



## 胶霉毒素的研究进展

陈芳艳, 张常建, 韩黎\*

中国人民解放军疾病预防控制中心医院感染监控中心, 北京 100071

**摘要:** 胶霉毒素(gliotoxin, GT)是一个分子量为 326 Da 的小分子化合物, 其骨架是由非核糖体肽合成酶 GliP 催化苯丙氨酸和丝氨酸缩合成的环二肽, 属于表聚硫代哌嗪二酮类化合物, 是一种重要的真菌次级代谢产物。体内外研究已经表明, GT 对动植物产生多种效应, 不仅具有免疫抑制功能和诱导细胞凋亡作用, 在生物防治方面也具有潜在的应用价值。本文将对有关 GT 生物合成、诱导宿主效应机制及其潜在应用价值进行综述。

**关键词:** 真菌, 胶霉毒素, 次级代谢产物

胶霉毒素(gliotoxin, GT)是一种重要的疏水性真菌代谢产物, 属于表聚硫代哌嗪二酮类化合物(Epidithiodiketopiperazines, ETPs)<sup>[1]</sup>。ETPs 是一类主要由真菌产生的活性次级代谢产物, 其结构特征是都含有二硫键的二酮哌嗪(diketopiperazine, DKP)核心, 具有广泛的生物活性, 包括抗增殖、细胞毒、免疫抑制、抗病毒以及抗菌等; 而 GT 是第一个被发现的 ETP 类化合物, 也是最简单的 ETP 类化合物之一。到目前为止, 从自然界中共分离得到一百多个 ETP 类化合物, 如 chaetocin、andchetomin 和 sporidesmin 等<sup>[2-4]</sup>。GT 最初分离于绿色木霉菌(*Trichoderma virens*), 后来研究发现其广泛存在于曲霉菌和其他真菌的代谢产物中, 如烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)、黑曲霉(*Aspergillus*

*niger*)、土曲霉(*Aspergillus terreus*)、谢瓦散囊菌(*Eurotium chevalieri*)以及一些青霉属(*Penicillium*)真菌和支顶孢属(*Acremonium*)真菌<sup>[5-6]</sup>。GT 是一个分子质量为 326 Da 的小分子化合物, 其前体是由非核糖体肽合成酶 GliP 催化苯丙氨酸和丝氨酸合成的二肽, 随后发生分子内的环化反应导致 DKP 核心骨架形成<sup>[7]</sup>。其结构特点与 ETPs 的结构特征一致, 哌嗪环上的二硫键是 GT 发挥生物活性的关键, 可与蛋白质上的半胱氨酸残基相连, 使 GT 与蛋白质发生相互作用进而影响蛋白质的生物学功能<sup>[8]</sup>; GT 还通过氧化还原循环生成 ROS, ROS 生成机制被认为是 GT 产生细胞毒性的一种机制<sup>[9]</sup>。体内外研究表明, GT 对动植物产生多种效应, 不仅具有免疫抑制功能和诱导细胞凋亡作用, 在生

基金项目: 国家自然科学基金(81401305)

\*通信作者。Tel: +86-10-66948316; E-mail: hanlicdc@163.com

收稿日期: 2016-11-22; 修回日期: 2017-02-24; 网络出版日期: 2017-03-03

物防治方面也具有潜在的应用价值。本文将对有关 GT 生物合成、诱导宿主效应机制及其潜在应用价值进行综述。

## 1 GT 生物合成过程及调控机制

尽管 GT 结构简单、分子量小,但是直到 2005 年烟曲霉全基因组测序完成,负责 GT 生物合成的基因才成功鉴定<sup>[10-11]</sup>。与许多次级代谢产物的生物合成通路相似,烟曲霉中所有参与 GT 生物合成的基因成簇分布于其基因组中,该基因簇由 12 个基因组成,分别是 *gliZ*、*gliI*、*gliJ*、*gliP*、*gliC*、*gliM*、*gliG*、*gliK*、*gliA*、*gliN*、*gliF* 和 *gliT*。绿色木霉菌中负责 GT 生物合成的基因只有 8 个,分别是 *gliI*、*gliP*、*gliC*、*gliM*、*gliG*、*gliK*、*gliN* 和 *gliF*。近年来在其生物合成过程方面的研究也取得了重要进展。目前已知的 GT 生物合成过程为<sup>[5]</sup>:起始于二酮哌嗪(DKP)骨架的形成,DKP 骨架由非核糖体肽合成酶 *GliP* 催化形成;*GliP* 是一种多功能酶,催化苯丙氨酸和丝氨酸发生缩合反应形成 Phe-Ala 二肽,随后发生分子内的环化反应导致 DKP 骨架形成。已有研究表明 *gliP* 基因的敲除导致无 GT 合成。在 GT 合成过程中,引入硫是很关键的一步,但是研究表明在谷胱甘肽-S-转移酶 *GliG* 介导谷胱甘肽耦合到 DKP 骨架上之前,*GliC* 必须先催化 DKP 骨架上  $\alpha$  碳位点发生羟基化<sup>[12]</sup>。谷胱甘肽骨干的降解涉及到多种酶的参与,促使胶霉毒素的表聚硫代形成。*GliK*,一种  $\gamma$ -谷氨酰环化转移酶,将谷胱甘肽化的中间体上的  $\gamma$ -谷氨酰基团切割下来,剩下的 Cys-Gly 二肽被特异的二肽酶 *GliJ* 切割。该降解级联反应的最后一步是由 5'-磷酸吡哆醛依赖性酶 *GliI* 催化完成的,涉及到 C-S 键的切割,生成一种生物合成中间体,以

