

氧代赖氨酸抗真菌作用机制的初步研究

张鸿龙 顾秀玉 王 冀

(中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

J. M. Becker

(美国田纳西大学微生物系, 诺斯维尔)

氧代赖氨酸(Oxalysine)对致病真菌类克念珠菌(*Candida parapsilosis*)的 MIC 为 $0.8-3.1 \mu\text{g/ml}$, 而两性霉素 B(Amphotericin-B)为 $1.6-3.1 \mu\text{g/ml}$ 。氧代赖氨酸高于赖氨酸(Lysine)10 倍浓度, 无明显抑制白念珠菌(*Candida albicans*)对 Lysine 的吸收。Oxalysine 0.4 mmol/L 对白色念珠菌细胞膜透性, 如胞内物于 UV 260nm 下的吸收物质外泄无明显影响。放射性前体物渗入试验结果指出, Oxalysine 0.4 mmol/L 弱抑制 (^{14}C)-Methionin 和 (^{14}C)-Adenine 渗入蛋白质和 DNA, 而显著抑制 (^{14}C)-Adenine 渗入 RNA。

关键词 氧代赖氨酸; 白色念珠菌; 抗真菌作用机制

目前临床应用的抗深部真菌药物很有限, 两性霉素 B(Amphotericin-B)毒性大, 5-氟胞嘧啶易产生耐药。Imidazole 类药物对某些真菌无效, 且出现毒性。新发展的 LY121019 (Lily 公司) 和烯丙胺(Allylamine(Sando 公司)), 二者的临床效果尚未肯定。抗真菌药物, 尤其抗白色念珠菌药物研究引起各国学者普遍重视^[1-4]。我们用抗真菌药物抗代谢筛选法从玫瑰绿褐链霉菌新种(*Streptomyces roseoviridofuscus* n. sp.) 培养物中分离到赖氨酸(Lysine)类似物氧代赖氨酸(Oxalysine)其结构式为 $\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$ ^[5-6]。除发现了它对 5 种动物肿瘤有抑制作用^[7]以及临床治疗 200

多例慢性肝炎患者证明有降低 SGPT 作用及改善肝功能外^[8], 我们还发现它是一种强的狭谱抗真菌抗生素。鉴于氧代赖氨酸毒性较低, 临床试用未发现明显副作用, 因此我们在抗真菌方面作了分析研究。本文报道氧代赖氨酸抗真菌活性及其初步作用机制试验结果。

材 料 和 方 法

(一) 试验菌与生长条件

白色念珠菌(*Candida albicans* H317)来自美国 Atlanta 疾病控制中心。将白色念珠菌接种于 YNB 一种以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源的培养基。16-18 小时振荡培养, 取 2.5ml 在对数期生长的菌细胞转入 200ml 新鲜培养基中, 继续培养 3 小时。1800×g 离心, 洗二次后悬于 2% 葡萄糖中备用。

(二) 氧代赖氨酸的制备

本实验室提取制备的单盐酸盐结晶。 (^3H) -Lysine (76.4Ci/mmol), (^{14}C) -Adenine (296mCi/mmol), (^{14}C) -Methionine (45.7mCi/mmol) 购自 Bachem Chemical Co. U. S. A.

(三) 赖氨酸运转竞争试验

0.5ml 白色念珠菌悬液 (3×10^8 /ml) 加入反应液 (400 μ l Oxalysine 60—6000 μ g/ml, 10 μ l Lysine 6 μ g/ml 含 (^3H) -Lysine 0.5 μ Ci, 50 μ l 20% 葡萄糖和 40 μ l 1/15 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH6.0 缓冲液) 于 0.25、1、2、3 和 4 分钟时取样。滤膜 (0.45 μ m) 抽滤。冷水洗二次, 将含有菌体的滤膜放入含 5ml Bray's 溶液小瓶, 闪烁计数。比较放射强度。不含 Oxalysine 的作实验对照。

(四) 酵母样菌胞内物泄漏试验

收集在沙保氏液体培养基中对数期生长菌细胞 $2500 \times g$ 离心, 洗三次, $3-6 \times 10^8$ /ml 菌液悬于 Oxalysine 等药物, 30 C 200r/min 旋转培养, 不同时间取菌液离心 ($3000 \times g$ 15 分钟), 上清液测 UV 260nm 的吸收值。

