

抗真菌药物靶点研究现状

胡永峰 赵蓉 金奇

【关键词】 抗真菌药物; 靶点

Current situation of the research for antifungal drug's targets HU Yong-feng, ZHAO Rong, JIN Qi. *Stake Key Laboratory for Molecular Virology and Genetic Engineering, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100176, China*

Corresponding author: JIN Qi, Email: zdsys@vip.sina.com

【Key words】 Antifungal drug; Targets

真菌可引起人类慢性传染病,发病率高,在世界各地广泛流行。由真菌感染引起的真菌病可分为浅部真菌病和深部真菌病(又名系统性真菌病)。皮肤癣菌(例如红色毛癣菌)感染引起的是浅部真菌病,包括头癣、股癣、甲癣等。而深部真菌(例如白色念珠菌)感染可侵犯人体内脏、血液、骨骼等器官和系统,治疗预后差,死亡率高。随着介入性医学治疗的广泛开展、抗真菌药物的滥用、尤其是免疫系统抑制患者数量的上升,例如艾滋病感染人群的增加、癌症的化学治疗等使得系统性真菌病的发生率大幅增加,严重威胁人类生命,引起了人们对真菌感染的关注^[1]。但是由于现有抗真菌药物的毒副作用、以及真菌耐药性的出现^[2],导致了临床药物应用受限和抗真菌感染治疗的失败,因此寻找新的抗真菌药物靶点并得到新的抗真菌化合物成为人类迫切的需要。

1. 背景:在当代药物研发过程中,发现和选择合适的药物靶点是药物开发的第一步,也是药物筛选及药物合成的关键因素之一。药物靶点是能够与特定药物特异性结合并产生治疗疾病作用或调节生理功能作用的生物大分子或生物分子结构。药物靶点的特点归纳起来有以下几点:①是菌体生长必需的基因或基因产物,在原菌序列中高度保守和特异,对人体无害;②在病原微生物感染或致病过程中至关重要;③功能清楚。目前在抗真菌药物靶点研究中发现的靶点主要集中在两个方面:真菌生存必需基因和与毒力或致病性相关的因子^[3]。

国际上药物研究的竞争主要集中在药物靶点的研究。20世纪药物靶点筛选模式是“从功能到基因”,特点是先获得了有效的治疗药物,随后在对该药物进行药理学研究时才发现药物靶点。这种方法的优点是可以得到生理学或生物学功能比较明确的靶点,但研发周期长,花费巨大。人类进入21世纪,随着人类基因组计划完成和一批重要模式生物基因组的全序列测定,如多个真菌基因组测序顺利完成,包括酿酒酵母、构巢曲霉以及临床上三大致病真菌(白色念珠菌、烟

曲霉菌和新型隐球菌)等(<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/Fungi/>),给新型抗真菌药物研究带来了发展契机。科研人员运用功能基因组学、比较基因组学、生物信息学、转录组学和蛋白质组学等相关技术,对真菌和人类基因在全基因组水平上进行研究,发现不同种属真菌的保守基因,鉴定出新的候选药靶。据了解,在人类基因组中目前已可作为药物靶点的基因约500个。通过“基因组-药物靶点-筛选-先导物-药物”的逆向药理学方法,现代药物靶点筛选变成了“从基因到功能”的过程^[4],研发周期变短,操作起来省时、省力和便捷。科技进步使得科学家们能够找到并最终鉴定出新的药物靶点,设计出广谱、高效、低毒、安全和无交叉耐药性的抗真菌化合物。

2. 药物靶点筛选技术:在国际上新药研究呈现出一个特点,即各种生命科学前沿学科如功能基因组学、蛋白质组学和生物信息学等与药物研究技术交叉联合起来,把发现和验证新型药物靶点作为主要目标。这些技术包括DNA芯片技术、蛋白质组研究、计算机辅助药物设计、组合化学和分子库技术以及化学遗传技术等。目前药物靶点的研究集中在基因和蛋白质两个层面。

