

· 论著 ·

## 基于气相色谱-质谱技术对用咪康唑处理的白念珠菌的代谢组学研究

杨宇<sup>a</sup>, 王慧<sup>a</sup>, 曹颖璞<sup>b</sup>, 朱臻宇<sup>a</sup> (第二军医大学药学院, a. 药物分析学教研室; b. 新药研究中心, 上海 200433)

**[摘要]** 目的 基于代谢组学方法研究咪康唑作用前后白念珠菌的代谢谱差异, 寻找潜在的生物标志物, 探讨药物作用机制。方法 采用气相色谱-质谱方法测定咪康唑给药前后白念珠菌的代谢特征谱, 利用多元统计分析方法进行比较, 筛选潜在的生物标志物, 并探讨代谢物产生差异的原因。结果 经分析, 筛选出 23 个潜在的生物标志物, 主要参与了氨基酸代谢、三羧酸循环、氧化应激、糖酵解和磷脂代谢等代谢路径。结论 咪康唑通过影响多种代谢路径而发挥抗真菌活性。

**[关键词]** 代谢组学; 气相色谱-质谱; 白念珠菌; 咪康唑

**[中图分类号]** R379.4

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2015)03-0209-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.03.005

## Metabolic analysis of miconazole-treated *Candida albicans* by GC-MS

YANG Yu<sup>a</sup>, WANG Hui<sup>a</sup>, CAO Yingying<sup>b</sup>, ZHU Zhenyu<sup>a</sup> (School of Pharmacy, Second Military Medical University, a. Department of Drug Analysis; b. New Drug Research and Development Center, Shanghai 200433 China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the metabolism in miconazole-treated *Candida albicans*, search for possible biomarkers and discuss the mechanism of miconazole. **Methods** GC-MS was employed to determine the metabolic fingerprint of *Candida albicans* before and after treatment with miconazole, and the difference based on multivariate was compared by statistical analysis, the potential biomarkers were screened out and the mechanism of miconazole was discussed. **Results** Twenty three metabolites was screened out as potential biomarkers, and they were primarily involved in amino acid metabolism, citrate cycle, glycolysis and lipid metabolism. **Conclusion** The antifungal activity of miconazole was played by affecting a variety of metabolic pathways.

**[Key words]** metabolomics; gas chromatography-mass spectrometry; *Candida albicans*; miconazole

随着免疫功能低下患者的增加、器官移植等医疗技术的发展以及免疫抑制剂的使用, 真菌感染率居高不下, 其中白念珠菌成为真菌感染的主要病原菌<sup>[1]</sup>。

咪康唑因生物利用度好和不良反应少成为防治真菌感染的一线药物。研究表明, 咪康唑可通过影响过氧化物酶和线粒体而发挥抗真菌活性<sup>[2]</sup>。同时, 咪康唑可增加活性氧使细胞死亡<sup>[3]</sup>。然而, 目前咪康唑的作用机制尚不明确, 因此研究其作用机制显得尤为重要。

在生命系统中, 代谢组能将基因组、转录组和蛋白组的微小变化放大。因此, 代谢组学能更直接地反应生物体的功能变化。

笔者基于气相色谱-质谱(GC-MS)代谢组学技术, 研究咪康唑给药前后白念珠菌的代谢特征谱, 结合药物作用机制, 探讨代谢物产生差异的原因, 为阐

明药物作用机制提供参考。

### 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** Thermo Trace Ultra/DSQ II GC-MS (美国赛默飞公司); 微型漩涡混合仪(美国赛默飞公司); -80 °C 低温冰箱(美国赛默飞公司); 冻干机(美国 Virtis 公司); MJx 型智能霉菌培养箱(宁波江南仪器厂)。

