

丝状致病真菌的分子生物学研究进展

韩黎 谭耕雯 陈世平

(中国人民解放军总医院 北京 100853)

关键词 致病因子, 分生孢子, 抗真菌药物, 分子进化

分类号 Q939[.93]

随着分子生物学技术的飞速发展和日益成熟, 有关丝状致病真菌的分子生物学和基因的研究日渐增多。目前, 从分子水平研究丝状致病真菌的主要目标是探讨致病真菌的致病性因子、分生机制及寻求抗真菌药物、分子进化等。作者综述了近年来在这一领域的新进展。

1 致病毒素因子

研究较为广泛、透彻的丝状真菌致病毒素因子是黄曲霉毒素蛋白。该毒素 B_1 、 B_2 是一组由黄曲霉、寄生曲霉产生的有毒性和致癌作用的次级代谢产物。目前, 黄曲霉毒素的生物合成途径已经研究确立, 但其调节机制仍不清楚^[1]。主要研究途径有三条: (1) 先分离特殊的合成酶的 mRNA, 再通过逆转录克隆出相应的基因进行研究。Yu Jiujiang 等^[2] 从寄生曲霉中提取出了含量极微的黄曲霉毒素合成酶之一的 O-甲基转移酶, 并克隆了其相应的 OMT-1 基因, 同时构建了 cDNA 文库。然后用多克隆抗体进行筛选, 继而在 *E. coli* 载体表达系统中进行了表达。(2) 通过阻断黄曲霉毒素的生物合成途径获得突变株, 再利用由毒素产生菌构建的 COSMID 基因转移系统分离基因。已成功分离的有寄生曲霉的 NOR-1^[3], VER-1^[4], APA-2^[5] 及黄曲霉的 AFL-2 基因^[6]。其中 AFL-2 与 APA-2 功能相近, 有大于 95% 的 DNA 序列同源性。这些调控基因表达的强与弱, 直接影响到黄曲霉毒素的生物合成的多少。(3) cDNA 文库筛选法。它设定与黄曲霉毒素合成有关的基因, 应在合适的条件下才表达, 反之, 则不表达或表达极少。Woloshuk C P 等^[7] 成功地利用在诱导合成培养基上活跃转录的基因克隆的不同杂交图谱来筛选黄曲霉 cDNA 文库, 得到了一个有 1.28kb 插入片段的克隆, 该基因片段与构巢曲霉的乙醇脱氢酶有 75% 的 DNA 序列同源性, 命名为 ADH-1 基因, 其转录产物生成时间与毒素产生时间一致。

此外, 关于丝状真菌侵袭酶基因的研究也有进展。现已获得一种由临床致病真菌——烟曲霉产生的胞外弹性蛋白质水解酶的 cDNA^[8]。该酶与碱性胰蛋白酶有高度序列同源性, 较之哺乳动物弹性蛋白酶, 其与枯草杆菌弹性蛋白酶更为相似。免疫荧光法标记显示, 在嗜中性粒细胞缺少的小鼠的肺中生长和渗透的烟曲霉分泌该弹性蛋白酶。由于肺部 28% 的组织是由弹性蛋白构成的, 因此, 该胞外弹性蛋白质水解酶的确是侵袭性曲霉病中很重要的侵袭因子。

2 分生孢子产生机制

真菌孢子在人体内的萌发及菌丝的恶性生长是深部丝状真菌感染难以根治的主要原因, 所以关于分生孢子的产生及分生孢子梗的生成调节机制已愈来愈受到医学真菌学家的重视。现在, 大量与分生孢

子产生相关的基因已被克隆,其中许多控制着产孢细胞的各种酶和结构蛋白的合成,另一些则调控上述诸多基因的协同表达^[9]。这些调控基因包括 *stuA*、*medA*、*brlA*、*abaA*、*wetA* 等。对这些基因的诱变,将使丝状真菌在分子结构、形态上发生极大变化。例如, *brlA* 基因就是其中最典型的调控基因,若其缺失,分生孢子梗虽能成熟,但发育不完全,不能产生分生孢子。1993年,Prade R A等^[10]发现 *brlA* 是一个复合基因,含 α 、 β 两个重叠转录单元,且 α 的起始密码位于 β 的内含子内。两者的转录表达,都对分生孢子梗的发育起重要作用。而 HanST^[11] 等的研究表明, *brlA* 基因的 α 、 β 两个转录单元在发育中的作用有差异,前者偏重于发育的延续,后者则控制发育的开始。

3 抗真菌药物的研究

丝状真菌与人的真核生物相似性,决定了对其有效的治疗药物的毒副作用较大,如两性霉素 B、克霉唑、伊曲康唑、5-氟胞嘧啶等,寻找新的抗真菌特异性药物已是势在必行。一种小分子的抗真菌蛋白已被从半知菌——巨大曲霉中分离出。它抑制许多丝状真菌(如黑曲霉及巨大曲霉等曲霉)自身的生长。此酶基因的限制性内切酶图谱、分子杂交图谱和核酸测序已由 Wneddt S 等^[12]完成,部分 cDNA 文库已经建立并且该蛋白基因已转入黑曲霉表达系统中,但表达量很低,可能是由于该酶的遏制性。鉴于该蛋白作为抗真菌药物的前景良好,真菌学家将对其抗真菌活性的分子机制进一步研究。另外,首先在 *E. coli* 中发现的拓扑异构酶(W-Protein)也已成为重要研究对象。它首先是一种能改变 DNA 拓扑异构的酶,不仅在 DNA 的复制及重组中起作用,而且还是许多抗细菌和抗癌药物的作用靶点^[13]。1992年 Fostel J M^[14]等比较了白色念珠菌与哺乳类、人类拓扑异构酶的分子结构和功能特异性,肯定了两种酶在化学药物(如 Eupolauridine)靶标识别上的特异性的差异,确立了拓扑异构酶作为寻找高效、安全抗真菌药物筛选靶点的可行性。同年 Shen L L 等^[15]在重要机会致病菌——黑曲霉中发现了 I 型和 II 型拓扑异构酶的高表达。II 型拓扑异构酶经纯化后可进行药物指标的检定。

