

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00328

白假丝酵母菌对宿主的应激反应

康 焯, 阎 澜*, 姜远英*

第二军医大学药学院新药研究中心, 上海 200433

[摘要] 白假丝酵母菌是临床最常见的条件致病真菌之一, 近年来引起人们的广泛关注。白假丝酵母菌在侵染宿主时会遇到各种环境条件如温度、pH、渗透压及氧化损伤等的改变, 如何适应这些环境条件对白假丝酵母菌在宿主中生存及发挥其致病性至关重要。本文总结了白假丝酵母菌应对宿主的应激反应通路, 提示进一步深入研究白假丝酵母菌应激反应通路有助于发现新的抗真菌药物靶点。

[关键词] 白假丝酵母菌; 宿主与病原体相互作用; 应激

[中图分类号] R 379.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)03-0328-05

Stress response of *Candida albicans* to human hosts

KANG Ye, YAN Lan*, JIANG Yuan-ying*

New Drug R&D Center, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] *Candida albicans* (*C. albicans*), one of the most commonly-seen opportunistic fungal pathogen, has drawn great public health concern in recent years. *C. albicans* faces numerous challenges when entering human hosts, including temperature, pH, osmotic stress and oxidative damage. How to adapt to these challenges is critical to the survival and infection ability of *C. albicans*. This article summarizes the stress response pathways of *C. albicans* to human host, and it is suggested that studying the stress response pathways may help to find new antifungal targets for *C. albicans*.

[Key words] *Candida albicans*; host-pathogen interactions; stress

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(3):328-332]

白假丝酵母菌是临床常见的条件致病菌, 它在正常人体中可造成浅表感染, 在免疫缺陷患者中甚至会造成威胁生命的系统性感染^[1]。白假丝酵母菌成功发挥其致病性与应对来自宿主环境损伤(如温度、pH、渗透压及氧化损伤等)的应激反应能力是密不可分的, 本文综述了白假丝酵母菌应对宿主的应激反应通路, 为深刻理解白假丝酵母菌的致病机制, 发现新的抗真菌药物靶点提供参考。

1 氧化应激

人体组织的氧含量远低于大气, 在受到感染而产生炎症、血栓、坏死等情况下, 组织内的氧含量会进一步降低。因此白假丝酵母菌在侵袭宿主时, 除了要

外, 还要适应组织的低氧环境。白假丝酵母菌转录因子 Ace2p 可抑制氧化代谢并促进白假丝酵母菌菌丝形成^[2], 从而更好地适应缺氧环境。

Alonso-Monge 等^[3]发现, 氧化环境可以激活白假丝酵母菌高渗透压甘油应答(high osmolarity glycerol, HOG)通路。HOG 通路主要通过 Ssk1p 激酶感应和传递氧化应激调节信号, 氧化信号通过一系列磷酸化步骤活化白假丝酵母菌 HOG 基因产生应答, 缺失菌则对氧化剂如甲萘醌、过氧化氢和超氧化钾等敏感性升高。Hog1p 还可与 Mkc1p 协同调节过氧化氢酶、超氧化物歧化酶(SOD)及谷胱甘肽(GSH)还原酶等, 从而应对氧化损伤。

由碱性亮氨酸拉链(basic region leucine zipper, bZip)转录因子 Cap1p 调节的通路也是与氧化应激

[收稿日期] 2012-08-21 **[接受日期]** 2012-12-24

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(31000079), 上海市基础研究重点项目(10JC1417500). Supported by National Natural Science Foundation of China for Young Scientists (31000079) and Program on Key Basic Research Project of Shanghai (10JC1417500).

[作者简介] 康 焯, 硕士生. E-mail: kangye1011@163.com

* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-81871359, E-mail: ylan20001228@sina.com; Tel: 021-81871357, E-mail: jiangyycn@yahoo.com.cn

密切相关的信号通路。Zhang 等^[4]发现 Cap1p 调控靶基因的机制是核定位机制,即在通常状态下, Cap1p 弥散在胞质和胞核,当受到氧化刺激时, Cap1p 发生定位转移,聚积在胞核,激活靶基因 *GLR1* 等的转录。

Enjalbert 等^[1]将白假丝酵母菌暴露在 5 mmol/L 过氧化氢中,发现有 347 个基因的表达发生改变,其中许多基因与过氧化氢解毒作用相关,如 *SOD2*、硫氧还原蛋白酶(*TSA1*、*TRX1*、*TRR1*)、谷氧原蛋白系统(*GPX1*、*GSH1*)等。*CTA1* 作为编码抗氧化蛋白酶——过氧化氢还原酶的关键基因,过表达尤为明显。