(五) (^{14}C) -Methionine, (^{14}C) -Adenine 渗入生长细胞试验

对数期生长白色念珠菌于 0.2—0.4 mmol/L Oxalysine 37 C 预培养 30 分钟后, 分别加入 0.08 μ Ci/ml (^{14}C) -Methioine, 0.05 μ Ci/ml (^{14}C) -Adenine, 不同时间取样, 悬于冷 10% TCA, 抽滤, 10% TCA 洗二次, 将含沉淀物滤膜放入 5ml Bray's 溶液中, 闪烁计数。分别测定渗入蛋白质和核酸放射强度。 (^{14}C) -Adenine 渗入试验样品经 1 mol/L KOH, 60 C 加热 2 小时处理为 DNA 渗入量。未处理样品为 DNA+RNA 总渗入量。

试验结果

(一) 氧代赖氨酸抗真菌活性

用液体稀释法测定了氧代赖氨酸抗真菌活性。从表 1—2 结果看出, 氧代赖氨酸是一种窄谱抗真菌抗生素。对致病菌类秃发念珠菌 (*Candida parapsilosis*) MIC 为 0.4—0.8 μ g/ml, 与两性霉素 B 和 5 氟胞嘧啶活性相近。对红色毛癣菌 (*Trichophyton rubrum*)、絮状表皮癣菌 (*Epidermophyton floccosum*) 和石膏样小孢子菌 (*Microsporum gypseum*) 等作用较强, MIC 为 1.56—3.13 μ g/ml。但对白色念珠菌 (*Candida albicans*) 作用较弱, MIC 25 μ g/ml

(二) 氧代赖氨酸与 Lysine 吸收运转竞争试验

从图 1 结果看出, 大于 Lysine 10 倍浓度的氧代赖氨酸对白色念珠菌对数期细胞吸收 Lysine 无明显影响。当氧代赖氨酸增加到 6000 μ g/ml (1000 倍) 时, 才对吸收 Lysine 出现竞争性抑制 (图 2—3), 看出白色念珠菌 Lysine 透性酶对氧代赖氨酸的较低亲和力。

(三) 氧代赖氨酸对酵母样菌胞内物泄漏的影响

从图 4 看出, 作用于细胞膜的抗真菌药物两性霉素-B、多粘菌素-E (Polymyxin E) 和益康唑 (Miconazole) 明显引起 *Candida parapsilosis* 和 *Candida albicans* 胞内物的 UV 260nm 波段吸收物质外泄。而较高浓度氧代赖氨酸 0.4mmol/L 对胞内物外泄无明显影

响。

表 1 氧代赖氨酸抗菌谱

Table 1 Antimicrobial spectrum of oxalysine on *Candida* spp. & *Fungi* spp.

试 验 菌 Test Microorganism	最低抑菌浓度 Minimal inhibition concentration($\mu\text{g}/\text{disk}$)
<i>Candida albicans</i> H317	50—100
<i>Candida parapsilosis</i>	0.1—0.4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.8
<i>Trichophyton rubrum</i>	1.56
<i>Trichophyton mentagrophyte</i>	6.25
<i>Microsporum gypseum</i>	3.13
<i>Microsporum audouinii</i>	3.31
<i>Epidermophyton floccosum</i>	1.56
<i>Aspergillus niger</i>	>100
<i>Sporotrichum schenckii</i>	>100

表 2 氧代赖氨酸抗类壳发念珠菌作用

Table 2 Activity of oxalysine and three kinds of antifungal agent on *Candida parapsilosis*

抗 生 素 Antibiotic	最低抑菌浓度 Minimal inhibitory concentration (mcg/ml)		
	24h	48h	72h
L-4-oxalysine	0.8	1.6	3.1
Amphotericin-B	1.6	3.1	3.1—6.3
5-Fluorocytosine	0.4	0.4	25
Clotrimazol	0.2	6.3	6.3

