

白假丝酵母菌分泌型天冬氨酰蛋白酶的研究进展

汪春华 综述, 陈艺林 审校

[关键词] 白假丝酵母菌; 天冬氨酰蛋白酶; 综述

[中国图书资料分类法分类号] R 379.4 [文献标识码] A

白假丝酵母菌俗称白念珠菌,是存在于健康人群口腔、肠道、生殖道等部位的微生物,也是人体内的条件致病菌。随着抗生素、抗癌药物、免疫抑制剂及大量激素的临床应用,白念珠菌已成为常见的医院感染病原体之一,同时也是引起女性生殖道感染的常见菌。尽管有抗真菌药物的治疗,但真菌菌血症的病死率仍然较高,特别是念珠菌菌血症的病死率达40%~80%,有报道深部白念珠菌感染病死率达68.9%^[1]。深入研究白念珠菌的毒力,可为了解白念珠菌的致病机制并寻找新的预防及治疗途径提供理论依据。白念珠菌的毒力因素包括黏附因子、菌丝形成、W-O型转换、分泌侵袭性酶等,侵袭性酶中以分泌型天冬氨酰蛋白酶(secreted aspartic proteinase, Sap)的研究最为深入。本文就白念珠菌Sap的研究进展作一综述。

1 Sap理化特性

Sap是白念珠菌胞外蛋白酶的主要成分,属于天冬氨酰内肽酶类,在细胞外起催化水解蛋白质肽键的作用。已知Sap由10个成员组成,分别命名为Sap₁~Sap₈,最初以酶原的形式存在,在酸性条件下,自身可活化成熟为Sap, Sap₁~Sap₈分泌到胞外,而Sap₉和Sap₁₀则锚定在细胞膜上。对不同的白念珠菌株培养物中Sap的成分进行分析发现Sap₂的含量最高,并在体内感染的后期优先表达。Sap是分子量约41.5 kDa的一条多肽链, N-和C-末端残基为色氨酸和亮氨酸,产生Sap的最适温度为37℃,酶学活性具有pH值依赖性,最适的pH值为4.0,在pH中性时Sap较为稳定, pH 5.0~6.0时最稳定, pH呈碱性时容易失活。不同的Sap的活性pH值有所区别, Sap₁和Sap₃在pH 2~6时具有活性,最适的pH值为3.3; Sap₂和Sap₆在pH 3~6时具有活性,最适的pH值为4。Sap的活性可被抑胃肽特异抑制^[2]。Sap的同工酶Sap₁₀和Sap₃在酸性环境中活性最高,参与白念珠菌对上皮细胞的黏附,能被溶解酵素溶解^[3];同工酶Sap₅和Sap₆在中性时仍保留活性,且在菌丝形成时其基因最先表达^[4]。Sap在酸性范围内有水解蛋白的活性,具有广泛的底物作用范围,有多个底物裂解靶位,可裂解多种氨基酸残基,对多种机体组织蛋白有水解活力。Sap对牛血红蛋白最敏感,对蛋白催化水解较弱。

2 Sap的诱导

Sap的诱导多采用限制性氮盐酸性培养基法,尚无其他

方法可循。王丹敏等^[5]在诱导Sap时,先取一环YPD(葡萄糖2.0%、蛋白胨2.0%、酵母粉1.0%或琼脂1.5%, pH值6.5)斜面上的活化菌接入10 ml YPD液体培养基中, 37℃振荡培养, 16 h后按4%接种量将菌种转入100 ml 诱导培养基FMM(酵母炭基1.1%、葡萄糖0.6%、氮源0.2%, pH 5.5)中,于摇床180 r/min 37℃培养,隔一定时间测培养液酶活性和生长量。各诱导培养基振荡培养30 h检测Sap分泌水平的结果表明:蛋白类氮源可有效诱导白念珠菌合成分泌Sap,诱导强度随蛋白质种类而异,其中牛血清白蛋白诱导作用最强,皮肤中主要角蛋白也有较强的诱导作用;胺类混合物的诱导作用较弱;而氨基酸、铵盐、尿素等小分子易代谢的氮源则抑制Sap的合成,当两大类氮源同时存在时,酶分泌抑制程度取决于阻遏物的浓度。Sap的合成还与培养基的pH值有关,起始pH为3.0~6.0时白念珠菌方可被诱导分泌Sap,最适值为5.0, pH>6.0时白念珠菌虽生长良好,但Sap分泌量很低甚至为零。pH<3.0时,由于在强酸下菌体生长缓慢或停止, Sap活力几乎检测不到。

