

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00447

病原真菌中群体感应现象研究进展

车付彬,徐楠,陈江汉*

第二军医大学长征医院皮肤科,上海 200003

[摘要] 群体感应现象在细菌中普遍存在,参与细菌多种生理功能的调控。近期在真菌中也发现存在类似于细菌群体感应信号分子的调节分子,并且介导着真菌诸如生物膜形成、菌相转换等生理行为的调节。本文主要综述了目前病原真菌中群体感应系统的研究进展,并探讨真菌群体感应系统作为抗真菌治疗靶点的可能性。

[关键词] 群体感应;真菌;致病性;生物膜

[中图分类号] R 379 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)04-0447-03

The development of quorum sensing phenomenon in pathogenic fungi

CHE Fu-bin, XU Nan, CHEN Jiang-han*

Department of Dermatology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[ABSTRACT] The quorum sensing commonly exists in prokaryote kingdom, regulating various biologic functions. Recently similar phenomenon was also found in fungi world, which affecting both biofilm formation and dimorphism. In this article, we focus on the recent progress on quorum sensing of pathogenic fungi and discuss the possibility of taking quorum sensing molecule as a potential target for antifungal therapy.

[KEY WORDS] quorum sensing; fungi; pathogenicity; biofilms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(4): 447-449]

群体感应系统(quorum sensing)是指细菌监控自身群体密度的环境信号感受系统。细菌在繁殖过程中分泌一些特定的化学信号分子,这种信号分子从胞内扩散到胞外,当信号分子达到一定的阈值时,细菌感受到自身的细胞密度从而启动某些基因的表达,这一过程称为群体感应^[1]。群体感应现象最早发现于原核生物中,但近期发现在真核生物中也存在群体感应。自2000年首次在荚膜组织胞浆菌中发现群体感应现象以来,又在白念珠菌、新生隐球菌及多种植物真菌中发现类似现象,并证实其与菌相转换、致病性及生物膜形成密切相关。本文以病原真菌为主要对象,综述了白念珠菌、新生隐球菌和荚膜组织胞浆菌3类重要病原菌中群体感应现象研究的最新进展。

1 白念珠菌群体效应分子法尼醇(farnesol)

作为双相真菌,菌丝相是白念珠菌的重要致病因子。多种因素可以引起白念珠菌由酵母相向菌丝相转变,群体感应便是其中之一;当接种量 $<10^6$ 时,白念珠菌主要以菌丝相生长,而当接种量 $>10^6$ 时,白念珠菌则主要以酵母相生长。通过对培养基上清进行成分分析,分离出一种相对分子质量为222.37的亲脂分子,结构式 $C_{15}H_{26}O$,分析证实该活性分子为法尼醇,法尼醇在自然界存在四种同分异构体,但只有E-

E异构体具有群体效应分子活性^[2],它也是真核生物中第一个被发现的群体效应分子^[3]。

关于法尼醇同致病性关系存有兩種不同观点:一种认为由于法尼醇是阻止白念珠菌由酵母相向菌丝相转变的关键,因此认为其具有治疗价值;而另一种观点则认为法尼醇是白念珠菌毒力因子之一,它可能通过改变宿主细胞膜的通透性而增强白念珠菌的致病性^[4]。Nebraska大学学者研究zara-gozic酸^[5](一种鲨烯抑制剂类抗真菌药物)和5种唑类药物(氟康唑、咪康唑、酮康唑、克霉唑、脱萘酯)^[6]同白念珠菌A72株体外相互作用后,发现法尼醇的产量显著增加,由于唑类药物也可阻止白念珠菌向菌丝相转化,因此认为farnesol生成增加可能是唑类药物阻止白念珠菌向菌丝相转变的机制之一;在动物实验中,他们使用经亚抑菌浓度氟康唑处理后的白念珠菌A72感染小鼠并同未处理组进行比较,发现同体外试验一致,处理组法尼醇生成量显著增加,其中胞外、胞膜和胞内浓度处理组分别为非处理组的12、2和6倍;进一步对菌株毒力研究发现同法尼醇生成增加相对应,处理组的毒力显著增强^[7],为未处理组的4~8倍,这就引出疑问,法尼醇究竟是不是白念珠菌的毒力因子。为进一步明确,2007年他们^[8]通过敲除DPP3基因(一种催化焦磷酸法尼脂转变成法尼脂的磷酸酶的编码基因),以A72菌株为基础构建出