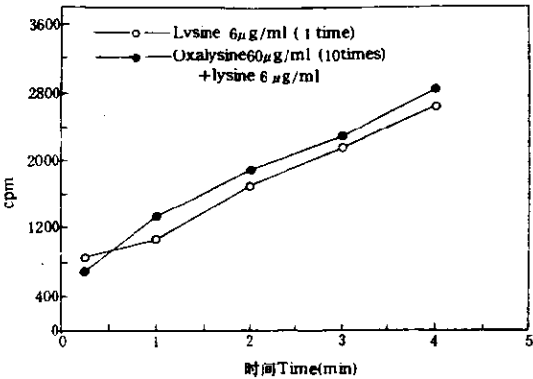


图 1 氧代赖氨酸与 $[^3\text{H}]$ -Lysine 运转竞争

Fig. 1 Transport competition between lysine and oxalysine in *Candida albicans* H317

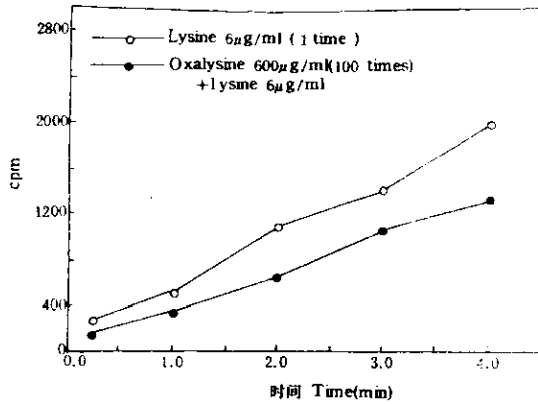


图 2 氧代赖氨酸与 $[^3\text{H}]$ -Lysine 运转竞争

Fig. 2 Transport competition between lysine and oxalysine in *Candida albicans* H317

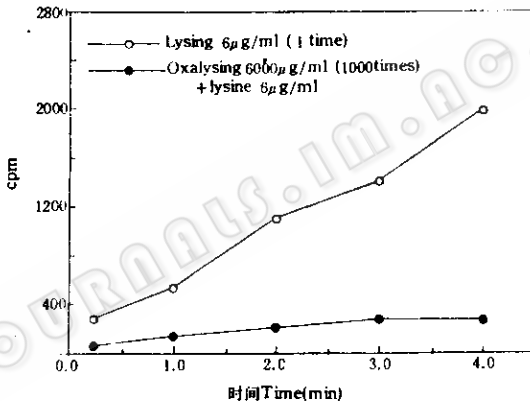


图 3 氧代赖氨酸与 $[^3\text{H}]$ -Lysine 运转竞争

Fig. 3 Transport competition between lysine and oxalysine in *Candida albicans* H317

(四) 对蛋白质合成的影响

已知氧代赖氨酸抗肿瘤与抑制 (^3H) -Lysine 渗入组蛋白有关^[8],所以首先试验氧代赖氨酸对白色念珠菌蛋白质大分子合成的影响。从图 5 结果看出 0.2mmol/L Oxalysine (^{14}C)-Methionine 渗入菌体的放射强度与对照无明显差异。90 分钟渗入量比对照只减少 1.0%,当 Oxalysine 浓度增加至 0.4mmol/L, (^{14}C)-Methionine 渗入比对照减少 5.3% 时,呈现了弱的抑制作用。

(五) 对核酸合成的影响

1 ml 处于对数生长期的白色念珠菌细胞与 0.4mmol/L Oxalysine 预培养 30 分钟后,加入 0.05μCi(^{14}C)-Adenine,每 10 分钟取样测定相同细菌数的放射强度。从图 6 结果看出,0.4mmol/L Oxalysine 不抑制(^{14}C)-Adenine 渗入 DNA 大分子合成,而显著地抑