4 丝状致病真菌的分子进化

核糖体 DNA (rDNA) 基因序列区是丝状致病真菌分子进化研究的理想靶点, Morales VM^[16] 等对 9 株东北小球腔菌基因组中编码 5.8S rRNA 的序列区及其转录开放阅读框架 (ITS1, ITS2) 进行 PCR 扩增、测序,并利用最大类似法对 5.8S rRNA 的序列进行同源性分析,作出了 10 种相关真菌的种系亲缘图谱,发现东北小球腔菌与链格孢的亲缘关系更近。而与致病性有关的 ITS1、ITS2 序列区在种间有显著不同,其中弱侵袭性的菌株与链格孢的亲缘关系比与同种高侵袭性的菌株的更相近,而且侵袭性强、弱两种菌株,在限制性内切酶酶切图谱 (RFLP)、DNA 随机扩增多态性 (RAPD) 及基因组核型上均有较大差异^[17]。另外,根据 rDNA 绘制的进化图谱可能会在种间由于 G+C 百分含量的变化而变化。但到目前为止,还没有比 rDNA (rRNA) 更好的种系进化标记物,它所给出的真菌包括担子菌、丝状子囊、子囊酵母菌、接合菌和壶菌,除去了卵菌和 Chlorophyte。另一重要的丝状致病真菌——卡氏肺囊虫,组织学和细胞学上长期被认为既是真菌,又是原生动物。但在分子水平上,对其大、小亚基 rRNA 的核酸序列分析^[18]表明,卡氏肺囊虫起源于真菌,与子囊菌的亲缘关系更加密切。其线粒体 DNA 与真菌的具有 60% 的同源性,远高于其与原生动物的 20% 同源性,且还具有一种真菌特有的分子标记, EF-3 延伸因子^[19]。

5 展望

综上所述,丝状致病真菌的分子生物学研究日益深入,基础性研究将在丝状真菌致病机理,包括真菌毒素的神经作用机理、基因工程药物、真菌的分子进化等方面取得较大突破。同时,临床早期诊断丝状真菌感染的各种分子生物学技术的不断改进必将给丝状真菌病的临床早期诊断和治疗带来一次巨大的飞跃。

参 考 文 献

- [1] Bhatnagar D, Ehrlich K C, Cleveland T E. Oxodation-Reduction Reactions in Biosynthesis of Secondary Metabolites, In: Bhatnagar D *et al* ed. Handbook of Applied Mycology, Vol 5. Mycology in Ecological Systems. New York: Academic Press, 1992. 255~286.
- [2] Yu Jiujiang, Carry J W, Bhatnagar D *et al*. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 3564~3571.
- [3] Chang P K, Skory C D, Linz J E. *Curr Genet*, 1992, **21**: 231~233.
- [4] Skory C D, Chang P K, Linz J E. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **338**: 286~296.
- [5] Chang P K, Carry J W, Bhatnagar D. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 327~329.
- [6] Payne G A, Nystrom G J, Bhatnagar D. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 156~162.
- [7] Woloshuk C P, Payne G A. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**: 670~676.
- [8] Kolattukudy P E, Lee J D, Rogers, L M. *Infect Immun*, 1993, **61**: 2357~2368.
- [9] Miller L Y, Wu J, Miller B L. *Genes Dev*, 1992, **6**: 1770~1782.
- [10] Prade R A, Timberlake W E. *EMBO J*, 1993, **12**: 2439~2447.
- [11] Han S T, Navarro J, Greve R A *et al*. *EMBO J*, 1993, **12**: 1~9.
- [12] Wnendt S, Ulbrich N, Stahl U. *Curr Genet*, 1994, **25**: 519~523.
- [13] Liu L F. *Annu Rev Biochem*, 1989, **58**: 351~375.
- [14] Fostel J M, Montgomery D A, Shen L L. *Antimic Agents Chemothe*, 1992, **36**: 2131~2138.
- [15] Shen L L, Baranowski J, Fostel J M *et al*. *Antimic Agents Chemothe*, 1992, **36**: 2778~2784.
- [16] Morales V M, Pelcher L E, Taylor J L. *Curr Genet*, 1993, **23**: 490~495.
- [17] Taylor J L, Borgmann I, Seguin-Swartz G. *Curr Genet*, 1991, **19**: 273~277.
- [18] Hughes W T. *Euro J Epidemiol*, 1989, **5**: 265~269.
- [19] Ypma-Wongg MF, Fonzi W A, Sypberd P S. *Infect Immun*, 1992, **60**: 4140~4145.

ADVANCE OF MOLECULAR BIOLOGICAL RESEARCH OF FILAMENTOUS PATHOGENIC FUNGI

Han Li Tan Gengwen Chen Shiping

(Chinese PLA General Hospital, BeiJing 100853)