3 基因表达

人们对Sap的研究现在已进入基因水平。已知白念珠菌最少有10个基因家族成员,分别记作SAP1~SAP10,每个基因都已经排序,这些基因成员分别位于不同的染色体上^[6], SAP1、SAP2和SAP4~SAP6在第六条染色体上, SAP3在第三条染色体上, SAP7在第一条染色体上。SAP1和SAP3~SAP7的表达是某些菌的特征,而SAP2在所有的白念珠菌上表达, SAP4~SAP6也可在中性pH值酵母-菌丝转化中表达, SAP7在所有实验生长条件下都是静止的, SAP8和SAP9的表达研究仍在进行中。Sap由SAP基因家族的10个成员编译,但白念珠菌只在特定的条件下才表达Sap,以适应宿主环境的改变。SAP基因表达类型与白念珠菌的核型、感染部位及感染类型均有关,在感染白念珠菌的不同阶段、不同部位,不同Sap的产生明显不同, Sap₁、Sap₂和Sap₃在白念珠菌的表型转换和整个侵袭过程中分别表达SAP1、SAP2和SAP3^[7]。Arianna等^[8]研究发现, b核型共生株的SAP基因表达明显低于患白念珠菌病的免疫功能低下者的分离株,而c核型株的SAP基因表达无差别。在无Sap诱导因素下,仅c核型株表达所有SAP, b核型株不表达SAP2。在Sap诱导因素存在下, b核型株和c核型株均能表达SAP,但c核型株SAP基因表达早于b核型株,且c核型株Sap分泌量多。在口腔黏膜感染者中, SAP2和SAP5表达最多,在阴道黏膜感染者, SAP2、SAP4、SAP5表达最多;在小鼠的系统性感染模型中, SAP4~SAP6持续高水平表达, SAP7不表达^[9]。单个

[收稿日期] 2008-01-03

[作者单位] 蚌埠医学院病原生物学教研室, 安徽蚌埠 233030

[作者简介] 汪春华(1976-), 女, 硕士研究生。

SAP 基因突变及 SAP4 ~ SAP6 三联突变表明, 突变株的传播力及致病力均比亲代弱, 产生 Sap 酶的毒力排序从大到小依次为 Sap₂、Sap₁、Sap₃, SAP4 ~ SAP6 基因的表达在感染过程中有稳定增加, 而 SAP1 ~ SAP3 基因的表达少见或呈低水平。