制渗入 RNA。

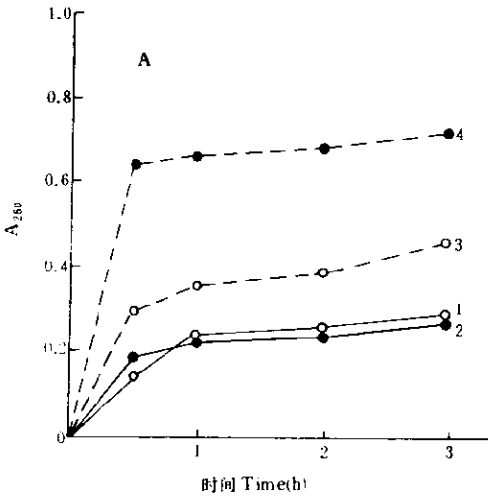


图 4(A) 氧代赖氨酸、多粘菌素-E 和两性霉素-B 对类克发念珠菌胞内物外泄的作用

Fig. 4(A) Effect of oxalysine, polymyxine E and Amphotericin-B on Leakage of cellular constituents

- 1. Control
- 2. Oxalysine; 100mcg/ml
- 3. Amphotericin-B; 5mcg/ml
- 4. Polymyxin-E; 100mcg/ml

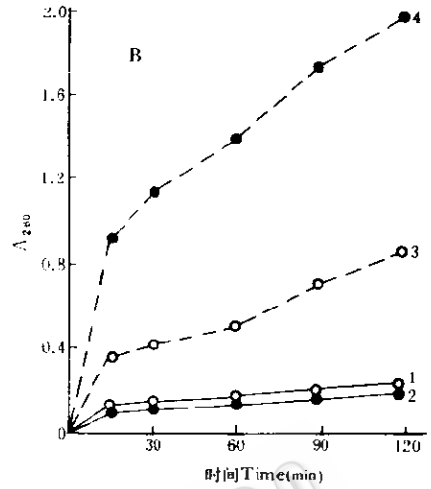


图 4(B) 氧代赖氨酸和益康唑对白色念珠菌胞内物外泄的作用

Fig. 4(B) Effect of oxalysine and miconazole on leakage of cellular constituents

- 1. Control
- 2. Oxalysine; 0.5mmol/ml (92mcg/ml)
- 3. Miconazole; 50mcg/ml
- 4. Miconazole; 100mcg/ml

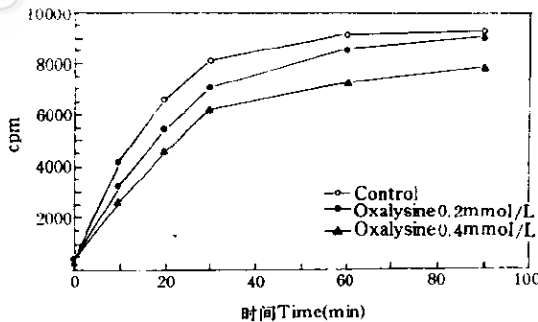


图 5 氧代赖氨酸对^[14C]-Methionine 渗入的影响

Fig. 5 Effect of oxalysine on Incorporation of C¹⁴-Met

讨 论

类克发念珠菌是引起真菌性心内膜炎的主要致病菌。国内已报道心脏手术后死于该菌感染病例^[9]。由于氧代赖氨酸对该菌强抗菌活性以及它的毒性较低,急性 LD₅₀为

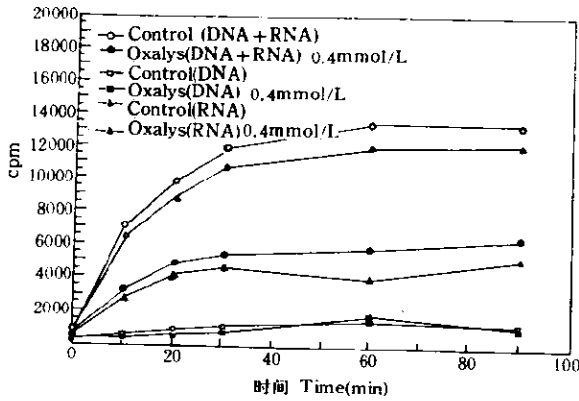


图6 氧代赖氨酸对 ^{14}C -Adenine 渗入DNA和RNA的影响

Fig. 6 Effect of oxalys on incorporation of ^{14}C -Adenine into RNA and DNA in *Candida albicans* H317

1.79g/kg。经小鼠体内分析测定,血浓度40—50 $\mu\text{g}/\text{ml}$,心肌浓度40—80 $\mu\text{g}/\text{ml}$,并能维持4小时。临床试用于治疗肝炎病人未发现明显副作用。因此,氧代赖氨酸有希望发展为治疗该病的有效低毒药物。