2 药物应激

目前临床常用的抗真菌药物主要有以下几类:(1)唑类,通过抑制细胞色素 P450 羊毛甾醇-14 α -去甲基化酶(*Erg11p*)阻断真菌细胞膜中麦角固醇的生物合成,使细胞膜成分发生变化,细胞膜通透性改变,导致胞内重要物质渗漏,从而抑制真菌生长^[5];(2)多烯类,如两性霉素 B,通过与真菌细胞膜上的麦角固醇结合,在真菌细胞膜上产生多孔,使胞内液中的重要物质外溢而导致真菌细胞死亡^[6];(3)5-氟胞嘧啶,能够通过真菌细胞的酶系统转变为氟尿嘧啶,替代尿嘧啶进入真菌的脱氧核糖核酸中,竞争性地干扰真菌 DNA 合成^[7];(4)棘白菌素类,如卡泊芬净,通过非竞争性抑制 β -1,3-葡聚糖合成酶破坏真菌细胞壁结构,使细胞破裂而死亡^[8]。

Liu 等^[9]实验表明,在酮康唑(KTZ)作用下,麦角固醇合成相关基因被诱导表达以应对麦角固醇的缺失。药物外转运相关基因 *MDR1*、*CDR1*、*CDR2* 也在唑类药物刺激下表达上调,促进药物从胞内泵出胞外,使胞内药物浓度降低,导致真菌产生耐药。其他应激相关基因如 *IFD4*、*DDR48* 等也有不同程度的高表达。另外,钙调磷酸酶及 *Hsp90p* 也与白假丝酵母菌对唑类药物的耐药性有关^[10-11]。

在两性霉素 B 作用下, Ca^{2+} 、 K^{+} 、 Na^{+} 、 Zn^{2+} 及硫酸盐转运相关基因表达上调,这些基因可以帮助白假丝酵母菌摄取胞外的 K^{+} 、 Na^{+} 等;反之, H^{+} 、柠檬酸盐、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 等转运相关基因表达下调^[6]。同时下调的还有 *ERG26*、*ERG11*、*ERG9* 等麦角固醇合

成通路相关基因,*FEN12*、*FAS1*、*ACB1* 等脂肪酸合成基因以及磷脂合成基因 *CHO2* 和 *OPI3*^[9],推测白假丝酵母菌可能通过下调这些基因来改变细胞中的固醇类型以应对两性霉素 B 产生的损害。

对 5-氟胞嘧啶的应激可能与尿嘧啶磷酸核糖基转移酶(*Fur1p*)突变使 5-氟尿嘧啶不能转变为 5-氟尿糖苷磷酸盐有关^[6]。环腺苷酸-蛋白激酶 A (*cAMP*-PKA)通路也可对药物压力产生应答,如腺苷酸环化酶 *CDC35* 突变菌可引起 *CDR1* 表达上调^[12]。Baixench 等^[8]研究表明,白假丝酵母菌 β -1,3-葡聚糖合酶亚基 *GSC1* 突变可对棘白菌素类产生抗药作用。此外,PKC 通路也可通过调节葡聚糖合成和细胞壁修复,对棘白菌素类以及唑类抗真菌药物引起的细胞壁、细胞膜压力等进行应答^[13]。

3 渗透应激

HOG 通路是白假丝酵母菌 MAPK 级联系统的一条重要通路,对于白假丝酵母菌在高渗透条件下的生长是必需的,该通路主要由双组分蛋白 *Ssk1p* 和 *Skn7p* 调节。白假丝酵母菌在等渗环境下,磷酸化的 *Ssk1p* 阻碍下游区蛋白进一步活化;而在高渗透环境下,*Ssk1p* 去磷酸化使 *Ssk2p* 激活,随后依次激活 *Ssk2* MAPKKK、*Pbs2* MAPKK 及 *Hog1* MAPK,*Hog1* 磷酸化并聚集在核内调控相关基因表达^[1]。

Enjalbert 等^[14]研究发现,在 0.3 mmol/L 氯化钠作用下,95 个基因被诱导表达,包括糖转运蛋白(*STL1*、*IPF4181*、*IPF12946*)、阳离子转运蛋白(*ENA22*、*ENA21*)和丙三醇积聚相关蛋白(*GPD2*、*RHR2*)等。其中 *HSP12* 和 *RHR2* 基因可能作为 HOG 通路的调节靶基因而参与渗透应激。