及氨和丙酮酸两个副产物。随后该中间体被 N-甲基转移酶 *GliN* 进行 N-甲基化。胶霉毒素生物合成的最后一步由一种黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)依赖的胶霉毒素氧化还原酶 *GliT* 催化完成,氧化自由巯基形成二硫键,与此同时分子氧被还原成过氧化氢。*GliA* 作为主要的转运载体,参与 GT 分泌到培养基过程<sup>[13]</sup>。虽然基因测序结果显示<sup>[5]</sup>,*GliF* 是一种细胞色素 P450 氧化还原酶,*GliM* 是一种 O-甲基转移酶,但是二者在 GT 生物合成途径中的具体功能还不清楚。基因组比较分析发现,两种甲基转移酶对 GT 活性的影响是完全相反的;S-甲基转移酶 *TmtA* 由 *gli* 基因簇外的基因编码,GT 被 *TmtA* 甲基化后无法形成二硫键,完全抑制 GT 的有害效应;N-甲基转移酶 *gliN*,其基因敲除后导致 GT 去甲基化,导致其细胞毒性显著降低<sup>[14]</sup>。虽然 GT 生物合成的主要反应过程已经被阐明,关于其生物合成过程的相关综述也已有详细报道<sup>[5,15]</sup>,但是大部分反应的调控机制还不清楚,主要是调控其生物合成过程的机制比较复杂,涉及范围广泛,不仅涉及真菌自身相关因子的调控机制,还包括外界环境因素的调控机制。

锌指转录因子 *GliZ* 是 GT 生物合成中的关键调控因子,调控所有负责 GT 合成的基因转录<sup>[16]</sup>。敲除 *gliZ* 基因导致 GT 合成终止,*gli* 基因簇的其他基因也不表达;而过表达相应基因后 GT 含量显著增加。*mtfA* 是一个 *veA* 依赖基因,其编码产物为一种新的 C2H2 锌指结构域转录因子。研究表明,*mtfA* 基因不仅影响烟曲霉生长和发育,还与其次级代谢产物 GT 的生成显著相关,当烟曲霉中 *mtfA* 基因过表达时,GT 生成量显著增加,且参与 GT 合成的 *gliZ* 和 *gliP* 基因转录水平也显著升高<sup>[17]</sup>。*Schoberle* 及其同事鉴定出一个新的转录因子 *GipA*,调控 GT 的生物合成<sup>[18]</sup>。*GipA* 拷

贝数增多时诱导 GT 含量升高, 反之, GipA 缺失时其含量显著下降。GipA 结合 DNA 的位点紧挨 GliZ 结合 DNA 的一个潜在位点, 因此我们推测 GliZ 和 GipA 这两个转录因子的调控作用很可能相互影响。BrlA 是含 C2H2 锌指结构域的转录因子, *abaA* 基因可被 BrlA 激活, 编码产物为含 ATTS DNA-binding motif 的转录因子 AbaA。比较蛋白质组学研究表明烟曲霉的 AbaA 和 BrlA 转录因子正调控 GT 生物合成基因簇的表达, 这两种烟曲霉突变株(*ΔabaA*、*ΔbrlA*)内的 GT 合成基因簇基因 mRNA 水平显著下降, 包括 *gliM*、*gliP*、*gliT* 及 *gliZ*, 且 GT 水平显著下降, 甚至不产生<sup>[19]</sup>。

除真菌自身转录因子调控 GT 生物合成外, 外界环境因素也发挥重要作用。真菌培养过程中的 N/C 源、pH 值、温度以及通气条件均影响其次级代谢产物的生成。已有研究表明, 与传统培养条件(低氧、室温)相比, 37 °C 条件下培养的烟曲霉生成 GT 的速度明显加快, 培养 24 h 即可检测到 GT, 培养 48–72 h 达到峰值, 且烟曲霉生成 GT 具有氧气依赖性<sup>[20–21]</sup>。烟曲霉感染哺乳动物或与细胞相互作用时, 负责 GT 合成的基因表达升高, 但是具体是什么因子诱导其表达还不清楚<sup>[22–23]</sup>。细菌细胞壁相关成分如肽聚糖、脂多糖刺激烟曲霉时 GT 含量显著增加<sup>[24]</sup>。除此以外, GT 自身可通过正反馈的方式影响 *gli* 基因簇中基因的表达<sup>[25]</sup>。

## 2 GT 的作用机制

已有研究表明真菌对不同类型的细胞或微生物产生的诸多效应均依赖于 GT 的生物学活性, 主要包括其诱导作用和抑制活性<sup>[26]</sup>。GT 对宿主的诱导效应主要包括: 诱导细胞凋亡; 诱导细胞形态改变; 抑制 NADPH 氧化酶组装; 导致氧化还

