

第一章 引言

1.1 真菌感染疾病——危机与挑战

霉菌、酵母菌以及蕈菌等皆为真菌，属真核微生物。它们既是自然界中的分解者，也被人类广泛利用在生化、食品、环保等工业中。然而，它们对物种进化，食品安全以及生态系统稳态等也造成了许多负面的影响，同时也威胁着动植物的健康^[1]。

真菌感染能造成多种疾病，从皮肤、黏膜处的浅表性感染，到内在器官的侵袭性感染。其中，浅表性感染发病率很高，最常见的真菌感染便是皮肤指甲处的浅表性感染，全球约有 25% 的人口受此影响^[2]，幸运的是，此类感染易治愈且不会危及生命。与之相反，侵袭性真菌感染虽然发病率相对较低，但被喻为“隐藏的杀手”，据估计，每年因此丧命的人数高达 150 万^[3]，而其中最常见的致病真菌是白色念珠菌^[4]。

事实上，白色念珠菌是一种典型的条件致病菌，通常情况下存在于健康人皮肤表面，口腔及阴道黏膜等部位，是人类微生物群（microbiota）中的一员。然而，对于免疫功能异常的患者，宿主细胞与白色念珠菌之间的平衡被打破，它则转化为病原在皮肤黏膜等处大量繁殖生长。其菌丝态能够侵入到机体内，传播到血液中，形成念珠菌菌血症。一旦念珠菌菌血症形成，真菌可以传播到其他组织器官，导致二级转移性的感染，例如骨头关节、肺、眼睛、肝脏、脾脏、肾脏，甚至大脑（脑膜炎）与心脏（心内膜炎）等等^[5,6]，即深部组织念珠菌感染。

据保守估计，全世界每年有 25 万患者发生侵袭性念珠菌感染，每年病死人数超过 5 万^[6]。念珠菌血症的发生与年龄相关，高发于老年人及婴幼儿。常见的危险因素总结在表 1-1 中^{[7] [8] [9]}。

表 1-1 侵袭性念珠菌病危险因素

侵袭性念珠菌病危险因素
需要长期滞留在 ICU 的危重患者
腹部术后可能存在吻合口瘘或再次剖腹探查术
急性坏死性胰腺炎
实体器官移植
新生儿，特别是低体重儿或早产儿
广谱抗生素的使用
中心静脉导管，全肠外营养
血液透析
糖皮质激素的使用或肿瘤化疗
念珠菌定植，特别是多灶

目前治疗侵袭性真菌疾病最大的挑战是诊断技术的不足：例如血液培养缓慢，且对侵袭性念

珠菌的敏感性约为 50%；基于 PCR 的检测、真菌抗原检测、影像学检查等大多数诊断方法缺乏特异性、敏感性；并且临床医生在真菌鉴定上也缺乏共识^[1]。这些往往导致诊断的延迟和错误的临床治疗，病情一旦恶化，抗真菌药物的治疗也将无力回天。

除此之外，抗真菌药物的种类也十分有限，因为与其他病原相比，真菌在进化上更接近人类，这大大限制了新型药物的开发^[1]。目前临床上使用的抗真菌药物总结在图 1-1 中^[10]，它们都是以干扰真菌重要生命活动为靶点的原理制成。即使是这些临床上应用的“主力军”，也存在着许多方面的限制：临床上高剂量、长时间的使用不可避免地导致了耐药性的产生；不同的给药方式影响着药物的吸收效果；以及无法突破屏障，治疗特定组织（如大脑）的感染。与此同时，很多抗真菌药物都有较大的毒性：肝肾毒性、心脏毒性等等；加上不同种类药物之间的相互作用，这些因素都严重制约着它们的应用。