(1)DNA芯片技术:是一门汇集了微电子学、生物学、物理学、化学、计算机科学等学科的集成化技术。利用这种技术可进行大规模、高通量、平行性的药物筛选,可在基因水平研究药物的作用机制、药物活性及进行药物毒性评价。该技术可以节省复杂的动物试验,缩短药物筛选所用时间,节省新药开发经费。作为实施“后基因组计划”的有力工具,芯片技术不仅能为药物应用奠定扎实的理论基础,而且为药物进一步开发和利用提供理论支持。在药物靶点发现和药物机制研究中主要应用DNA芯片技术,是在多个生物体全基因组序列草图或EST文库顺利完成的基础上构建芯片,检测药物处理后的真菌基因转录水平上的差异性表达。那些表达明显改变的基因往往与特定的疾病表型相关^[5],与发病过程和药物作用途径相关,可作为潜在的药物靶点进行验证。红色毛癣菌是人类浅部真菌感染的主要病原, Yu等^[6]和Diao等^[7]利用DNA芯片技术分别对酮康唑(Ketoconazole)、两性霉素B(Amphotericin B)、伊曲康唑(Itraconazole)等药物作用后的红色毛癣菌进行了基因表达谱研究,获得了很多有价值的信息。

(2)蛋白质组研究:主要研究蛋白质的特征,包括蛋白质在表达水平、翻译后修饰、蛋白质与蛋白质相互作用等方面与疾病发生、细胞代谢等过程相关的一种整体性研究。蛋白质是基因功能的具体实施者,是生命最直接的表现者,尽管现在有多个物种的基因组序列已经被测定,但通常一半以上基因功能未知,且转录水平调控不能全面代表蛋白质表达水平。蛋白质组学研究作为连接基因、蛋白质和疾病的纽带被

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.08.022

作者单位:100176 北京,中国疾病预防控制中心病毒预防控制所病毒基因工程国家重点实验室

胡永峰与赵蓉同为第一作者

通信作者:金奇, Email: zdsys@vip.sina.com

广泛应用在疾病诊断治疗、药物筛选等方面,成为生命科学领域里最重要的研究领域之一。通过正常及病理个体间蛋白质组的比较分析,可以找到“疾病特异性蛋白质分子”,这些分子将成为新药设计的靶点,或者用来检测和监测疾病^[8]。双向电泳、质谱技术是蛋白质组学的核心技术,二维色谱、二维毛细管电泳、液相色谱-毛细管电泳及质谱鸟枪法、毛细管电泳-质谱联用等新策略是更先进的技术。而质谱显像、多维液相色谱、核素标签色谱和蛋白质芯片是高通量和高精度的蛋白质相互作用检测技术。高通量的蛋白质组学技术结合先进的生物信息学在抗真菌药物靶点研究中已经获得约有 13 类抗真菌蛋白,如 PR-1 proteins, (1, 3)- β -glucanases, chitinases, chitin-binding proteins 等^[9]。

(3) 计算机辅助药物设计:现代药物开发已经从古老的在天然产物和化合物中筛选的阶段,发展到根据分子结构进行药物设计的时代,可以从结构入手了解药物与药物靶点之间的关系。因此计算机辅助药物设计成为现代抗真菌药物研究非常有用的工具。该技术先通过 X-单晶衍射等技术获得受体大分子结合部位的结构,采用分子模拟软件分析结合部位的结构性质,再模拟计算受体与配体的相互作用进行先导化合物的优化与设计,从而发现具有全新作用机制、全新结构类型的抗真菌新药。主要方法有活性位点分析法、数据库搜寻、全新药物设计。如病毒基因工程国家重点实验室与军事医学科学院合作,根据真菌脂肪酸合成酶结构设计和构建了先导化合物 PHS11A,通过作用于红色毛癣菌的药物实验,结果表明该化合物有良好的抗真菌效果^[10]。

(4) 组合化学和分子库技术:药物研究和制药工业的发展与有机化学紧密相连,组合化学和分子库技术就是有机合成技术发展的具体体现。用相同的组合化学合成方法将不同的“结构单元”构建成一个所有化合物的分子库,通过筛选发现高活性的先导化合物。该技术使药物开发的速度加快,能快速地归类和优化活性化合物并得到药物候选分子,在抗真菌药物的研究中得到广泛的应用。目前常用的领域有:具有抗真菌活性的天然产物、多肽类化合物、抗真菌寡核苷酸和杂环类化合物。

(5) 化学遗传技术:是一种以不同时间、不同剂量、进行可逆操作的方式来检测特定蛋白质功能的手段。该技术在两个方面促进了新药开发:一是用正向化学遗传学方法鉴定在某种疾病病程中关键基因或蛋白质,为新药筛选提供靶点;二是用反向化学遗传学技术发现特异性作用于某个基因或蛋白质的小分子化合物,为新药开发提供先导化合物。

