

气-质联用研究氟康唑对白念珠菌甾醇生物合成的抑制作用

刘洪涛, 高平挥, 曹永兵, 徐 铮, 姜远英*

(第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433)

摘要: 目的 为抗真菌药物作用机理的研究提供有力的工具。方法 白念珠菌经药物作用后提取未皂化脂(NSLs), 其中的甾醇组分经衍生化后 GC-MS 分析, 测定各组分的结构和含量。结果 经氟康唑作用的真菌, CYP51 酶受抑制, 使细胞膜内羊毛甾醇和 24(28)-亚甲基-24, 25-二氢羊毛甾醇累积, 后者更为明显, 而麦角甾醇合成受阻。结论 GC-MS 分析获满意的效果, 可对抗真菌药物阻断真菌麦角甾醇合成通路所引起各甾醇组分的含量变化进行研究。

关键词: 氟康唑; 气-质联用; 白念珠菌; 甾醇

中图分类号: R965.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2002)05-0368-04

近 10 年来, 真菌感染在免疫受损的病人群体中发病率猛增, 特别引人注意的是 80% 以上艾滋病病人受真菌感染, 尤其是白念珠菌比较常见, 深部真菌感染已成为许多疾病的主要死亡原因之一^[1]。自发现第一个抗真菌抗生素灰黄霉素以来, 有多类药物用于临床。这些药物的抗真菌作用部位、机理以及毒性等不尽相同, 因此研究抗真菌药物的作用机理, 探究真菌耐药机理, 建立一种切实可靠的分析方法, 可以为寻找更好的高效、低毒、广谱的抗真菌药物提供分子水平上的重要依据。抗真菌药物研究中, 影响真菌麦角甾醇生物合成和功能的药物一直是重点。羊毛甾醇 14 α -去甲基化酶(cytochrome P450 lanosterol 14 α -demethylase, CYP51)是真菌细胞膜必需成分麦角甾醇生物合成过程中的一个关键酶^[2]。临床应用最成功且仍作为一线药物而被广泛应用的

氟康唑、酮康唑、伊曲康唑等抗真菌药物都是通过抑制这个靶酶来发挥抗真菌作用的, 真菌耐药性的产生与 CYP51 的结构变异也有密切关系, 因此研究 CYP51 的结构和功能关系是指导抗真菌药研究和真菌耐药机理研究的有效途径之一。本文通过气-质联用(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)定性定量分析测定了白念珠菌细胞膜中麦角甾醇和羊毛甾醇等各种甾醇组分, 并以此来考察药物对 CYP51 的作用及对甾醇生物合成的影响, 为抗真菌药物研究提供了有力的工具。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

Voyager 型气-质联用仪, 美国 Finnigan 公司。1-三甲基甲硅烷咪唑(*N*-trimethylsilylimidazole, TMSI), Aldrich 公司; 氟康唑注射液, 2 g·L⁻¹, 上海信谊药厂; YEPD 培养液; 0.1 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(PBS)(pH = 7.4); 皂化剂: 为新鲜配制的含 15% NaOH 的 90% 乙醇溶液, 样品为本实验室制备。

1.2 气-质谱条件

HP50(50% 苯基-50% 甲基聚硅氧烷交联柱) 30 m × 0.25 mm × 0.25 μ m。柱温: 程序升温 150 ~ 290℃, 起始温度 150℃, 按 15℃·min⁻¹升至 290℃恒定; 检测器温度 280℃; 进样口温度 250℃。柱头压 35 kPa; 载气: He, 流速 1 mL·min⁻¹; 进样量: 0.5 μ L; 分流比为 15:1。质谱检测器: EI 电离源, 电离电压 70 eV, 源温 200℃。利用气-质联用仪计算机的 NIST 谱库自动检索各组分的质谱数据, 确定结构和计算含量。胆固醇为内标。

1.3 菌株和样品制备方法

白念珠菌标准株 y 01.09(ATCC76615)为本室真菌库保存, 并经形态学和生物化学鉴定。样品制备: 取白念珠菌 y 01.09 接种于 YEPD 培养液中, 35℃, 250 r·min⁻¹振荡培养 16 h, 活化两次, 使其处于指数生长期后期, 分别取菌液 2 mL 于 250 mL 锥形瓶, 加

收稿日期: 2002-04-02 接受日期: 2002-05-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770876); 上海市科技发展基金资助项目(98QB14009)

