

Terric acid 对白色假丝酵母生长、细胞形态和大分子合成影响的研究

李淑彬¹, 王 军², 钟英长²

(¹ 华南师范大学生命科学学院 广州 510631)

(² 中山大学生命科学学院 广州 510275)

摘 要: 从海洋霉菌 *Aspergillus flavis* No.179 中分离纯化胞外抗真菌代谢产物 Terric acid。以液体稀释法研究 Terric acid 在不同浓度下对酵母类真菌白色假丝酵母(*Candida albicans*) 生长、细胞形态的影响。结果表明, Terric acid 在较低浓度下能抑制测试菌株 *C. albicans* AS2 538 的生长, 高浓度的 Terric acid 则能杀死 *C. albicans* AS2 538 细胞, 其最小抑菌浓度和最小杀菌浓度分别为 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 。在亚抑菌浓度下, 该物质能抑制 *C. albicans* AS2 538 假菌丝的形成, 并引起细胞形态发生改变。当浓度达到 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞形态变得极不规则, 有些细胞体积增大或破裂溶解。用 ¹⁴C-缬氨酸、¹⁴C-胸腺嘧啶、³H-尿嘧啶同位素标记物掺入的方法分别研究 Terric acid 对测试菌株 *C. albicans* AS2 538 蛋白质、DNA 和 RNA 合成的影响, 与对照相比, 在含有 5 $\mu\text{g/mL}$ Terric acid 的培养基中培养 4h 后, ¹⁴C-缬氨酸和 ³H-尿嘧啶的掺入量分别减少 47.8% 和 70.7%, ¹⁴C-胸腺嘧啶的掺入量没有明显差异。此结果暗示 Terric acid 能抑制测试菌 *C. albicans* AS2 538 蛋白质和 RNA 的合成, 但对其 DNA 的合成没有明显影响。

关键词: Terric acid; *C. albicans*; 抗真菌作用

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)03-0447-05

近年来, 随着癌症放疗、化疗和器官移植人数的不断增加, 免疫抑制及艾滋病感染、空气恶化等使人类真菌感染特别是条件性致病真菌感染的发病率显著上升^[1~3]。目前, 临床上所用的抗真菌感染药物由于其抗菌谱窄和较大的毒副作用, 很难达到理想的治疗效果。治疗过程中抗药性菌株的出现, 更使得真菌治疗困难重重^[4]。由此急需开发出高效、低毒的广谱抗真菌药物。

黄柄曲霉(*Aspergillus flavis*) No.179 是我们从中国南海海底沉积物中分离到的一株对酵母类真菌、皮肤感染真菌及植物病原真菌均具有强烈抑制作用的海洋霉菌。对其胞外抗真菌代谢产物分离纯化后, 通过体外琼脂扩散试验发现该物质对酵母类真菌的最小抑菌浓度 MICs 为 0.78 ~ 12.5 $\mu\text{g/mL}$, 对皮肤感染真菌 *Microspore gypseum* 的 MIC 为 1.56 $\mu\text{g/mL}$, 同时该物质对多种植物病原真菌有强烈的抑制作用, 具有较好的开发前景^[5]。为此, 我们进一步对其化学结构进行了测定, 经核磁、红外、紫外及质谱分析, 证实此抗真菌抗生素为 5,6-Epoxy -3hydroxy

toluquinone, 化学名称为 Terric acid, 为一种醌类化合物(图 1)。虽然该物质并非新的化合物, 但其抗真菌作用除本研究外尚无其他报道。

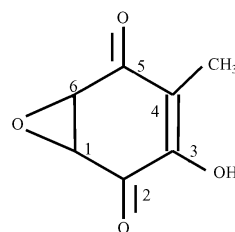


图 1 Terric acid 的化学结构

Fig.1 Chemical structure of terric acid.