3. 药物靶点的确认:通过以上技术筛选出的潜在药物靶点,还必须通过药物靶点确认才可以根据那些确定的药物靶点开发、研制出广谱、高效、低毒的抗真菌化合物。药物靶点确认的过程是:首先要了解候选药物靶点分子的生理学和生化功能;其次要明确其在疾病发生发展过程中的作用;最后要证明阻断或激活候选药物靶点分子将产生有利的治疗效果。目前常用的药物靶点确认方法有生物芯片、基因敲除、基因突变、抗体、转基因和反义技术等,要求在细胞水平和整体动物上进行。另外 RNA 干扰技术(RNAi)中因为较低浓

度双链 RNA 可使靶基因沉默,所以该技术被广泛应用到功能基因组学中进行药物靶点筛选研究和疾病治疗^[11]。

4. 抗真菌药物靶点:真菌与人类细胞同属于真核细胞,有许多共同的细胞结构和代谢途径,因此应该筛选对人类无害、只特异性作用于真菌的药物靶点。过去几十年间临床上一直沿用的抗真菌药物已经有了一些确定的药物靶点,但是由于这些有限的药物作用谱、毒性、耐药性和交叉耐药性,迫切需要发展新的低毒、高效的抗真菌药物,这就依赖于新的候选药物靶点成功筛选和鉴定。根据各种生命科学前沿技术和交叉学科对真菌生存和毒力相关保守基因的分析研究,研究者提出了许多候选药物靶点,其中 Liu 等^[12]提出了约 240 种候选靶点。这些靶点有些已经找到抑制剂,并且有抗真菌药物成功上市,有些还处于实验室验证阶段。真菌由细胞壁、细胞膜和细胞核组成,抗真菌药物可以针对三者中的任何一个类型的靶点基因产生作用,使真菌生长受到抑制直至凋亡。

(1) 真菌的细胞壁:由于人类细胞结构中不存在细胞壁,所以针对真菌细胞壁来开发药物在理论上选择性高,对人体的副作用少。真菌细胞壁的主要成分是 β -葡聚糖、几丁质、甘露聚糖,参与细胞壁合成途径的关键酶是理想的药物靶点。

大多数的真菌中都含有 β -1, 3-葡聚糖和 β -1, 6-葡聚糖,少数还有一些 β -1, 4-葡聚糖。由于葡聚糖对维持细胞形态和调节菌体内的渗透压具有重要作用,所以抑制葡聚糖合成将会导致细胞壁结构异常,使细胞容易受到破坏而产生抑菌的效果^[13]。 β -1, 3-葡聚糖合成酶是催化、合成 β -1, 3-葡聚糖的关键酶,目前已成为新抗真菌药物的研究热点。代表药物刺白菌素 B 衍生物 Caspofungin 是该酶低毒高效的非竞争性抑制剂^[14]。 β -1, 6-葡聚糖的合成主要在细胞表面^[15],说明很有可能存在还没有被发现的 β -1, 6-葡聚糖合成酶。

几丁质是由 β -1, 4-糖苷键连接的线性同聚物,是细胞壁的支架结构。编码几丁质合成酶的基因已经在许多真菌中得到证实,并可能为真菌生存所必需,它将是一个非常理想的药物靶点,代表药物是 Nikkomycin^[16]。

甘露聚糖是真菌细胞壁间质组分,由 α -连接的甘露糖聚合物分支通过 N-乙酰葡萄糖胺基团附加在蛋白质上组成,在哺乳动物中不存在^[17],因此可以作为有潜在价值的药靶,代表抑制剂是 Pradimicin 和 Benanomycin^[16]。

(2) 真菌的细胞膜:主要由磷脂类、鞘脂类和固醇组成,为各种功能蛋白提供基质结构。其中有一类特殊的成分——麦角固醇,针对其生物合成途径开发的抗真菌药物占据了现在抗真菌药物市场的大部分。

麦角固醇是真菌细胞膜的特有脂质,对于维持真菌细胞膜的正常生理功能起着至关重要的作用。真菌的麦角固醇生物合成途径已经比较清楚,从鲨烯开始有 10 个以上不同的酶参与。这类药物具有广谱的特性,对人类毒性小,是必需关键酶的抑制剂,通过竞争性结合关键酶抑制麦角固醇合成路径来破坏真菌细胞膜。临床上常用的药物中,多烯类的两性霉素 B (Amphotericin B) 可与麦角固醇特异性的结合;吡咯类中氟康唑 (Fluconazol) 等唑类药物特异抑制细胞色素 P450 依赖的 14- α -去甲基化酶;烯丙胺类的特比萘芬