作者简介: 刘洪涛(1972-), 男, 讲师, 硕士。

E-mail: hongtao6@yahoo.com

*联系作者 Tel: (021)25070321

YEPD 培养液 98 mL, 加氟康唑注射液使其中氟康唑终浓度分别达到 0, 0.25, 1.0 和 4.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 35℃, 250 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 24 h。菌液于 2000 $\times g$ 离心 10 min, PBS 洗涤两次至上清液无色, 去上清, 称湿菌重。各精密称取湿菌 0.5 g 于 50 mL 管中, 加 PBS 2.5 mL 和新鲜配制的皂化剂 6 mL, 混匀, 80℃ 水浴皂化 60 min。加石油醚(沸程 30~60℃) 6 mL 提取 2 次, 合并提取液, 加蒸馏水 6 mL 洗涤 1 次, 醚层于 60℃ 水浴挥干, 得未皂化脂(nonsaponifiable lipids, NSLs), 加环己烷溶解使溶液体积为 1 $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 湿菌, -20℃ 保存。

1.4 样品测定

将上述得到的未皂化脂环己烷溶液各取 200 μL 于 1.5 mL 离心管中, 于氮气下吹干后, 加 TMSI 30

μL 混匀后置于 30℃ 保温箱中反应 24 h 后, 用氮气吹去残余衍生化试剂, 再精密加入氯仿 100 μL , 充分混匀溶解, 直接进样 0.5 μL , GC-MS 分析测定。衍生化条件见参考文献^[3]。