[收稿日期] 2008-08-18 **[接受日期]** 2008-11-27

[作者简介] 车付彬,硕士生, E-mail:chefubin@126.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-81885492, E-mail:chenjianghan@126.com

产法尼醇缺陷菌株 KWN2, KWN2 仅产生正常菌株六分之一量的法尼醇,用 KWN2 接种小鼠后,发现毒性比 A72 大大降低,说明减少内源性 farnesol 在降低白念珠菌致病性方面起到重要作用;采用经口或经腹膜给予外源性的法尼醇再接种 LD50 量白念珠菌也可显著降低小鼠的生存率和存活时间。以上两个实验证明法尼醇在增强白念珠菌致病性方面发挥重要作用,可能是白念珠菌的毒力因子。

法尼醇除可改变细胞膜通透性,是否还有其他机制可以增强白念珠菌致病性?考虑到细胞免疫在抗真菌感染中的重要性,有学者考察了法尼醇同细胞免疫之间的关系^[9],他们采用法尼醇处理过的小鼠接种白念珠菌,在多个时间点测定细胞因子浓度,结果发现法尼醇可引起 Th1 细胞因子 IFN- γ 和 IL-12 的显著减少, Th2 细胞因子 IL-5 明显增加,通过削弱宿主细胞免疫功能增强致病性,这可能也是法尼醇致病机制之一。

除可阻止白念珠菌向菌丝相转变外,法尼醇对生物膜形成也有影响^[10]。白念珠菌生物膜由两层结构组成,上层较厚主要由菌丝相细胞组成,下层较薄主要由致密的酵母相细胞黏附在固相表面。Ramage 等^[10]证实法尼醇可阻止白念珠菌生物膜形成,但同时有密切关系,仅在菌体细胞刚刚黏附时加入法尼醇具有阻止生物膜形成效应;当黏附超过 2~3 h,一旦菌丝形成再加入法尼醇无抑制作用;这种抑制作用也同法尼醇量成正相关。cDNA 基因芯片及半定量 RT-PCR 研究发现^[11-12],生物膜细胞有 274 个基因在同法尼醇作用后发生变化,其中包含有多个菌相转换相关基因,如 TUP1 基因表达上调, PDE2 和 CRK1 基因表达下调,细胞表面疏水性相关基因 CSH1 表达下调,还有一些耐药性相关基因也发生了显著变化。

此外,法尼醇还可能介导真菌间的相互拮抗作用^[13],构巢曲霉同产法尼醇的白念珠菌共同培养发现构巢曲霉不能存活,而向构巢曲霉培养基中加入法尼醇也发现构巢曲霉发生凋亡。深入研究揭示这种拮抗作用可能是通过 fadA 异源三聚体 G 蛋白复合物信号通道介导的,线粒体和活性氧中间产物也参与了这一过程。

2 白念珠菌群体效应分子 tyrosol

Tyrosol 于 2004 年被发现,同法尼醇作用相反, tyrosol 可促进白念珠菌由酵母相向菌丝相的转变^[14],同法尼醇共同调控白念珠菌酵母相和菌丝相之间的转换。此外 Tyrosol 还可影响白念珠菌的生长,当菌体密度低于 10^7 /ml 时,白念珠菌在指数生长期前可出现一个明显的生长停滞期,密度越低该生长停滞期就越长。向培养液中加入 tyrosol 可明显缩短该停滞期,同时诱导菌体形成芽管向菌丝相转变。

白念珠菌生物膜细胞在 37°C 培养时可生成 tyrosol^[15],其产量与生物膜干重相关。扫描电镜显示加入 tyrosol 在生物膜形成初期(2~6 h)可促进菌丝形成,由于生物膜细胞可同时产生法尼醇和 tyrosol,为比较两者在生物膜形成过程中的影响孰强孰弱,同时加入不同浓度的法尼醇(0.05、0.1、1 mmol/L)和 tyrosol(0.1、0.5、1 mmol/L),以生物膜形成作为考核指标,结果发现低浓度(50 μ mol/L)的法尼醇可以被高

浓度的 tyrosol(0.1、0.5、1 mmol/L)所抑制,当法尼醇浓度增加到 100 μ mol/L 时,只有 1 mmol/L 浓度的 tyrosol 可对抗其作用,且生物膜细胞主要为酵母相,说明法尼醇在菌相转换方面的作用要胜于 tyrosol。但目前对 tyrosol 的认识远不如法尼醇,需要深入研究。

