

烟曲霉胶霉毒素的研究进展

周万青 沈瀚 张之烽 张葵

(南京大学医学院附属鼓楼医院检验科, 南京 210008)

【摘要】 胶霉毒素作为烟曲霉产生的真菌毒素之一, 对哺乳动物细胞具有免疫抑制及促凋亡作用。其通过抑制 NAPDH 氧化酶活性进而抑制粒细胞抗微生物作用。在侵袭性曲霉病动物模型和临床确诊患者血清中均可检测到胶霉毒素, 预示其可作为曲霉病诊断指标。本文将从胶霉毒素合成的操控基因组成、分布、致病性及临床检测前景予以综述。

【关键词】 烟曲霉; 胶霉毒素; 免疫抑制; 毒力因子

【中图分类号】 R 379.6 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1673-3827(2011)02-0118-04

多细胞型真菌多呈丝状, 分支交织成团, 称为丝状菌。这种真菌一般可产生一系列小分子次级代谢产物, 如抗生素、羟甲基戊二酰辅酶 A (hydroxymethylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA) 还原酶抑制剂、毒素等。其中, 具有毒副作用的代谢产物又称真菌毒素。侵袭性曲霉病 (invasive aspergillosis, IA) 是由丝状真菌中的曲霉侵入深部组织所引起的真菌感染性疾病。IA 主要发生在免疫受损人群, 急性白血病、骨髓干细胞移植、实体器官移植、长期化疗、糖皮质激素的应用以及艾滋病都是 IA 的危险因素^[1]。烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*, Af) 作为 IA 最常见的病原菌, 可产生很多免疫抑制性真菌毒素, 例如胶霉毒素 (gliotoxin, GT)、烟曲霉素、烟曲霉酸、烟曲霉溶血素等^[2]。这些毒素在对中性粒细胞的迁移、超氧化物的产生以及杀真菌素的产生均有抑制作用, 其中 GT 的作用最强。然而, 对于 GT 是否为烟曲霉的毒力因子目前并无定论。本文就烟曲霉 GT 的研究进展予以综述。

1 胶霉毒素合成的操控基因及分布

2004年, Gardiner等^[3]在 Af 基因组中发现一组由 12个基因组成的基因簇, 其序列与在十字花科小球腔菌 (*Leptosphaera maculans*) 中发现的刺串

孢素 (sirodesmin) 十分相似, 同样为表聚硫代哌嗪二酮 (epipolythiodioxopiperazine, ETP) 毒素。通过比较基因组学研究证实, 这个由 12个基因组成的簇就是操控 GT 合成的基因。在烟曲霉野生型 A 293株中这段基因全长 28 kb 与 sirodesmin 具有 8个同源基因。所组成的 12个基因分别是: 锌指转录因子 (glZ)、氨基环丙烷羧酸合酶 (glL)、二肽酶 (glJ)、肽合成酶 (glP)、两个细胞色素 P450 单加氧酶 (glC 和 glF)、邻甲基转移酶 (glM)、谷胱甘肽 S 转移酶 (glG)、假设蛋白 (glK)、转运蛋白 (glA)、甲基转移酶 (glN) 和硫氧还蛋白还原酶 (glT)。Gardiner 等根据基因组序列及 GT 的合成时相推测: GT 合成过程中有 6个酶促反应。GT 是由二硫键交叉哌嗪二酮所形成的一个环肽结构, 其分子量为 326 Da。ETP 家族成员发挥毒副作用主要通过二硫键, 巯基与靶蛋白的交联进而灭活该蛋白活性, 并能通过氧化还原循环产生具有毒害的活性氧 (reactive oxygen species, ROS)。其所发挥的免疫抑制、致凋亡及致细胞坏死作用曾一时被认为可用于肿瘤的治疗^[4]。

造成 IA 的主要病原菌包括烟曲霉、土曲霉 (*Aspergillus terreus*)、黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 以及黑曲霉 (*Aspergillus niger*)。一项对三级护理肿瘤中心罹患 IA 的患者调查研究显示, 93% 的烟曲霉为 GT 产毒株^[5]。基因组研究显示, 除了烟曲霉外, 土曲霉、黄曲霉和黑曲霉同样具有 GT 基因^[6], 不同的是土曲霉与黄曲霉缺失 glN。虽然这些曲霉均可产生 GT, 但并不是每个分离株都能产

