

黄连解毒汤醋酸乙酯提取物对白色念珠菌毒力因子的作用

汪天明^{1,2}, 严园园^{1,2}, 夏丹^{1,2}, 施高翔^{1,2}, 邵菁^{1,2}, 汪长中^{1,2*}

1. 安徽中医药大学中西医结合临床学院, 安徽 合肥 230038

2. 安徽省中医药科学院 中西医结合研究所, 安徽 合肥 230038

摘要: 目的 探讨黄连解毒汤醋酸乙酯提取物(ethyl acetate extract of Huanglian Jiedu Decoction, EAHJD)对白色念珠菌毒力因子的作用。方法 分别采用卵黄培养基法检测磷脂酶(PL)活力、牛奶平板法检测天冬氨酸蛋白酶(Sap)活力、橄榄油乳化法检测脂肪酶(Lip)活力;水-烃两项测定实验检测细胞表面疏水性(CSH);RT-PCR法检测毒力因子相关基因的表达。结果 EAHJD对PL的活力无影响;1 250 $\mu\text{g/mL}$ EAHJD可显著抑制Sap与Lip的活力,312 $\mu\text{g/mL}$ EAHJD效果次之;EAHJD对CSH呈现剂量依赖性抑制,CSH1分别下调了7.69、3.57、2.95倍;分泌型酶相关基因在EAHJD作用下呈现不同倍数的变化,其中PLC1、Sap2、Sap3、Sap9、Lip3、Lip4、Lip6下调,PLB1、PLC2、Sap10、Lip5无明显变化。结论 EAHJD可抑制白色念珠菌毒力因子的活力。

关键词: 黄连解毒汤;白色念珠菌;毒力因子;磷脂酶;天冬氨酸蛋白酶;脂肪酶;细胞表面疏水性

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)24-3579-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.24.015

Effect of ethyl acetate extract from Huanglian Jiedu Decoction on virulence factors of *Candida albicans*

WANG Tian-ming^{1,2}, YAN Yuan-yuan^{1,2}, XIA Dan^{1,2}, SHI Gao-xiang^{1,2}, SHAO Jing^{1,2}, WANG Chang-zhong^{1,2}

1. School of Integrated Traditional and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China

2. Institute of Integrated Traditional and Western Medicine, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230038, China

Abstract: **Objective** To observe the effects of ethyl acetate extract from Huanglian Jiedu Decoction (EAHJD) on the virulence factors of *Candida albicans*. **Methods** Egg-yolk medium, milk-plate medium, and olive oil emulsification were used respectively to test the activities of phospholipase (PL), aspartic protease (Sap), and lipase (Lip) of *C. albicans*. The water-hydrocarbon two-phase assay was applied to measure the cell surface hydrophobicity (CSH) of *C. albicans*. qRT-PCR was adopted to observe the expression of virulence factors related genes. **Results** EAHJD had no effect on the activity of PL. EAHJD (1 250 $\mu\text{g/mL}$) could significantly inhibit the activity of PL and Lip better than that by 312 $\mu\text{g/mL}$ EAHJD. EAHJD could reduce CSH of *C. albicans* in a dose-independent manner and CSH1 was down-regulated by 7.69, 3.57, and 2.95 folds by 1 250, 312, and 78 $\mu\text{g/mL}$ EAHJD, respectively. The expression of secretory enzyme related genes displayed different changing folds: PLC1, Sap2, Sap3, Sap9, Lip3, Lip4, and Lip6 were down-regulated; PLB1, PLC2, Sap1, Sap10, and Lip5 had no distinct change treated by EAHJD. **Conclusion** EAHJD could inhibit the activities of virulence factors of *C. albicans*.

Key words: ethyl acetate extract of Huanglian Jiedu Decoction; *Candida albicans*; virulence factors; phospholipase; aspartic protease; lipase; cell surface hydrophobicity

白色念珠菌是一种重要的条件致病性真菌,其毒力因子除了黏附素、菌丝形成及表型转换之外,还包括磷脂酶(phospholipase, PL)、天冬氨酸蛋白酶(aspartic protease, Sap)、脂肪酶(lipase, Lip)、

细胞表面疏水性(cell surface hydrophobicity, CSH)等^[1]。白色念珠菌通过黏附素识别宿主细胞,继而分泌侵袭性酶促进其在细胞中扩散,同时通过形态发生及酵母-菌丝相转换使其利于侵入宿主,适应宿