细胞壁的完整性可以改变胞内渗透压,因此蛋白激酶 C 细胞壁完整性(*Mkc1p*)通路可能对渗透应激也有影响^[15]。

4 pH 应激

环境 pH 可影响白假丝酵母菌蛋白质的活化、质子梯度的维持以及营养物质的获取,白假丝酵母菌能够感知并对环境中 pH 变化做出应答。*Rim101p* 信号转导通路是白假丝酵母菌应对碱性

pH 的重要通路。当环境中的 pH 由酸性变为碱性时,全长无活性的 Rim101p 在 Rim13p 的辅助下激活并调节相关基因的表达^[16]。活化的 Rim101p 可调节下游的靶基因表达,如铁还原酶蛋白可在碱性条件下被宿主储存起来的 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} , 供白假丝酵母菌细胞利用^[17]; Als3 可与细胞内铁蛋白结合,促进白假丝酵母菌在低铁的碱性环境生存^[18]。

Kullas 等^[19]发现, Mds3p 参与了一条与 Rim101p 通路平行的 pH 应答通路,但具体机制未阐明,同时 Mds3p 也是白假丝酵母菌生物被膜形成所必需,提示该蛋白可能对真菌致病性有重要作用。

钙调磷酸酶及其脱磷酸生成的转录因子 Crz1p 也被认为与白假丝酵母菌适应碱性环境有关。钙调磷酸酶/Crz1p 主要调控体内的离子平衡,当钙调磷酸酶脱磷酸化后, Crz1p 转位入核,激活下游基因 *CCH1*、*MID1* 等,通过调控 Ca^{2+} 内流促进碱性 pH 下菌丝生长^[20]。

目前,白假丝酵母菌应对酸性 pH 压力的通路尚不明确, Mira 等^[21]研究发现酿酒酵母中 *Rim101* 缺失菌对醋酸盐和丙酸盐的敏感性上升,提示 Rim101p 通路可能涉及白假丝酵母菌对酸性环境的应答。Naglik 等^[22]研究表明 Sap5 在口腔、阴道等酸性模型中表达并产生致病性,且受 Rim101p 通路调控。

5 血清应激

人体血清中的固有免疫系统、碱性 pH 环境、离子成分以及低营养都对白假丝酵母菌的生存构成威胁,白假丝酵母菌必须适应血清环境才能在血液传播。钙调磷酸酶对白假丝酵母菌在血清中的生存是必需的。Blankenship 等^[23]实验表明,血清对钙调磷酸酶 *CNB1* 缺失菌株产生致命毒性。研究还发现,在血清环境中,白假丝酵母菌的糖酵解、乙醛酸循环和脂肪酸代谢等过程相关基因表达上调,钙调磷酸酶促使白假丝酵母菌在血清中的生存是否与调节这些过程有关非常值得研究。

血清的温度和高 pH 均可刺激白假丝酵母菌由酵母态到菌丝态的转变,这一过程主要由 cAMP-PKA 通路中的 Efg1p 调控^[24]。另外, *THR1* 缺失菌也被证实对血清的敏感性上升^[25], *DDR48* 缺失菌影

响白假丝酵母菌在血清中形成正常的菌丝^[26]。

6 温度应激

人体温度接近 37°C , 不适于白假丝酵母菌生存,白假丝酵母菌可通过其形态的改变,即由酵母态转变为菌丝态来适应温度的变化。热休克转录因子 Hsf1 是白假丝酵母菌中的“恒温器”,它可以通过调节必需的分子伴侣水平维持白假丝酵母菌自身的热稳态平衡。当白假丝酵母菌侵染宿主时,磷酸化的 Hsf1 因子诱导含 HSE(heat shock element)的基因表达,增加相应蛋白的合成,如热休克蛋白(HSPs)^[27]。Hsf1-HSE 调节子在温度超过 30°C 时才会被激活,并且不受其他环境压力的影响。在受到热休克或暴露于其他形式的环境压力时,许多细胞内蛋白会发生部分或全部变性,此时 HSPs 可识别暴露于变性蛋白表面的疏水性区域,协助它们进行重新折叠,或者将无法恢复的蛋白质转移给蛋白质降解系统,使之降解,从而避免细胞进一步受到伤害。