作者简介: 周万青, 男 (汉族), 硕士, 技师。E-mail: zwq_0961@yahoo.com.cn
通讯作者: 张葵, E-mail: zhanku@yahoo.com.cn

生。环境分离株与临床患者分离株中产毒株的分离率也存在差异。最近研究发现,产生 GT 的 A f 分离株随着地理区域和 (或) 患者基础疾病的不同而存在差异^[7]。一项对环境分离 A f 产毒株的调查显示其产毒株分离率只有 11%^[8]。而对肿瘤中心患者的调查显示黑曲霉的产毒株分离率为 75%, 高于土曲霉 (25%), 而黄曲霉的产毒株分离率只有 4%^[5]。而且, A f 产生 GT 的量明显高于其他曲霉。另外在其他真菌如假丝酵母属、青霉属及木霉属也有该毒素的产生^[9]。

2 胶霉毒素的致病机制

最初研究发现 GT 通过抑制逆转录酶活性进而抑制病毒 RNA 的复制^[10]。其作用的发挥主要依赖二硫键桥,若去除硫原子或应用还原性二硫苏糖醇则可完全阻断这种抑制作用;此外其特殊结构特点也决定了它免疫抑制作用的发挥。其毒性作用机制主要包括二硫键桥联和 ROS 的产生两种方式。例如 GT 可与肌酸激酶中邻近的两个半胱氨酸形成混合二硫键,而该作用可以采用还原剂逆转。还原状态的 GT 可自发的氧化至二硫化物形式并产生 ROS。另外,钙的内流在 GT 毒副作用的发挥中扮演间接作用的角色,GT 可致胸腺细胞内钙离子水平不断上升而使细胞坏死。该作用是由于其可与细胞质膜上氧化还原敏感性钙离子通道相互作用^[2]。GT 通过抑制多形核细胞中还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化还原酶复合物的组装及功能进而破坏宿主细胞对 A f 的感染控制^[11]。

胶霉毒素能抑制宿主的应答反应,主要包括:巨噬细胞或多形核细胞吞噬及杀菌功能^[12]、转录因子 NF- κ B 的产生 (阻断炎症反应和细胞因子的产生)^[13]、肥大细胞的活化及脱颗粒^[14]以及抗原递呈细胞的功能 (抑制细胞免疫)^[15]。并且,它还可引起宿主细胞的凋亡,如巨噬细胞和单核细胞等免疫细胞以及一些非免疫细胞 (包括 EL4 胸腺瘤细胞和鼠胚胎成纤维细胞等)^[15];程序上是细胞线粒体 ATP 合酶受到抑制,接着线粒体膜发生超极化,最终导致凋亡。最近研究显示,其可通过激活促凋亡 Bcl-2 家族中 Bak 进而促发细胞凋亡^[16]。而 ROS 的产生则可加速线粒体内细胞色素 c 和凋亡诱导因子的释放参与细胞凋亡^[16]。然而,体

外研究发现健康个体来源的中性粒细胞却能抵抗 GT 诱导的凋亡。不过,中性粒细胞的各项生物学功能呈现出不同程度的减低,例如 ROS 的产量以及吞噬能力。具体机制尚待进一步研究。此外 GT 对 A f 的定植亦有帮助,它能降低呼吸道纤毛运动并导致纤毛上皮细胞的损伤^[4]。这也许是为何烟曲霉主要定植并侵犯呼吸道黏膜的原因之一。

胶霉毒素作为 A f 的次级代谢产物,与初级代谢产物最大的不同在于 GT 的合成并不会影响到 A 本身的生长。对于 GT 致病性的研究主要通过基因敲除技术,而研究较多的基因则是 gIIP 和 gIIZ^[17-21]。gIIP 编码非核糖体肽合成酶,其催化 GT 合成过程中第一步丝氨酸与苯丙氨酸的缩合, gIIZ 则编码 Zn (II) 2Cys₆ 转录因子。二者的缺失体 (分别为 Δ gIIP 和 Δ gIIZ) 对于 A f 的形态及生长发育并无影响,但却无 GT 的产生。体外培养实验发现,GT 缺失突变株的培养上清并不能抑制肥大细胞的脱颗粒^[20]以及中性粒细胞超氧化物的产生^[19],也不能诱导 T 细胞^[18]以及各种哺乳动物细胞的凋亡^[19]。敲除 A 293 株中的 gIIP 或 gIIZ 基因导致整个 12 基因簇的低表达,但若外源性补充该基因却可修复这种下调情况^[20, 21]。此外有研究表明, Δ gIIP 株培养上清对吞噬细胞及 T 细胞的毒副作用减弱,并未完全消失^[18]。可见,培养上清中可能存在其他毒素分子或毒力蛋白在发挥作用。