收稿日期: 2014-07-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81073127); 安徽省自然科学基金项目(1408085MH165); 安徽中医药大学校级科研项目(2014zr026)

作者简介: 汪天明(1978—),男,讲师,从事抗真菌研究。E-mail: wtm1818@163.com

*通信作者 汪长中,教授,从事抗真菌研究。Tel: (0551)65169204 E-mail: ahwc63@sina.com

主环境,造成白色念珠菌感染。因此,有效抑制毒力因子的活性成为治疗白色念珠菌感染的有效手段。本课题组前期研究发现黄连解毒汤醋酸乙酯提取物(ethyl acetate extract of Huanglian Jiedu Decoction, EAHJD)可一定程度抑制白色念珠菌的早期黏附及菌丝形成^[2],在此基础上,本研究拟进一步探讨 EAHJD 对白色念珠菌分泌酶等毒力因子的作用,为黄连解毒汤临床用于抗真菌感染提供重要的实验依据。

1 材料

1.1 菌株

白色念珠菌 *Candida albicans* 17 株临床株由第二军医大学药学院姜远英教授惠赠。

1.2 药物

阳性对照药氟康唑(fluconazole, FLZ)对照品(中国食品药品检定研究院);黄连解毒汤按国家中医药管理局统一组织编审的普通高等类教育中医类规划教材《方剂学》中的药物组成,具体包括黄连、黄芩、黄柏和栀子,药材均购于安徽中医药大学第一附属医院中药房,并经高家荣主任药师鉴定。使用 80%甲醇 70 ℃回流 2 h 后滤过,收集滤渣,共重复回流 3 次后,滤液用醋酸乙酯萃取 3 次,萃取液 65 ℃旋转蒸发至结晶干燥,得到 EAHJD。

1.3 试剂

pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PBS),氨基黑 10B(Aladdin 公司),冰乙酸(上海化学试剂有限公司),正辛烷(国药集团化学试剂有限公司),无水乙醇(上海苏懿化学试剂有限公司),溶壁酶(Sigma 公司),Total RNA 提取试剂、PCR 反应试剂(日本 ToyoBo 公司),引物(上海生工生物工程有限公司)。

1.4 培养基

RPMI 1640 液体培养基(Gibco 公司),用 1 mol/L NaOH 溶液调整该液体培养基在 25 ℃的 pH 为 7.0±0.1,滤过灭菌,4 ℃保存备用。沙氏液体培养基、沙氏琼脂培养基(青岛高科技海博生物技术有限公司)。

蛋黄培养基(100 mL):葡萄糖 2.0 g、蛋白胨 1.0 g、营养琼脂 2.0 g、5 mol/L NaCl 20 mL、25 mmol/L CaCl₂ 20 mL,补蒸馏水至 100 mL,115 ℃灭菌 30 min,冷却至 50 ℃左右,取新鲜鸡蛋 1 个,酒精浸泡 30 min 后严格无菌操作取出蛋黄液,每 100 毫升上述培养基加入无菌蛋黄 4 mL,充分混匀。

YGM-牛奶培养基(100 mL):葡萄糖 2.0 g、

酵母粉 0.2 g、KH₂PO₄ 1.0 g、营养琼脂 2.0 g,115 ℃灭菌 30 min,冷却至 50 ℃左右,加入 1.0%灭菌脱脂奶粉,充分混匀。

平板筛选培养基(100 mL):橄榄油 2.0 mL、蛋白胨 1.0 g、牛肉膏 0.5 g、葡萄糖 0.3 g、聚乙烯醇(PVA) 1.0 g、氯化钠 0.5 g、聚山梨酯 80 0.5 mL、琼脂 1.5 g、溴百里香酚蓝 0.01 g。

发酵产酶培养基(1 L):葡萄糖 100 g、蛋白胨 1.8 g、酵母膏 0.5 g、KH₂PO₄ 2.0 g、橄榄油 8.5 mL、聚山梨酯 804.6 mL。

橄榄油乳化液:取 2.0 g PVA 加热溶解,冷却定容至 100 mL,橄榄油与 PVA 溶液按 1:3 混合。

1.5 仪器

16EWri 游标卡尺(Mahr 公司),DPH—9162 型电热恒温培养箱(上海一恒科技有限公司),血细胞计数板(上海求精生化试剂仪器有限公司),AB SpectraMax M2e 多功能酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司],KQ5200B 超声波(昆山市超声仪器有限公司),I7000 荧光定量 PCR 仪(美国生物应用系统公司)。