4 对宿主的防御作用

Sap 可降解白蛋白、角蛋白、血红蛋白和凝血因子等, 还对中性粒细胞、淋巴细胞具有趋化作用, 且能降解 SIgA、SIgA₁、SIgA₂ 等多种人体蛋白, 去除宿主的屏障作用, 有助于白念珠菌通过循环系统传播; Sap 能刺激细胞产生 IL-1、IL-8、 γ -IFN 等细胞因子。董小青等^[10]用 40 株临床分离白念珠菌分别以腹腔接种方式感染小鼠进行毒力实验, 以血清中 ALT 和 α -淀粉酶 (AM) 活力表示菌株毒力, 结果显示, 白念珠菌体外测得的芽管长度分别与受染动物血清中 ALT、AM 含量呈正相关, 菌株 Sap 活力与血清中 ALT、AM 水平也存在显著的正相关, 且经 Sap 特异抑制剂处理过的受染小鼠其 ALT 活性显著降低, 表明白念珠菌 Sap 是与腹膜炎发生有关的重要的毒力因子。不同的感染类型, 甚至同一类型不同部位发挥作用的 Sap 不完全相同。Sap₁ ~ Sap₃ 在白念珠菌黏附上皮细胞及局限性组织损伤中起作用, Sap₄ ~ Sap₆ 在系统性感染中充当重要角色, Sap₂ 能降解细胞外基质、角蛋白、纤维粘连蛋白、层粘连蛋白及免疫球蛋白等^[11], 为白念珠菌提供营养, 并促进白念珠菌黏附上皮细胞, 侵入宿主造成组织损伤及协助其逃脱宿主的防御机制。Betb 等^[12]在小鼠角膜炎的研究中分别用白念珠菌野生株、Sap₁ ~ Sap₃ 和 Sap₄ ~ Sap₆ 三倍体无效株、Sap₄/Sap₅、Sap₄/Sap₆、Sap₅/Sap₆ 和 Sap₉/Sap₁₀ 双重突变株、Sap₄、Sap₅ 和 Sap₆ 单个突变株、Sap₆ 重建株用刮痕的方法感染小鼠角膜, 每天观察 1 次, 持续 8 天, 结果发现野生株可导致小鼠持续性的溃疡性角膜炎, Sap₁ ~ Sap₃ 三倍体突变株、Sap₄/Sap₅ 和 Sap₉/Sap₁₀ 双重突变株与其亲代相似可导致小鼠中度角膜炎, Sap₄ ~ Sap₆ 三倍体突变株、Sap₄ ~ Sap₆ 和 Sap₅/Sap₆ 双重突变株所导致角膜炎症状明显减轻, Sap₆ 的单个突变株对小鼠角膜影响甚微, Sap₆ 重建株能重新引起中度炎症。此实验说明 Sap₆ 在白念珠菌性角膜炎中起重要作用, 后证实 Sap₆ 在角膜炎中与白念珠菌的孢子-菌丝形态转换有关。在小鼠和荷兰猪感染模型中, Sap₁ ~ Sap₆ 的缺失株毒力有所下降^[13,14]。Schaller 等^[15]研究发现, Sap₁ ~ Sap₃ 在口腔念珠菌病中很重要, 而 Sap₄ ~ Sap₆ 却是非必要的。Sap₁、Sap₂、Sap₄ 参与了念珠菌性阴道炎^[16,17]。而冯静等^[18]用 TR-PCR 技术检测急性念珠菌性阴道炎患者白带标本中 SAP 基因表达情况, 结果发现, 20 份白念珠菌阴道感染阳性的标本中 SAP1 基因表达阳性 18 例 (90%), SAP6 基因表达阳性 14 例 (70%), Sap₂、Sap₃、Sap₄、Sap₅ 在阴道急性感染期是最常检测到的转录产物, 20 例均为阳性表达, SAP2 和 SAP5 在阴道白念珠菌感染者中是最主要的表达基因, 说明 SAP 基因可能与阴道念珠菌病的发病机制有关。Vilanova 等^[19]用高度纯化的 Sap₂ 体内注射小鼠用以提供免疫保护, 再用白念珠菌感染小鼠, 结果发现小鼠肾脏内的念珠菌量比对照组少近 20 倍。用 Sap₂ 蛋白对小鼠进