原反应失衡; 抑制蛋白酶体活性, 导致 NF-κB 活性被抑制, 降低免疫活性<sup>[5]</sup>。但是研究者们已经发现, 在不同研究中 GT 的作用效应可能不同甚至相反, 这不仅是因为 GT 使用浓度不同, 而且与其作用的细胞类型及其他技术参数有关。尽管 GT 的一些诱导效应的具体机制还是未知的, 但是可以明确的是 GT 哌嗪环上二硫键的完整性对其活性来说是必不可少的, 如其巯基与靶蛋白交联进而使之灭活, 并能产生 ROS, 引起细胞凋亡和坏死; 一些还原试剂可以使 GT 活性降低甚至失活<sup>[18–9]</sup>。

### 2.1 GT 在细胞凋亡中的诱导机制

已有大量的研究报道表明, GT 可诱导不同种属(人、猴、猪、大鼠、小鼠、鱼及昆虫等)的多种类型的细胞(单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞、胸腺细胞、上皮细胞、成纤维细胞及脾细胞等)凋亡, 但是 GT 诱导不同类型细胞凋亡的浓度和时间具有显著差异。巨噬细胞比上皮细胞、成纤维细胞更容易被 GT 诱导凋亡, 相对较低浓度的 GT 刺激较短时间即可诱导巨噬细胞凋亡, 如 0.15 μmol/L GT 刺激巨噬细胞 6 h 时, 该细胞出现典型的凋亡特征, 而 1.5 μmol/L GT 刺激上皮细胞或成纤维细胞 24 h 时才出现细胞凋亡的特征<sup>[27]</sup>。单核细胞比 T 细胞、B 细胞也更容易被 GT 诱导凋亡, 35 ng/mL GT 分别作用单核细胞、T 细胞及 B 细胞 1、2、3、4、6 h 时检测细胞凋亡情况, 结果显示作用 4 h 时, 约 40% 单核细胞发生凋亡, 作用 6 h 时约 60% 单核细胞发生凋亡, 而 T 细胞和 B 细胞的凋亡率均小于 30%<sup>[28]</sup>。

近年, 研究者在 GT 诱导细胞凋亡机制方面的研究已取得一定的进展<sup>[5]</sup>。在人宫颈癌细胞(Hela)和人软骨肉瘤(SW1353)细胞中 GT 主要通过线粒体通路诱导细胞凋亡, 表现为诱导 caspase-3, caspase-8 及 caspase-9 活化, 下调 Bcl-2 表达, 上

调 Bax 表达和增加细胞色素 C(cytochrome c, cyt c) 释放<sup>[29]</sup>。在小鼠成纤维细胞、人支气管上皮细胞和小鼠肺泡上皮细胞中, GT 和烟曲霉培养上清激活 JNK 通路, JNK 介导 Bim<sub>EL</sub> 的 3 个位点(S100、T112 和 S114)磷酸化, 引发 Bak 和 caspase 依赖的细胞凋亡。该信号通路似乎是烟曲霉以 GT 依赖的方式杀死肺上皮细胞的有利工具, 该机制也能解释为什么 GT 具有促进侵袭性曲霉病发展的作用<sup>[30]</sup>。GT 通过 JNK 介导的 Bim 磷酸化信号通路诱导多种哺乳动物细胞发生细胞凋亡, 该发现为我们对 Bim 激活提供了一个全新的认识。从各种基因缺陷小鼠品系的表型可知, Bim 是免疫系统最重要的 BH3-only 蛋白, 参与多种不同类型细胞的凋亡过程。BH3-only 蛋白被认为是线粒体凋亡通路的传感器, 他们是 Bcl-2 家族中最上游的组件, 从而调节线粒体凋亡。GT 还通过氧化应激途径介导细胞凋亡。GT 诱导 ROS 过量生成进而诱导细胞凋亡, ROS 亦可加速线粒体细胞色素 C 和诱导凋亡因子的释放从而参与细胞凋亡<sup>[9]</sup>。此外还有研究表明, 进入细胞内的 GT, 诱导细胞凋亡后, 大部分会被释放出来, 且以氧化型形式释放, 然后进入临近细胞并诱导该细胞凋亡, 该机制使得很少量的 GT 可以发挥最大的作用效应<sup>[31]</sup>。

## 2.2 GT 在宿主细胞中的免疫抑制效应机制

众所周知, GT 具有免疫抑制作用, 主要表现为: 抑制巨噬细胞的吞噬作用, 抑制中性粒细胞的免疫功能, 抑制免疫细胞的免疫反应, 帮助真菌逃脱免疫细胞的免疫攻击, 促进真菌感染进展。不少研究者一直在探索 GT 发挥免疫抑制作用的具体机制。最为熟知的是, GT 通过抑制蛋白酶体介导的 I $\kappa$ B $\alpha$  降解抑制 NF- $\kappa$ B 激活<sup>[32]</sup>。GT 能够有效地、非竞争性地抑制 20S 蛋白酶体的糜蛋白酶样活性, 因此 I $\kappa$ B $\alpha$  激酶复合物介导的 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸