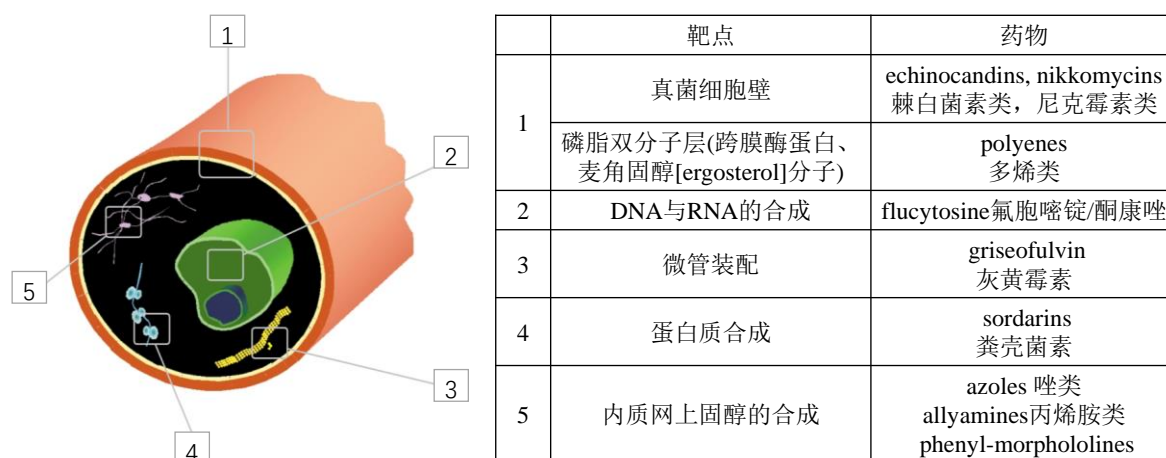


图 1-1 临床抗真菌药物一览^[10]

综上，开发新型抗真菌治疗药物迫在眉睫。基于经典思路，可以（1）寻找新的特异性杀伤真菌的靶点；（2）寻找针对已知靶点的新药；（3）改进现有药物。而考虑真菌感染的本质——免疫功能异常，即使通过外源途径实现了真菌的杀伤，免疫系统的缺陷仍然存在，不能保证持久的治疗效果，所以新型的治疗思路——免疫疗法——将是发展的新方向。通过增强宿主的免疫功能来清除侵入的病原，或许可以为治愈侵袭性真菌感染带来新的希望。

1.2 真菌感染与免疫反应

由于本研究建立的系统性真菌感染模型使用的是白色念珠菌。故以白色念珠菌为例，阐述机体与真菌之间的相互作用。

真菌细胞壁含有的多糖和脂质分子可以活化天然免疫细胞的 PRRs（模式识别受体）调控免疫反应。白色念珠菌的细胞壁如图 1-2 所示^[11]，最内层由几丁质、N-乙酰氨基葡萄糖聚合体构成，赋予细胞壁强度和形状；与之相邻的外部层是葡聚糖；最外层由甘露聚糖、细胞壁蛋白等构成。

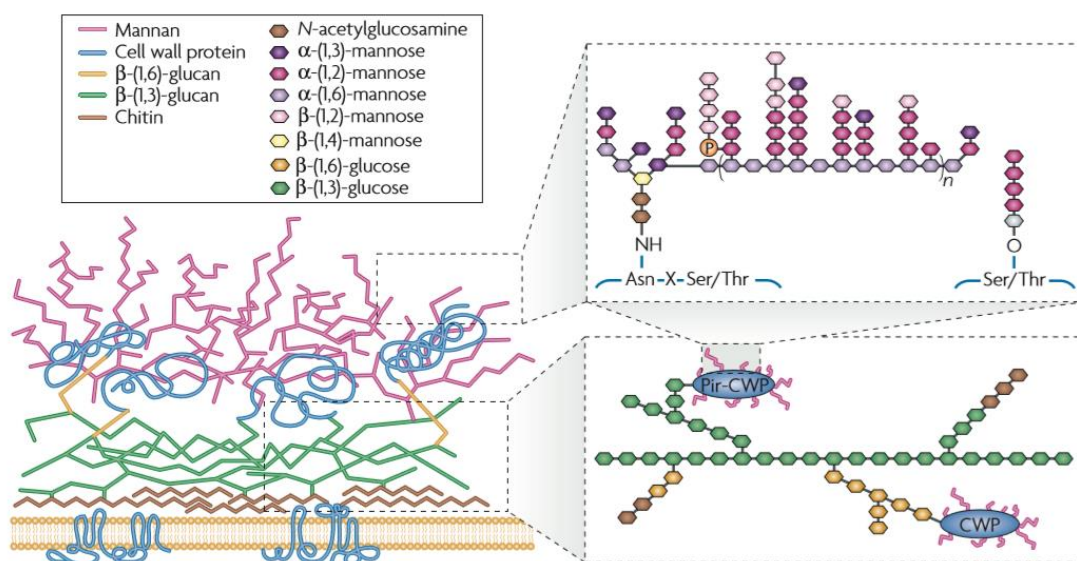


图 1-2 白色念珠菌细胞壁结构^[11]