2 方法

2.1 菌悬液配制

从 4 ℃保存的沙氏培养平板上挑取单菌落白色念珠菌,接种至液体沙氏培养液,37 ℃、200 r/min 过夜培养,离心收集菌体,血细胞计数板计数,以 RPMI 1640 培养液稀释至 2×10^7 CFU/mL。

2.2 分泌型酶阳性菌株的筛选及其酶活力测定

2.2.1 分泌型酶阳性菌株的筛选 ①PL 阳性菌株筛选^[3]:取 10 μL 菌悬液滴加于蛋黄培养基表面,使其呈圆形,37 ℃培养 48 h,菌落周围出现沉淀圈即为 PL 阳性菌株。②Sap 阳性菌株筛选^[4]:取 10 μL 菌悬液滴加于 YGM-牛奶培养基表面,使其呈圆形,37 ℃培养 72 h 后,再将适量氨基黑染色液缓慢倾入培养基表面,室温染色 24 h,洗脱液脱色 15 min,吸去洗脱液,重新加入洗脱液,如此反复脱色,直至不含蛋白质部分的琼脂褪色为止,底部出现透明圈即为 Sap 阳性菌株。③Lip 阳性菌株筛选^[5]:取 10 μL 菌悬液滴加于平板筛选培养基表面,使其呈圆形,37 ℃培养 48 h 后,菌落周围出现黄色环即为 Lip 阳性菌株。

2.2.2 EAHJD 对酶活力的影响 取充分混匀的蛋黄、YGM-牛奶、发酵产酶培养基,分别加入终质量浓度为 1 250、312、78 μg/mL EAHJD 及 256 μg/mL

FLZ 作为给药组,另设正常培养基为阴性对照组。各组按“2.2.1”项方法接种菌种,分别培养不同时间后进行 PL、Sap 和 Lip 酶活力的测定。具体如下:①PL 活力测定,操作步骤同“2.2.1”项,测定菌落及沉淀圈直径。②Sap 活力测定,操作步骤同“2.2.1”项,测定菌落及透明圈直径,结果测定以 Pz 值表示酶的活力, Pz 值=菌落直径/总直径(菌落+菌落周围圈), Pz 值愈小,酶活力愈强。③Lip 活力测定,取菌悬液按 10%接种于发酵产酶培养基中, 30 ℃, 160 r/min 摇床培养 16 h, 10 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 10 mL, pH 6.8 无菌 PBS 冲洗 2 次,称取 0.5 g 离心压积细胞与 25 mL 无菌 PBS 混合于冰水中超声破碎(输出功率 500 W,每次辐射时间 6 s,间歇时间 5 s,总时间 5 min), 10 000 r/min 离心 10 min 收集上清液得到粗酶液。取 6 个 100 mL 三角烧瓶,依次标为阴性对照组(只加 95%乙醇 15 mL, 38 ℃水浴 5 min); 1 250 μg/mL EAHJD 组; 312 μg/mL EAHJD 组; 78 μg/mL EAHJD 组; 256 μg/mL FLZ 组; 空白对照组。各瓶均加入 4 mL 橄榄油乳化液与 5 mL pH 6.8 的 0.067 mol/L PBS 混匀,所有组均加入 1 mL 酶液,立即混匀反应 10 min,除阴性对照瓶外,其他均加入 15 mL 95%乙醇终止反应。各瓶均加入 2 滴酚酞,用 0.01 mol/L NaOH 滴定。计算酶活力(U/g)。

$$\text{酶活力} = \text{NaOH 消耗量} \times 0.05 \times 40 \times 1\,000 / 10$$

2.3 CSH 的测定^[6]

取菌悬液于 6 孔培养板中,加入终质量浓度为 1 250、312、78 μg/mL EAHJD 及 256 μg/mL FLZ, 37 ℃培养 48 h 后,弃去培养基,无菌 PBS 分别刮取细胞,离心,弃上清,加入沙氏培养基制备成菌悬液[600 nm 处吸光度值(A_{600})=1],每组取 1.2 mL 置于洁净玻璃管内,加入 0.3 mL 正辛烷,涡旋混匀 3 min,静置 15 min 两相分离,分离后立即测定水相 A_{600} ,以不加正辛烷测得的 A_{600} 作为对照。计算 CSH。