化不会导致 I $\kappa$ B $\alpha$  的蛋白酶体降解, 结果 I $\kappa$ B $\alpha$  仍然结合在 NF- $\kappa$ B 上, NF- $\kappa$ B 不能进入核, 导致 NF- $\kappa$ B 介导的转录信号被抑制。最近研究表明, GT 通过靶向磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸肌醇 [PtdIns(3,4,5)P3] 的代谢帮助烟曲霉逃脱巨噬细胞的免疫吞噬作用<sup>[33]</sup>。GT 作用巨噬细胞后, 胞内磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸肌醇含量下降, 导致整合素和肌动蛋白骨架功能缺陷, 阻止细胞膜突起延伸, 进而影响巨噬细胞的吞噬功能, 有助于烟曲霉逃脱。然而, 我们前期的研究发现, GT 通过激活肺上皮细胞内磷脂酶 D 和诱导细胞肌动蛋白骨架重排促进烟曲霉孢子内化侵入细胞, 但是其具体调控机制还不是很清楚<sup>[34]</sup>。此外, 已有大量研究表明, GT 显著抑制血管生成<sup>[5,35-36]</sup>。在低于细胞毒性浓度下, GT 能够抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的血管生成作用。在环磷酰胺免疫抑制的小鼠中, GT 抑制 ROS 的生成, 导致血管生成效应被完全抑制。但是在醋酸可的松免疫抑制的小鼠中, 多形核白细胞大量浸润到肺中, ROS 生成量显著增加, 增加的 ROS 可能能够抵消 GT 的抑制活性, 因此, 在醋酸可的松免疫抑制的小鼠体内 GT 不能抑制血管生成。

## 2.3 GT 在感染疾病中的作用机制

一些致病真菌感染人体或动物、植物后, 该真菌在感染部位会产生多种次级代谢产物, 其中包括 GT。烟曲霉感染的小鼠肺组织和血清及感染曲霉的人类血清和肺泡灌洗液中也均可检测到 GT<sup>[37-38]</sup>。环磷酰胺和醋酸可的松是两种常用的免疫抑制剂。研究证明环磷酰胺和醋酸可的松联合诱导的免疫缺陷小鼠模型肺组织中中性粒细胞缺乏, 用 *gliP* 和 *gliZ* 突变烟曲霉菌株感染该小鼠时, 无中性粒细胞募集到肺组织中, 且与能够生成 GT 的野生型烟曲霉菌株感染组相比, 突变株的毒力没有显著变化<sup>[25,39]</sup>。相反, 当仅用醋酸可的松诱

导小鼠免疫抑制时, *gliP* 敲除突变株对该小鼠的毒力显著减弱<sup>[8,40]</sup>。进一步研究发现仅用醋酸可的松免疫抑制的小鼠被感染后, 中性粒细胞仍然能够被募集到感染部位, 暗示在有中性粒细胞的小鼠中, GT 主要通过靶向免疫细胞(中性粒细胞或其他吞噬细胞)的活性促进真菌致病性。因此, 我们可以推测, 宿主免疫抑制的状态决定 GT 在致病真菌烟曲霉感染过程中的贡献。体外研究已经表明, 不同类型细胞对 GT 的敏感性不同。体内研究结果也显示 GT 浓度差异大, 这可能与疾病病程有关, 但是目前为止我们还不能确定 GT 到达机体某组织或某类细胞中的有效浓度是多少, 而且体内外效应有显著差异。因此, GT 在感染过程中的意义还需进一步研究验证。

### 3 GT 的潜在应用价值

已有一些研究表明, GT 通过诱导人类多种癌细胞凋亡发挥抗癌作用, 如人宫颈癌细胞、肺癌细胞、结肠癌细胞、慢性淋巴细胞白血病细胞等。GT 作为一种免疫抑制剂, 可抑制多种分子的生理活性, 如抑制 NF- $\kappa$ B 活性, 抑制 Notch2 转录, 抑制组蛋白甲基转移酶活性等。研究者们已发现人类多种癌细胞中 Wnt 信号通路的异常激活, 且该信号通路活化的标志是  $\beta$ -catenin 的转录作用激活。在多种结肠癌细胞系中, GT 通过促进  $\beta$ -catenin 降解抑制 Wnt 信号通路活性, 为 GT 具有抗癌活性提供充分证据; 同时 GT 还表现出抑制大肠癌细胞增殖、诱导其凋亡的生理功能, 在这些结肠癌细胞系中 GT 很可能是通过激活 caspase 通路诱导细胞凋亡的<sup>[41]</sup>。在慢性淋巴细胞白血病(CLL)细胞中, 被激活的 Notch2 组成性表达, 参与调节多种癌症相关的信号转导通路, 包括 NF- $\kappa$ B 和