在条件性致病真菌感染中, 深部真菌感染以 *C. albicans* 最为常见, 是引起艾滋病病人和白血病等癌症患者因继发性真菌感染而死亡的重要原因之一^[6]。本文以 *C. albicans* 菌株 *C. albicans* AS2 538 作为测试菌株, 通过研究海洋霉菌 *Aspergillus flavis* No.179 代谢产物 Terric acid(以下简称为 TA)对该酵母型真菌生长、形态结构和大分子合成的影响, 对该物质抗真菌作用及其机理进行初步探讨。

基金项目: 国家自然科学基金(30270021)

作者简介: 李淑彬 1965 - 女, 副教授, 湖南宁乡人, 博士, 主要从事微生物生理生化及海洋微生物资源及生理活性物质研究。Tel: 86-20-85211372; E-mail: zhoure@scnu.edu.cn

收稿日期: 2006-08-29; 接受日期: 2006-09-18; 修回日期: 2006-12-20

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 测试真菌白色假丝酵母 *C. albicans* AS2 538 购自中山大学(原中山医科大学)。海洋霉菌 *Aspergillus flavis* No.179 由本实验室从南海海底沉积物中分离并鉴定^[5]。

1.1.2 试剂和仪器 ^{14}C -缬氨酸、 ^{14}C -胸腺嘧啶、 ^3H -尿嘧啶购自 Sigma 公司;其他试剂均为国产分析纯或色谱纯,高效液相色谱仪购自美国 waters 公司;显微摄影仪购自日本 Olympus 公司;液体闪烁计数器购自美国 Packard 公司;紫外可见分光光度计购自日本岛津公司。

1.2 TA 的制备

海洋霉菌 *Aspergillus flavis* No.179 发酵液经真空冷冻干燥、乙酸乙酯抽提、硅胶柱层析和多次重结晶获得,用高效液相色谱检测其纯度。色谱条件为:洗脱液:A:H₂O;B:5%磷酸;洗脱流程:A(15min)→B(15min)→A(5min);洗脱速度:1mL/min。样品制备后用少量 DMSO 溶解并用 ddH₂O 配成 1mg/mL 溶液,细菌过滤器过滤后备用。

1.3 TA 对 *C. albicans* AS2 538 生长的影响

在 4.5mL (180×10mm 试管装)PDA 培养基中加入 0.5mL TA 母液(1mg/mL),配成 TA 终浓度为 100μg/mL 的培养液,用新鲜培养基进行二倍稀释,使 TA 终浓度为 50、25、12.5、6.25、3.13、1.56μg/mL,每管接入 0.5mL *C. albicans* AS2 538 菌悬液(10^5 个细胞/mL),30℃、180r/min 振荡培养 24h,测定菌体总量(OD_{600})。同时取上述培养物适当稀释后在新鲜的培养基中以平板菌落计数法测定活细胞数量(菌落形成单位 cfu)。

1.4 TA 对 *C. albicans* AS2 538 生长方式和细胞形态的影响

参照 1.3 的方法,在含不同浓度 TA 的 PDA 培养液中接入 *C. albicans* AS2 538 菌悬液,30℃ 静止培养 8h 后取培养液直接在显微镜下观察。

1.5 TA 对 *C. albicans* AS2 538 蛋白质、DNA 和 RNA 合成的影响

采用 ^{14}C -缬氨酸、 ^{14}C -胸腺嘧啶、 ^3H -尿嘧啶同位素标记物掺入的方法分别研究 TA 对测试菌株蛋白质、DNA 和 RNA 合成的影响^[7,8]。具体方法如下:测试菌株 *C. albicans* AS2 538 在 PDA 培养基中 30℃、

180r/min 振摇过夜,用新鲜培养基稀释到约 10^5 个细胞/mL,取 4.5mL 加入到灭菌试管中,加入 0.5mL 50μg/mL 的 TA 使其终浓度为 5.0μg/mL,对照以同样体积的 ddH₂O 代替,5 个重复。混合后,30℃、180r/min 振摇 15min 使药物与菌体充分接触并作用,在试管中分别加入 50μL 40 微居里/mL 的不同同位素标记物,180r/min 振摇 4h 后,加入 5mL 10% 的经过预冷的三氯乙酸,充分震荡,于冰浴中放置 30min,用针筒式细菌过滤器过滤,滤膜用 5mL 10% 的三氯乙酸洗涤 2 次,自然干燥后于液体闪烁测定仪中测定放射剂量(每分钟蜕变数, DPM)。以平均 DPM 值代表放射性物质的掺入量。