3 新生隐球菌中的群体效应样分子 (quorum sensing-like peptide 1, QSP1)

NIH 学者^[16]在研究敲除 TUP1 基因对新生隐球菌影响时发现,在单平板上接种小于 10^3 菌株时不能正常形成菌落,而当接种量达到 $10^5 \sim 10^6$ 时可以形成菌苔。这种现象引起了关注,通过分析已形成菌落的 TUP1 Δ 菌株培养液上清分离出效应分子 QSP1,向不能生长的平板中加入该效应分子 QSP1 后即使接种量小于 10^3 也可形成正常菌落,此现象类似细菌中的群体感应现象却又不完全相同,其区别于在低接种量时新生隐球菌并不能形成菌落所以谈不上群体,因此该分子命名为群体效应样分子 (quorum sensing-like peptide 1)。结构分析发现 QSP1 是一条相对分子质量为 1 136.23 的 11 肽(NH₂-NFGAPGGAYPW-COOH),此多肽对应的编码基因同基因数据库中一条更大的 hypothetical gene (CNC00730, <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/cna1/index.shtml>)的 C 末端完全一致,并命名该基因为 Cryptococcus quorum sensing-like molecule(CQS1)。采用人工合成的方法合成该 QSP1 多肽后也具有群体效应的活性。

为了解 QSP1 是否是新生隐球菌中唯一群体效应样分子, NIH 学者^[16]采用融合 PCR 和基因枪技术构建了 CQS1, TUP1 Δ 菌株,该变种不能生成 QSP1 分子,但却发现其培养液上清仍可使接种量小于 10^3 的平板形成菌落,只是菌落数量很少且尺寸也很小,因此 QSP1 并不是新生隐球菌中唯一群体效应样分子。

但这种群体效应样现象目前仅发现于 TUP1 Δ 菌株中,在野生株并未发现, NIH 学者^[16]进一步分析有无可能使得 TUP1 基因下调到相当低的水平甚至关闭而诱发新生隐球菌的群体感应现象。在他们设计的实验条件中,发现生长静止期时 TUP1 转录水平为早期对数期的 3 倍,在低氧条件下上述比值变为 3.2,因此认为尽管目前尚未发现某一条件能够引起 TUP1 基因彻底关闭,但是 TUP1 基因肯定可能受到某些影响因素的作用而发生改变,并不同程度影响 CQS1 基因,进而引发群体感应现象。

对不同配型的 TUP1 Δ 菌株研究^[16]发现,不同配型 TUP1 Δ 菌株发生群体感应现象所需条件不同, a 配型需要在 30°C 菌数为 5×10^5 ,而 α 配型需要 25°C 菌数为 5×10^6 ,此发现说明隐球菌 a 配型和 α 配型在多个方面存在不同,有待深入研究探讨。

4 荚膜组织胞浆菌的群体效应分子

荚膜组织胞浆菌是一种双相真菌,形成酵母相是荚膜组织胞浆菌致病的必要条件,其细胞壁中 α -1,3 葡聚糖糖苷与致病性密切相关。研究^[17]发现体外条件下,荚膜组织胞浆菌接种密度对糖苷的产生具有显著影响:当接种密度高时糖

苷含量丰富,密度低时大部分酵母细胞不再合成糖苷;但如果向低密度培养体系中加入高密度培养时的上清液,则低密度体系中的酵母细胞仍可以合成糖苷。这是由于,高密度培养时组织胞浆菌酵母细胞可以释放一种相对分子质量大于6 000的物质,其效应类似于细菌中的自身诱导物(autoinducer),可以促进糖苷的合成,构成细胞的胞壁组分。由于组织胞浆菌是一种细胞内寄生菌,而且群体效应分子相对分子质量较大(>6 000),因此不易于穿透细胞膜,所以在其被免疫细胞吞噬后群体效应分子的浓度逐渐增加,极有可能引发类似体外观察到的群体感应现象。