NR4A1。研究发现 GT 显著抑制 Notch2 信号, 诱导 CLL 细胞凋亡, 在治疗 CLL 方面具有很大的应用潜能<sup>[42]</sup>。GT 对 NF- $\kappa$ B 活性的影响也可能具有潜在的医疗应用价值, 在 13 例患有多发性骨髓瘤病人的原代样本和 4 种多发性骨髓瘤细胞系(U266、RPMI 8226、HS-Sultan 和 K620)中发现 GT 能够诱导细胞凋亡<sup>[43]</sup>。GT 对蛋白酶体的抑制活性在病原体恶性疟原虫中也有表现, 且其有效浓度低于细胞毒性水平<sup>[44-45]</sup>。因此, GT 在抗疟疾方面可能具有潜在应用价值。此外, 随着近年来检测技术的迅速发展, 目前已在人血清、血浆及小鼠肺组织、血清中检测到 GT<sup>[37-38,46]</sup>。侵袭性曲霉病小鼠模型肺组织和血清中 GT 含量分别为(3976 $\pm$ 1662) ng/g 和(36.50 $\pm$ 30.28) ng/mL; 确认患有侵袭性曲霉病病人的 5 例血清样本中有 4 例检出 GT, 浓度分别为 166、372、203、785 ng/mL; 疑似患有侵袭性曲霉病病人的血清样本 11 例, 其中 2 例检出 GT, 浓度分别为 65、154 ng/mL; 疑似患有侵袭性曲霉病病人的血浆样本 18 例, 其中 10 例检测出 GT 的衍生物 bmGT, 浓度高达 49.84  $\mu$ g/mL, 且认为 bmGT 更稳定。因此, 研究者表明 GT 及其衍生物均可作为诊断烟曲霉感染的潜在标志物。

19 世纪 30 年代发现绿色木霉菌生成的 GT 可作为“抗生素”使用, 抑制广泛分布于植物中的病原体纹枯病菌, 因而作为植物疾病生物防治试剂。随后, 一些报道呼吁用能够生成 GT 的绿色木霉菌株防治植物疾病<sup>[5]</sup>, 且至少有 2 个可用的商业配方是基于产生 GT 的绿色木霉菌株制成的。叶面喷施的方式使用 GT 可以防治马铃薯叶子生烟草褐斑病, 具有相当好的保护作用, 没有任何明显的药物毒害。但是在土壤和植物根系周围检测到 GT, 而关于植物持续地吸收 GT 对其是否有危害方面的研究还很少, 所以这方面也是使用绿色木

霉菌作为商业制剂需要注意的安全问题。也有一些报道表明 GT 具有植物毒性。简单的发芽试验表明 GT 是有植物毒性的。烟曲霉产生的 GT 也可以抑制莴苣幼苗生长。GT 通过抑制乙酰乳酸合成酶干扰侧链氨基酸的生成进而抑制烟草细胞和幼苗根系的生长。但是在生物防治实验中,已经观察到产生 GT 的菌株对栽培植物生长没有副作用<sup>[47]</sup>。

## 4 展望

综上所述,近几年在调控 GT 合成机制和 GT 对宿主产生效应机制方面的研究取得了较多的进展,研究领域涉及广泛,从 GT 的致病机制研究到利用其免疫抑制功能在抗癌等药物开发以及农业生物防治方面的研究均在积极向前推进。然而 GT 作为真菌天然产品,尽管在生物防治和药物应用上有一定的价值,但是自然界中存在的 GT 对动物和人类健康的影响不容忽视。黄曲霉毒素和霉菌毒素能够进入食物链,并在加工食品和人体中达到惊人的数量。但是,人们很少知道食物中有 GT 的污染。实际上与黄曲霉毒素一样,GT 也能够污染青储饲料和储存的食物。近年来,尽管真菌毒素检测技术迅速发展,现已可以同时筛选几种真菌毒素,但是我们还需要更进一步优化筛选方法确保食物的质量,尤其需要考虑的是低浓度 GT 对人类细胞产生的效应。此外,在洪水淹没过的建筑物中发现建筑材料、室内家具和室内灰尘中均有 GT 存在<sup>[48]</sup>。住宅中霉菌的生长已经是一个公认的问题,尤其是在全球温暖而潮湿的地区,GT 的潜在生成可能是一个被人们低估了的风险因素。正如 GT 污染食物和饲料问题一样,室内环境 GT 污染问题也值得人们深入地研究探讨。