$$\text{CSH} = (A_{600 \text{ 对照}} - A_{600 \text{ 实验}}) / A_{600 \text{ 对照}}$$

2.4 PL、Sap、Lip 相关基因的检测

将标准菌悬液稀释成 2×10^6 CFU/mL,每孔 1 mL 加入 24 孔板,然后分别加入终质量浓度为 1 250、312、78 μg/mL EAHJD 及 256 μg/mL FLZ 各 1 mL 混匀, 37 ℃培养 24 h 后,吸取培养液; 3 000 r/min 离心 5 min,弃上清后用无菌 PBS 洗 3 次。加入溶壁酶水浴 20 min 后进行 RNA 提取,并调节 RNA 浓度,

使菌体模板量一致。具体操作方法参照 ToyoBo 公司 MagExtractor-RNA 提取试剂说明书进行。

2.4.1 引物的设计与合成 根据 NCBI 基因库查得所需基因序列,并用 Premier 5.0 软件设计所需引物,委托上海生工生物有限公司合成引物,各引物情况见表 1。

表 1 PCR 反应引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR reaction

引物	序列 (5'→3')	长度 / bp
CSH1-F	ATTCATCTCCATGCAAAGTC	20
CSH1-R	ACCACCGTTTGGAGACCAAG	20
PLB1-F	GCAATACCATTACCCTGTG	19
PLB1-R	GCAATACCATTACCCTGTG	19
PLC1-F	TGATGTTGCTATTGCTGGT	19
PLC1-R	TGATGTTGCTATTGCTGGT	19
PLC2-F	GAATTTGCCGTGAATAACC	19
PLC2-R	GAATTTGCCGTGAATAACC	19
Sap1-F	GGTTGACCGTTAGCGTAGC	19
Sap1-R	GGTTGACCGTTAGCGTAGC	19
Sap2-F	GTGGCAGCATCTGGAGAAT	19
Sap2-R	GTGGCAGCATCTGGAGAAT	19
Sap3-F	GAGAATCAGGAACCCATAA	19
Sap3-R	GAGAATCAGGAACCCATAA	19
Sap9-F	CCTCGTCGGTTTCTATGGT	19
Sap9-R	CCTCGTCGGTTTCTATGGT	19
Sap10-F	TTACAACGAAGACCACCAG	19
Sap10-R	TTACAACGAAGACCACCAG	19
Lip3-F	TAATCCCAAACGCACTAAA	19
Lip3-R	GAGCAATCCATAACCCTGT	19
Lip4-F	TGCTGCTTTAGGTGGATTT	19
Lip4-R	CTGTTTGTCGGTGTCTGTTT	19
Lip5-F	TCTATCACTGGTGGGTTC	19
Lip5-R	GAAGAGCATAGGAAGGAGC	19
Lip6-F	AGCCACCCAGCCAAGATGA	19
Lip6-R	TTCCGACCTGACCAAGAGC	19
actin-F	TTGATTGGCTGGTAGAG	18
actin-R	ATGGCAGAAGATTGAGAA	18

2.4.2 反转录为 cDNA 6 μL RNA 变性后加入试剂 [4×DNA Master (55 μL) 和 gDNA Remover (1.1 μL)] 2 μL, 37 ℃水浴 5 min 后加入 5RT-Master MixII 2 μL 混合后 50 ℃、5 min; 98 ℃、5 min; 4 ℃、1 min 反转录。反应完成后将 cDNA 稀释 10 倍备用。

2.4.3 实时荧光定量PCR反应 配制25 μL 总反应体系: 2 $\times$ SYBR Green Realtime PCR 12.5 μL , PCR 正、反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 各1 μL , cDNA 0.5 μL , ddH₂O 10 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 60 s; 扩增定量程序 40 个循环, 循环参数: 变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s; 退火 55 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s; 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s; 溶解曲线: 60~95 $^{\circ}\text{C}$, 加热速率为 0.1 $^{\circ}\text{C/s}$ 。内参基因为 actin。每个样品均设置 3 个重复, 重复实验 2 次。

2.4.4 定量分析 实时荧光定量 PCR 分别测定目的基因及内参的 C_t 值, 结果取其平均值。基因表达水平用倍数变化 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) 来表示。

