

颗粒溶素肽对白念珠菌的毒性作用

陈孙孝¹, 温海¹, 邓安梅^{2*}, TAO Shiyong³, ZHENG Hanson³

(1. 第二军医大学长征医院皮肤性病科, 上海 200003; 2. 长征医院实验诊断科; 3. 美国斯坦福大学医学院皮肤科, 加利福尼亚州 94305)

[摘要] **目的:** 研究颗粒溶素肽对白念珠菌的毒性作用。 **方法:** 将白念珠菌和不同浓度的颗粒溶素肽混合培养后, 计算沙氏琼脂培养基平板上白念珠菌菌落数。采用标准微量稀释法测定颗粒溶素肽以及氟康唑(FCZ)对白念珠菌的最低抑菌浓度(MIC)。 **结果:** 当相应于颗粒溶素第2和第3个螺旋的肽段G2和G3浓度达到20 μg/ml时, 对白念珠菌产生较强的细胞毒性, 形成的平均菌落数分别从883、937降到203、218, 而G1、G4、G5肽段浓度达到40 μg/ml时, 也不能明显减少白念珠菌平均菌落数。3株标准白念珠菌株对颗粒溶素肽均较为敏感, MIC分别为26、22、29 μg/ml, 而对FCZ的MIC分别为4、20、128 μg/ml。 **结论:** 颗粒溶素肽对白念珠菌具有细胞毒性, 是人体内天然存在的抗真菌感染物质之一, 具有潜在的药物开发意义。

[关键词] 颗粒溶素; 白念珠菌; 最低抑菌浓度

[中图分类号] R 977.4; R 379.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)02-0140-03

Cytotoxic effects of granulysin on *Candida albicans*

CHEN Sun-xiao¹, WEN Hai¹, DENG An-mei^{2*}, TAO Shiyong³, ZHENG Hanson³ (1. Department of Dermatology and Venereology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Laboratory Diagnosis, Changzheng Hospital; 3. Department of Dermatology, Medical School, Stanford University, California 94305, USA)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the cytotoxic effects of granulysin on *Candida albicans*. **Methods:** *Candida albicans* were cultured with different concentrations of granulysin peptides and the colonies of *Candida albicans* on Sabouraud dextrose agar were calculated. Broth microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentrations (MIC) of granulysin and fluconazole on *Candida albicans*. **Results:** When granulysin peptides 2 and 3 (corresponding to G2 and G3 peptides) were at 20 μg/ml, the average colonies of *Candida albicans* decreased from 838 and 927 to 203 and 218, respectively; G1, G4 and G5 did not reduce the average colony of *Candida albicans* even at 40 μg/ml. Three strains of *Candida albicans* were sensitive to granulysin, with their MICs being 26, 22, 29 μg/ml, and their MICs to fluconazole were 4, 20 and 128 μg/ml. **Conclusion:** Granulysin has cytotoxic effects on *Candida albicans* and is one of the natural anti-fungi proteins in human body; it has a promising future for anti-fungi drug development.

[KEY WORDS] granulysin; *Candida albicans*; minimum inhibition concentration

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(2): 140-142]

颗粒溶素(granulysin, GNLY)是人细胞毒性T细胞(CTL)和天然杀伤细胞(NK)表达的一种阳离子肽^[1], 对革兰阴性和革兰阳性菌均有杀伤作用, 包括结核杆菌、沙门杆菌、大肠杆菌等等。GNLY属于皂素样蛋白(sapoin-like protin, SAPLIP)家族, 近1亿年来在许多生物中呈高度保守状态。该家族包括NK溶素(一种从猪小肠中分离出的溶解性分子)、阿米巴溶素(阿米巴用于杀菌的分子)和皂素。天然产生的GNLY是相对分子质量为15 000的分子, 在细胞内被降解为9 000。GNLY含5个α螺旋, 其间由短环状结构隔开。分子中有4个半胱氨酸残基, 形成2个分子内二硫键^[2]。

研究表明, GNLY在人细胞免疫反应中起重要

作用^[3]。T淋巴细胞分泌GNLY以杀灭胞外和胞内的结核杆菌, 后者还需要穿孔素的协同。在麻风病患者皮肤活检中, 结节型麻风患者表达GNLY的T细胞数目高于瘤型麻风患者的6倍, 提示GNLY可控制麻风菌的扩散。而在2种麻风患者的皮肤活检中, 穿孔素的表达类似。在预后差的肿瘤患者中, NK细胞表达的GNLY显著低于预后好或健康个体。在肾移植患者中, PBL和肾活检中GNLY水平升高与急性排斥及移植物预后差有关。

[基金项目] 上海市青年科技启明星计划(QMX01423)。Supported by Shanghai Rising Star Program(QMX01423)。