**1.2 试剂** 甲氧基胺盐酸盐、N-甲基-N-(三甲基硅烷)三氟乙酰胺(MSTFA)、吡啶、三甲基氯硅烷(TMCS)、咪康唑均购自 Sigma 公司; 正庚烷(上海晶纯实业公司)。

**1.3 菌株和培养基** 白念珠菌 SC5314; YPD 培养液; 酵母浸膏 10 g, 蛋白胨 20 g, 葡萄糖 20 g, 溶解于 1 000 ml 三蒸水, 高压灭菌(121 °C, 15 min), 4 °C 保存。

### 2 方法

#### 2.1 真菌培养

**[作者简介]** 杨宇, 硕士研究生. E-mail: yangyulucky@126.com

**[通讯作者]** 朱臻宇, 博士, 副教授, 硕士生导师. 研究方向: 代谢组学. Tel: (021)81871261; E-mail: zzyzfyh@163.com

**2.1.1 咪康唑半数抑菌浓度( $IC_{50}$ )的确定** 挑取白念珠菌单克隆,接种至 1 ml YPD 培养液,于 30 °C,200 r/min 培养至指数生长后期,于紫外分光光度计 600 nm<sup>[4]</sup>下测菌液光密度( $D$ )值,用 YPD 培养液调整菌液浓度至  $D$  值为 0.1,取 20 ml 加入各锥形瓶中培养,至  $D$  值为 0.2 时,给药组中加入咪康唑,使其终浓度分别为 0.5、1、2、4、8、16、32、64  $\mu\text{g/ml}$ ,继续培养(对照组中加入相同体积的二甲基亚砜,其浓度应小于 0.05%,以确保不影响白念珠菌的生长),分别在 3、4、5、6 h 测定各组的  $D$  值。与对照组的  $D$  值相比,选择继续培养 4 h,其中咪康唑的  $IC_{50}$  为 16  $\mu\text{g/ml}$ 。

**2.1.2 培养条件** 按照  $IC_{50}$  的测定方法和给药浓度,培养给药组和对照组各 6 份。

## 2.2 样品前处理

**2.2.1 样品淬灭** 向样品中加入等体积的 60% 甲醇(预冷至 -20 °C),迅速摇匀,静置 5 min (-40 °C),6 000 r/min 离心。

**2.2.2 样品提取** 样品用超纯水迅速清洗后,重悬于 1 ml 沸水(含 10  $\mu\text{l}$  200 mmol/L 的  $\alpha$ -氨基丁酸内标)<sup>[4]</sup>,静置 15 min,放入 -80 °C 冰箱冰冻 15 min,取出,60 °C 水浴溶解 15 min,再重复冻融操作 2 次,13 200 r/min 离心,取上清液,放置在一 20 °C 冰箱预冻。后置于冻干机中冻干,获得冻干粉。

**2.2.3 衍生化** 向冻干粉中加入 75  $\mu\text{l}$  甲氧基胺盐酸盐/吡啶溶液,40 °C 温孵 90 min,再加入 75  $\mu\text{l}$  MSTFA 溶液(1% TMCS),40 °C 温孵 50 min,13 200 r/min 离心,取上清液,装入进样小瓶。

**2.2.4 菌体干重的测定** 将样品沉淀在室温下风干至恒重,称样品干重,至少称量 3 次以确保样品完全干燥。

**2.3 GC-MS 条件** 毛细管柱:HP-5MS 石英毛细管柱(30 m  $\times$  0.25 mm,0.25  $\mu\text{m}$ );进样口温度:260 °C;升温程序:起始温度为 70 °C,保持 3 min,4 °C/min 升至 220 °C,再 8 °C/min 升至 310 °C,保持 10 min,图谱从第 7.6 分钟开始采集;载气:高纯氮气;流速:1.0 ml/min。进样量为 1  $\mu\text{l}$ 。

电子轰击源(EI);离子源温度:200 °C;接口温度:280 °C;电子能量:70 eV;调谐方式:标准调谐;质谱扫描方式:扫描范围 15~800 amu,扫描速度 5 s/dec。

**2.4 数据处理** 将原始数据(.RAW)经 Xcubur 数据处理系统转化成 CDF 格式,利用 XCMS 软件对数据峰校正和峰积分,并采用 MATLAB 7.0

(The MathWorks, Inc., USA)过滤离子峰,留下相同保留时间下峰度最大的离子峰。为校正质谱响应,每个样品的各个峰面积先除以各自的细胞干重,再除以内标衍生化后峰度最大的离子峰。利用 SIMCA-P V 11.0(Umetrics, Sweden)软件将数据中心化和帕累托变换,标准化后进行主成分分析(PCA)和偏最小二乘法(PLS-DA)分析,根据 variable influence in the projection(VIP)值来预测代谢物对模型的贡献程度。VIP>1 的数据对模型有明显贡献。接着对数据进行独立样本  $t$  检验,保留  $P<0.01$  的数据。将数据与 NIST 数据库匹配,并用标准品定位,得到潜在的生物标志物。

