DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00558

·综 述·

深部真菌感染治疗的新思路

朱良华[1,2],李德东[2],王 彦[2*],姜远英[2*]
1. 福建中医药大学药学院中药学教研室,福州 350108
2. 第二军医大学药学院新药研究中心,上海 200433

[摘要] 近年来,深部真菌感染发病率急剧升高,且具有极高的致死率。而临床上现有的抗真菌药物的耐药现象十分严重,寻求新的治疗手段成为当前研究的热点。本文从作用于新靶点的抗真菌药物、采取联合用药方式进行抗真菌治疗以及研发真菌疫苗 3 大方面进行综述。

[关键词] 深部真菌感染;新药;联合药物疗法;真菌疫苗
[中图分类号] R 519 [文献标志码] A [文章编号] 0258-879X(2012)05-0558-04

Novel thoughts on treatment of invasive fungal infections

ZHU Liang-hua[1,2], LI De-dong[2], WANG Yan[2*], JIANG Yuan-ying[2*]
1. Department of Traditional Chinese Medicine, College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, Fujian, China
2. New Drug R & D Center, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] The incidence of invasive fungal infections rose rapidly during the past years, which resulted in high mortality. What makes it worse is that drug resistance has also become a very serious problem in clinical practice. Searching for the novel therapy strategies is now a focus of related scientists. This article reviews the treatment of invasive fungal disease from the following three aspects: the development of anti-fungal agents aiming new targets, combined drug therapy and development of antifungal vaccines.

[Key words] invasive fungal infections; new drugs; combination drug therapy; antifungal vaccine
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(5): 558-561]

近年来,随着癌症放疗/化疗、器官移植、艾滋病患者的增加,广谱抗生素、肾上腺皮质激素、细胞毒药物和免疫抑制剂的长期广泛应用,导管介入、静脉营养等治疗手段的普及与发展,深部真菌感染的发病率和病死率不断上升。在发达国家,尽管针对临床上主要的两大类致病真菌白假丝酵母菌和曲霉菌采取了新的诊疗手段,深部真菌感染的病死率仍高达 30%~50%[1]。除白假丝酵母菌和曲霉菌外,其他类型的真菌感染也很严重。如隐球菌感染引起的隐球菌脑膜炎,在每年约 100 万病例中,最终将近 62.5 万人死亡[2]。

目前临床上常用的抗真菌药物品种有限,包括唑类[酮康唑、氟康唑(FLU)、伊曲康唑、伏立康唑等]、多烯类(两性霉素 B,AMB)、丙烯胺类(特比萘芬)、5-氟胞嘧啶(5-FC)和棘白菌素类(卡泊芬净、米卡芬净)。由于 FLU 的生物利用度高、不良反应小、疗效明确并且价格能让公众接受,因此在临床上被广泛应用。在以 FLU 为代表的传统抗真菌药物长期广泛应用于临床的同时,病原菌株的耐药现象也越来越普遍,耐药性已成为临床治疗深部真菌感染失败的最主要原因[3]。即使对于当前新型的抗真菌药物——棘白菌素类的卡泊芬净,近期研究发现如果细胞壁上 FKS1 基因缺失或者形成生物被膜,都会导致其对卡泊芬净耐药[4]。为了克服真菌的耐药性问题,研发作用于新靶点的抗真菌药物、采取联合用药的方式以及研发抗真菌疫苗将成为今后抗真菌药物研发的新方向。

1 研发针对新靶点的抗真菌药物

研发针对新靶点的抗真菌药物可以有效对抗现有的耐

[收稿日期] 2011-12-12 [接受日期] 2012-03-10
[基金项目] 国家自然科学基金(81072678,30672626,30825041,30630071),国家科技部科技重大专项(2011ZX09102-002-01),上海市教育发展基金(2007CG51),上海市科技重点项目(10431902200). Supported by National Natural Science Foundation of China (81072678, 30672626, 30825041, 30630071), National Science and Technology Major Project of the Ministry of Science and Technology of China (2011ZX09102-002-01), Education Development Foundation of Shanghai (2007CG51), and Major Science and Technology Project of Shanghai (10431902200).
[作者简介] 朱良华,硕士生. E-mail: zxwy7777@163.com
* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-81871357, E-mail: wangyancn@smmu.edu.cn; Tel: 021-81871280, E-mail: jiangyy@smmu.edu.cn