2 结果

2.1 TA 的制备和纯度测定

约 6.5L 海洋霉菌 *Aspergillus flavis* No.179 发酵液经真空冷冻干燥、乙酸乙酯抽提、硅胶柱层析和多次重结晶后,得 2.58mg 抗真菌代谢产物 TA 的白色针状结晶,高效液相色谱检测纯度达色谱纯(图 2)。

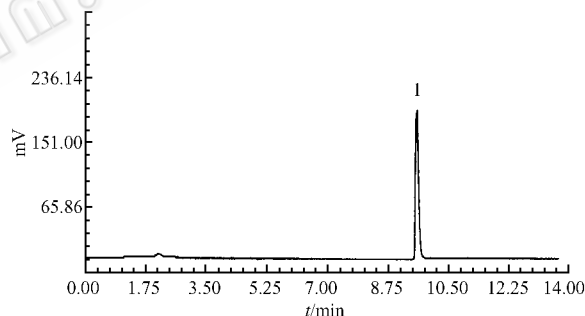


图 2 TA 的高效液相色谱图谱

Fig.2 HPLC spectrum of TA.

2.2 TA 对 *C. albicans* AS2 538 生长的影响

培养基中加入 TA 后真菌 *C. albicans* AS2 538

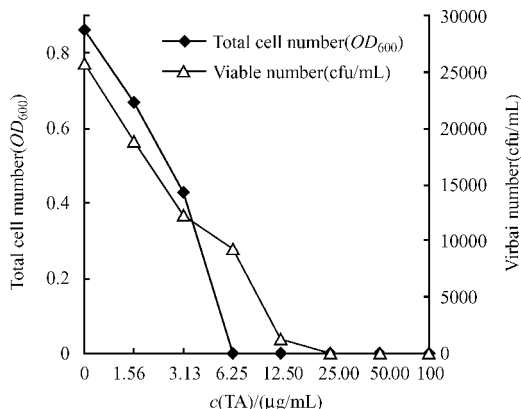


图 3 TA 对 *C. albicans* AS2 538 生长的影响

Fig.3 Effects of TA on the growth of *C. albicans* AS2 538.

的生长受到明显抑制 ,这种抑制作用随着浓度的增高而加强(图 3)。当 TA 的浓度达到 6.25μg/mL 时 ,*C. albicans* AS2 538 的生长完全停止。在该浓度下 ,*C. albicans* AS2 538 的生长虽然停止 ,但大部分细胞并没有死亡 ,活细胞数目仅略低于接种时的细胞数目。随着 TA 浓度的继续增大 ,活细胞数目显著减少 ,50μg/mL 的 TA 能完全杀死起始浓度为 10⁴ 个/mL 的 *C. albicans* AS2 538 细胞。在液体培养的条件下 ,TA 对 *C. albicans* AS2 538 的最小抑菌浓度(MIC)为 6.25μg/mL ,最小杀菌浓度(MLC)为50μg/mL。

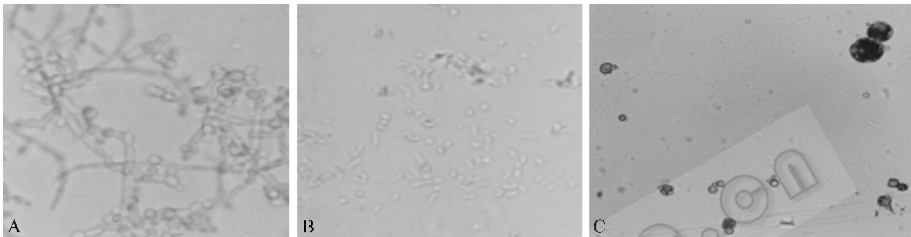


图 4 TA 对 *C. albicans* AS2 538 形态结构的影响(10 × 40)

Fig.4 Effect of TA on morphology of *C. albicans* . AS2 538(10 × 40). A :Control ,no TA ;B 3.13μg/mL TA ;C 50μg/mL TA .