## 3 结果

**3.1 GC-MS 色谱图** 给药组和对照组白念珠菌的胞内代谢物,经提取,衍生化后进样分析,其 GC-MS 色谱图,如图 1 所示。

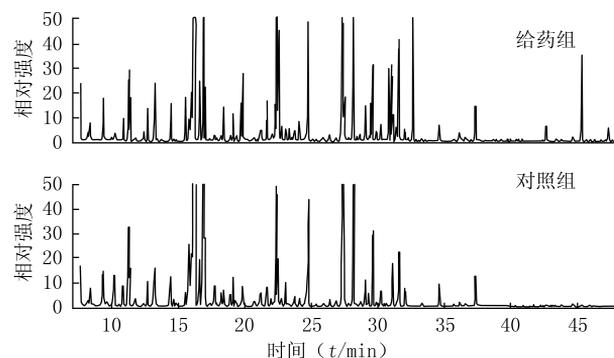


图 1 给药组和对照组的 GC-MS 色谱图

**3.2 PCA 与 PLS-DA 结果** 数据校正后,对给药组和对照组进行 PCA 和 PLS-DA 分析,如图 2A 和 2B 所示,结果表明两组明显分开。其载荷图和 S-plot 图,如图 2C 和 2D 所示。载荷图用于潜在生物标志物的筛选,根据载荷图所示,离原点越远的离子对分类贡献越大。得到 23 个潜在的生物标志物,给药组和对照组代谢物含量变化见图 3。

## 4 讨论

根据给药组和对照组的差异代谢物实验结果,分别讨论如下:

**4.1 葡萄糖** 给药组与对照组相比,葡萄糖含量显著升高。研究表明咪康唑通过影响线粒体 ATP 酶和钾离子泵而发挥抗真菌活性<sup>[5]</sup>,其中钾离子泵是主动运输,消耗能量,而葡萄糖可产生能量。因此,葡萄糖含量的升高可能与咪康唑作用钾离子通道有关。

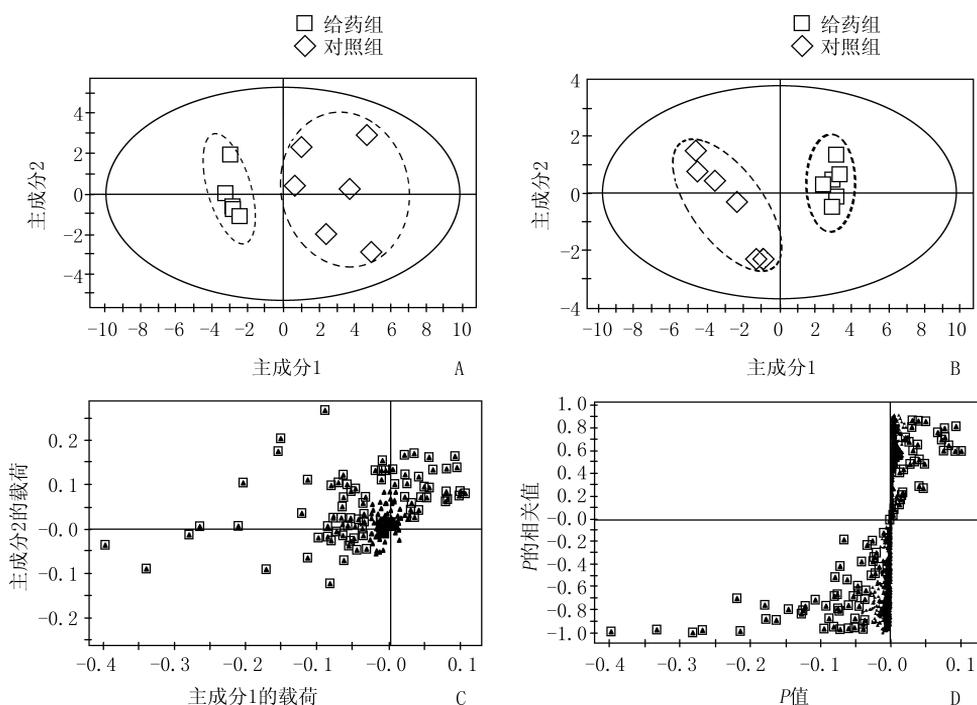


图2 给药组和对照组的主成分分析图(A)、偏最小二乘法得分图(B)、载荷图(C)和S-plot图(D)