许多潜在的抗菌物质往往不显或仅表现弱的抗菌活性,其重要原因是药物难以通透菌体细胞。从本文试验结果可以看出,氧代赖氨酸对白色念珠菌低活性在于对该菌低通透率缘故。几年前我们曾以小肽为载体,连接氧代赖氨酸(弹头),成功地由菌体细胞肽透酶(Peptide permease)的介导进入白色念珠菌。由于改善了通透性,提高了对白色念珠菌抗菌活性28倍^[10]。证明了Oxalysine也是一种很强活性抗白色念珠菌的抗生素。

氧代赖氨酸抗肿瘤作用已证明主要是由于抑制了肿瘤细胞蛋白质合成。Oxalysine 2mg/ml抑制Lysine渗入,从而抑制了蛋白质合成,特别是抑制渗入组蛋白高达59%^[8]。从我们试验结果看出,氧代赖氨酸对白色念珠菌主要作用部位不在蛋白质和DNA合成,而是RNA。进一步试验用 ^{32}P 渗入和提取RNA凝胶电泳分析,经0.4mmol/L Oxalysine处理的白色念珠菌细胞,4s、5.8s、18s和26sRNA含量比对照减少。证实了氧代赖氨酸主要抑制白色念珠菌RNA大分子的合成。关于氧代赖氨酸如何影响携带Lysine的tRNA以及对mRNA有无影响将进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Medoff, G. et al.; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **23**: 3030—3033, 1983.
- [2] Chandler, F. W.; *Current Topics in Medical Mycology*, **1**: 1—23, Springer-Verlag, New York, 1985.
- [3] Holmberg, K. et al.; *J. Infect. Dis.*, **18**: 179—192, 1986.
- [4] Morrison, C. J. et al.; *Antimicrob. Agents Chemother.*, **34**: 746—750, 1990.
- [5] 张鸿龙等;微生物学报, **19**: 126—130, 1979.

- [9] Xie Ling et al. : Proceeding of Southeast Asia Interational Conference of Medical Mycology and Mycotoxin, p. 125, Guilin, 1989.
- [10] 陆一毓等: 药学报, 23(1): 504-509, 1988.

PRELIMINARY EXPERIMENTS ON THE MODE OF ACTION OF OXALYSINE ON *CANDIDA ALBICANS* and *C. PARAPSILOSIS*

Zhang Honglong Gu Xiuyu Wang Qu

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

Becker, J. M.

(Department of Microbiology of Tennessee, Knoxville, USA)

Oxalysine, $\text{NH}_2\text{—CH}_2\text{—O—CH}_2\text{—}\overset{\text{NH}_2}{\underset{|}{\text{CH}}}\text{—COOH}$ is a novel anti-fungal antibiotic isolated from *Streptomyces roseoviridofuscus* n. sp.. MIC values 0.8 – 3.1 $\mu\text{g/ml}$ suggested a good activity of oxalysine against *Candida parapsilosis* when compared to Amphotericin-B and 5-Fluorocytosine. The MIC for *Trichophyton rubrum* and *Microsporeum gypseum* range from 1.56 – 3.13 $\mu\text{g/ml}$.

Transportation of radioactivity labelled (^3H)-Lysine compete with oxalysine was used to characterize Lysine permease in *Candida albicans*. The results showed that oxalysine 10-folds did not reduce the rate of (^3H)-Lysine uptake. This showed low affinity of lysine permease to oxalysine in *Candida albicans*. When the leakage of U V 260 nm-absorbing materials was used as the evidence of permeability of the cell membrane. Oxalysine was not observed to cause leakage of cellular constituents. The result showed that the action of oxalysine is not on the cell membrane of the micro-organism. The incorporations of (^{14}C)-Methione and (^{14}C)-Adenine were used as a method of measuring the antimicrobial action of the drug oxalysine is on protein and/or nucleic acid synthesis. It was found that oxalysine 0.4 mmol/L did not significantly inhibit their incorporations into protein and/or DNA, but strongly inhibit the incorporation of (^{14}C)-Adenine into RNA.

Key words Oxalysine; *Candida albicans*; Mode of action