葡聚糖在酵母态以及菌丝态的表面暴露程度不同，其在酵母态的芽痕暴露，而不能在菌丝上暴露^[12]。然而，也有研究表明，菌丝的葡聚糖也可被识别，或许是由于菌丝的表面甘露聚糖纤维更短更稀疏^[13]。因为菌丝态的白色念珠菌才能激活炎性小体，所以机体可以区分白念的“定居”和“侵入”^[12]。

在健康个体中，黏膜表面常常有白色念珠菌的定居，它会与机体皮肤及黏膜表层寄生的微生物菌群拮抗生长（如图 1-3）。相对少量的白色念珠菌不会诱发上皮细胞的损伤，也不会诱导上皮细胞、黏膜巨噬细胞以及树突状细胞分泌细胞因子。在酵母态细胞中，负责激发炎症反应的 PAMPs（病原相关分子模式）被隐藏，故不会诱发免疫细胞炎症小体和 T_H17 细胞的活化。其能触发 MAPK 信号通路调控转录因子 c-Jun 和 c-Fos 的活化，但不足以引发上皮细胞产生细胞因子^[5]。

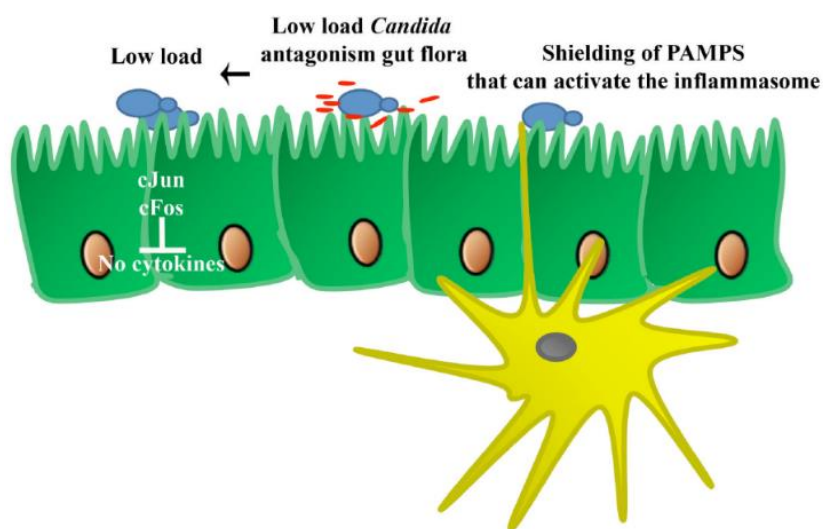


图 1-3 健康个体与白色念珠菌的稳态关系^[5]

但当机体处于免疫低下或免疫缺陷时，宿主细胞与白色念珠菌之间的平衡被打破，它则转化为病原在皮肤黏膜等处大量繁殖生长。当白色念珠菌从酵母态转变为菌丝态，便可以诱发巨噬细胞的内吞作用或者主动的渗入，穿过皮肤及黏膜表层。上皮细胞可以分泌 β -防御素直接抵抗白色念珠菌，同时活化 MAPK1 和 FOS 依赖的信号通路分泌细胞因子如 IL-1 β ，TNF 和 IL-6，进而募集吞噬性的免疫细胞。当白色念珠菌已经侵入组织，首先会遇到组织居住的巨噬细胞，它们将吞噬清除菌体。一旦侵入，中性粒细胞会被巨噬细胞和上皮细胞分泌的前炎症细胞因子募集而来。除了吞噬作用，巨噬细胞和中性粒细胞会产生活性氧 (ROS)；中性粒细胞还能释放中性粒细胞外陷阱 (NETs) 来捕获白色念珠菌，其中含有抗菌蛋白例如钙卫蛋白，抑制菌丝的生长。炎症单核细胞通过 CCL2 被募集到感染区行使杀伤功能，树突状细胞募集到淋巴结参与辅助 T 细胞的活化，如 T_H17、T_H1 等。T_H17 细胞能够分泌 IL-17，募集并激活中性粒细胞；分泌 IL-22，诱导上皮细胞产生 β -防御素。T_H1 产生的 IFN- γ 能够大大促进吞噬细胞的吞噬功能。白色念珠菌侵袭的最后一步是穿过血管内皮细胞进入血液。除了中性粒细胞，系统性的白念感染也能激活血小板产生 CCL5 和血小板第 4 因子，共同抵抗白色念珠菌^[12]。