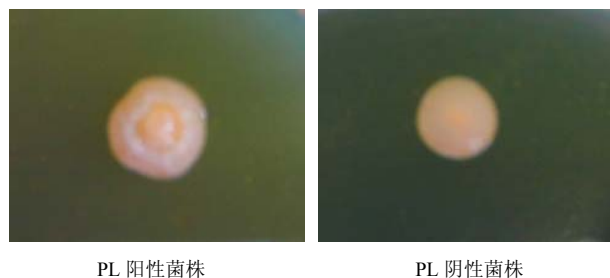
2.5 统计学处理

所有数据应用 SPSS 17 统计软件分析处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 分泌型酶阳性菌株筛选结果

3.1.1 PL 阳性菌株 17 株白色念珠菌中, PL 阳性菌株共 15 株, 占 88.2%。其中 PL 活性较高菌株 5 株, 蛋黄培养基上形成较宽的沉淀圈; PL 活性较低菌株 10 株, 形成较窄沉淀圈; PL 阴性无沉淀圈。见图 1。



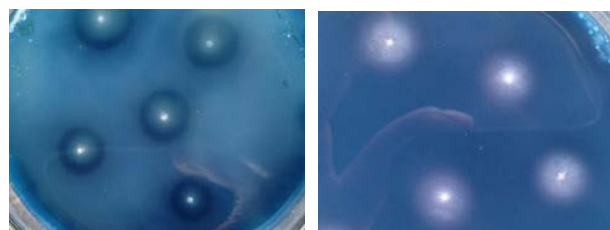
PL 阳性菌株

PL 阴性菌株

图 1 PL 阳性菌株筛选结果

Fig. 1 Screening of PL positive *C. albicans* strain

3.1.2 Sap 阳性菌株 17 株白色念珠菌中, Sap 阳性菌株共 13 株, 占 76.5%。其中 Sap 活性较高菌株 7 株, 透明圈较宽; Sap 活性较低菌株 6 株, 透明圈较窄; Sap 阴性的无透明圈。见图 2。



Sap 阳性菌株

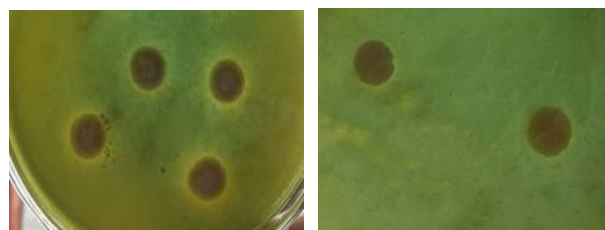
Sap 阴性菌株

图 2 Sap 阳性菌株筛选结果

Fig. 2 Screening of Sap positive *C. albicans* strain

3.1.3 Lip 阳性菌株 17 株白色念珠菌中, Lip 阳性菌株共 10 株, 占 58.8%。其中 Lip 活性较高菌株 6 株, 黄色环较宽; Lip 活性较低菌株 4 株, 黄色环较窄; Lip 阴性的无黄色环。见图 3。

17 株白色念珠菌中 3 种分泌型酶均呈阳性 3 株, 占 17.6%。



Lip 阳性菌株

Lip 阴性菌株

图 3 Lip 阳性菌株筛选结果

Fig. 3 Screening of Lip positive *C. albicans* strain

3.2 EAHJD 对分泌型酶活力的影响

3.2.1 EAHJD 对 PL 分泌的影响 结果发现, 用药组均未能抑制 PL 的分泌, 菌落周围仍呈现沉淀圈。

3.2.2 EAHJD 对 Sap 分泌的影响 1 250 $\mu\text{g/mL}$ EAHJD 作用组, 透明圈几乎消失; 312 $\mu\text{g/mL}$ EAHJD 作用组透明圈稍大; 78 $\mu\text{g/mL}$ EAHJD 作用组同空白对照组比较透明圈接近。见表 2。

表 2 EAHJD 对白色念珠菌 Sap 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of EAHJD on Sap activity of *C. albicans* ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\rho / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	Sap 活力 (Pz 值)
对照	—	0.21 ± 0.06
EAHJD	78	0.26 ± 0.04
	312	$0.47 \pm 0.12^{**}$
	1 250	$0.93 \pm 0.11^{**}$
FLZ	256	$0.52 \pm 0.07^{**}$

与对照组比较: $^{**}P < 0.01$, 下同

$^{**}P < 0.01$ vs control group, same as below

3.2.3 EAHJD 对 Lip 分泌的影响 对照组 Lip 活力较强, 达 104 U/g, EAHJD 从 78 $\mu\text{g/mL}$ 增加至 1 250 $\mu\text{g/mL}$ 时, 酶活力依次降至 99、68、23 U/g, 256 $\mu\text{g/mL}$ FLZ 作用后酶活力为 55 U/g。见图 4。

