

侵袭性光滑念珠菌感染治疗策略的研究进展

刘赞蕾 综述 王中新 审校

摘要 近年来引起侵袭性念珠菌感染的病原体种类越来越多,其中光滑念珠菌已位居第二。抗真菌药物广泛使用使得光滑念珠菌耐药现象日趋严重,临床治疗易导致失败。目前,两种或多种抗真菌剂的联合治疗已在临床实施,同时各种研究性抗真菌药物尚处于临床前或临床开发阶段,其中部分抗真菌药物可能对唑类或棘白菌素类光滑念珠菌感染有效。该文从光滑念珠菌对常见抗真菌药物耐药着手,就新型抗真菌剂及联合使用抗真菌剂的研究进展做一综述,为指导临床合理使用抗真菌剂提供理论基础。

关键词 光滑念珠菌; 耐药机制; 治疗策略; 新药; 联合治疗
中图分类号 R 446.5; R 978.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)01-0150-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.01.031

流行病学调查显示,近年来光滑念珠菌已成为全球第二大引起侵袭性真菌感染的病原体,血流感染病死率近 50%^[1],与其他非白色念珠菌相比,其血流感染病死率最高。光滑念珠菌较高的感染发病率及血流感染病死率的可能原因有:①目前可用于一线治疗的抗真菌剂有限,其中常用且对人体副作用较小的抗真菌剂仅有两类:三唑类(如氟康唑和伏立康唑等)和棘白菌素类(如卡泊芬净和米卡芬净等);②易对唑类产生耐药,20%~30%的光滑念珠菌表现出对唑类耐药,且仍持续呈现上升趋势^[2-3];更甚者,棘白菌素类使用时间仅 10 余年,在部分地区 3%~12%光滑念珠菌临床分离株表现出对一种或多种棘白菌素类药物耐药^[2,4]。故针对上述问题,目前要亟待解决的问题主要包括减少现有抗真菌剂的副作用以及制定新的治疗策略如开发新抗真菌剂、联合使用抗真菌剂的研究等。该文就与光滑念珠菌相关的新型抗真菌剂及联合使用抗真菌剂的研究进展做一综述。

1 光滑念珠菌对常见抗真菌药物的耐药机制

光滑念珠菌对唑类产生耐药的主要机制是唑类药物外排转运蛋白的过量表达^[3,5]。其中,与真菌耐药关系最为密切的外排转运蛋白有 ATP 结合转运蛋白和易化扩散载体超家族蛋白,CDR1、CDR2、SNQ2、MDR1 等基因突变,可致上述蛋白表达上调^[3,5]。同时上述基因处于 PDR1 基因的调节之下,PDR1 基因功能获得性突变使 Pdr1 蛋白功能过度活跃,导致下游唑类药物外排泵基因高表达,从而影响光滑念珠菌对唑类药物的耐药性^[5-6]。

编码 β -1,3-葡聚糖合酶亚基的 FKS1 和 FKS2 基因高度保守区域发生点突变,是光滑念珠菌对棘白菌素抗真菌剂耐药的主要机制^[3-4]。其中,FKS1 中的 ser629 和 FKS2 中的 ser663、phe659 发生突变的频率较高,并引起显著的耐药表型。

多烯类抗真菌剂代表药物为两性霉素 B,然而由于输液相关不良反应和肾毒性的问题,近年来其用量明显下降。光滑念珠菌对多烯类耐药与 ERG 基因(编码真菌细胞膜麦角甾醇,包括 ERG1、ERG2、ERG6、ERG11 等)突变有关^[7]。

嘧啶类似物的代表药物是 5-氟胞嘧啶,如果将其作为单一疗法使用,耐药性迅速增加,现已被归因于 FCY1(编码胞嘧啶脱氨酶)、FCY2(编码通透酶)和 FUR1(编码尿嘧啶磷酸核糖基转移酶)基因的突变^[8]。