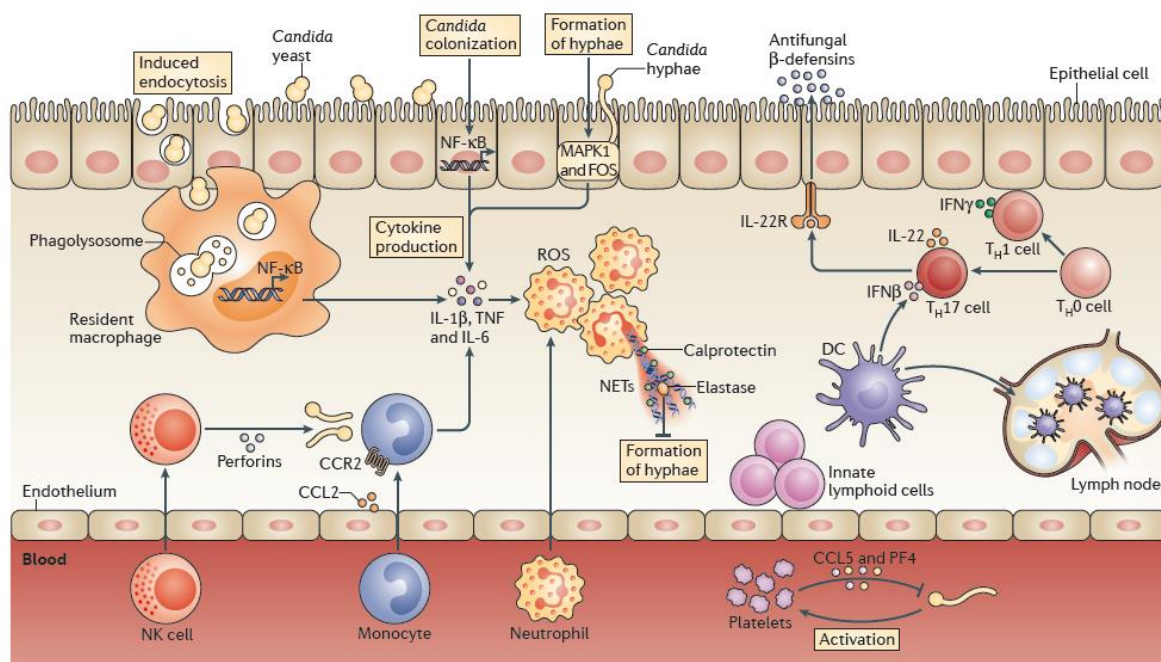


图 1-4 侵袭性真菌感染诱发的免疫反应^[12]

2017 年，清华大学免疫学所林欣教授团队研究发现，JNK1 能够负调控抗真菌免疫反应^[14]，并进一步揭示了其分子机制^[14,15]。初次感染，白色念珠菌被 C 型凝集素受体 Dectin-1 识别，其可激活下游的 JNK1 和 NFATc1，而 JNK1 对 NFATc1 存在抑制作用。当 JNK1 缺陷时，NFATc1 的抑制将被解除，结合到 CD23 的启动子区域，介导 CD23 表达的上升（如图 1-5）^[14]。CD23 是一种新发现的 C 型凝集素受体，可以识别白色念珠菌表面的甘露聚糖和葡聚糖，识别并结合后，它将募集下游的接头蛋白 FcR γ ，进而激活 NF κ B 信号通路，从而促进 iNOS (inducible NO synthase) 表达的上调——NO 产生增多，杀伤白色念珠菌的能力增强；也可促进 IL-6、TNF- α 等细胞因子的分泌，进而募集中性粒细胞和巨噬细胞，增强杀伤功能（如图 1-6）^[15]。