行预防接种, 结果小鼠免受了系统性念珠菌病的侵害, 此实验为用 Sap₂ 作为系统性念珠菌病的疫苗提供了理论依据。

综上所述, 目前对白念珠菌 Sap 的研究大多是在体外或用动物模型以及重组人类上皮来进行, 不能完全代表人体内 Sap 的表达调控, Sap 的作用多通过应用酶抑制剂或基因敲除来证明。随着人们对 Sap 的诱导、激活条件、基因表达及对宿主作用不断深入地研究, 有助于揭示白念珠菌的致病机制及感染途径, 也为寻找防治白念珠菌病的措施、研制疫苗、开发以 Sap 为作用靶点的高效特异的抗真菌药提供了理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] 秦启贤. 临床真菌学 [M]. 上海: 复旦大学出版社, 2001: 58 - 59.
- [2] Wang DM, Liu LY, Ye L, et al. Purification and properties of secretory aspartic proteinase from *Candida albicans* [J]. Microbiology, 2002, 29(2): 27 - 30.
- [3] Wu T, Samaranayke LP, Leung WK, et al. Inhibition of growth and secreted aspartyl proteinase production in *Candida albicans* by lysozyme [J]. Med Microbiol, 1999, 48: 721 - 730.
- [4] Chen YC, Wu CC, Chun WL, et al. Differential secretion of Sap4 - 6 proteins in *Candida albicans* during hyphae formation [J]. Microbiology, 2002, 148: 3743 - 3754.
- [5] 王丹敏, 董小青, 龚海英, 等. 白色念珠菌分泌型酸性蛋白酶诱导研究 [J]. 武警医学, 2002, 13(6): 341 - 343.
- [6] Dominique S, Bernhard H, Michel M, et al. A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5, and SAP6 of *Candida albicans* causes attenuated virulence [J]. Infect Immun, 1997, 65(9): 3539 - 3546.
- [7] De Bernardis F, Sullivan PA, Cassone A. Aspartyl proteinase of *Candida albicans* and their role in pathogenicity [J]. Med Mycol, 2001, 39(4): 303 - 313.
- [8] Tavanti A, Pardini G, Campa D, et al. Differential expression of secretory aspartyl proteinase genes (SAP1-10) in oral *Candida albicans* isolates with distinct karyotypes [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(10): 4726 - 4734.
- [9] Falk A, Kretschmar M, Albrecht A, et al. *Candida albicans* hypha formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs [J]. Infect-Immune, 2002, 70: 3689 - 3700.
- [10] 董小青, 王丹敏, 刘丽英, 等. 小鼠腹腔感染中白念珠菌芽管及蛋白酶活性与其毒力的相关性研究 [J]. 武警医学院学报, 2002, 11(2): 147 - 149.
- [11] Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinase: resolving the mystery of agene family [J]. Microbiology, 2001, 147 (Pt 8): 1997 - 2005.
- [12] Jackson BE, Wilhelmus KR, Hube B. The role of secreted aspartyl proteinase in *Candida albicans* keratitis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(8): 3559 - 3565.
- [13] Hube B, Sanglard D, Odds FC, et al. Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes SAP1, SAP2, and SAP3 of *Candida albicans* attenuates virulence [J]. Infect Immun, 1997, 65: 3529 - 3538.
- [14] Sanglard D, Hube B, Monod M, et al. A triple deletion of the

- secreted aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5, and SAP6 of *Candida albicans* causes attenuated virulence[J]. *Infect Immun*, 1997, 65:3539-3546.
- [15] Schaller M, Korting HC, Schafer W, et al. Secreted aspartic proteinase activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis[J]. *Mol Microbio*, 1999, 34:169-180.
- [16] Schaller M, Bein M, Korting HC, et al. The secreted aspartyl proteinase Sap1 and Sap2 cause tissue damage in an in vitro model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium[J]. *Infect Immun*, 2003, 71:3227-3234.
- [17] Taylor BN, Staib P, Binder A, et al. Profile of *Candida albicans* secreted aspartic proteinase elicited during vaginal infection[J]. *Infect Immun*, 2005, 73:1828-1835.
- [18] 冯静,涂亚庭,林能兴,等.白念珠菌分泌型天冬氨酸蛋白酶基因在急性念珠菌外阴阴道炎中的表达[J]. *中华皮肤科杂志*, 2005, 38(4):235-237.
- [19] Vilanova M, Teixeira L, Caramalho I, et al. Protection against systemic candidiasis in mice immunized with secreted aspartic proteinase 2[J]. *Immunology*, 2004, 111(3):334-342.

[文章编号] 1000-2200(2009)06-0548-03

· 综述 ·

生长抑素临床应用及机制研究进展

马振增 综述,燕善军 审校

[关键词] 生长抑素;药理学,临床;综述

[中国图书资料分类法分类号] R 977.1;R 969

[文献标识码] A

20世纪70年代初期,Guillemin从羊的下丘脑中分离能够刺激脑垂体分泌生长的激素,同时发现相反的具有抑制作用的物质。随后 Brazeau^[1] 在研究中证实了生长抑素(somatostatin,SS)是一种抑制生长激素释放的因子,并证实该物质是一种环状14氨基酸多肽,相对分子质量为1637。在体内分布广泛,用放射免疫法测定,在中枢及末梢神经、心脏、甲状腺、消化道及胰腺都发现SS样免疫活性物质,其类型包括SS、SS-28、SS-14、SS-13等,SS是通过生长抑素受体(SSTR)发挥其生理学功能^[2](即SSTR1、SSTR2A、SSTR2B、SSTR3、SSTR4、SSTR5),天然SS为142氨基酸多肽,在肝内代谢,其生物半衰期为1~3 min(正常人),肝硬化患者为1.2~4.8 min。Jenkins等^[3]人工合成了SS的长效八肽类似物奥曲肽,其半衰期为70~90 min,它克服了SS半衰期短的缺点,同时具有SS的作用。随着对SS作用机制的深入研究,SS在临床上应用日益广泛,本文就SS临床应用的研究作一综述。

