关 ERG 基因表达的作用研究[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(16): 1229-1233.
- [22] Dai BD, Cao YY, Huang S, et al. Baicalein induces programmed cell death in *Candida albicans*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 19(8): 803-809.
- [23] Fu Z, Lu H, Zhu Z, et al. Combination of baicalein and Amphotericin B accelerates *Candida albicans* apoptosis[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2011, 34(2): 214-218.
- [24] 冯鑫, 汪长中, 汪天明, 等. 黄芩苷体外对白念珠菌凋亡的影响[J]. 中成药, 2012, 34(8): 29-32.
- [25] 汪长中, 韩宁, 徐振华, 等. 穿心莲内酯诱导白念珠菌生物膜分散细胞凋亡的研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(3): 362-365.
- [26] Wu XZ, Chang WQ, Cheng AX, et al. PlagiocchinE, an antifungal active macrocyclic bis(bibenzyl), induced apoptosis in *Candida albicans* through a metacaspase-dependent apoptotic pathway[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2010, 1800(4): 439-447.
- [27] Hatcher H, Planalp R, Cho J, et al. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008, 65(11): 1631-1652.
- [28] Sharma M, Manoharlal R, Puri N, et al. Antifungal curcumin induces reactive oxygen species and triggers an early apoptosis but prevents hyphae development by targeting the global repressor TUP1 in *Candida albicans*[J]. Bioscience Reports, 2010, 30(6): 391-404.
- [29] Sharma M, Manoharlal R, Negi AS, et al. Synergistic anticandidal activity of pure polyphenol curcumin I in combination with azoles and polyenes generates reactive oxygen species leading to apoptosis[J]. FEMS Yeast Research, 2010, 10(5): 570-578.
- [30] Zeng H, Tian J, Zheng Y, et al. *In vitro* and *in vivo* activities of essential oil from the seed of *Anethum graveolens* L. against *Candida* spp.[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011, DOI: 10.1155/2011/659704
- [31] Tsubura A, Lai YC, Kuwata M, et al. Anticancer effects of garlic and garlic-derived compounds for breast cancer control[J]. Anticancer Agents in Medicinal Chemistry, 2011, 11(3): 249-253.
- [32] Pagliei B, Aquilano K, Baldelli S, et al. Garlic-derived diallyl disulfide modulates peroxisome proliferator activated receptor gamma co-activator 1 alpha in neuroblastoma cells[J]. Biochemical Pharmacology, 2013, 85(3): 335-344.
- [33] Lemar KM, Aon MA, Cortassa S, et al. Diallyl disulphide depletes glutathione in *Candida albicans*: oxidative stress-mediated cell death studied by two-photon microscopy[J]. Yeast, 2007, 24(8): 695-706.
- [34] Milla Sanabria L, Rodríguez ME, Cagno IS, et al. Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular components of the tumor microenvironment[J]. Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer, 2013, 1835(1): 36-45.
- [35] Lam M, Jou PC, Lattif AA, et al. Photodynamic therapy with Pc 4 induces apoptosis of *Candida albicans*[J]. Photochemistry and Photobiology, 2011, 87(4): 904-909.
- [36] Dovigo LN, Carmello JC, de Souza Costa CA, et al. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida*

- albicans* in a murine model of oral candidiasis[J]. Medical Mycology, 2013, 51(3): 243-251.
- [37] Shirliff ME, Krom BP, Meijering RA, et al. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(6): 2392-2401.
- [38] Sharma M, Prasad R. The quorum-sensing molecule farnesol is a modulator of drug efflux mediated by ABC multidrug transporters and synergizes with drugs in *Candida albicans*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(10): 4834-4843.
- [39] 戴宝娣, 曹颖瑛, 徐勇刚, 等. 致病真菌凋亡机制的研究进展[J]. 第二军医大学学报, 2008, 29(11): 1390-1394.
- [40] Phillips AJ, Crowe JD, Ramsdale M. Ras pathway signaling accelerates programmed cell death in the pathogenic fungus *Candida albicans*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(3): 726-731.
- [41] Narasimhan ML, Damsz B, Coca MA. A plant defense response effector induces microbial apoptosis[J]. Molecular Cell, 2001, 8(4): 921-930.
- [42] Khan MA, Chock PB, Stadtman ER. Knockout of caspase-like gene, YCA1, abrogates apoptosis and elevates oxidized proteins in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(48): 17326-17331.
- [43] Guaragnella N, Pereira C, Sousa MJ, et al. YCA1 participates in the acetic acid induced yeast programmed cell death also in a manner unrelated to its caspase-like activity[J]. FEBS Letters, 2006, 580(30): 6880-6884.
- [44] Dai B, Wang Y, Li D, et al. Hsp90 is involved in apoptosis of *Candida albicans* by regulating the calcineurin-caspase apoptotic pathway[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e45109.
- [45] Dai BD, Wang Y, Zhao LX, et al. Cap1p attenuates apoptosis of *Candida albicans*[J]. The FEBS Journal, 2013, 280(11): 2633-2643. DOI: 10.1111/febs.12251.

书 讯

现代生物技术——万能灵药，还是新潘多拉魔盒？



作者: (荷兰) Johannes Tramper & Yang Zhu;

于洁, 李寅, 朱阳 (译)

出版: 化学工业出版社

ISBN: 978-7-122-17499-4

定价: 49 元

开本: 16

装帧: 平装

页码: 248

现代生物技术在解决人类社会面临的人口、健康、资源和环境等重大问题上表现出了巨大的应用潜力。然而，与历史上任何新兴技术面世的时候一样，广大民众对现代生物技术这样一种新兴高技术的内涵并不清楚，因此容易产生怀疑、误解，甚至恐惧，阻碍了现代生物技术的正常发展和应用。

为了更好地认识现代生物技术的科技内涵，本书以现代生物技术 in 食品 and 医疗领域的发展和应用为主线，希望以事实为依据，为读者提供一个丰富且可靠的信息来源，从而消除偏见，正确判断现代生物技术对人类带来的福音还是灾难。

本书共分四部分。第一部分是引言，重点介绍了现代生物技术的两面性。第二部分“日常饮食”，分别从奶酪、烘烤食品、葡萄酒、生物技术肉制品和所谓“妖魔食品”等入手，阐述生物技术和各种日常饮食之间的渊源。第三部分“健康也有极限”，则从抗生素、荷尔蒙、基因治疗、异种器官移植、人类基因组计划和干细胞治疗等六个与健康 and 医学相关的方面，分析现代生物技术与人类的密切关系。最后一部分是“尾声”，希望给读者留下一个印象和认识：“生物技术不一定是有害的！”

本书主要选材于日常生活中与现代生物技术密切相关的实例，所参考的文献多来自《自然》、《科学》等国际知名期刊或杂志，将专业的理解和大众的视角结合起来，向人们介绍现代生物技术的基本原理及其利弊；语言通俗易懂，大量使用简明易懂的插图和插页，深入浅出地解释生物技术的热门话题。

本书适合于生物类专业及其他拟了解现代生物技术的人士阅读参考。

订购方式: 各大网站

化学工业出版社: <http://shop.cip.com.cn/product/20131001/283979787122174994.html>

<http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>