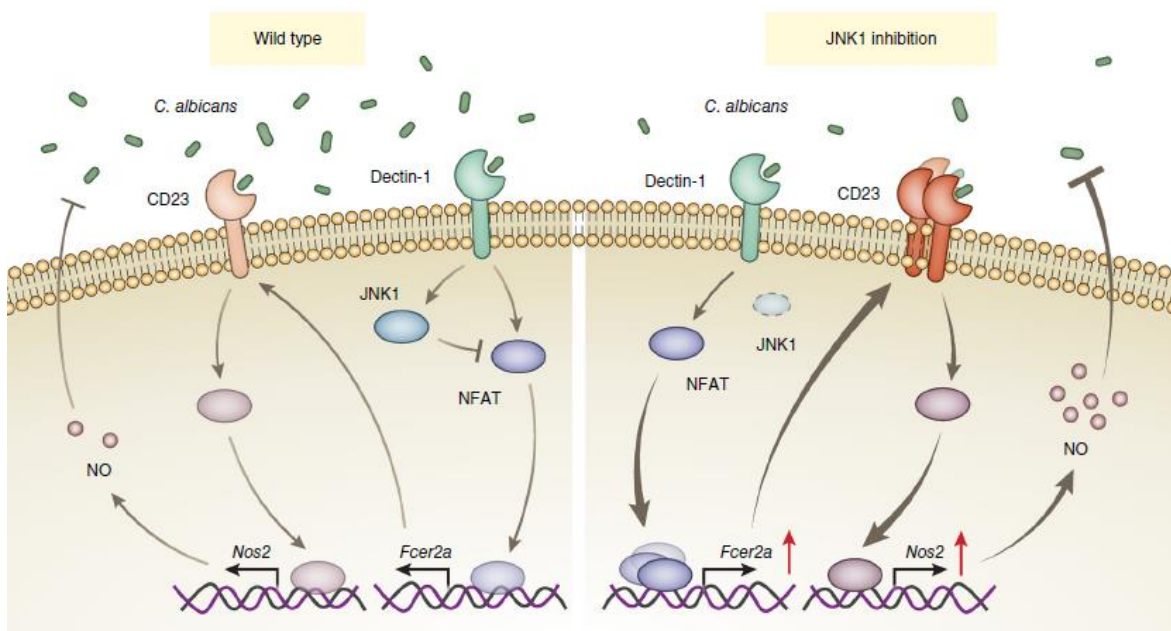


图 1-5 JNK1 通过抑制 CD23 的表达负调控抗真菌免疫反应^[14]

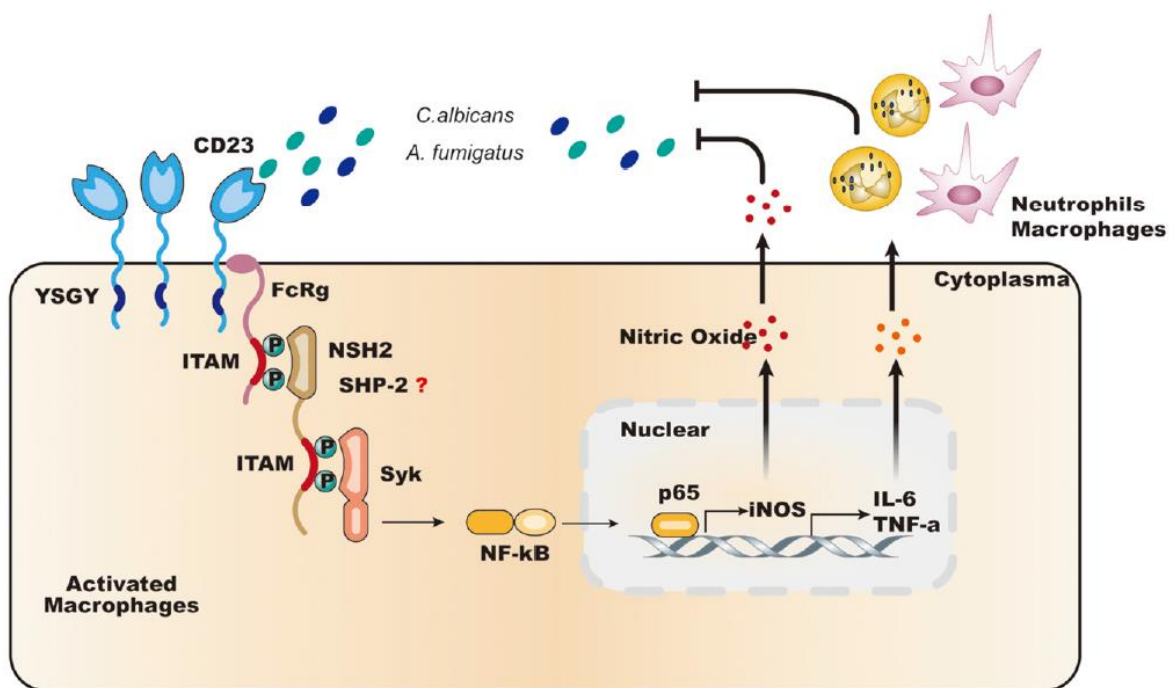


图 1-6 CD23 调控抗真菌免疫反应的机制^[15]