(Terbinafine)则能抑制鲨烯环氧化酶^[16]。

真菌的细胞膜脂质中包含有鞘脂,由于鞘脂几乎在所有的真核生物和某些细菌的细胞膜中都存在,所以很长时间被人们忽视。但是最新的研究表明鞘脂蛋白在真菌、植物、动物中的结构存在很大的不同^[18]。鞘类磷脂生物合成途径中的肌醇磷酸鞘氨醇合成酶是合成鞘脂的关键酶,已经证明是一个理想的药物作用靶点^[19]。

(3)真菌的细胞核:针对此靶点开发的抗真菌药物,主要影响真菌的遗传信息转录、翻译过程。由于真菌和人类细胞在细胞核中的差异很小,因此这类药物副作用相对较大,成功的例子很少。5-氟胞嘧啶(5-Fluorocytosine)针对的靶点是胸苷酸合成酶,可抑制RNA合成和细胞核分裂^[16]。因为单独使用5-氟胞嘧啶会频繁发生抗药性,因此临床上常将5-氟胞嘧啶与其他抗真菌药物,如两性霉素B合并使用。

(4)其他候选药物靶点:

真核翻译延长因子2(EF2)和翻译延长因子3(EF3):在真核生物蛋白质翻译过程中,需要2个延长因子EF1和EF2。EF1的作用是形成EF1-GTP的复合体后将aminoacyl-tRNA放到核糖体上相应的受体位置,而EF2的作用是将新生成的肽链部分从核糖体上解离。在对各种真核模式生物的研究中发现,这种蛋白质的合成机制在生物进化过程中被高度保留下来,没有发生大的改变。针对EF2基因的代表抑制剂是Sordarins^[16]。EF3非常特异,只在真菌中存在,并且其作用的位点已经确定。该基因的出现说明真菌在进化过程中对环境有适应能力,被认为是非常理想的药物靶点^[20],但是很长时间内都没有能够筛选到合适的抑制剂。新的研究还发现EF3与真菌质膜上钙离子通道的调节相关^[21],扩展了其在蛋白质翻译过程中的功能。

微管蛋白:普遍存在于真核细胞中,是构成细胞骨架的主要成分,在保持细胞形态、细胞分裂增殖、细胞器组成和信号传导等方面发挥重要作用。代表抑制剂Cationic peptides可抑制微管的装配和微管依赖的GTP结合,有潜在的抗真菌效应^[16]。

钙调神经磷酸酶:在真核生物中,钙调神经磷酸酶是一个Ca²⁺-钙调节蛋白激活的磷酸酶,在多种生物学过程中发挥关键性的调控作用,包括T细胞活化、细胞周期调控等。该酶参与了一个重要的信号传导途径,在各类真菌细胞中非常保守,是免疫抑制剂环孢霉素A(Cyclosporin A)和FK506的作用靶点^[22]。

DNA拓扑异构酶:与DNA局部的空间构型变化有关,对DNA复制、转录和修复具有重要作用。真菌与哺乳动物DNA拓扑异构酶I有明显的结构差异,因此该酶也是一个理想的潜在抗真菌药物作用靶点,代表抑制剂是Eupolauridine^[23]。

质子泵H⁺-ATP酶:主要作用是维持真菌营养吸收所必需的跨膜电化学质子梯度和细胞的酸碱度。筛选此靶点的原因有:膜周转较慢;不同致病性真菌编码H⁺-ATP酶序列的高度相似性使之成为广谱抗真菌药物靶点;真菌与动物P型ATP酶序列仅有30%的相似性,可被抑制剂选择性地定向抑制。代表抑制剂Ebselen^[23]。