作为真菌的毒力因子,其必须能在体内产生并具毒性。为此,5 个研究小组对 GT 的体内毒性作用进行了研究^[17-21]。前 2 个研究小组的结果显示 GT 为烟曲霉的重要毒力因子^[17, 19],而另外 3 个研究小组的结果却相反^[18, 20, 21]。相同之处是,两种缺陷菌株在感染小鼠体内造成 GT 的缺失,而修复株感染则可弥补缺失,这与体外培养结果相同。前 2 个研究小组结果显示,感染 Δ gIIP 株小鼠的生存期明显长于野生株或 gIIP 修复株,其致小鼠肺部病理损伤程度减弱,而感染 A f 菌量负荷却没有减低;感染野生株或修复株的小鼠肺部中性粒细胞的病理损伤程度明显大于 Δ gIIP 株感染组^[17]。另外 3 个研究小组中作者联合应用环磷酸胺和醋酸可的松作为免疫抑制剂构建 A 小鼠模型,结果发现无论是野生株还是 Δ gIIP 或 Δ gIIZ 株均致感染动物呈相似的感染结局。研究结果的迥然不同主要在于免疫抑制剂的应用与否。二者均为广泛免疫抑制剂,然而环磷酸胺可作用于天然免疫和获得性细胞

免疫,造成中性粒细胞的减少,而皮质类固醇类只是影响中性粒细胞的功能,并不消除中性粒细胞。GT可抑制中性粒细胞突发性氧化作用,而如今没有粒细胞这一作用对象,也许就造成感染缺陷株与野生株相似结局。由此推测,GT在持续性中性粒细胞减少的小鼠模型中,对IA的发生并不是必须,但不排除GT可能对不同的免疫抑制状态宿主具有一定的致病作用。目前IA主要发生在异基因造血干细胞移植受者,这类患者虽然不是中性粒减少症患者但却是曲霉感染的易感人群。由此可见,对于此类患者,在A的感染与致病过程中GT发挥了重要作用。

3 胶霉毒素的产生及检测

烟曲霉通过分泌胶霉毒素等毒素造成机体免疫抑制状态,进而有利其自身的生存。GT的合成受控于GT调控基因的表达^[3]。大致过程如下:首先由肽合成酶(glp)催化丝氨酸与苯丙氨酸生成环状产物,接下来经过硫氧还蛋白还原酶(gliF)的硫化作用,最终经邻-甲基转移酶(gliM)和甲基转移酶(gliN)的甲基化形成GT^[11]。真菌毒素的产生一般具有时间依赖性释放特征,即在传统培养条件(低氧和室温)下一般需要几天的时间。然而在37°C培养条件下,GT的产生量明显增快。体外培养实验显示,37°C培养24h即可检测到GT,在48~72h达到高峰^[3]。另一个影响因素则是氧含量。当将Af接种在一个通风较好的培养环境如RPMI1640 37°C培养下,其培养上清很快就呈现出对巨噬细胞或多个核细胞的细胞毒作用^[22]。可见真菌代谢产物的产生取决于培养环境。这种现象的发生对于环境分离株和临床分离Af菌株均相类似;但其他曲霉如黄曲霉、土曲霉和黑曲霉并非如此,甚至呈现出毒力减弱,具体机制尚不清楚。体外培养Af发现GT的产生具有氧气依赖性,这也许就是Af最初感染部位主要是肺部的原因^[23]。

真菌毒素一般在菌丝形成时产生,由此可见在IA的疾病过程中,菌丝体原位GT的产生对烟曲霉的致病程度影响很大^[15]。对于培养上清中GT的检测传统采用气相色谱-质谱法。由于GT是一个非蛋白结构的小分子真菌毒素,其产生抗体的能力甚微。然而,最近Fox等以甲状腺球蛋白为基础免疫原,成功制备了GT的抗体,已经验证了其对感