药菌株。目前可能的新靶点包括细胞壁成分、钙调神经磷酸酶通路和磷脂酶等。

1.1 针对真菌的细胞壁成分 葡聚糖是真菌细胞壁的重要组成成分,包括 β-1,3-葡聚糖和 β-1,6-葡聚糖。近年来新上市的棘白菌素类抗真菌药物的作用靶点是 β-1,3-葡聚糖;D75-4590 是一种吡啶苯并咪唑类化合物,可以通过抑制真菌 β-1,6-葡聚糖的合成,抑制菌丝生长而起到抗白假丝酵母菌的作用[5]。壳多糖也是真菌细胞壁的重要组成成分,对维持真菌细胞壁的弹性有重要作用。Chen 等[6]从 BALB/c 小鼠腹腔中提取了壳多糖酶,通过克隆和表达得到了酸性的哺乳动物壳多糖酶 (acidic mammalian chitinase),实验表明这些酸性的哺乳动物壳多糖酶可以通过溶解白假丝酵母菌和烟曲霉菌的壳多糖而对真菌生长起到抑制作用。

1.2 针对钙调神经磷酸酶通路 钙调神经磷酸酶(calcineurin,CaN)是迄今所知的唯一一种受 Ca^{2+}/钙调蛋白调节的丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶。该通路对真菌的生长和致病性都起着重要的作用,也是免疫抑制剂环孢素 A(CsA)和他克莫司(FK506)的作用靶点。Odom 等[7]研究发现,卡泊芬净合用钙调神经磷酸酶通路抑制剂,可以大大增强对曲霉菌的杀菌作用。Onyewu 等[8]研究发现唑类药物和钙调神经磷酸酶通路抑制剂合用可使唑类药物的抑菌作用转为杀菌作用。体外实验表明,37℃时,单用 CsA 和 FK506 对新生隐球菌有很强的杀菌作用,但在 30℃时却没有作用,这说明钙调神经磷酸酶通路在较高温度条件下才能被激活从而发挥作用。然而 CsA 在新生隐球菌感染的家兔和小鼠模型的体内实验结果却不一致:对小鼠真菌感染能起到治疗作用,而对家兔无效果,这可能是 CsA 对家兔的药物渗透性不好导致的[9]。免疫抑制剂的不良反应及生物利用度的问题,限制了 CsA 等在临床上作为抗真菌药的应用,因此,开发特异性的钙调神经磷酸酶通路抑制剂,避免其对人体的免疫抑制作用,成为抗真菌研究的方向之一。近年来 CsA 类似物(γ-OH) Me-Leu-Cs(211-810)、D-Sar(α-Sme) Val-DH-Cs(209-85)、以及 FK506 衍生物 L-685818 都已被成功研制,并且显示了良好的体外抗真菌效果[10]。

1.3 针对其他靶点 近年来磷脂酶开始受到关注,人们发现双季铵盐可以通过抑制隐球菌和白假丝酵母菌的磷脂酶起到杀菌作用[11]。此外,pleofungin A,一种从茎点霉属(*Phoma*)类真菌菌丝体中提取的天然产物,是一种新的环肽类抗真菌抗生素,可抑制真菌的肌醇磷脂神经酰胺酶[12]。一些香豆素类衍生物可以通过破坏菌株细胞色素的合成而诱导凋亡[13]。Cruentaren,一种大环内酯类的粘细菌次生代谢产物,可以通过抑制真菌线粒体的 F0F1-ATP 酶活性,强烈抑制真菌生长[14]。

2 采取联合用药的方式治疗真菌感染

2.1 联合用药的应用历史 由于新药研发成本高,采用联合用药方案一直是临床药物治疗的理想选择。抗真菌联合用药最具代表性的是 AMB 和 5-FC 联合应用治疗隐球菌性脑膜炎:AMB 由于极高的肾毒性,限制了其临床应用;5-FC 虽易穿透血脑屏障,但单用极易产生耐药性。因此临床上采取静脉滴注 AMB 0.7~1.0 mg/kg,口服 5-FC 100 mg/kg 2 个星期,之后 8 个星期以 FLU 400 mg/d 巩固治疗的方案[15],由于 AMB 和 5-FC 作用于不同的靶点,耐药性被明显遏制,合用后 AMB 的使用剂量减少,肾毒性下降。AMB 与 5-FC 联合应用的临床疗效好,临床应用已有 40 多年的历史。

受此启发,研究人员通过体外实验筛选抗真菌增效药物,通常以部分抑菌浓度指数(fractional inhibitory concentration index,FICI)作为评价联合用药协同作用的主要参数。其中抑菌浓度分数(FIC)为每一种药物联合抑菌时所需浓度与单用时最低抑菌浓度(MIC)的比值,而 FICI 则等于 2 种药物 FIC 之和。当 FICI≤0.5 时,两药之间为协同作用[16]。最近的研究表明,一些本身不是抗真菌或抗真菌活性很低的化学药和天然产物在与临床常用药物合用后,显现出显著的抗真菌增效作用。