2.4 TA 对 *C. albicans* AS2 538 蛋白质、DNA 和 RNA 合成的影响

在不含有 TA 的培养液中 ,菌株进行正常生长和物质合成 ,放射性标记的¹⁴ C-缬氨酸、¹⁴ C-胸腺嘧啶、³ H-尿嘧啶迅速掺入到细胞中分别用于蛋白质、DNA 和 RNA 的合成。用 5μg/mL 的 TA 处理后 ,¹⁴ C-缬氨酸和³ H-尿嘧啶的掺入量分别减少 47.8% 和 70.7% ,表明该物质对 *C. albicans* AS2 538 蛋白质和 RNA 具有强烈的抑制作用。与对照相比 ,处理后¹⁴ C-胸腺嘧啶的掺入量没有明显差异 ,该物质对 *C. albicans* AS2 538 DNA 合成影响不大(表 1)。

表 1 Terrie acid 对 *C. albicans* AS2 538 蛋白质、DNA 和 RNA 合成的影响

<i>C. albicans</i> AS2 538			
Sample	¹⁴ C-Valine incorporation (DPM)*	¹⁴ C-Thymidine incorporation (DPM)*	³ H-Uridine incorporation (DPM)*
Control	10128.92	1572.30	544.07
Treatment	5524.33	1440.42	159.67
Significance of difference	P < 0.01	p > 0.05	P < 0.01

* Dates were the average values of five repetitive tests .

2.3 TA 对 *C. albicans* AS2 538 形态结构的影响

C. albicans AS2 538 在含有 TA 的条件下其细胞形态和生长情况会发生明显改变 ,此变化随所含 TA 浓度而不同(图 4)。在不含 TA 新鲜液体培养基中静置培养 ,*C. albicans* AS2 538 生长旺盛 ,原生质均匀分布 ,能形成大量假菌丝(图 4-A)。在 TA 亚抑菌浓度下(3.13μg/mL ,1/2MIC) ,*C. albicans* AS2 538 形态由椭圆形变为杆型甚至不规则形 ,不能形成假菌丝(图 4-B)。当 TA 浓度继续增大到 50μg/mL (MLC)细胞形态变得极不规则 ,有些细胞体积增大 ,细胞物质分布也不均匀 ,有些细胞破裂溶解(图 4-C)。

3 讨论

1980 年日本学者 Haruo 等^[9]从一株土壤霉菌中分离纯提到 Terrie acid(TA) ,他们对该种来源 TA 的生物活性进行了研究 ,发现该物质对一些肿瘤细胞、革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌和黄单胞菌属(*Xanthomonas* sp.)细菌具有一定的抑制作用 ,但是不能抑制假单胞菌、真菌和酵母的生长。本试验结果与文献报道有较大的差别 ,其原因还有待进一步探讨。同一种化学物质其来源不同 ,生物学特性有差异 ,这在文献中也有报道过类似的情况 ,如李群等^[10]从北京土壤中分离得到的链霉菌 1006-60 (*Streptomyces* 1006-60)所产生的抗生素理化特性鉴别与国外报道的链佐霉素(Streptozotocin)完全相同 ,二者能抑制痢疾杆菌和变形杆菌等革兰氏阴性细菌 ,但前者无致糖尿病作用 ,后者对大鼠一次静脉注射 50mg/kg 体重时 ,可使大鼠 24h 内出现高血糖和糖尿。

天然产物中由于杂质的干扰 ,会对其生物活性产生一定的影响 ,我们测定时所用的样品纯度很高 ,排除了杂质的干扰。同一种化学物质由于其立体结构的差异 ,甚至是旋光度的差异 ,也会引起生物学性