在长期广谱抗真菌剂暴露下,现已出现多重耐药光滑念珠菌。Alexander et al^[2]对美国杜克医院研究发现 2001~2010 年光滑念珠菌对氟康唑耐药率从 18% 升至 30%,对棘白菌素类耐药率从 4.9% 升至 12.3%,其中 14.1% 对氟康唑耐药的光滑念珠菌对棘白菌素类也出现耐药。随着侵袭性光滑念珠菌感染的增加,光滑念珠菌对常规抗真菌剂的耐药情况也愈加严重,且多重耐药光滑念珠菌检出率明显增加,这就迫切需要寻求治疗侵袭性光滑念珠菌感染的新策略。

2 新型抗真菌药物的研究进展

对于新型抗真菌药物,应具备以下特征:①药

2018-07-16 接收

基金项目:安徽省高校省级自然科学基金项目(编号: KJ2015A337)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院检验科,合肥 230022

通讯作者:刘赞蕾,女,硕士研究生;

王中新,男,副教授,主任技师,硕士生导师,责任作者,E-

mail: aywzhx87@163.com

物作用的选择性; ② 减少/不具有宿主毒性; ③ 与其他药物的拮抗作用较少; ④ 良好的药效学和药代动力学; ⑤ 主要作用为杀菌活性而非抑菌活性; ⑥ 对多重耐药光滑念珠菌治疗有效^[9]。目前正在进行一些研究性新型抗真菌剂的临床前和临床评估, 这些药物可能克服临床现有抗真菌剂所存在耐药性和副作用等问题, 在真菌感染治疗领域中带来突破性进展。

2.1 高选择性 CYP51 抑制剂 唑类抗真菌剂通过与位于酶活性位点的血红素辅因子可逆的竞争性结合, 抑制真菌羊毛甾醇 14 α -脱甲基酶 (cytochrome P450 14 α -lanosterol demethylase, CYP51) 的活性, CYP51 为细胞色素 P450 酶家族的一员, 同时唑类抗真菌剂还可抑制人细胞色素 P450 酶的活性, 导致各种不良反应 (如: 肝毒性等) 的产生。

为克服上述问题, Hoekstra et al^[10] 用四唑代替三唑金属结合基团, 通过对结合基团结构进行修饰, 从而增加底物与 CYP51 结合亲和力的大小, 改善抑制剂的效力。该过程产生了一系列高选择性真菌 CYP51 抑制剂, 如 VT-1161、VT-1129、VT-1598 等。其中, VT-1161 在临床前和临床 I 期研究中被证实高度安全性、有效性, 现已制成口服抗真菌剂处于 2 期临床试验中; VT-1129 正处于临床 I 期研究中^[11]。Break et al^[12] 研究证明 VT-1129 和 VT-1161 表现出对念珠菌菌株 (包括氟康唑耐药的白色念珠菌和光滑念珠菌) 显著的体外活性; VT-1161 在小鼠中使用, 成功有效的治疗了由氟康唑耐药的念珠菌菌株引起的感染。因此, 高选择性 CYP51 抑制剂的研究和进展将会在真菌感染治疗领域中发挥重要作用。

2.2 糖基磷脂酰肌醇合成抑制剂 糖基磷脂酰肌醇 (glycosylphosphatidylinositol, GPI)-锚定细胞壁蛋白调控生物被膜中细胞芽管和菌丝的形成, 并促进念珠菌黏附、定植于宿主细胞上, 若 GPI-锚定细胞壁蛋白合成破坏, 可导致免疫细胞对念珠菌识别增加^[13], 因此, GPI-锚定细胞壁蛋白对于真菌定植和感染是必需的。

APX001 是一种糖基磷脂酰肌醇合成抑制剂, 可抑制 GPI-锚定细胞壁蛋白生物合成途径中的肌醇酰基转移酶作用, 从而阻止 GPI 锚定蛋白成熟。APX001 对念珠菌表现出广谱的体外活性, 包括氟康唑耐药的分离株^[14]。Zhao et al^[15] 建立中性粒细胞减少性播散性念珠菌病小鼠模型, 分别通过体外和体内研究, 证实了 APX001 对白色念珠菌、光滑念