cAMP-PKA 通路对白假丝酵母菌中的菌丝生长有重要作用。当温度升高时,鸟嘌呤交换因子 Cdc25p 和腺苷酸环化酶 Cdc35p 可接受刺激激活 RAS1 通路,该通路与 Cap1p 蛋白共同增加细胞内 cAMP 水平^[28],进而激活 PKA 通路催化亚基 Tpk1 和 Tpk2。在 25°C 时, cAMP-PKA 通路被 Hsp90p 抑制, Tpk1 和 Tpk2 与 Hsp90p 结合呈无活性状态,此时白假丝酵母菌为酵母态生长;当温度升高时, Hsp90p 作为热休克蛋白被激活,但其分子伴侣功能受到抑制, Tpk1 和 Tpk2 从 Hsp90p 中释放出来,促进白假丝酵母菌菌丝形成。在鼠的全身感染模型中已证实 HSP90 缺失会导致白假丝酵母菌在温度升高时毒性减弱^[23]。

Efg1 是 APSES 转录调节器家族的一员,它在 PKA 通路调节菌丝生长中起重要作用,但 *EFG1* 缺失菌在 37°C 时仍可观察到菌丝生长,提示 PKA 信号通路下游其他因子如 Sfl1p 等可能与温度应激有关^[29]。

7 小结

白假丝酵母菌可通过多种应激反应来适应宿主

体内环境的变化,这些应激反应间是相互关联的:HOG 通路可同时调节白假丝酵母菌渗透应激、氧化应激和重金属应激,Cap1p 可调节氧化应激和药物应激,Hsp90p 可参与白假丝酵母菌的抗药性和温度应激,钙调磷酸酶可提高白假丝酵母菌的抗药性并促进其在血清中生长^[30-31]。进一步深入研究白假丝酵母菌应激反应通路有助于我们深刻理解白假丝酵母菌的致病机制,更有助于我们发现新的抗真菌药物靶点。

8 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] Enjalbert B, Smith D A, Cornell M J, Alam I, Nicholls S, Brown A J, et al. Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*[J]. *Mol Biol Cell*, 2006, 17:1018-1032.
- [2] Mulhern S M, Logue M E, Butler G. *Candida albicans* transcription factor Ace2 regulates metabolism and is required for filamentation in hypoxic conditions[J]. *Eukaryot Cell*, 2006, 5:2001-2013.
- [3] Alonso-Monge R, Navarro-García F, Román E, Negro A I, Eisman B, Nombela C, et al. The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamyospore formation in *Candida albicans*[J]. *Eukaryot Cell*, 2003, 2:351-361.
- [4] Zhang X, De Micheli M, Coleman S T, Sanglard D, Moye-Rowley W S. Analysis of the oxidative stress regulation of the *Candida albicans* transcription factor, Cap1p[J]. *Mol Microbiol*, 2000, 36:618-629.
- [5] Calderone R A. *Candida* and candidiasis[M]. Washington: ASM Press, 2002:349-383.
- [6] Cannon R D, Lamping E, Holmes A R, Niimi K, Tanabe K, Niimi M, et al. *Candida albicans* drug resistance-another way to cope with stress[J]. *Microbiology*, 2007, 153(Pt 10):3211-3217.
- [7] Akins R A. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*[J]. *Med Mycol*, 2005, 43:285-318.
- [8] Baixench M T, Aoun N, Desnos-Ollivier M, Garcia-Hermoso D, Bretagne S, Ramires S, et al. Acquired resistance to echinocandins in *Candida albicans*: case report and review [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 59:1076-1083.
- [9] Liu T T, Lee R E, Barker K S, Lee R E, Wei L, Homayouni R, 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.
- [10] Singh S D, Robbins N, Zaas A K, Schell W A, Perfect J R, Cowen L E. Hsp90 governs echinocandin resistance in the pathogenic yeast *Candida albicans* via calcineurin [J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5:e1000532.
- [11] Uppuluri P, Nett J, Heitman J, Andes D. Synergistic effect of calcineurin inhibitors and fluconazole against *Candida albicans* biofilms[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52:1127-1132.
- [12] Jain P, Akula I, Edlind T. Cyclic AMP signaling pathway modulates susceptibility of *Candida* species and *Saccharomyces cerevisiae* to antifungal azoles and other sterol biosynthesis inhibitors [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47:3195-3201.
- [13] LaFayette S L, Collins C, Zaas A K, Schell W A, Betancourt-Quiroz M, Gunatilaka A A, et al. PKC signaling regulates drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans* via circuitry comprised of Mkc1, calcineurin, and Hsp90 [J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6:e1001069.
- [14] Enjalbert B, Nantel A, Whiteway M. Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: absence of a general stress response[J]. *Mol Biol Cell*, 2003, 14:1460-1467.
- [15] Román E, Arana D M, Nombela C, Alonso-Monge R, Pla J. MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence[J]. *Trends Microbiol*, 2007, 15:181-190.
- [16] Davis D A, Wilson R B, Mitchell A P. RIM101-dependent and-independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20:971-978.
- [17] Baek Y U, Li M, Davis D A. *Candida albicans* ferric reductases are differentially regulated in response to distinct forms of iron imitation by the Rim101 and CBF transcription factors[J]. *Eukaryot Cell*, 2008, 7:1168-1179.
- [18] Almeida R S, Brunke S, Albrecht A, Thewes S, Laue