3.3 EAHJD 对 CHS 的影响

对照组的细胞 CSH 较高, 经 EAHJD 处理后其 CSH 明显降低, EAHJD 为 78 $\mu\text{g/mL}$ 时 CHS 为 0.92, 随着药物质量浓度迅速升高其 CHS 迅速降低, EAHJD 为 312 $\mu\text{g/mL}$ 时 CHS 为 0.43, 略低于 256

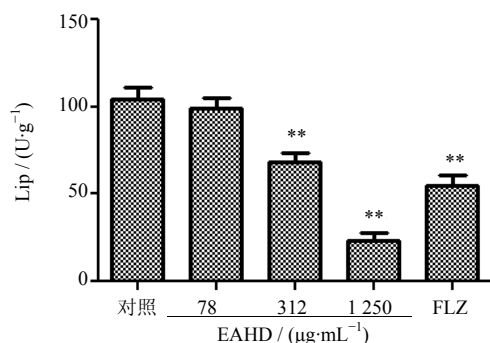


图 4 EAHJD 对白色念珠菌 Lip 活力的影响

Fig. 4 Effect of EAHJD on Lip activity in *C. albicans*

μg/mL FLZ 作用后的 CSH (0.49), 1 250 μg/mL EAHJD 作用后降至 0.15。见图 5。

3.4 EAHJD 对毒力因子相关基因的影响

检测所有基因发现, 随着 EAHJD 质量浓度的降低, CSH1 分别下调了 7.69、3.57、2.95 倍; 分

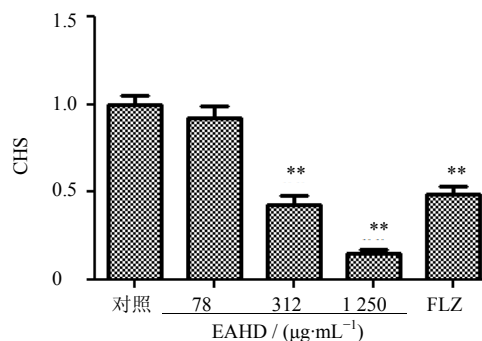


图 5 EAHJD 对白色念珠菌 CSH 的影响

Fig. 5 Effect of EAHJD on CSH of *C. albicans*

泌型酶相关基因的表达呈现不同倍数变化, PLC1、Sap1、Sap2、Sap3、Sap9、Lip3、Lip4、Lip6 表达均下调, 其中 1 250 μg/mL EAHJD 使 Sap2、Lip3 分别下调 8.29、9.24 倍, 效果显著; PLB1、PLC2、Sap10、Lip5 表达无变化。见表 3。

表 3 EAHJD 对白色念珠菌毒力因子合成相关基因表达的影响

Table 3 Effect of EAHJD on expression of virulence factors synthesis related gene of *C. albicans*

组别	$\rho /$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	基因相对表达 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)												
		CSH1	PLB1	PLC1	PLC2	Sap1	Sap2	Sap3	Sap9	Sap10	Lip3	Lip4	Lip5	Lip6
EAHJD	1 250	-7.69	-2.01	-4.30	-2.11	-1.28	-8.29	-4.52	-4.98	-2.44	-9.24	-5.16	-2.19	-4.23
	312	-3.57	-1.08	-3.10	-1.98	-1.09	-3.21	-3.24	-1.98	-1.39	-4.22	-3.28	-2.08	-2.93
	78	-2.95	-1.02	-1.70	-1.20	-1.02	-2.25	-1.23	-1.02	-1.15	-1.20	-2.09	-1.03	-1.24
FLZ	256	-5.63	-3.23	-4.14	-4.20	-2.38	-1.28	-1.79	-4.28	-1.47	-6.23	-2.57	-1.98	-6.32

4 讨论

白色念珠菌是一种重要的条件致病菌, 在菌群失调或机体免疫功能下降时可引发机会性感染。随着分子免疫学、分子生物学的发展, 对于该菌感染人类宿主的研究取得了很大进展, 对白色念珠菌的毒力因子有了进一步的认识。