质的改变。John 等用全合成的方法合成了 TA ,同时用化学方法处理使之变成了各种立体异构体 ,然后比较了各类立体异构体的抗菌活性 ,结果表明不同立体结构的 TA 对金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 的抑制活性不同 ,而同样是(-)TA ,天然分离提纯的与人工合成的也存在着差异^[11]。从立体结构来看 ,我们从海洋霉菌 *Aspergillus flavis* 代谢产物中分离的 TA [α]D 为 -37 ,文献 [9] 报道值为 -23.9。这也可能会导致两种不同来源的 TA 生理活性相差较大。

C. albicans 可以以两种形式存在 ,卵圆型芽生的酵母样型和假菌丝型。菌丝形式的菌体可以粘附到机体黏膜细胞 ,进而侵袭到深部组织 ,定居和大量繁殖 ,引起感染 ,因而更具威胁性^[12]。我们的试验结果表明海洋霉菌 *Aspergillus flavis* No.179 代谢产物 TA 在极低的浓度下即能抑制测试菌株 *C. albicans* AS2 538 假菌丝的形成 ,因而该物质在较低的浓度下即能通过阻止菌体对深部组织的感染而发挥抗真菌感染作用。随着浓度的提高 ,菌体生长速度减慢 ,细胞形态也发生改变 ,到浓度达到 $6.25\mu\text{g/mL}$ 时生长完全停止。一些抗生素在低浓度下抗微生物活性表现为抑菌作用 ,高浓度时即可以发挥杀菌效果。TA 对测试菌的作用也表现为这种形式。用最小杀菌浓度的 TA 处理后的 *C. albicans* AS2 538 细胞形态发生明显改变 ,体积增大 ,细胞内含物分布极不均匀 ,有些细胞破裂溶解。

TA 是一种具有多种生理功能的微生物次生代谢产物。YuKo 等^[13]的研究表明 ,TA 不仅能够抑制哺乳动物细胞酪氨酸激酶的催化活性 ,而且能够抑制蛋白激酶与酪氨酸激酶的相互作用 ,使后者不能磷酸化。对 TA 抗细菌机理的研究表明 ,该物质可以通过阻断亮氨酸-tRNA 的合成从而抑制细菌蛋白质的合成^[14]。利用放射性同位素标记的方法 ,本文初步探讨了 TA 对酵母型真菌 *C. albicans* 生物大分子合成的影响 ,发现该物质能抑制测试菌株 *C. albicans* AS2 538 蛋白质和 RNA 的合成 ,但并不影响其 DNA 的合成。关于 TA 对真菌大分子合成影响的详细机制 ,如作用确切位点和作用方式等有待进一步研究。鉴于 TA 生理活性的多样性和不同浓度下

抗微生物作用效果的差异 ,推测 TA 可能充当一种 RNA 转录或蛋白质合成的抑制剂 ,且该物质对不同位点的调节(结合)能力不同 ,导致在不同浓度下引起不同的抗菌效果。