5 展 望

目前真菌中的群体感应现象研究开展尚浅,不断有新的群体效应分子被发现,如近期在酿酒酵母中发现的 phenylethanol 和 tryptophol^[18]被证实也属群体感应分子,但其理化性质及作用机制尚未完全阐明。群体效应分子已经证实同真菌的菌相转换、生物膜形成及致病性有一定相关性,但迄今研究成果主要限于白念珠菌,关于真菌群体效应分子的受体或靶蛋白、相关信号转导通路、靶基因的调控等都有待进一步的研究。细菌中的群体感应现象已经证实同致病性密切相关,而且针对通过干扰群体效应减弱其致病性的药物正在紧锣密鼓开发当中,因此我们应当加深对致病真菌的群体感应研究,一旦建立真菌群体感应同病原真菌致病性的联系并明确其机制,我们就可以开发以真菌群体感应为靶点的新型抗菌药物或治疗手段,从而达到有益于社会的目的。

[参 考 文 献]

- [1] Miller M B, Bassler B L. Quorum sensing in bacteria[J]. Annu Rev Microbiol, 2001, 55: 165-199.
- [2] Shechepin R, Hornby J M, Burger E, Niessen T, Dussault P, Nickerson K W. Quorum sensing in *Candida albicans*: probing farnesol's mode of action with 40 natural and synthetic farnesol analogs[J]. Chem Biol, 2003, 10: 743-750.
- [3] Hornby J M, Jensen E C, Liseac A D, Tasto J J, Jahnke B, Shoemaker R, et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 2982-2992.
- [4] Nickerson K W, Atkin A L, Hornby J M. Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72: 3805-3813.
- [5] Hornby J M, Kebaara B W, Nickerson K W. Farnesol biosynthesis in *Candida albicans*: cellular response to sterol inhibition by zaragozic acid B[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47: 2366-2369.
- [6] Hornby J M, Nickerson K W. Enhanced production of farnesol by *Candida albicans* treated with four azoles[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48: 2305-2307.
- [7] Navarathna D H, Hornby J M, Hoerrmann N, Parkhurst A M, Duhamel G E, Nickerson K W. Enhanced pathogenicity of *Candida albicans* pre-treated with subinhibitory concentrations of fluconazole in a mouse model of disseminated candidiasis[J]. J Antimicrob Chemother, 2005, 56: 1156-1159.
- [8] Navarathna D H, Hornby J M, Krishnan N, Parkhurst A, Duhamel G E, Nickerson K W. Effect of farnesol on a mouse model of systemic candidiasis, determined by use of a DPP3 knockout mutant of *Candida albicans* [J]. Infect Immun, 2007, 75: 1609-1618.
- [9] Navarathna D H, Nickerson K W, Duhamel G E, Jerrels T R, Petro T M. Exogenous farnesol interferes with the normal progression of cytokine expression during candidiasis in a mouse model[J]. Infect Immun, 2007, 75: 4006-4011.
- [10] Ramage G, Saville S P, Wickes B L, López-Ribot J L. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68: 5459-5463.
- [11] Cao Y Y, Cao Y B, Xu Z, Ying K, Li Y, Xie Y, et al. cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49: 584-589.
- [12] Cho T, Aoyama T, Toyoda M, Nakayama H, Chibana H, Kaminishi H. Transcriptional changes in *Candida albicans* Genes by both farnesol and high cell density at an early stage of morphogenesis in N-acetyl-D-glucosamine medium [J]. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi, 2007, 48: 159-167.
- [13] Semighini C P, Hornby J M, Dumitru R, Nickerson K W, Harris S D. Farnesol-induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi[J]. Mol Microbiol, 2006, 59: 753-764.
- [14] Chen H, Fujita M, Feng Q, Clardy J, Fink G R. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 5048-5052.
- [15] Alem M A, Oteef M D, Flowers T H, Douglas L J. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development[J]. Eukaryot Cell, 2006, 5: 1770-1779.
- [16] Lee H, Chang Y C, Nardone G, Kwon-Chung K J. TUP1 disruption in *Cryptococcus neoformans* uncovers a peptide-mediated density-dependent growth phenomenon that mimics quorum sensing[J]. Mol Microbiol, 2007, 64: 591-601.
- [17] Kügler S, Schurtz Sebghati T, Groppel Eissenberg L, Goldman WE. Phenotypic variation and intracellular parasitism by histoplasma Capsulatum[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 8794-8798.
- [18] Chen H, Fink G R. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols[J]. Genes Dev, 2006, 20: 150-161.

[本文编辑] 孙 岩