[作者简介] 陈孙孝, 博士, 讲师、主治医师。

* Corresponding author. E-mail: amdeng70@yahoo.com

本研究观察了颗粒溶素肽对白念珠菌的毒性作用,并与一般抗真菌药物进行比较,为进一步开发颗粒溶素肽的抗微生物活性提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 氟康唑(FCZ, Sigma, 纯度 > 98.8%)用无菌蒸馏水配制成 3 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的贮存液,分装至 1.5 ml Eppendorf 管中,置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱贮存备用。颗粒溶素来源的短肽由 Applied Biosystems 公司合成,经反相 HPLC 验证,纯度 > 95%。其序列分别为: G1, GRD YRT SLT IVQ KLK KMV D; G2, QRS VSN AAT RVC RT; G3, RDV CRN FMR R; G4, QSR VIQ GLV; G5, QQI CED。

3 株白念珠菌标准菌株 ATCC76615:09、ATCC76615:108、ATCC76615:19,其中已知 ATCC76615:09 对 FCZ 敏感,ATCC76615:108 对 FCZ 中度敏感,ATCC76615:19 对 FCZ 耐药。

RPMI 1640 培养液: RPMI 1640 粉 10.4 g,三氮吗啡啉丙磺酸(MOPS) 34.53 g,蒸馏水 900 ml,调节 pH 为 7.0,加蒸馏水至 1 000 ml,0.2 μm 滤器(Sigma)滤过除菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。(2)改良沙氏琼脂培养基:葡萄糖 40.0 g,蛋白胨 10.0 g,琼脂 20.0 g,蒸馏水 1 000 ml,氯霉素 0.05 mg/ml,高压灭菌。

1.2 颗粒溶素肽对白念珠菌的毒性作用 用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4,含 0.03%的沙氏培养基)将白念珠菌稀释至 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 。而后将 25 μl 的白念珠菌和 25 μl 不同浓度(5、10、20、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的颗粒溶素肽混合,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 3 h 后,用磷酸盐缓冲液以 1:100 稀释培养物,取 50 μl 涂布于沙氏琼脂培养基平板,在 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后,计算白念珠菌菌落数($n=3$,取平均值)。

1.3 NCCLS M27-A 微量稀释法药敏试验

1.3.1 微量药敏板制备 将配制好的 GNLY 肽和 FCZ 药物贮存液用 RPMI 1640 培养液做稀释液进行 10 级倍比稀释,起始浓度为 128 $\mu\text{g}/\text{ml}$,终末浓度为 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$,以上各药浓度均为 2 倍应测试药物浓度。将稀释好的药液对应加在无菌 96 孔 U 形底微量培养板的孔中,从第 1 孔至第 10 孔浓度由高到低,每孔 100 μl 。第 11、12 孔加不含药液的 RPMI 1640 培养液,其中 11 孔为生长对照,12 孔为空白对照。加毕药敏板用铝箔纸密封后放置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保藏

备用。

1.3.2 菌液制备及接种 将受试菌在沙氏琼脂培养基上连续转种 2 次,以保证其纯度和活力。取经 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 的菌落,用无菌生理盐水制成菌悬液并用 RPMI 1640 培养液调整菌浓度为 $(1\sim 5) \times 10^3$ CFU/ml(2 倍菌接种液浓度)。将冷冻的药敏板按 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、室温各 1 h 的融化程序融化后置超净工作台上,用微量移液器以从第 11 孔至第 1 孔的顺序每孔加 100 μl 菌悬液(此时各孔药液和菌悬液均分别达到应测试的浓度),第 12 孔不加。

1.3.3 培养及结果判定 接种后的药敏板置 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 湿盒温育,分别于培养 24、48、72 h 观察受试菌生长情况,于 48 h 读取结果。视觉法判定终点:96 孔培养板各孔充分混匀后与生长对照孔比较,生长完全抑制,培养基清亮所对应的最低药物浓度为颗粒溶素的最低抑菌浓度(MIC);唑类药物则以 80% 生长抑制(IC_{80} , 40 μl 生长对照稀释至 160 μl 培养基中产生的浊度)所对应的最低药物浓度为其 MIC。

2 结果

2.1 颗粒溶素肽对白念珠菌的细胞毒性 结果表明,当相应于颗粒溶素第 2 和第 3 个螺旋的肽段 G2 和 G3 浓度达到 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,对白念珠菌产生较强的细胞毒性,形成的菌落数分别从 883、937 降到 203、218,提示颗粒溶素对白念珠菌的细胞毒性与第 2 和第 3 个螺旋的序列有关。见图 1。

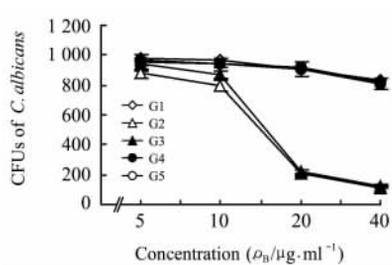


图 1 颗粒溶素肽对白念珠菌的毒性作用

Fig 1 Cytotoxic effects of granulyisin on *Candida albicans*

2.2 白念珠菌对抗真菌药物的敏感性 结果显示, MIC 波动范围不超过一个药物浓度梯度,且从已知对 FCZ 分别为耐药、中度敏感和敏感的 3 株标准菌株的重复测定结果显示, MIC 分别是 4、20、128 $\mu\text{g}/\text{ml}$,均在 NCCLSM27-A 中公布的 FCZ 药敏