1 消化系统疾病中应用

1.1 治疗消化道出血 各种原因消化道出血均可应用SS,1978年被首次用于临床治疗食管胃底静脉曲张破裂出血,止血率可达50%~100%,国内曾用SS与垂体后叶素对比治疗食管胃底静脉曲张出血,SS组止血率达90.0%(18/20),出血停止时间为(10±6)h;垂体后叶素组止血率达69.6%(16/23),出血停止时间为(38±30)h;治疗组止血率明显高于对照组,止血时间明显短于对照组($P < 0.005$)。而垂体后叶素组无效者改用SS治疗后效果仍满意。SS止血机制可能为^[4]:(1)降低胰高血糖素浓度,以减少功能性门静脉血流,还可通过激活SS L型受体,调节L型Ca²⁺通道,使Ca²⁺流入平滑肌细胞,改变血管活性肽和激素的释放及改善血管收

缩活性物质的敏感性,减少功能性门静脉血流,降低门静脉压力。(2)选择性收缩内脏血管,减少胃黏膜血流量^[5]。(3)抑制胃酸和胃蛋白酶的分泌,增强胃黏膜对H⁺的拮抗,减少胃酸刺激,同时刺激胃黏膜分泌而加强胃黏膜的保护作用。(4)提高胃内pH值,有助于血小板的凝血作用。(5)有细胞保护作用,减少毒素对胃黏膜细胞和肝细胞的损伤。(6)抑制胃肠运动,减少胃肠运动而减少机械性刺激。

1.2 治疗胰腺炎 重症急性胰腺炎为临床常见急危重病之一,病情复杂,变化迅速,若救治不及时,常可导致多器官功能衰竭甚至死亡,总病死率达到5%~10%,若合并其他并发症,病死率可达到35%以上。以往以外科治疗为主,效果甚微,SS应用于临床后,显著提高了胰腺炎治愈率,其机制为:(1)SS可以直接和间接抑制胰酶的分泌^[6]。(2)改善胰腺微循环,抑制炎症因子的释放,刺激单核巨噬细胞系统而减轻内毒素血症^[7]。(3)抑制血小板活化因子释放,直接或间接调节细胞因子链产生细胞保护作用。(4)细胞保护作用,主要通过调节细胞因子的作用和前列腺素的产生,降低毒素对胃黏膜、胰腺及肝细胞的损害,促进受损胰腺细胞愈合。(5)抑制消化液的分泌,减少胆汁分泌量,降低胆管内压力,减少胆胰反流及胆汁对胰管上皮细胞的损伤,而胆汁的减少也降低对胰酶的激活,从而减少胰腺的自身消化^[8]。(6)松弛Oddi括约肌,降低胰管压力,减少胰管的胰液进入胰腺组织,减轻由此引起的胰腺自身消化作用^[9]。

1.3 治疗胰肠吻合后胰漏 胰腺切缘或吻合口瘘是胰腺切除术,尤其是胰十二指肠切除术最常见并发症之一。发生率3.4%~45%^[10]。在应用SS后,抑制胰腺分泌和神经内分泌,抑制胃酸、胆汁、肠液分泌,显著减少了胰瘘发生^[11]。

1.4 对消化系统肿瘤的作用 近年来的研究表明,SS是一种重要的细胞增殖与分化的激素调节肽,SS及类似物能够抑制许多实体肿瘤如大肠癌、胰腺癌、肝癌等的增殖,这些肿瘤表面高度表达SSTR^[12],神经内分泌肿瘤及其转移灶较正常组织更多地表达SSTR。SSTR mRNA亚型在神经内分泌肿瘤

[收稿日期] 2008-06-17

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 消化内科,安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 马振增(1979-),男,硕士研究生。