2 结果

2.1 白念珠菌未皂化脂的气相色谱分离效果

见图 1A, B。由图可清楚看到, 真菌细胞膜中的甾醇组分经过硅烷化后再进样 GC-MS 分析, 各组分可以得到理想的分离效果, 且峰型和柱效良好。

2.2 各甾醇组分的气-质结果

经 GC-MS 的 NIST 谱库自动检索各甾醇组分的结构, 并利用面积归一化法计算各甾醇组分在总甾醇(100%)中所占的百分比, 结果见表 1。

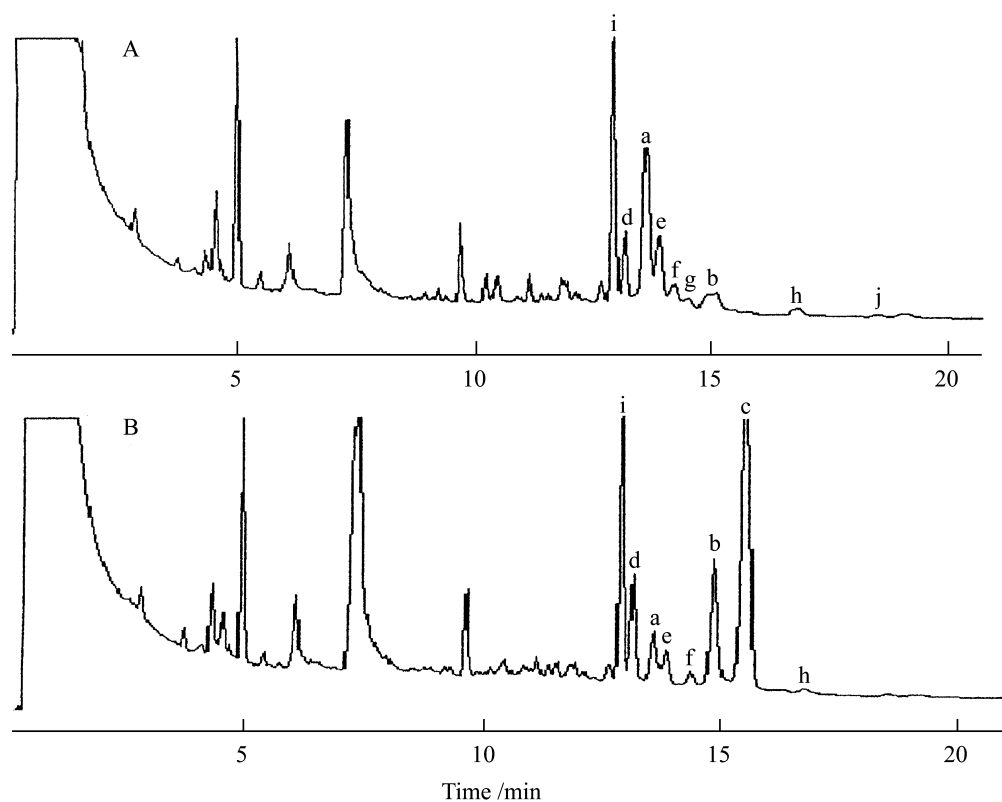


Fig 1. Chromatogram of sample y 01.09 (control, A) and y 01.09 treated with fluconazole(B). a: ergosterol, b: lanosterol, c: trimethyl(24-methylenelanost-8-en-3-ol), d: cholesta-8,24-dien-3-ol, e: 4-methylcholesta-8,24-dien-3-ol, f: stigmasta-7,25-dien-3-ol, g: 14 α -methylergosta-8,24-dien-3-ol, h: 4,4-dimethylcholesta-8,24-dien-3-ol, i: cholesterol(inner standard), j: 14 α -methylergosta-8,24-dien-3-ol.

Tab 1. Results of gas chromatography-mass spectrometry and sterol composition

Sterol	Sterol composition/%			
	y 01.09 alone	y 01.09 + F0.25	y 01.09 + F1.0	y 01.09 + F4.0
Cholesta-8,24-dien-3-ol	6.7 ± 0.4	4.9 ± 0.6	2.3 ± 0.2	0.6 ± 0.1
Ergosterol	60.3 ± 5.6	51.0 ± 8.7 *	32.2 ± 5.3 * *	4.6 ± 0.7 * *
Stigmasta-7,25-dien-3-ol	4.2 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0	0.1 ± 0.03
4-methylcholesta-8,24-dien-3-ol	7.7 ± 0.5	3.0 ± 0.4	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1
Ergosta-7,22-dien-3-ol	6.8 ± 0.3	1.9 ± 0.3	0	0.4 ± 0.1
Lanosterol	3.5 ± 0.6	18.5 ± 3.2 * *	15.7 ± 1.7 * *	11.8 ± 2.0 * *
14 α -methylergosta-8,24-dien-3-ol	0.30 ± 0.02	0	0	0
4,4-dimethylcholesta-8,24-dien-3-ol	7.4 ± 0.5	3.3 ± 0.4	1.3 ± 0.3	0.3 ± 0.04
Trimethyl(24-methylenelanost-8-en-3-ol)	0	10.9 ± 1.4 * *	42.6 ± 8.1 * *	80.1 ± 9.8 * *
Unidentified sterols	3.1 ± 0.4	6.1 ± 0.8	5.2 ± 0.9	1.5 ± 0.4

F 0.25, F 1.0, F 4.0(0.25, 1.0, 4.0 mg·L⁻¹ fluconazole). $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$, compared with y 01.09.

3 讨论

麦角甾醇是真菌细胞膜特有的脂质,又是其重要结构组分,它在确保膜结构的完整性、膜结合酶的活性、膜流动性等方面起着重要作用。羊毛甾醇 14 α -去甲基化酶(CYP51)是真菌麦角甾醇生物合成过程中的一个关键酶,氟康唑、酮康唑、伊曲康唑等目前临床最常用的抗真菌药物都是通过抑制这个靶酶来发挥抗真菌作用的,因此研究药物对真菌 CYP51 的作用及对甾醇生物合成通路的影响十分必要。但由于甾醇类化合物的结构特性,以往的分析方法如高效液相色谱、薄层色谱、同位素标记等虽能达到分离和定性定量的目的,但存在不少缺点,如操作复杂且结果不直观、分离效果不理想、定量不准确等。而甾醇类的沸点较高,直接用 GC 法分析则存在拖尾和峰型展宽的问题,因此本文先对甾醇进行硅烷化反应后,其衍生物再经 GC-MS 分析,得到了很好的峰型和柱效,可对真菌甾醇生物合成通路中的各组分进行结构和含量分析,以进一步研究药物对靶酶和甾醇合成的作用。

通过 GC-MS 分析,可确定各甾醇结构和含量,随着氟康唑剂量的增加,抑制 CYP51 酶而导致麦角甾醇生物合成受阻,麦角甾醇含量明显降低,而羊毛甾醇等的含量增加。在白念珠菌甾醇生物合成通路中,24(28)-亚甲基-24,25-二氢羊毛甾醇是 CYP51 的直接底物,随着氟康唑浓度加大,羊毛甾醇含量虽增