分界点标准范围内,即:耐药 $\geq 64 \mu\text{g/ml}$,剂量依赖性敏感 $16\sim 32 \mu\text{g/ml}$,敏感 $\leq 8 \mu\text{g/ml}$,证实了 NCCLS M27 方案的可重复性和结果的一致性。而颗粒溶素对白念珠菌标准菌株 ATCC76615:09、ATCC76615:108、ATCC76615:19 的 MIC 分别是 26、22、29 $\mu\text{g/ml}$,提示颗粒溶素与 FCZ 的杀真菌机制有所不同,值得进一步研究。

3 讨论

有关阳离子多肽杀伤微生物的机制尚不十分明确。目前学者们已对一些阳离子肽的潜在治疗性开展研究。短杆菌肽 S6 和多黏菌素 B,是从细菌中分离的阳离子肽,可用于软膏和溶液。但这些制剂毒性较大,限制了它们的系统性应用。而用甲烷磺酸中和多黏菌素 B,则成为一种前体药物盐酸多黏菌素 E,可被系统性应用。随着日益严重的细菌耐药性,越来越需要作为人体治疗用的抗微生物肽。目前进入商业化的抗微生物肽有:(1)Pexiganin,一种蛙蛋白爪蟾抗菌肽提取物,用于治疗糖尿病性足部溃疡的感染;(2)IB-367,一种猪蛋白溶菌素的类似物,用于治疗黏膜炎;(3)BPI(细菌渗透性增加蛋白),用于治疗隐球菌性脑膜炎。

颗粒溶素是一种人抗菌性多肽,带阳性电荷,与磷脂结合^[4]。GNLY 与穿透素(perforin)、颗粒酶(granzyme)共同存在于人 CTL 和 NK 细胞的细胞毒性颗粒中。GNLY 是一种极具应用前景的抗微生物肽。它是人体内极少几种阳离子抗微生物肽之一,是在天然免疫反应中起重要作用的 CTL 和 NK 细胞产生的、目前发现的惟一一种抗微生物肽;它快速杀伤许多微生物,并且既能杀胞外菌,也能杀胞内菌;GNLY 序列不同于以前研究的其他阳离子肽,部分 GNLY 来源肽段在高离子强度环境中仍具有活性。

本研究参照美国国家临床实验室标准化委员会(NCCLS)关于《酵母菌液基稀释法抗真菌药物敏感性试验参考方案》(NCCLS M27-A)对标准念珠菌株采用培养液微量稀释法技术系统测定了对颗粒溶素肽的敏感性,旨在研究白念珠菌对颗粒溶素肽的

MIC,探讨颗粒溶素对白念珠菌的细胞毒性。在培养基及其 pH、缓冲液、菌接种液浓度以及培养温度都固定的情况下,影响 MIC 的主要因素包括培养时间及终点判读标准。由于念珠菌的生长特性和抗真菌药物自身的基本特性如溶解度、化学稳定性、抑菌或杀菌活性,因而终点判读时间为 48 h;FCZ 等唑类药物由于其抑菌活性,在培养过程中真菌尚未完全抑制前在较宽的浓度范围内均产生部分抑菌,出现拖尾现象(phenomenon of tailing),造成终点判读困难,为此规定了 80% 生长抑制的判读标准,而颗粒溶素作为杀菌剂,无拖尾现象,终点判读较容易,其判读标准则为 100% 生长抑制。

本研究结果表明,相应于颗粒溶素第 2 和第 3 个螺旋的肽段 G2 和 G3 浓度达到 20 $\mu\text{g/ml}$ 时,对白念珠菌产生较强的细胞毒性,提示颗粒溶素对白念珠菌的细胞毒性与第 2 和第 3 个螺旋的序列有关。而有研究表明,在此浓度,颗粒溶素肽对哺乳动物细胞不具有毒性^[5]。3 株白念珠菌对颗粒溶素均较为敏感,MIC 分别为 26、22、29 $\mu\text{g/ml}$ 。这可作为进一步开发利用颗粒溶素的依据,将有助于研究真菌感染免疫中的分子、细胞作用机制,促进困扰临床的反复感染、多耐药性难题的解决。

[参考文献]

- [1] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms [J]. *Nature*, 2002, 415: 389-395.
- [2] Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin [J]. *Science*, 1998, 282: 121-125.
- [3] Sarwal MM, Jani A, Chang S, et al. Granulysin expression is a marker for acute rejection and steroid resistance in human renal transplantation [J]. *Hum Immunol*, 2001, 62: 21-31.
- [4] Ernst WA, Thoma-Uszynski S, Teitelbaum R, et al. Granulysin, a T cell product, kills bacteria by altering membrane permeability [J]. *J Immunol*, 2000, 165: 7102-7108.
- [5] Deng A, Chen S, Li Q, et al. Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator [J]. *J Immunol*, 2005, 174: 5243-5248.

[收稿日期] 2005-09-22

[修回日期] 2005-12-13

[本文编辑] 尹 茶