这一机制的发现，为我们寻找基于“增强宿主免疫功能”的抗真菌药物提供了两个潜在靶点：JNK1 抑制剂和 NO 供体药物。林欣教授团队已证明了 JNK1 抑制剂在抵抗真菌感染中的功能^[14]，且与清华大学药学院饶鹂团队合作，致力于合成并筛选出更安全高效的 JNK1 抑制剂。故本课题的主要目标是验证 NO 供体在抗真菌感染中的功能，如果能够达到预期的效果，则进一步筛选更安全有效的 NO 供体药物。

1.3 NO 的生物特性与 NO 供体概述

其实 NO 的应用对我们来说并不陌生。1998 年的诺贝尔生理学奖的主角便是 NO, Ferid Murad, Robert F. Furchgott 和 Louis Ignarro 研究发现了它作为气体信号分子的特性: 引起血管平滑肌的舒张。1992 年, NO 登上了《科学》杂志的封面, 成为了该年度的明星分子^[16]。NO 从仅仅被认为是燃料燃烧后产生的有毒致癌的污染物, 到发现了它广泛的生物学功能: 包括舒张平滑肌、抑制血小板聚集、神经递质、宿主防御等^[16]。

NO 的生物合成需要 NO 合酶的催化, 以及还原型辅酶II (NADPH) 作为电子供体, 将 L-精氨酸为底物等物质的量地生成 NO 和 L-瓜氨酸 (图 1-7) ^[17]。

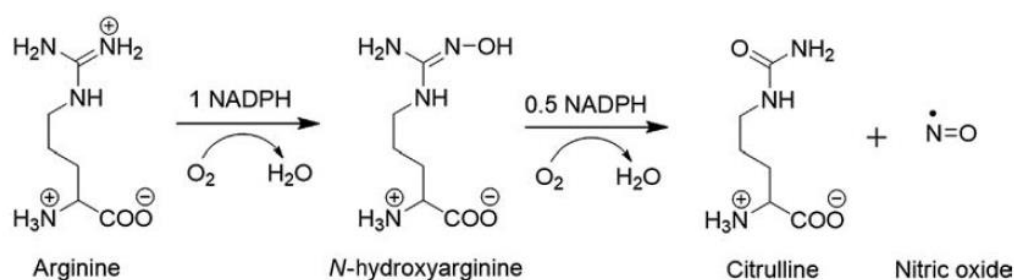
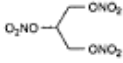
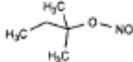
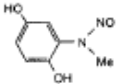
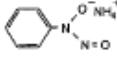
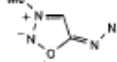
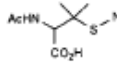
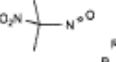
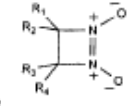
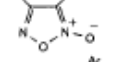
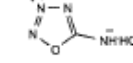
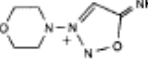
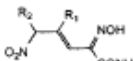





图 1-7 NO 的生物合成^[17]

NO 合酶是二聚黄素蛋白, 包含了四氢生物蝶呤, FAD (黄素腺嘌呤二核苷酸), FMN (黄素单核苷酸) 和原血红素, 其与细胞色素 P450 具有同源性^[18]。主要有三种不同亚型的 NOS, 包括了两种组成型: 存在于上皮细胞中的 eNOS 和存在于神经元中的 nNOS; 以及一种诱导型的 iNOS, 存在于巨噬细胞, 成纤维细胞和肝脏中的巨噬细胞——Kupffer 细胞^[19,20]。前两种组成型 NOS 是钙离子和钙调蛋白依赖型, 能产生少量的 NO; 而诱导型的 iNOS 是非钙依赖型, 在细胞受到刺激时可大量表达, 产生大量的 NO。

我们主要关注的, 是 NO 在宿主防御方面的功能。在促炎细胞因子的刺激下, 由 iNOS 催化产生的 NO 是哺乳动物固有免疫系统中的重要成分。NO 的细胞毒性和/或细胞抑制作用与对抗多种病原 (包括病毒、细菌、真菌、寄生虫) 的原始的非特异性宿主防御机制相关联。之前有研究表明, 缺少 iNOS 基因的小鼠对利什曼原虫、疟原虫、结核杆菌等多种病原菌都易感^[21,22], 也侧面证实了 NO 在抵抗病原入侵中的重要性。