5. 小结:本文回顾了抗真菌药物靶点的研究背景、筛选技术和确认方法,总结了已确认药物靶点及其代表抗真菌药

物,探讨了潜在的候选药物靶点。真菌与人类细胞同属真核细胞,筛选抗真菌药物必须考虑对人体的毒副作用和真菌的交叉耐药性。抗真菌药物靶点研究运用了生命科学中可能用到的所有技术方法,但它的发现和确证还要求不断探索和创新更有效的技术方法和途径,而且需要更多的基础研究来揭示药物作用机制和耐药机制,为未来新的广谱、低毒、高效、无交叉耐药性的抗真菌药物研制和开发提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Sundriyal S, Sharma RK, Jain R. Current advances in antifungal targets and drug development. *Curr Med Chem*, 2006, 13(11): 1321-1335.
- [2] Osborne CS, Leitner I, Favre B, et al. Amino acid substitution in *Trichophyton rubrum* squalene epoxidase associated with resistance to terbinafine. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(7): 2840-2844.
- [3] De Backer MD, Van DP. Progress in functional genomics approaches to antifungal drug target discovery. *Trends Microbiol*, 2003, 11(10): 470-478.
- [4] Melese T, Hieter P. From genetics and genomics to drug discovery: yeast rises to the challenge. *Trends Pharmacol Sci*, 2002, 23(12): 544-547.
- [5] Quackenbush J. Extracting meaning from functional genomics experiments. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 207(2 Suppl): S195-199.
- [6] Yu L, Zhang W, Wang L, et al. Transcriptional profiles of the response to Ketoconazole and Amphotericin B in *Trichophyton rubrum*. *Antimicrob Agents Ch*, 2007, 51(1): 144-153.
- [7] Diao YJ, Zhao R, Deng XM, et al. Transcriptional profiles of *Trichophyton rubrum* in response to itraconazole. *Med Mycol*, 2008, 47(3): 237-247.
- [8] Pierce JD, Fakhari M, Works KV, et al. Understanding proteomics. *Nurs Health Sci*, 2007, 9(1): 54-60.
- [9] Selitrennikoff CP. Antifungal proteins. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(7): 2883-2894.
- [10] Zhang WL, Yu L, Leng WC, et al. cDNA microarray analysis of the expression profiles of *Trichophyton rubrum* in response to novel synthetic fatty acid synthase inhibitor PHS11A. *Fungal Genet Biol*, 2007, 44(12): 1252-1261.
- [11] Tourmu H, Serneels J, Van DP. Fungal pathogens research: novel and improved molecular approaches for the discovery of antifungal drug targets. *Curr Drug Targets*, 2005, 6(8): 909-922.
- [12] Liu M, Healy MD, Dougherty BA, et al. Conserved fungal genes as potential targets for broad-spectrum antifungal drug discovery. *Eukaryot Cell*, 2006, 5(4): 638-649.
- [13] Georgopapadakou NH, Tkacz JS. The fungal cell wall as a drug target. *Trends microbiol*, 1995, 3(3): 98-104.
- [14] Walsh TJ, Viviani MA, Arathoon E, et al. New targets and delivery system for antifungal therapy. *Med Mycol*, 2000, 38 Suppl 1: S335-347.
- [15] Montijn RC, Vink E, Mulle WH, et al. Localization of synthesis of beta 1, 6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1999, 181(24): 7414-7420.
- [16] Andriole VT. The 1998 Garrod lecture. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. *J Antimicrob Chemother*, 1999, 44(2): 151-162.
- [17] Gao XD, Dean N. Distinct protein domains of the yeast Golgi GDP-mannose transporter mediate oligomer assembly and export from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 2000, 275(23): 17718-17727.
- [18] Sperling P, Heinz E. Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1632(1-3): 1-15.
- [19] Nageic MM, Nageic EE, Baltisburger JA, et al. Sphingolipid synthesis as a target for antifungal drugs. Complementation of the inositol phosphorylceramide synthase defect in a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by the AUR1 gene. *J Biol Chem*, 1997, 272(15): 9809-9817.
- [20] Sturtevant J. Translation elongation-3-like factors: are they rational antifungal targets? *Expert Opin Ther Targets*, 2002, 6(5): 545-553.
- [21] Liu M, Gelli A. Elongation factor 3, EF3, associates with the calcium channel Cchl and targets Cchl to the plasma membrane in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, 2008, 7(7): 1118-1126.
- [22] Kozubowski L, Lee SC, Heitman J. Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. *Cell Microbiol*, 2009, 11(3): 370-380.
- [23] Odds FC. Genomics, molecular targets and the discovery of antifungal drugs. *Rev Iberoam Micol*, 2005, 22(4): 229-237.

(收稿日期:2009-01-20)

(本文编辑:尹廉)