2.2 龙胆紫 90%的 HIV 感染患者会出现鹅口疮等真菌感染性疾病,而应用 FLU 治疗鹅口疮临床耐药现象严重。在医疗资源短缺的国家,如非洲地区,早期的临床试验表明龙胆紫、氯己定、茶油和聚唯碘酮等可以作为辅助治疗的药物。Traboulsi 等[17]通过实验发现龙胆紫与 FLU 相比,最低抑菌浓度(MIC_{50} 和 MIC_{90})更低,值得关注的是龙胆紫与 FLU 合用,可以对近平滑假丝酵母菌产生很好的协同效应。龙胆紫作为碱性染料,其阳离子可以渗透进入细胞并与白假丝酵母菌细胞的 DNA 结合,抑制 DNA 合成。它的渗透性引起线粒体膜的消散,最终导致细胞溶解[18]。而 FLU 通过抑制真菌麦角甾醇的合成发挥抑制真菌生长的作用,对组织没有刺激性,也没有明显的毒副作用。两者作用于真菌细胞不同靶点,因而龙胆紫合用 FLU 可以作为一种预防和治疗鹅口疮的有效手段。

2.3 小檗碱(BBR) 在传统中医理论指导下,作者所在的课题组从苦寒而燥的药物入手,广泛筛选具有抗真菌活性和抗耐药活性的中药提取物和中药单体,首次发现 BBR 与 FLU 具有强大的协同抗耐药真菌的作用(FICI<0.5),对耐药白假丝酵母菌的协同抗菌效果尤其显著[19]。通过研究 40 株对 FLU 耐药的白假丝酵母菌,发现合用 BBR 后 FLU 的 MIC 降低到原先的 1/1 028~1/32,而单用 FLU 或 BBR 的抑菌活性均很差。蛋白质组学和功能研究结果表明 FLU+BBR 可以通过增强三羧酸循环和抑制线粒体 ATP 合酶的活性这两条途径使内源性活性氧大量生成。内源性活性氧的大量生成导致耐药菌株的氧化损伤,这可能是两药协同的作用机制[20]。

2.4 其他抗真菌增效剂 An 等[21]实验表明,大蒜素和 AMB 合用,在体内和体外都可以协同抗白假丝酵母菌。大蒜素是一种含硫代亚磺酸酯的化合物,可以增强体内 Cu^{2+} 活性[22-23],而 Cu^{2+} 通过促进内源性活性氧的生成而产生杀菌活性。Amber 等[24]发现从圣罗勒中提取的精油和 FLU 或者酮康唑合用,可以增强两者抗白假丝酵母菌的活性(FICI:

0.25～0.54)。体外溶血实验表明，精油成分与 AMB 相比具有较低的细胞毒性，即使精油和 FLU 合用后其溶血毒性也很低。此外，Chamilos 等[25]通过体外实验和感染接合菌(zygomycete)的果蝇动物模型，发现降脂药洛伐他汀和伏立康唑合用可以起到协同作用。由于降脂药是 HMG-CoA 还原酶的抑制剂，而 HMG-CoA 还原酶是真菌体内甾醇合成的主要酶成分，抑制 HMG-CoA 还原酶可能是降脂药协同伏立康唑抗真菌的机制。

3　研发抗真菌疫苗

研发抗真菌疫苗是当前的研究热门。最近的研究发现，真菌体内的糖类和蛋白会引起人体免疫反应，可以作为抗原诱发机体产生抗体。人体免疫系统在抗真菌过程中起着重要作用，机体会对不同的菌株产生不同的免疫应答。因此，我们研发真菌疫苗重点要研究抗原抗体的选择。新生隐球菌会释放出大量的荚膜多糖在组织中，从而对免疫系统造成伤害。在小鼠的隐球菌感染动物模型中，给予针对荚膜多糖成分之一的葡糖醛木甘聚糖(GXM)的抗体可以起到很好的保护作用，并且合用 AMB、FLU 或 5-FC 能改善疗效[26]。很多病原菌产生的蛋白都有糖基化现象，卵白蛋白甘露糖化之后作为抗原的潜力提高，可以通过诱导 T 细胞的增生，使机体产生大量抗体[27]。Ibrahim 等[28]在鸡蛋黄中制备针对白假丝酵母菌抗原的免疫球蛋白抗体，实验结果表明该抗体能剂量依赖性地减少病原菌对人体口腔咽癌细胞的黏附能力。在口腔感染白假丝酵母菌的免疫缺陷小鼠模型中，发现服用该抗体可以减少病原菌的数量和小鼠舌创伤的面积，解剖后发现深部脏器的菌落数目也大大减少。这说明在免疫抑制的情况下，免疫球蛋白抗体可以对小鼠起到保护作用。该研究结果对艾滋病患者口腔白假丝酵母菌感染的治疗具有指导意义，在人体免疫抑制的情况下，采取抗体等免疫疗法可以起到辅助治疗作用。