珠菌、耳念珠菌感染均有有效药物活性。现该药物处于 1 期临床试验中, 评估其静脉注射安全性、耐受性和药代动力学。

2.3 新型葡聚糖合成酶抑制剂 棘白菌素类抗真菌剂是治疗侵袭性念珠菌病的一线药物, 目前所有棘白菌素均需静脉用药, 因半衰期 10~12 h, 需每天给药 1 次, 如上所述, 在部分地区已出现对现有棘白菌素类耐药的菌株。新型葡聚糖合成酶抑制剂 CD101 有较长半衰期, 约 130 h, 可以每周给药 1 次, 对健康志愿者没有严重副作用, 且 CD101 的 PK / PD 靶值在数量上均低于其他棘白菌素类, 具有有利的药代动力学性质和有效的体内药效学活性^[16]。Ong et al^[17] 建立中性粒细胞减少性小鼠模型评估 CD101 对肝脏的副作用, 研究发现在接受 CD101 给药的小鼠肝脏在显微镜下观察没有变化, 而阿尼芬净给药可导致肝细胞坏死。CD101 的强效杀真菌活性、安全性强调了其用于治疗侵袭性念珠菌病和念珠菌血症的潜在临床应用。

目前正在研究用于口服给药的葡聚糖合成酶抑制剂有 MK-3118、SCY-078 等。Pfaffer et al^[18] 使用 CLSI 和 EUCAST 肉汤微量稀释法, 证明 MK-3118 对氟康唑耐药菌株和有 FKS 突变的卡泊芬净耐药菌株表现出有效的体外活性。Wiederhold et al^[19] 通过念珠菌感染小鼠模型证明了 SCY-078 对由野生型和棘白菌素耐药光滑念珠菌引起的感染治疗有效。故口服葡聚糖合成酶抑制剂具有治疗由棘白菌素耐药光滑念珠菌引起感染的潜力。

2.4 其他新型抗真菌剂 T-2307 是一种芳香酰胺类化合物, 其结构类似于芳香族二脒类, 并引起线粒体膜电位崩溃, 与哺乳动物细胞比较, 该化合物优先被真菌细胞摄取, 可能有显著的安全性。相关研究^[20-21] 证明, T-2307 对光滑念珠菌 (包括氟康唑耐药或卡泊芬净耐药菌) 有体外和体内活性。Wiederhold et al^[21] 将棘白菌素类耐药的光滑念珠菌静脉接种于中性粒细胞减少的小鼠体内, 经 T-2307 治疗 8 d 后评估肾脏的组织载菌量, 试验得出与对照组相比, T-2307 的每个剂量水平下的组织载菌量显著减少。这些研究结果为 T-2307 成为新药提供了有力的支持。

苯并咪唑类衍生物由于具有广泛的药理学和生物学活性而成为研究重点, 在医药方面具有抗真菌活性而备受关注。Keller et al^[22] 研究发现苯并咪唑类衍生物对多种致病念珠菌 (包括光滑念珠菌) 具有高度的抗真菌活性, 同时表明阻断麦角甾醇的合

成途径是其作用机制。后 Kaplanckll et al^[23] 合成了 12 种新型苯并咪唑-噻唑类衍生物并评估其对白念珠菌、光滑念珠菌等的体外活性, 研究表明所有合成化合物均具有良好的药代动力学特征和抗真菌活性。故此类化合物有潜力成为新型抗真菌剂。

3 抗真菌剂的联合治疗

尽管正积极地研究与开发新型抗真菌剂, 但侵袭性真菌感染的高发病率和死亡率的严峻形势, 迫使我们需利用现有的抗真菌剂制定合理有效的治疗方案。单一用药易受药物毒性、耐药性等的影响, 而联合使用抗真菌剂疗法可提高药物效力, 改善安全性和耐药性, 还可减少耐药菌的产生数量^[24]。