## 参考文献

- [1] Orciuolo E, Stanzani M, Canestraro M, Galimberti S, Carulli G, Lewis R, Petrini M, Komanduri KV. Effects of *Aspergillus fumigatus* gliotoxin and methylprednisolone on human neutrophils: implications for the pathogenesis of invasive aspergillosis. *Journal of Leukocyte Biology*, 2007, 82(4): 839–848.
- [2] Li WL, Xia J. Recent advances in diketopiperazines biosynthesis. *Microbiology China*, 2014, 41(1): 111–121. (in Chinese)  
李文利, 夏娟. 二酮哌嗪类化合物生物合成研究进展. *微生物学通报*, 2014, 41(1): 111–121.
- [3] Li LY, Zhu TJ, Li DH, Gu QQ. Progress in the research of epipolythiodioxopiperazines. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2013, 38(3): 161–174. (in Chinese)  
李莉媛, 朱天骄, 李德海, 顾谦群. 多硫代二酮哌嗪类化合物的研究进展. *中国抗生素杂志*, 2013, 38(3): 161–174.
- [4] Reece KM, Richardson ED, Cook KM, Campbell TJ, Pisle ST, Holly AJ, Venzon DJ, Liewehr DJ, Chau CH, Price DK, Figg WD. Epidithiodiketopiperazines (ETPs) exhibit in vitro antiangiogenic and in vivo antitumor activity by disrupting the HIF-1 $\alpha$ /p300 complex in a preclinical model of prostate cancer. *Molecular Cancer*, 2014, 13: 91.
- [5] Scharf DH, Brakhage AA, Mukherjee PK. Gliotoxin--bane or boon? *Environmental Microbiology*, 2016, 18(4): 1096–1109.
- [6] Lewis RE, Wiederhold NP, Lionakis MS, Prince RA, Kontoyiannis DP. Frequency and species distribution of gliotoxin-producing *Aspergillus* isolates recovered from patients at a tertiary-care cancer center. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(12): 6120–6122.
- [7] Schrettl M, Carberry S, Kavanagh K, Haas H, Jones GW, O'Brien J, Nolan A, Stephens J, Fenelon O, Doyle S. Self-protection against gliotoxin--a component of the gliotoxin biosynthetic cluster, GliT, completely protects *Aspergillus fumigatus* against exogenous gliotoxin. *PLoS Pathogens*, 2010, 6(6): e1000952.
- [8] Chen JJ, Yang M, Zhang LR, Zheng ZH, Song SY. Study on the interaction of Gliotoxin with BSA. *Microbiology*, 2009, 36(8): 1227–1231. (in Chinese)  
陈俊杰, 杨梅, 张连茹, 郑忠辉, 宋思扬. 胶毒素与 BSA 的相互作用. *微生物学通报*, 2009, 36(8): 1227–1231.
- [9] Kwon-Chung KJ, Sugui JA. What do we know about the role of gliotoxin in the pathobiology of *Aspergillus fumigatus*? *Medical Mycology*, 2009, 47(Suppl 1): S97–S103.

- [10] Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, Wortman JR, Kim HS, Arroyo J, Berriman M, Abe K, Archer DB, Bermejo C, Bennett J, Bowyer P, Chen D, Collins M, Coulsen R, Davies R, Dyer PS, Farman M, Fedorova N, Fedorova N, Feldblyum TV, Fischer R, Fosker N, Fraser A, García JL, García MJ, Goble A, Goldman GH, Gomi K, Griffith-Jones S, Gwilliam R, Haas B, Haas H, Harris D, Horiuchi H, Huang JQ, Humphray S, Jiménez J, Keller N, Khouri H, Kitamoto K, Kobayashi T, Konzack S, Kulkarni R, Kumagai T, Lafon A, Latgé JP, Li WX, Lord A, Lu C, Majoros WH, May GS, Miller BL, Mohamoud Y, Molina M, Monod M, Mouyna I, Mulligan S, Murphy L, O'Neil S, Paulsen I, Peñalva MA, Perteua M, Price C, Pritchard BL, Quail MA, Rabbinowitsch E, Rawlins N, Rajandream MA, Reichard U, Renauld H, Robson GD, Rodriguez de Córdoba S, Rodríguez-Peña JM, Ronning CM, Rutter S, Salzberg SL, Sanchez M, Sánchez-Ferrero JC, Saunders D, Seeger K, Squares R, Squares S, Takeuchi M, Tekaia F, Turner G, Vazquez de Aldana CR, Weidman J, White O, Woodward J, Yu JH, Fraser C, Galagan JE, Asai K, Machida M, Hall N, Barrell B, Denning DW. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 2005, 438(7071): 1151–1156.
- [11] Gardiner DM, Howlett BJ. Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 248(2): 241–248.
- [12] Chang SL, Chiang YM, Yeh HH, Wu TK, Wang CCC. Reconstitution of the early steps of gliotoxin biosynthesis in *Aspergillus nidulans* reveals the role of the monooxygenase GliC. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013, 23(7): 2155–2157.
- [13] Wang DN, Toyotome T, Muraosa Y, Watanabe A, Wuren T, Bunsupa S, Aoyagi K, Yamazaki M, Takino M, Kamei K. GliA in *Aspergillus fumigatus* is required for its tolerance to gliotoxin and affects the amount of extracellular and intracellular gliotoxin. *Medical Mycology*, 2014, 52(5): 506–518.
- [14] Scharf DH, Habel A, Heinekamp T, Brakhage AA, Hertweck C. Opposed effects of enzymatic gliotoxin N- and S-methylations. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(33): 11674–11679.
- [15] Dolan SK, O'Keefe G, Jones GW, Doyle S. Resistance is not futile: gliotoxin biosynthesis, functionality and utility. *Trends in Microbiology*, 2015, 23(7): 419–428.
- [16] Bok JW, Chung D, Balajee SA, Marr KA, Andes D, Nielsen KF, Frisvad JC, Kirby KA, Keller NP. GliZ, a transcriptional regulator of gliotoxin biosynthesis, contributes to *Aspergillus fumigatus* virulence. *Infection and Immunity*, 2006, 74(12): 6761–6768.
- [17] Smith TD, Calvo AM. The *mtfA* transcription factor gene controls morphogenesis, gliotoxin production, and virulence in the opportunistic human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell*, 2014, 13(6): 766–775.
- [18] Schoberle TJ, Nguyen-Coleman CK, Herold J, Yang A, Weirauch M, Hughes TR, McMurray JS, May GS. A novel C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> transcription factor that regulates *gliA* expression interdependently with GliZ in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genetics*, 2014, 10(5): e1004336.
- [19] Shin KS, Kim YH, Yu JH. Proteomic analyses reveal the key roles of BrlA and AbaA in biogenesis of gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 463(3): 428–433.
- [20] Watanabe A, Kamei K, Sekine T, Higurashi H, Ochiai E, Hashimoto Y, Nishimura K. Cytotoxic substances from *Aspergillus fumigatus* in oxygenated or poorly oxygenated environment. *Mycopathologia*, 2004, 158(1): 1–7.
- [21] Brakhage AA. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(1): 21–32.
- [22] McDonagh A, Fedorova ND, Crabtree J, Yu Y, Kim S, Chen D, Loss O, Cairns T, Goldman G, Armstrong-James D, Haynes K, Haas H, Schrettl M, May G, Nierman WC, Bignell E. Sub-telomere directed gene expression during initiation of invasive aspergillosis. *PLoS Pathogens*, 2008, 4(9): e1000154.
- [23] Bertuzzi M, Schrettl M, Alcazar-Fuoli L, Cairns TC, Muñoz A, Walker LA, Herbst S, Safari M, Cheverton AM, Chen D, Liu H, Saijo S, Fedorova ND, Armstrong-James D, Munro CA, Read ND, Filler SG, Espeso EA, Nierman WC, Haas H, Bignell EM. The pH-responsive PacC transcription factor of *Aspergillus fumigatus* governs epithelial entry and tissue invasion during pulmonary aspergillosis. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(10): e1004413.
- [24] Svahn KS, Göransson U, Chryssanthou E, Olsen B, Sjölin J, Strömstedt AA. Induction of gliotoxin secretion in *Aspergillus fumigatus* by bacteria-associated molecules. *PLoS One*, 2014, 9(4): e93685.
- [25] Cramer RA Jr, Gamcsik MP, Brooking RM, Najvar LK, Kirkpatrick WR, Patterson TF, Balibar CJ, Graybill JR, Perfect JR, Abraham SN, Steinbach WJ. Disruption of a