4　结　语

综上所述，新药研发、联合用药和真菌疫苗的研制能有效地克服当前致病真菌的耐药性问题。但是上述策略也面临诸多挑战：研发新药和研制疫苗成本高、周期长；很多联合用药的研究尚处于体外实验阶段，动物实验和临床数据还十分缺乏。由于没有充分考虑到药物在机体内的药代动力学过程，很多体外有效的药物在体内实验阶段却显示无效。当前国际上开始注重临床前研究实验动物模型的标准化，以此为临床研究提供更多科学依据。Breger 等[29]通过建立感染白假丝酵母菌的线虫动物模型，高通量筛选可以延长线虫生命及抑制白假丝酵母菌菌丝生长的化合物，并最终获得成功。随着研发力度的加强，相信在不远的将来，会有更多抗真菌新药、联合应用的药物以及抗真菌疫苗进入临床研究阶段。

5　利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参 考 文 献]

[1] Denning D W, Hope W W. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities[J]. Trends Microbiol, 2010, 18: 195-204.

[2] Park B J, Wannemuehler K A, Marston B J, Govender N, Pappas P G, Chiller T M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS [J]. AIDS, 2009, 23: 525-530.

[3] Espinel-Ingroff A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi[J]. Rev Iberoam Micol, 2008, 25: 101-106.

[4] Walker L A, Gow N A, Munro C A. Fungal echinocandin resistance[J]. Fungal Genet Biol, 2010, 47: 117-126.

[5] Kitamura A, Someya K, Hata M, Nakajima R, Takemura M. Discovery of a small-molecule inhibitor of β-1, 6-glucan synthesis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53: 670-677.

[6] Chen L, Shen Z, Wu J. Expression, purification and *in vitro* antifungal activity of acidic mammalian chitinase against *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum* strains[J]. Clin Exp Dermatol, 2009, 34: 55-60.

[7] Odom A, Del Poeta M, Perfect J, Heitman J. The immunosuppressant FK506 and its nonimmunosuppressive analog L-685, 818 are toxic to *Cryptococcus neoformans* by inhibition of a common target protein [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41: 156-161.

[8] Onyewu C, Blankenship J R, Del Poeta M, Heitman J. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against Candida albicans, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47: 956-964.

[9] Steinbach W J, Reedy J L, Cramer R A Jr, Perfect J R, Heitman J. Harnessing calcineurin as a novel anti-infective agent against invasive fungal infections[J]. Nat Rev Microbiol, 2007, 5: 418-430.

[10] Cruz M C, Del Poeta M, Wang P, Wenger R, Zenke G, Quesniaux V F, et al. Immunosuppressive and nonimmunosuppressive cyclosporine analogs are toxic to the opportunistic fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* via cyclophilin-dependent inhibition of calcineurin[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44: 143-149.

[11] Ng C K, Obando D, Widmer F, Wright L C, Sorrell T C, Jolliffe K A. Correlation of antifungal activity with fungal phospholipase inhibition using a series of bisquaternary ammonium salts [J]. J Med Chem, 2006, 49: 811-816.

[12] Yano T, Aoyagi A, Kozuma S, Kawamura Y, Tanaka I, Suzuki Y, et al. Pleofungins, novel inositol phosphorylceramide synthase inhibitors, from *Phoma sp*. SANK 13899. Ⅰ. Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activities[J]. J Antibiot (Tokyo), 2007, 60: 136-142.

[13] Thati B, Noble A, Rowan R, Creaven B S, Walsh M, McCann M, et al. Mechanism of action of coumarin and silver(Ⅰ)-cou-

marin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans* [J]. Toxicol In Vitro, 2007, 21: 801-808.

[14] Kunze B, Steinmetz H, Höfle G, Huss M, Wieczorek H, Reichenbach H. Cruentaren, a new antifungal salicylate-type macrolide from *Byssovorax cruenta* (myxobacteria) with inhibitory effect on mitochondrial ATPase activity. Fermentation and biological properties[J]. J Antibiot (Tokyo), 2006, 59: 664-668.