早期 NO 多种生物学功能的发现促进了 NO 供体药物的研发。所有结合氮、氧的化合物都具有分解、被氧化或被还原产生活性氮的潜能。目前主要的 NO 供体药物和它们的作用机制总结在图 1-8 中^[23]。之前 NO 供体药物主要用于治疗心绞痛, 例如有机硝酸类药物。但是连续使用这类药物, 将会耗竭体内硝酸酯受体中的巯基, 导致冠状动脉和静脉产生耐受性^[44], 所以人们也致力于开发促使内源性 NO 合成释放的新药。同样的, 将 NO 供体药物用到抵抗真菌感染中, 不应仅仅是“旧药新用”, 新型的 NO 供体药物更值得我们去开发探索。而那些通过调节信号通路, 实现上调 iNOS 表达的小分子, 也将是我们重点尝试的新型 NO 供体药物。

Index, Name	Representative Compounds	Pathway of NO Generation	
		Non-enzymatic	Enzymatic
A. Organic nitrates		thiols	Cyt-P450, GST and a membrane-bound enzyme
B. Organic nitrites		hydrolysis and trans-nitrosation; thiols; light; heat	cytosolic and microsomal enzymes; xanthine oxidase
C. Metal-NO complexes	$\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	light; thiols; reductants; nucleophiles	a membrane-bound enzyme
D. N-Nitrosamines		OH; light	Cyt-P450 related enzymes
E. N-Hydroxyl nitrosamines		light; heat	peroxidases
F. Nitrosimines		thiols; light	?
G. Nitrosothiols		spontaneous; enhanced by thiols, light and metal ions	unknown enzymes
H. C-nitroso compounds		light; heat	?
I. Diazetidine dioxides		spontaneous; thiols	?
J. Furoxans and benzofuroxans		thiols	unknown enzyme
K. Oxatriazole-5-imines		thiols	?
L. Sydnominimes		spontaneous, enhanced by light, oxidants and pH>5	prodrugs require enzymatic hydrolysis
M. Oximes		spontaneous; O2/FeIII-porphyrin	?
N. Hydroxylamines		autoxidation enhanced by metal ions	catalase/H2O2
O. N-Hydroxyguanidines		oxidants	NOSs, Cyt-P450
P. Hydroxyureas		H2O2/CuZn-SOD or ceruloplasmin; H2O2/Cu2+; heme-containing proteins	peroxidase

* The representative may differ greatly to individual NO donor of the corresponding class. Please refer to the text and references therein for details.

图 1-8 目前常见的 NO 供体药物及其作用机制^[23]

1.4 “潜在的”新型 NO 供体——GPR68 拮抗剂

G 蛋白偶联受体 (GPCR) 是细胞膜表面最大的受体家族, 是七次跨膜蛋白, 响应多种胞外信号: 例如生物胺, 磷脂, 多肽, 离子, 质子等, 调控一系列生理功能: 包括神经递质、器官感觉、细胞代谢和分化等^[24,25]。由于它们从胞外环境的可接触性, 配体选择性, 细胞组织的表达特异性以及在信号转导过程中的重要角色, GPCR 是食品和药物管理局 (FDA) 批准的最常见的药

物靶点, 目前靶向 GPCR 的药物占此类型药物的 35%^[26,27], 如我们日常使用的镇痛、降压药物等。

GPR68 是感受胞外氢离子的 GPCR, 在 pH 7.8 时不被激活, 在 pH 6.8 时被完全激活^[28]。它第一次从 HEY 人类卵巢癌细胞系中克隆出来, 故也称作 OGR1。GPR68 的开放读码框 (ORF) 含有 1095 个核苷酸, 编码 365 个氨基酸组成的蛋白^[29]。它的 3D 预测模型如下图 (图 1-9, 图中数字代表组氨酸残基), 包含一个 N 端的胞外结构域, 七个跨膜的 α -螺旋 (其中包含了 3 个胞内环和 3 个胞外环), 在胞外结构域的表面, 有许多组氨酸的聚集。弱碱性条件下, 由于组氨酸之间的氢键, GPR68 处于稳定的未激活状态; 酸性条件下, 组氨酸被质子化, 就造成了氢键的丢失, GPR68 就调整为激活的构象^[28]。

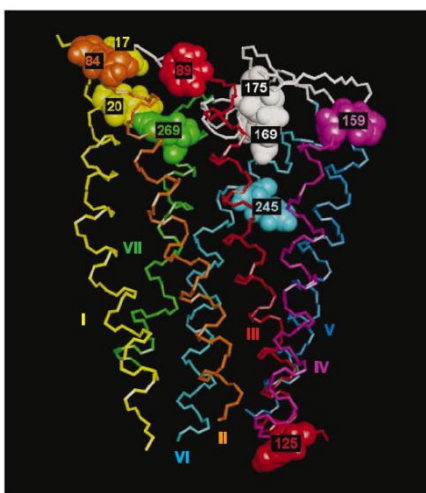


图 1-9 GPR68 3D 预测模型^[28]