- nonribosomal peptide synthetase in *Aspergillus fumigatus* eliminates gliotoxin production. *Eukaryotic Cell*, 2006, 5(6): 972–980.
- [26] Scharf DH, Heinekamp T, Brakhage AA. Human and plant fungal pathogens: the role of secondary metabolites. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(1): e1003859.
- [27] DeWitte-Orr SJ, Bols NC. Gliotoxin-induced cytotoxicity in three salmonid cell lines: cell death by apoptosis and necrosis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2005, 141(2): 157–167.
- [28] Stanzani M, Orciuolo E, Lewis R, Kontoyiannis DP, Martins SLR, St John LS, Komanduri KV. *Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. *Blood*, 2005, 105(6): 2258–2265.
- [29] Nguyen VT, Lee JS, Qian ZJ, Li YX, Kim KN, Heo SJ, Jeon YJ, Park WS, Choi IW, Je JY, Jung WK. Gliotoxin isolated from marine fungus *Aspergillus* sp. induces apoptosis of human cervical cancer and chondrosarcoma cells. *Marine Drugs*, 2014, 12(1): 69–87.
- [30] Geissler A, Haun F, Frank DO, Wieland K, Simon MM, Idzko M, Davis RJ, Maurer U, Borner C. Apoptosis induced by the fungal pathogen gliotoxin requires a triple phosphorylation of Bim by JNK. *Cell Death and Differentiation*, 2013, 20(10): 1317–1329.
- [31] Bernardo PH, Brasch N, Chai CLL, Waring P. A novel redox mechanism for the glutathione-dependent reversible uptake of a fungal toxin in cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(47): 46549–46555.
- [32] Kroll M, Arenzana-Seisdedos F, Bachelier F, Thomas D, Friguet B, Conconi M. The secondary fungal metabolite gliotoxin targets proteolytic activities of the proteasome. *Chemistry & Biology*, 1999, 6(10): 689–698.
- [33] Schlam D, Canton J, Carreño M, Kopinski H, Freeman SA, Grinstein S, Fairn GD. Gliotoxin suppresses macrophage immune function by subverting phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate homeostasis. *mBio*, 2016, 7(2): e02242–15.
- [34] Jia XD, Chen FY, Pan WH, Yu RT, Tian SG, Han GG, Fang HQ, Wang S, Zhao JY, Li XP, Zheng DY, Tao S, Liao WQ, Han XL, Han L. Gliotoxin promotes *Aspergillus fumigatus* internalization into type II human pneumocyte A549 cells by inducing host phospholipase D activation. *Microbes and Infection*, 2014, 16(6): 491–501.
- [35] Choi HS, Shim JS, Kim JA, Kang SW, Kwon HJ. Discovery of gliotoxin as a new small molecule targeting thioredoxin redox system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 359(3): 523–528.
- [36] Ben-Ami R, Lewis RE, Leventakos K, Kontoyiannis DP. *Aspergillus fumigatus* inhibits angiogenesis through the production of gliotoxin and other secondary metabolites. *Blood*, 2009, 114(26): 5393–5399.
- [37] Lewis RE, Wiederhold NP, Chi JD, Han XY, Komanduri KV, Kontoyiannis DP, Prince RA. Detection of gliotoxin in experimental and human aspergillosis. *Infection and Immunity*, 2005, 73(1): 635–637.
- [38] Domingo MP, Colmenarejo C, Martínez-Lostao L, Müllbacher A, Jarne C, Revillo MJ, Delgado P, Roc L, Meis JF, Rezusta A, Pardo J, Gálvez EM. Bis(methyl)gliotoxin proves to be a more stable and reliable marker for invasive aspergillosis than gliotoxin and suitable for use in diagnosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2012, 73(1): 57–64.
- [39] Kupfahl C, Heinekamp T, Geginat G, Ruppert T, Härtl A, Hof H, Brakhage AA. Deletion of the gliP 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. *Molecular Microbiology*, 2006, 62(1): 292–302.
- [40] Spikes S, Xu R, Nguyen CK, Chamilos G, Kontoyiannis DP, Jacobson RH, Ejzykowicz DE, Chiang LY, Filler SG, May GS. Gliotoxin production in *Aspergillus fumigatus* contributes to host-specific differences in virulence. *Journal of Infectious Diseases*, 2008, 197(3): 479–486.
- [41] Chen JX, Wang CL, Lan WJ, Huang CY, Lin MM, Wang ZY, Liang WL, Iwamoto A, Yang XL, Liu HL. Gliotoxin inhibits proliferation and induces apoptosis in colorectal cancer cells. *Marine Drugs*, 2015, 13(10): 6259–6273.
- [42] Hubmann R, Hilgarth M, Schnabl S, Ponath E, Reiter M, Demirtas D, Sieghart W, Valent P, Zielinski C, Jäger U, Shehata M. Gliotoxin is a potent NOTCH2 transactivation inhibitor and efficiently induces apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) cells. *British Journal of Haematology*, 2013, 160(5): 618–629.
- [43] Ni HY, Ergin M, Huang Q, Qin JZ, Amin HM, Martinez RL, Saeed S, Barton K, Alkan S. Analysis of expression of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in multiple myeloma: downregulation of NF- $\kappa$ B induces apoptosis. *British Journal of Haematology*, 2001, 115(2): 279–286.
- [44] Hatabu T, Hagiwara M, Taguchi N, Kiyozawa M, Suzuki M, Kano S, Sato K. *Plasmodium falciparum*: the fungal