[15] Perfect J R, Dismukes W E, Dromer F, Goldman D L, Graybill J R, Hamill R J, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America[J]. Clin Infect Dis, 2010, 50: 291-322.

[16] Odds F C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them[J]. J Antimicrob Chemother, 2003, 52: 1.

[17] Traboulsi R S, Mukherjee P K, Ghannoum M A. *In vitro* activity of inexpensive topical alternatives against *Candida spp*. isolated from the oral cavity of HIV-infected patients[J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 31: 272-276.

[18] Docampo R, Moreno S N. The metabolism and mode of action of gentian violet [J]. Drug Metab Rev, 1990, 22(2-3): 161-178.

[19] Quan H, Cao Y Y, Xu Z, Zhao J X, Gao P H, Qin X F, 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.

[20] Xu Y, Wang Y, Yan L, Liang R M, Dai B D, Tang R J, et al. Proteomic analysis reveals a synergistic mechanism of fluconazole and berberine against fluconazole-resistant *Candida albicans*: endogenous ROS augmentation[J]. J Proteome Res, 2009, 8: 5296-5304.

[21] An M, Shen H, Cao Y, Zhang J, Cai Y, Wang R, et al. Allicin enhances the oxidative damage effect of amphotericin B against *Candida albicans*[J]. Int J Antimicrob Agents, 2009, 33: 258-263.

[22] Ogita A, Hirooka K, Yamamoto Y, Tsutsui N, Fujita K, Taniguchi M, et al. Synergistic fungicidal activity of Cu^{2+} and allicin, an allyl sulfur compound from garlic, and its relation to the role of alkyl hydroperoxide reductase 1 as a cell surface defense in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Toxicology, 2005, 215: 205-213.

[23] Ogita A, Fujita K, Taniguchi M, Tanaka T. Dependence of synergistic fungicidal activity of Cu^{2+} and allicin, an allyl sulfur compound from garlic, on selective accumulation of the ion in the plasma membrane fraction via allicin-mediated phospholipid peroxidation[J]. Planta Med, 2006, 72: 875-880.

[24] Amber K, Aijaz A, Immaculata X, Luqman K A, Nikhat M. Anticandidal effect of *Ocimum sanctum* essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole[J]. Phytomedicine, 2010, 17: 921-925.

[25] Chamilos G, Lewis R E, Kontoyiannis D P. Lovastatin has significant activity against zygomycetes and interacts synergistically with voriconazole[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50: 96-103.

[26] Martinez L R, Moussai D, Casadevall A. Antibody to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan inhibits the release of capsular antigen[J]. Infect Immun, 2004, 72: 3674-3679.

[27] Lam J S, Mansour M K, Specht C A, Levitz S M. A model vaccine exploiting fungal mannosylation to increase antigen immunogenicity[J]. J Immunol, 2005, 175: 7496-7503.

[28] Ibrahim el-S M, Rahman A K, Isoda R, Umeda K, Van Sa N, Kodama Y. *In vitro* and *in vivo* effectiveness of egg yolk antibody against *Candida albicans* (anti-CA IgY)[J]. Vaccine, 2008, 26: 2073-2080.

[29] Breger J, Fuchs B B, Aperis G, Moy T I, Ausubel F M, Mylonakis E. Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay[J]. PLoS Pathog, 2007, 3: e18.

[本文编辑] 周燕娟,贾泽军

· 消　息 ·

中国科学院—第二军医大学转化医学研究院在沪成立

2012 年 4 月 26 日下午,“中国科学院—第二军医大学转化医学研究院”成立大会在第二军医大学隆重举行。解放军总后勤部副部长秦银河中将与中国科学院副院长张亚平院士为研究院揭牌。

新成立的转化医学研究院基于第二军医大学及其附属医院出色的医学科学研究优势和丰富的临床资源与实力,整合中国科学院强大的生命科学基础研究体系和先进的平台,以临床需求为导向,在发展转化医学的过程中体现双方优势互补,通过将研究实体建立到临床医院中,探索建立全新的转化医学研究机制和模式,促进基础研究与临床研究的紧密结合,从而实现真正意义上的临床重大“宏观”问题在实验室“具体”化(获得实验室的证实)、实验室重大“微观”科学问题在临床“宏观”化(获得临床上的验证)的临床—基础双向通道,进而实现研究院所和校院双赢、多赢,力争将共建的研究院建设成为具有重大国际影响、引领国内医学研究、促进生物医药产业发展的综合性转化医学研究机构。