目前关于 GPR68 的研究有很多, 它的功能也被逐一发现: 比如调控破骨细胞的分化^[24,30]; 影响葡萄糖促进血浆胰岛素的水平^[31]; 人类和小鼠血管内皮细胞的机械传感器^[32]等等。而提出 GPR68 拮抗剂作为“潜在的”新型 NO 供体源于 2014 年的研究发现^[33]: GPR68 敲除能够诱导 iNOS 的高表达, 如图 1-10, 为来自野生型和 GPR68 双敲除的小鼠的肿瘤细胞, 免疫组织化学分析结果表明, 敲除 GPR68 的小鼠肿瘤中 iNOS 的表达增多。这暗示我们抑制 GPR68 或许可以促进 NO 的产生。

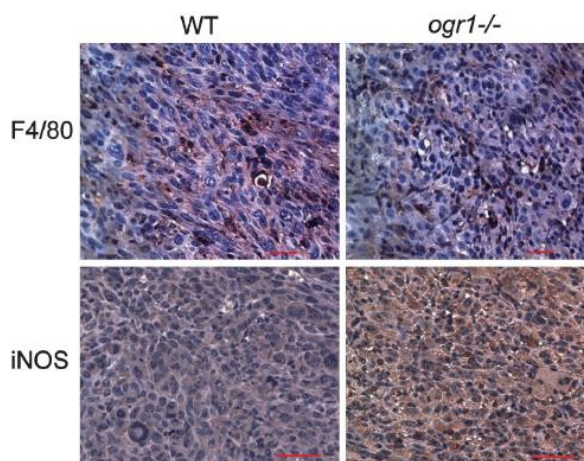


图 1-10 野生型和 GPR68 双敲除的小鼠的肿瘤免疫组化结果^[33]

2015年, Brain K. Shoichet 与 Bryan L. Roth 等人, 在 Nature 杂志发表了一篇发现 GPR68 的小分子正向别构调节剂的文章^[34], 作者先是通过改良的酵母系统, 筛选出了劳拉西洋, 一个作用于 GABA 受体的药物, 能够以正向变构调节剂方式激活 GPR68, 并通过计算机辅助药物设计的手段, 筛选到了选择性作用于 GPR68 的正向别构调节剂 Ogerin。德国勃林格殷格翰公司自主研发合成了 GPR68 特异性的拮抗剂, 并具有良好的体内特性。所以本项目的最终目的为检测该公司 GPR68 拮抗剂在抗真菌感染中的治疗效果。

1.5 本研究的目的是和意义

由于现有抗真菌药物的局限性、毒副作用和耐药性等缺点, 寻找新型的抗真菌药物迫在眉睫。而随着人们对真菌感染与免疫反应认识的深入, 免疫疗法成为了治疗真菌感染新的努力方向。结合原有的靶向真菌的治疗方案, 相辅相成, 或许可以取得更好的治疗效果。

基于清华大学林欣教授团队的研究, NO 供体药物是潜在的“免疫疗法”抗真菌药物。而作为治疗心绞痛等疾病中的“元老”, 传统 NO 供体药物的弊端也被逐渐发现。所以, 关于 NO 供体在抗真菌感染中的应用, 不仅仅止步于“旧药新用”, 还需要新型 NO 供体的发现和探索, 而 GPR68 拮抗剂便是潜在的新型 NO 供体。

因此, 本研究的主要目的如下:

一是验证 NO 供体药物在抗真菌感染中的作用。

一方面我们通过体外培养 BMDM, 验证在林欣教授团队发现的模型中, JNK1 缺陷导致抗真菌能力的提升确实主要通过促进 NO 的表达; 另一方面, 我们通过动物实验, 通过统计侵袭性白色念珠菌感染小鼠并给予经典的 NO 供体药物后的存活率、体重变化等指标, 评价 NO 供体药物的抗真菌治疗效果。

二是探究潜在的新型 NO 供体——GPR68 拮抗剂的作用。

因为参考的已发表成果有限, 我们需要更多的了解 GPR68 在抗真菌感染中的角色, 故首先通过构建 GPR68 过表达和敲除的细胞系, 通过体外实验对 GPR68 功能进行进一步的探究。另一方面, 后续我们也将通过动物实验, 统计侵袭性白色念珠菌感染小鼠并给予 GPR68 拮抗剂后的存活率、体重变化等指标, 评价其抗真菌治疗效果。