染器官中GT的原位检测价值^[24]。而对于血清样本中GT的检测研究也在不断进行中^[25]。Lewis等^[26]采用液相色谱串联质谱分析表明,在IA小鼠模型及临床患者血清中均可检测到GT。Puri A等^[27]建立了GT的高效薄层色谱分析方法,对于IA患者血清中毒素的检测具有快速简单等优点,而且不同的血清样本可以有比较的同时进行检测。由此可见,感染患者体内特定器官或血清中GT的检测似乎可以作为疾病诊断或是辅助诊断的一项指标^[27]。

胶霉毒素作为ETP家族成员,是Af产生的重要毒素分子。其可抑制机体的免疫反应,包括巨噬细胞吞噬和杀菌活性、T细胞增殖等,并且这种抑制作用是非特异性的。目前已经有多种技术可用于动物模型或IA患者血清中GT的检测^[26]。烟曲霉的致病过程是多因素的,GT仅是其中的一个重要致病因子。不断有新的细胞毒性分子被发现,并被证实参与了真菌的侵袭及对感染结局的影响^[28]。现在对于所发现的众多致病因子之间的相互作用关系的研究认识比较不足,有待加强。

综上所述,目前研究热点局限在IA,但对胶霉毒素在其他疾病如变应性支气管肺曲霉病以及慢性肉芽肿中的角色又是怎样的,尚无定论。

参考文献

- [1] Segal BH. Aspergillosis [J]. N Engl J Med. 2009; 360(18): 1870-1884.
- [2] Kanei K, Watanabe A. Aspergillus mycotoxins and their effect on the host [J]. Med Mycol. 2005; 43(suppl1): S95-S99.
- [3] Gardner DM, Howlett BJ. Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of Aspergillus fumigatus [J]. FEMS Microbiol Lett. 2005; 248(2): 241-248.
- [4] Peterson DE, Collier JM, Katterman ME, et al. Cytotoxicity of bacteria-derived toxins to immortal lung epithelial and macrophage cells [J]. Appl Biochem Biotechnol. 2010; 160(3): 751-763.
- [5] Lewis RE, Wiederhold NP, Lionakakis MS, et al. Frequency and species distribution of gliotoxin-producing Aspergillus isolates recovered from patients at a tertiary-care cancer center [J]. J Clin Microbiol. 2005; 43(12): 6120-6122.
- [6] Parton NJ, Waller RF, Cozijnsen AJ, et al. Origin and distribution of epipolythiodioxopiperazine (ETP) gene clusters in filamentous ascomycetes [J]. BMC Evol Biol. 2007; 26(7): 174-188.
- [7] Kosacek I, Pepelnjak S. Mycotoxigenicity of clinical and environmental Aspergillus fumigatus and A. flavus isolates [J]. Acta