3.1 常用抗真菌剂联合治疗 Denardi et al^[25] 利用微量棋盘稀释法评估唑类、棘白菌素类和两性霉素 B 单独和联合使用对唑类或(和)棘白菌素类耐药的光滑念珠菌的体外活性。当阿尼芬净与伏立康唑或泊沙康唑联合使用时, 70% 耐药光滑念珠菌观察到协同作用; 在卡泊芬净和伏立康唑的组合中发现较高的协同作用。卡泊芬净和氟康唑, 泊沙康唑和两性霉素 B, 米氟芬净和氟康唑, 泊沙康唑和伏立康唑, 以及阿尼芬净和两性霉素 B 的组合对大多数分离株均表现出不同的活性。而米卡芬净与两性霉素 B 联用时, 50% 菌株中检测到拮抗作用。故联合使用唑类和棘白菌素类对治疗多重耐药光滑念珠菌感染有重要的临床应用价值。

3.2 他克莫司与唑类抗真菌剂联合治疗 他克莫司(FK506)是一种钙调神经磷酸酶抑制剂, 可防止 T 细胞增殖并抑制移植排斥反应中的免疫应答。Denardi et al^[26] 通过棋盘微量稀释法评价 FK506 和唑类(氟康唑、酮康唑、伊曲康唑和伏立康唑)联合使用对氟康唑敏感和耐药的光滑念珠菌的体外作用, 研究表明 FK506 与唑类抗真菌剂联合使用有协同杀真菌活性作用。Li et al^[27] 探讨其协同作用的机制, 发现 FK506 通过降低 ERG11 和 SNQ2 基因表达水平, 抑制氟康唑外排, 增强氟康唑对耐药光滑念珠菌的敏感性。因此 FK506 和唑类联合治疗器官移植后光滑念珠菌感染, 在临床上是一定的应用前景。

3.3 天然产物与抗真菌剂联合治疗 许多天然产物有抗真菌活性, 可作为治疗真菌感染的潜在选择。薄荷醇是一种萜类化合物, 据报道有抗真菌活性, Sharifzadeh et al^[28] 通过棋盘法研究发现薄荷醇联合伊曲康唑或制霉菌素对所测试光滑念珠菌和克柔念

珠菌均表现出协同作用, 薄荷醇的使用明显降低抗真菌剂的最小有效浓度。质膜 H^+ -ATP 酶在真菌细胞生理学中起关键作用, 并且维持细胞膜上的电化学质子梯度, Samber et al^[29] 证明薄荷醇通过抑制质膜 H^+ -ATP 酶活性, 导致细胞内酸化, 最终致真菌细胞死亡而发挥抗真菌活性。Sadowska et al^[30] 研究发现沙棘的枝和叶的提取物可抑制念珠菌生物被膜的形成, 在相对较低的浓度下与常规抗真菌药物联合使用有协同作用, 同时能够使病原体对之前无效的药物敏感, 但具体机制现尚不清楚。这些体外试验结果均表明天然产物可应用于抗真菌药物的领域中, 但仍需通过体内研究或临床证据来证实天然产物与抗真菌剂联合治疗的实用性。

4 展望

由于广谱抗生素的滥用, 抗真菌药物的抗菌谱窄, 及多重耐药光滑念珠菌的出现, 给临床预防和治疗光滑念珠菌感染带来困难和挑战。近年来, 光滑念珠菌耐药机制的研究越来越深入, 真菌基因组改变导致药物耐药, 从点突变到整个染色体的获得或缺失, 但对光滑念珠菌可快速获得多种药物耐药的机制尚不清楚, 因此还需要进一步研究。此外, 需要进一步扩大具有抗真菌活性的化合物库, 包括合成或半合成化合物、天然产物。目前正在开发的几种新的抗真菌剂可能比现有的药物更有优势, 但仍需继续进行临床前评估和临床研究, 以确定这些药物的安全性, 及是否能成功治疗耐药念珠菌引起的感染。这些研究将有助于加深人们对光滑念珠菌的认识和了解, 合理有效的指导临床用药, 促进公共卫生事业的发展。