加,但 24(28)-亚甲基-24,25-二氢羊毛甾醇的累积更为明显,其含量增加和麦角甾醇含量降低与氟康唑呈剂量依赖性关系,见表 1。羊毛甾醇和 24(28)-亚甲基-24,25-二氢羊毛甾醇在结构上很相似,后者分子量 440,而羊毛甾醇为 426,只相差一个亚甲基,所以用其他的分析方法很难将二者分离和定量。羊毛甾醇是麦角甾醇合成通路中的一个重要中间产物,正常真菌细胞膜中较少累积,而 24(28)-亚甲基-24,25-二氢羊毛甾醇则基本检测不到,当药物(CYP51 酶抑制剂)作用时二者明显累积,后者尤甚。因此用 GC-MS 法可以从分子水平上研究不同药物的作用机理和 CYP51 酶的功能,为抗真菌新药研发和真菌耐药性研究提供准确可靠的方法。

4 参考文献:

- [1] Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans* [J]. *Clin Microbial Rev*, 1995, **8**(4):515 - 548.
- [2] Shyadehi AZ, Lamb DC, Kelly SL, Kelly DE, Schunck WH, Wright JN, *et al.* The mechanism of the acyl-carbon bond cleavage reaction catalyzed by recombinant sterol 14 α -demethylase of *Candida albicans* (other names are: lanosterol 14 α -demethylase, P-45014DM, and CYP51) [J]. *J Biol Chem*, 1996, **271**(21):12445 - 12450.
- [3] Gleispach H. The use of different silylating agents for structure analyses of steroids [J]. *J Chromatogr*, 1974, **91**: 407 - 412.

Inhibitory effect of fluconazole on sterol biosynthesis in *Candida albicans* studied by gas chromatography-mass spectrometry

LIU Hong-Tao, GAO Ping-Hui, CAO Yong-Bing, XU Zheng, JIANG Yuan-Ying

(Department of Pharmacology, School of Pharmacy, the Second Military Medical University, Shanghai 200433)

Abstract: **AIM** To provide an effective method for studying the mechanism of pharmacological effects of antifungal agents. **METHODS** From *Candida albicans* treated with fluconazole (inhibitor of ergosterol biosynthesis), the non-saponifiable lipids (NSLs) were extracted and the sterol components of NSLs were separated and analyzed as their *N*-trimethylsilylimidazole derivatives by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **RESULTS** Ergosterol was the predominant component of NSLs in control cells but showed a progressive decline during treatment with fluconazole. CYP51 was inhibited, while the lanosterol and trimethyl(24-methylenelanost-8-en-

3-ol) were accumulated to high levels, the later was seen more significantly. **CONCLUSION** The satisfactory results are obtained by GC-MS analysis and it can be used to study the inhibition of antifungal agents on sterol biosynthesis with the shift in sterol composition.

Key words: fluconazole; gas chromatography-mass spectrometry; *Candida albicans*; sterols

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation of China (39770876); and Shanghai Science and Technology Development Foundation (98QB14009)

(本文编辑 石 涛)

2003 年《中文科技资料目录·中草药》征订启事

《中文科技资料目录·中草药》为国家科技信息检索体系的刊物,以全面、系统、准确和迅速报道中草药文献题录,为读者提供准确、便捷的检索途径为办刊宗旨,是目前报道中草药文献最全的印刷本检索工具。由中草药信息中心站和天津药物研究院主办。

本刊 2003 年报道国内 1000 种医药学、化学、生物学、农林科学、综合自然科学期刊,以及各种资料汇编、会议论文集。每期报道中草药文献题录 2400 条,全年共报道 12 000 条(第 6 期为年度主题索引),报道时差 4~6 个月。本刊是从事中草药科研、生产、检验、教学、市场营销、信息服务等部门必备的检索工具。

本刊为双月刊,每期定价 30 元,全年订价 180 元。国内统一刊号:CN12-1107/R。编辑部自办发行,欢迎订阅,银行信汇、邮局汇款均可。

编辑部地址:天津市南开区鞍山西道 308 号

邮政编码:300193

联系电话:(022)23006822

传 真:(022)27381328

E-mail:lygi200188@hotmail.com; zwkjml@mail.china.com

开户银行:天津市工商银行南门外分理处

银行帐号:701264089632

银行户名:天津药物研究院