- Pham, 2005 55(4): 365-375
- [8] dos Santos VM, Dómer JW, Carneira F. Isolation and toxigenicity of *Aspergillus fumigatus* from moldy silage[J]. Mycopathologia 2003 156(2): 133-138.
- [9] Bertling A, Niemann S, Uekötter A, et al. *Candida albicans* and its metabolite gliotoxin inhibit platelet function via interaction with thiols[J]. Thromb Haemost 2010 104(2): 270-278.
- [10] Aljofan M, Sganga M L, Lo MK, et al. Antiviral activity of gliotoxin, gentian violet and brilliant green against Nipah and Herpesvirus *in vitro* [J]. Virol J 2009, 4(6): 187.
- [11] Gardiner DM, Waring P, Howlett BJ. The epipolythoxopiperazine (EPT) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis [J]. Microbiology, 2005 151(Pt 4): 1021-1032
- [12] Watanabe A, Kamei K, Sekine T, et al. Immunosuppressive substances in *Aspergillus fumigatus* culture filtrate[J]. J Infect Chemother 2003, 9(2): 114-121.
- [13] Pozo M, Izquierdo M C, de Nievo R, et al. Gliotoxin inhibits neointimal hyperplasia after vascular injury in rats[J]. J Vasc Res 2009 46(4): 278-289
- [14] Nide O, Suzuki Y, Yoshinai T, et al. Fungal metabolite gliotoxin blocks mast cell activation by a calcium- and superoxide-dependent mechanism: implications for immunosuppressive activities[J]. Clin Immunol 2006 118(1): 108-116
- [15] Stanzani M, Orzorio E, Lewis R, et al. *Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin mediated apoptosis of monocytes[J]. Blood, 2005 105(6): 2258-2265
- [16] Parlo J, Urban C, Alvarez EM, et al. The mitochondrial protein Bak is pivotal for gliotoxin-induced apoptosis and a critical host factor of *Aspergillus fumigatus* virulence in mice[J]. J Cell Biol 2006 174(4): 509-519
- [17] Spikes S, Xu R, Nguyen CK, et al. Gliotoxin production in *Aspergillus fumigatus* contributes to host-specific differences in virulence[J]. J Infect Dis 2008, 197(3): 479-486.
- [18] Kupfahl C, Heinekamp T, Geginat G, et al. Deletion of the glp gene of *Aspergillus fumigatus* results in loss of gliotoxin production but has no effect on virulence of the fungus in a low-dose mouse infection model[J]. Mol Microbiol 2006 62(1): 292-302.
- [19] Sugi JA, Pardo J, Chang YC, et al. Gliotoxin is a virulence factor of *Aspergillus fumigatus*: glp deletion attenuates virulence in mice immunosuppressed with hydrocortisone[J]. Eukaryot Cell 2007, 6(9): 1562-1569
- [20] Craner RA Jr, Ganesek MP, Brooking RM, et al. Disruption of a nonribosomal peptide synthetase in *Aspergillus fumigatus* eliminates gliotoxin production[J]. Eukaryot Cell 2006 5(6): 972-980.
- [21] Bok W, Chung D, Balajee SA, et al. Glz, a transcriptional regulator of gliotoxin biosynthesis, contributes to *Aspergillus fumigatus* virulence[J]. Infect Immun 2006 74(12): 6761-6768
- [22] Watanabe A, Kamei K, Sekine T, et al. Effect of aeration on gliotoxin production by *Aspergillus fumigatus* in its culture filtrate[J]. Mycopathologia 2004 157(1): 19-27.
- [23] Watanabe A, Kamei K, Sekine T, et al. Cytotoxic substances from *Aspergillus fumigatus* in oxygenated or poorly oxygenated environment[J]. Mycopathologia 2004 158(1): 1-7.
- [24] Fox M, Gray G, Kavanagh K, et al. Detection of *Aspergillus fumigatus* mycotoxins: immunogen synthesis and immunoassay development[J]. J Microbiol Methods 2004, 56(2): 221-230
- [25] Reeves E, Messina C, Doyle S, et al. Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*[J]. Mycopathologia 2004 158(1): 73-79
- [26] Lewis R, Wiederhold N, Chi J, et al. Detection of gliotoxin in experimental and human aspergillosis [J]. Infect Immun, 2005 73(1): 635-637
- [27] Puri A, Ahmad A, Panda BP. Development of an HPTLC-based diagnostic method for invasive aspergillosis[J]. Biomed Chromatogr 2010 24(8): 887-892
- [28] Berbot S, Badoc C, Mallé M, et al. Spore diffusate isolated from some strains of *Aspergillus fumigatus* inhibits phagocytosis by murine alveolar macrophages[J]. FEMS Immunol Med Microbiol 2002, 33(2): 101-106

[收稿日期] 2010-08-18

[本文编辑] 王 飞

简 讯

2010年 11月 26日 科技部中国科学技术信息研究所在北京召开的 2010年中国科技论文统计结果发布会公布,《中国真菌学杂志》2009年的影响因子为 0.528,在 1946种中国科技论文统计源期刊中排名第 548,在 47种基础医学类期刊中排名第 9,再次收录为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)。谨向长期以来关心和支持我刊成长的广大读者、作者及各位专家表示由衷的感谢!

值此《中国真菌学杂志》创刊 5周年之际,即日起,凡在 2011年 6月 31日前通过邮政汇款方式(汇款方法详见征订单)征订 2011年全年杂志者,2011年投稿时可免收 1次审稿费。

《中国真菌学杂志》编辑部