参考文献

- [1] Nishikawa J L, Boeszoemenyi A, Vale-Silva L A, et al. Inhibiting fungal multidrug resistance by disrupting an activator-mediator interaction[J]. *Nature*, 2016, 530(7591): 485-9.
- [2] Alexander B D, Johnson M D, Pfeiffer C D, et al. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations[J]. *Clin Infect Dis*, 2013, 56(12): 1724-32.
- [3] Kolaczowska A, Kolaczowski M. Drug resistance mechanisms and their regulation in non-albicans *Candida* species[J]. *J Anti-microb Chemother*, 2016, 71(6): 1438-50.
- [4] Pfaller M A, Castanheira M, Lockhart S R, et al. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(4): 1199-203.

- [5] Gohar A A , Badali H , Shokohi T , et al. Expression patterns of ABC transporter genes in fluconazole-resistant candida glabrata [J]. *Mycopathologia* , 2017 , 182 (3-4) : 273 – 84.
- [6] Vale-Silva L A , Moeckli B , Torelli R , et al. Upregulation of the adhesin gene EPA1 mediated by PDR1 in Candida glabrata leads to enhanced host colonization [J]. *mSphere* , 2016 , 1(2) : e00015 – 65.
- [7] Hull C M , Bader O , Parker J E , et al. Two clinical isolates of Candida glabrata exhibiting reduced sensitivity to amphotericin B both harbor mutations in ERG2 [J]. *Antimicrob Agents Chemother* , 2012 , 56(12) : 6417 – 21.
- [8] Charlier C , El Sissy C , Bachelier-Bassi S , et al. Acquired flucytosine resistance during combination therapy with caspofungin and flucytosine for Candida glabrata cystitis [J]. *Antimicrob Agents Chemother* , 2015 , 60(1) : 662 – 5.
- [9] Campoy S , Adrio J L. Antifungals [J]. *Biochem Pharmacol* , 2017 , 133 : 86 – 96.
- [10] Hoekstra W J , Garvey E P , Moore W R , et al. Design and optimization of highly-selective fungal CYP51 inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett* , 2014 , 24(15) : 3455 – 8.
- [11] Schell W A , Jones A M , Garvey E P , et al. Fungal CYP51 inhibitors VT-1161 and VT-1129 exhibit strong *in vitro* activity against Candida glabrata and C. krusei isolates clinically resistant to azole and echinocandin antifungal compounds [J]. *Antimicrob Agents Chemother* , 2017 , 61(3) : e. 01817 – 16.
- [12] Break T J , Desai J V , Natarajan M , et al. VT-1161 protects mice against oropharyngeal candidiasis caused by fluconazole-susceptible and -resistant Candida albicans [J]. *J Antimicrob Chemother* , 2018 , 73(1) : 151 – 5.
- [13] Singh S L , Rai R C , Sah S K. The catalytic subunit of the first mannosyltransferase in the GPI biosynthetic pathway affects growth , cell wall integrity and hyphal morphogenesis in Candida albicans [J]. *Yeast* , 2016 , 33(8) : 365 – 83.
- [14] Gonzalez-Lara M F , Sifuentes-Osornio J. Drugs in clinical development for fungal infections [J]. *Drugs* , 2017 , 77(14) : 1505 – 18.
- [15] Zhao M , Lepak A J , VanScoy B , et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of APX001 against Candida spp in a neutropenic disseminated candidiasis mouse model [J]. *Antimicrob Agents Chemother* 2018 , 62(4) : e02542 – 17.
- [16] Lepak A J , Zhao M , VanScoy B , et al. Pharmacodynamics of a long-acting echinocandin , CD101 , in a neutropenic invasive-candidiasis murine model using an extended-interval dosing design [J]. *Antimicrob Agents Chemother* , 2018 , 62(2) : e02154 – 17.