- M, Edwards J E, et al. The hyphal-associated adhesin and invasion Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin[J]. *PLoS Pathog*, 2008, 4: e1000217.
- [19] Kullas A L, Martin S J, Davis D. Adaptation to environmental pH, integrating the Rim101 and calcineurin signal transduction pathways[J]. *Mol Microbiol*, 2007, 66: 858-871.
- [20] Wang H, Liang Y, Zhang B, Zheng W, Xing L, Li M. Alkaline stress triggers an immediate calcium fluctuation in *Candida albicans* mediated by Rim101p and Crz1p transcription factors[J]. *FEMS Yeast Res*, 2011, 11: 430-439.
- [21] Mira N P, Lourenço A B, Fernandes A R, Becker J D, Sá-Correia I. The RIM101 pathway has a role in *Saccharomyces cerevisiae* adaptive response and resistance to propionic acid and other weak acids[J]. *FEMS Yeast Res*, 2009, 9: 202-216.
- [22] Naglik J R, Moyes D, Makwana J, Kanzaria P, Tsihklaki E, Weindl G, et al. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis[J]. *Microbiology*, 2008, 154(Pt 11): 3266-3280.
- [23] Blankenship J R, Wormley F L, Boyce M K, Schell W A, Filler S G, Perfect J R, et al. Calcineurin is essential for *Candida albicans* survival in serum and virulence [J]. *Eukaryot Cell*, 2003, 2: 422-430.
- [24] Shapiro R S, Uppuluri P, Zaas A K, Collins C, Senn H, Perfect J R, et al. Hsp90 orchestrates temperature-dependent *Candida albicans* morphogenesis via Ras1-PKA signaling[J]. *Curr Biol*, 2009, 19: 621-629.
- [25] Kingsbury J M, McCusker J H. Fungal homoserine kinase (thr1Delta) mutants are attenuated in virulence and die rapidly upon threonine starvation and serum incubation[J]. *Eukaryot Cell*, 2010, 9: 729-737.
- [26] Dib L, Hayek P, Sadek H, Beyrouthy B, Khalaf R A. The *Candida albicans* Ddr48 protein is essential for filamentation, stress response, and confers partial antifungal drug resistance [J]. *Med Sci Monit*, 2008, 14: BR113-BR121.
- [27] Nicholls S, Leach M D, Priest C L, Brown A J. Role of the heat shock transcription factor, Hsf1, in a major fungal pathogen that is obligately associated with warm-blooded animals [J]. *Mol Microbiol*, 2009, 74: 844-861.
- [28] Fang H M, Wang Y. RA domain-mediated interaction of Cdc35 with Ras1 is essential for increasing cellular cAMP level for *Candida albicans* hyphal development [J]. *Mol Microbiol*, 2006, 61: 484-496.
- [29] Song W, Wang H, Chen J. *Candida albicans* Sfl2, a temperature-induced transcriptional regulator, is required for virulence in a murine gastrointestinal infection model[J]. *FEMS Yeast Res*, 2011, 11: 209-222.
- [30] Chaves G M, Silva W P. Superoxide dismutases and glutaredoxins have a distinct role in the response of *Candida albicans* to oxidative stress generated by the chemical compounds menadione and diamide[J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2012, 107: 998-1005.
- [31] Miramón P, Dunker C, Windecker H, Bohovych I M, Brown A J, Kurzai O, et al. Cellular responses of *Candida albicans* to phagocytosis and the extracellular activities of neutrophils are critical to counteract carbohydrate starvation, oxidative and nitrosative stress [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e52850.

[本文编辑] 孙岩