- metabolite gliotoxin inhibits proteasome proteolytic activity and exerts a plasmodicidal effect on *P. falciparum*. *Experimental Parasitology*, 2006, 112(3): 179–183.
- [45] Kreidenweiss A, Kreamsner PG, Mordmüller B. Comprehensive study of proteasome inhibitors against *Plasmodium falciparum* laboratory strains and field isolates from Gabon. *Malaria Journal*, 2008, 7: 187.
- [46] Cerqueira LB, de Francisco TMG, Gasparetto JC, Campos FR, Pontarolo R. Development and validation of an HPLC-MS/MS method for the early diagnosis of aspergillosis. *PLoS ONE*, 2014, 9(4): e92851.
- [47] Howell CR. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathology*, 2006, 96(2): 178–180.
- [48] Thrasher JD. Fungi, bacteria, nano-particulates, mycotoxins and human health in water-damaged indoor environments. *Journal of Community and Public Health Nursing*, 2016, 2: 115.

## Progress in the research of gliotoxin

Fangyan Chen, Changjian Zhang, Li Han\*

Department of Hospital Infection Control, Institute of Disease Control and Prevention, PLA, Beijing 100071, China

**Abstract:** Gliotoxin is a small molecular compound with a molecular weight of 326 Da, and its skeleton is a cyclic two-peptide synthesized by the non-ribosomal peptide synthetase GliP, catalyzing the condensation reaction of phenylalanine and serine. Gliotoxin belongs to the family of epidithiodiketopiperazines, is an important fungal secondary metabolite. Many studies have shown that gliotoxin has a variety of effects on plants and animals both *in vivo* and *in vitro*. Gliotoxin not only has the function of immune suppression, inducing host cell apoptosis, but also has potential application in biological control. The recent advances in biosynthesis process, mechanisms of gliotoxin on host cells and its potential application value are reviewed in this paper.

**Keywords:** fungi, gliotoxin, secondary metabolites

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81401305)

\*Corresponding author. Tel: +86-10-66948316; E-mail: hanlicdc@163.com

Received: 22 November 2016; Revised: 24 February 2017; Published online: 3 March 2017