- [17] Ong V , Hough G , Schlosser M , et al. Preclinical evaluation of the stability , safety , and efficacy of CD101 , a novel echinocandin [J]. *Antimicrob Agents Chemother* , 2016 , 60(11) : 6872 – 9.
- [18] Pfaller M A , Messer S A , Motyl M R , et al. Activity of MK-3118 , a new oral glucan synthase inhibitor , tested against Candida spp by two international methods (CLSI and EUCAST) [J]. *J Antimicrob Chemother* 2013 , 68(4) : 858 – 63.
- [19] Wiederhold N P , Najvar L K , Jaramillo R , et al. Oral glucan synthase inhibitor SCY-078 is effective in an experimental murine model of invasive candidiasis caused by WT and echinocandin-resistant Candida glabrata [J]. *J Antimicrob Chemother* , 2018 , 73(2) : 448 – 51.
- [20] Yamada E , Nishikawa H , Nomura N , et al. T-2307 shows efficacy in a murine model of Candida glabrata infection despite *in vitro* trailing growth phenomena [J]. *Antimicrob Agents Chemother* , 2010 , 54(9) : 3630 – 4.
- [21] Wiederhold N P , Najvar L K , Fothergill A W , et al. The novel arylamidine T-2307 demonstrates *in vitro* and *in vivo* activity against echinocandin-resistant Candida glabrata [J]. *J Antimicrob Chemother* 2016 , 71(3) : 692 – 5.
- [22] Keller P , Müller C , Engelhardt I , et al. An antifungal benzimidazole derivative inhibits ergosterol biosynthesis and reveals novel sterols [J]. *Antimicrob Agents Chemother* , 2015 , 59(10) : 6296 – 307.
- [23] Kaplanclkl Z A , Levent S , Osmaniye D , et al. Synthesis and anticandidal activity evaluation of new benzimidazole-thiazole derivatives [J]. *Molecules* , 2017 , 22(12) : e2051.
- [24] Chang Y L , Yu S J , Heitman J , et al. New facets of antifungal therapy [J]. *Virulence* , 2017 , 8(2) : 222 – 36.
- [25] Denardi L B , Keller J T , Oliveira V , et al. Activity of combined antifungal agents against multidrug-resistant Candida glabrata strains [J]. *Mycopathologia* 2017 , 182(9-10) : 819 – 28.
- [26] Denardi L B , Mario D A , Loreto É S , et al. Synergistic effects of tacrolimus and azole antifungal compounds in fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant Candida glabrata isolates [J]. *Braz J Microbiol* , 2015 , 46(1) : 125 – 9.
- [27] Li H , Chen Z , Zhang C , et al. Resistance reversal induced by a combination of fluconazole and tacrolimus (FK506) in Candida glabrata [J]. *J Med Microbiol* , 2015 , 64(Pt 1) : 44 – 52.
- [28] Sharifzadeh A , Khosravi A R , Shokri H. Synergistic anticandidal activity of menthol in combination with itraconazole and nystatin against clinical Candida glabrata and Candida krusei isolates [J]. *Microb Pathog* , 2017 , 107 : 390 – 6.
- [29] Samber N , Khan A , Varma A. Synergistic anti-candidal activity and mode of action of Mentha piperita essential oil and its major components [J]. *Pharm Biol* , 2015 , 53(10) : 1496 – 504.
- [30] Sadowska B , Budzyńska A , Stochmal A , et al. Novel properties of Hippophae rhamnoides L twig and leaf extracts-anti-virulence action and synergy with antifungals studied *in vitro* on Candida spp model [J]. *Microb Pathog* , 2017 , 107 : 372 – 9.