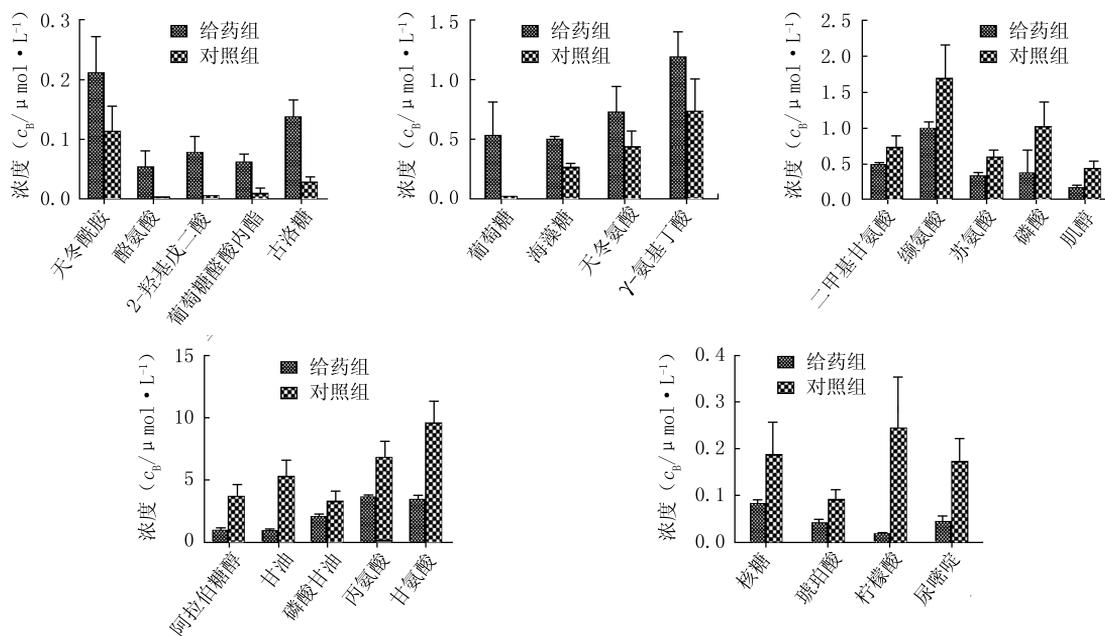


图3 给药组和对照组的差异代谢物柱状图

**4.2 海藻糖** 白念珠菌受到外界刺激时会采取保护性防御机制,其中氧化应激刺激细胞内非还原性二糖海藻糖明显增加<sup>[6]</sup>。在本实验中,咪康唑可能是一种氧化应激,给药后使细胞内海藻糖大量积累,从而起到抗氧化的作用。

**4.3 三羧酸循环相关代谢物** 三羧酸循环不仅是需氧生物体重要的代谢途径,还是糖类、脂质和氨基酸代谢联系的枢纽。酸刺激下,胞外谷氨酸通过反

向转运体(GadT)转移至胞内,在谷氨酸脱羧酶的作用下生成γ-氨基丁酸(GABA),该反应消耗氢离子,使胞内pH值升高。进而GABA通过GABA支路在GABA/α-酮戊二酸氨基转移酶的作用下脱氨基形成琥珀酸半醛(SSA),SSA在琥珀酸半醛脱羧酶的作用下生成琥珀酸,进而影响三羧酸循环<sup>[7]</sup>,同时GABA支路可降低细胞内活性氧<sup>[8]</sup>。这与前期的研究结果相符<sup>[9]</sup>。由此可知,三羧酸循环中琥珀酸

和柠檬酸含量的降低可能与咪康唑影响 GABA 支路有关。

**4.4 2-羟基戊二酸(2-HG)** 研究表明,2-HG 脱氢酶活性降低导致 2-HG 大量积累,而 2-HG 脱氢酶可降低 DNA 和组蛋白的甲基化,从而抑制正常细胞向癌细胞转化<sup>[10]</sup>。因此,咪康唑给药组 2-HG 的大量积累可能与 2-HG 脱氢酶活性降低有关,从而促进正常细胞向癌细胞转化。