参 考 文 献

- [1] Warnock DW. Fungal diseases : an evolving public health challenge. *Med Mycol* 2006 **44** (8) : 697 – 705.
- [2] Kasper LH, Buzoni GD. Some opportunistic parasitic infections in AIDS : Candidiasis , Pneumocystosis , Cryptosporidiosis , Toxoplasmosis. *Parasitol Today* 1998 **14** (4) : 150 – 156.
- [3] Lipsett PA. Surgical critical care : fungal infections in surgical patients. *Crit Care Med* 2006 **34** (9) : 215 – 224.
- [4] Maschmeyer G. The changing epidemiology of invasive fungal infections : new threats. *Int J Antimicrob Agents* 2006 **27** (Suppl 1) : 3 – 6.
- [5] 李淑彬 ,王 军 ,杨劲松 ,等 . 抗真菌抗生素 Terreic acid 产生菌的分离和生物学性质研究 . 菌物系统 ,2001 **20** (3) : 362 – 367.
- [6] Sims CR, Ostrosky Z L, Rex JH. Invasive candidiasis in immunocompromised hospitalized patients. *Arch Med Res* 2005 **36** (6) : 660 – 671.
- [7] Cornelius JC, Yue CY, Alfred L, et al. Inhibition of RNA synthesis as a therapeutic strateg against *Aspergillus* and *Fusarium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998 **42** (3) : 509 – 513.
- [8] Katarzyna U, Aleksandra T, Grażyna Kz, et al. Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA , RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Archives of Microbiology* 2005 **183** (2) : 2 – 14.
- [9] Haruon Y, Kiruko M, Hideaki J, et al. Studies on Terreic acid. *The Japanese Journal of Antibiotics* 1980 **32** (3) : 72 – 80.
- [10] 李 群 ,林赴田 ,解灵玉 ,等 . 链佐霉素产生菌 1006 – 60 的分类及其抗生素的生物性能 . 第四次全国抗生素学术会议论文集 . 上海 : 科学出版社 ,1982 ,148.
- [11] John CS, Yong SL. Total synthesis and resolution of Terreic acid. *J Med Chem* 1974 **17** (3) : 371 – 373.
- [12] Gow NA, Brown AJ, Odds FC. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol* 2002 **5** (4) : 366 – 371.
- [13] Yuko K, Hartaman SE, Kinonhita E, et al. Terreic acid , a quinone epoxide inhibitor of Bruton' s tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 **96** (5) : 2227 – 2232.
- [14] Basu S, Das SK, Bose JR, et al. Characterization of Versilin-sensitive sites in self-sensitive producer and sensitive non-producer or unrelated organism. *J Appl Bacteriol* 1989 **67** (2) : 191 – 200.

Effect of Terric acid on the growth cellular morphology and macromolecular synthesis of *C. albicans*

LI Shu-bin^{1*}, WANG Jun², ZHONG Ying-chang¹

(¹ School of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

(² School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract Terric acid, an antifungal metabolites produced by a marine mold *Aspergillus flavis* No.179, was isolated and purified. The effects of terric acid at different concentrations on the growth and cellular morphology of *C. albicans* AS2, 538 were studied by the method of liquid dilution. The substance inhibits the growth of *C. albicans* AS2, 538 obviously at low concentration and has fungicidal action at high concentration. The minimum inhibiting concentrations (MIC) and minimum lethal concentrations (MLC) on *C. albicans* AS2, 538 were 6.25 µg/mL and 50 µg/mL, respectively. At Sub-MIC (3.13 µg/mL), terric acid inhibited the formation of pseudo-hyphal of *C. albicans* AS2, 538 and caused cell morphological change. After addition of terric acid to the medium to final concentration of 50 µg/mL, cell morphology of *C. albicans* AS2, 538 was irregular and some cells turned bigger and disrupted. The effects of terric acid on the synthesis of macromolecules, DNA, RNA or proteins of *C. albicans* AS2, 538 were estimated by measurement of incorporation of radioactive precursors, ¹⁴C-Thymidine, ³H-Uridine or ¹⁴C-Valine, respectively. When *C. albicans* AS2, 538 was incubated for 4h in 5 g/mL terric acid medium, the incorporation of radioactive isoleucine and uridine decreased 47.8%, 70.7%, respectively, compared with controls incubated in commonly medium. However, the incorporation of [³H]thymidine did not have significant change. This results indicated that terric acid inhibits the synthesis of protein and RNA but have no effect on DNA synthesis in a *C. albicans* AS2, 538.

Keywords: Terric acid; *C. albicans*; antifungal action

Foundation item: Chinese National Natural Science Fund (30270021)

* Corresponding author. Tel: 86-020-85211372; E-mail: zhoure@scnu.edu.cn

Received: 29 August 2006 / Accepted: 18 September 2006 / Revised: 20 December 2006

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>