**4.5 氨基酸类** 天冬酰胺、天冬氨酸、酪氨酸在给药组中含量升高。其中,酪氨酸磷酸化参与细胞信息传递,因此酪氨酸的增加可能与细胞信息传递有关。天冬氨酸和天冬酰胺可合成多种氨基酸。有研究表明,苏氨酸生物合成中间体  $\beta$ -天冬氨酸半醛(ASA)的积累对细胞有一定的损伤作用,同时可加速 Gcn4 的降解,Gcn4 可调控多种氨基酸和维生素的生物合成<sup>[11]</sup>。因此丙氨酸、二甲基甘氨酸、缬氨酸、苏氨酸和甘氨酸含量的降低与咪康唑促使 ASA 积累有关。

**4.6 磷酸、磷酸甘油、甘油类** 磷脂是细胞膜的重要组成部分。Pasrija 等<sup>[12]</sup>报道药物外转运蛋白倾向定位于细胞膜。因此,咪康唑可能通过影响细胞膜而导致药物外转运蛋白的活性降低,使细胞内的药物积累而发挥治疗作用。

本实验基于 GC-MS 的代谢组学方法对咪康唑给药前后白念珠菌的代谢物进行研究,经比较分析,得到 23 个潜在的生物标志物,它们主要参与了氨基酸代谢、三羧酸循环、氧化应激、糖酵解和磷脂代谢等相关通路,对咪康唑抗真菌作用机制的阐明具有重要意义。

## 【参考文献】

- [1] Kriengkauyiat J, Ito JI, Dadwal SS. Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections[J]. Clin Epidemiol, 2011, 3: 175-191.
- [2] Vandenbosch D, De Canck E, Dhondt I, et al. Genomewide screening for genes involved in biofilm formation and micon-

azole susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. FEMS Yeast Res, 2013, 13(8): 720-730.

- [3] Zhu CX, Yan L, Wang XJ, et al. Transposition of the Zorro2 retrotransposon is activated by miconazole in *Candida albicans* [J]. Biol Pharm Bull, 2014, 37(1): 37-43.
- [4] 吴海棠,李祥,王添琦,等.黄芩素作用白假丝酵母菌的 GC-MS 代谢组学研究[J]. 第二军医大学学报, 2013, 34(2): 184-189.
- [5] Calahorra M, Lozano C, Sanchez NS, et al. Ketoconazole and miconazole alter potassium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1808(1): 433-445.
- [6] Sanchez-Fresneda R, Guirao-Abad JP, Arguelles A, et al. Specific stress-induced storage of trehalose, glycerol and D-arabitol in response to oxidative and osmotic stress in *Candida albicans* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 430(4): 1334-1339.
- [7] Feehily C, O Byrne CP, Karatzas KA. Functional  $\gamma$ -Aminobutyrate Shunt in *Listeria monocytogenes*: role in acid tolerance and succinate biosynthesis [J]. Appl Environ Microbiol, 2013, 79(1): 74-80.
- [8] Cao J, Barbosa JM, Singh NK, et al. GABA shunt mediates thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen production [J]. Yeast, 2013, 30(4): 129-144.
- [9] Kobayashi D, Kondo K, Uehara N, et al. Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(10): 3113-3117.
- [10] Shim EH, Livi CB, Rakheja D, et al. L-2-hydroxyglutarate: an epigenetic modifier and putative oncometabolite in renal cancer [J]. Cancer Discov, 2014, 4(11): 1290-1298.
- [11] Rawal Y, Qiu H, Hinnebusch AG. Accumulation of a threonine biosynthetic intermediate attenuates general amino acid control by accelerating degradation of Gcn4 via Pho85 and Cdk8 [J]. PLoS Genet, 2014, 10(7): e1004534.
- [12] Pasrija R, Panwar SL, Prasad R. Multidrug transporters CaCdr1p and CaMdr1p of *Candida albicans* display different lipid specificities: both ergosterol and sphingolipids are essential for targeting of CaCdr1p to membrane rafts [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(2): 694-704.

[收稿日期] 2014-10-21 [修回日期] 2015-02-28

[本文编辑] 顾文华