本实验从白色念珠菌几种常见的主要毒力因子方面探讨 EAHJD 抗白色念珠菌作用。PL 作为一种重要的毒力因子, 其中磷脂酶 B、C、D (PLB、PLC、PLD) 研究较多。Barrett-Bee 等^[7]证实 PL 活力高的白色念珠菌对颊膜上皮黏附力及小鼠的致病性均上升。PLB 是一种分泌型糖蛋白, 糖基化磷脂酰肌醇(GPI)结合位点与 PLB1 结合后, 将 PLB1 与细胞膜或细胞壁上的几丁质结合, 使其固定于细胞壁上。PLC 在膜受体的传递中扮演重要角色, 其中 PLC1 可能涉及白色念珠菌细胞生长过程, PLC1 突变株未能形成菌丝; 而 PLC2 与 PLC3 经证实并非白色念珠菌毒力所必需的^[8]。本实验 17 株临床株

中 PLB 阳性 15 株, 其中活性较高有 5 株。EAHJD 干预下, 仅从沉淀圈观察, PLB 的分泌并未发现明显变化。RT-PCR 检测基因发现 EAHJD 作用后, PLB1 与 PLC2 表达未见明显变化, 1 250、312 μg/mL EAHJD 分别使 PLC1 表达下降 4.3、3.1 倍。结合表型及基因变化推测, EAHJD 引起 PLC1 下调但未能造成表型变化推测可能还作用于其他 PLB 相关基因, 共同调节基因变化, 造成 PLB 分泌无明显差异。Sap 作为白色念珠菌另一个重要的毒力因子, 不仅有较高的蛋白水解活性, 而且对感染鼠有较高的致死性。研究证明 Sap1~3 无效突变体丧失了大部分毒性; Sap9 和 Sap10 通常存在于共生和感染过程中^[9]。17 株临床株筛选出 13 株 Sap 阳性菌株, 其中活性较高有 7 株。EAHJD 干预后, Sap 分泌显著降低。与对照组相比, 78、312、1 250 μg/mL EAHJD 作用后 Sap 活力 Pz 值依次上升了 19.2%、55.3%、77.4%。RT-PCR 检测基因发现 EAHJD 作用后, Sap2、Sap3、Sap9 均下调; Sap1、Sap10 无明显变

化,推测 EAHJD 对 Sap 基因的下调效应起主导作用,从而抑制了 Sap 的分泌。Lip 也是白色念珠菌的重要毒力因子之一,1965 年首次提出白色念珠菌细胞外 Lip 活性。Hube 等^[10]实验发现 Lip3~6 在多种培养及各生长阶段均表达。17 株临床株筛选出 10 株 Lip 阳性菌株,其中活性较高有 6 株。EAHJD 干预后,与对照组相比,78、312、1 250 $\mu\text{g/mL}$ EAHJD 作用组分别使 Lip 活性下降 0.05%、34.6%、77.9%。RT-PCR 检测基因发现 EAHJD 作用后,Lip3、Lip4、Lip6 均下调,Lip5 无显著变化。这与 Lan 等^[11]的研究一致,即 Lip5 属于冷活性酶,最适环境为 15~25 $^{\circ}\text{C}$,而本实验作用温度为 37 $^{\circ}\text{C}$,推测该基因表达受到抑制,导致 EAHJD 难于无法作用该靶点。而其他 3 个基因表达下调引起 Lip 分泌大大降低。

CSH 有助于菌体黏附于上皮细胞、内皮细胞和胞外基质蛋白,以及抵抗吞噬细胞的杀伤,因而是白色念珠菌的一种重要毒力因子^[12]。同时,CSH 也参与了生物膜的形成,后者不仅参与了白色念珠菌的耐药性,同时也是重要的致病因素。本实验检测了经不同质量浓度 EAHJD 处理的白色念珠菌 CSH 值,结果表明,EAHJD 浓度越大,CSH 值越小,CSH1 基因表达也相应越低,推测 CSH1 表达下降而导致 CSH 降低可能是 EAHJD 降低毒力的分子机制之一。

综上所述,EAHJD 的抗白色念珠菌作用可能与其抑制 PL、Sap、Lip 和 CSH 等密切相关。

参考文献

- [1] 马 虎,崔 凡,林昭春.白念珠菌致病相关的水解酶[J].中国真菌学杂志,2012,7(4): 247-251.
- [2] 汪天明,严园园,施高翔,等.黄连解毒汤乙酸乙酯提取物对白假丝酵母菌黏附作用的影响[J].中国微生态学杂志,2014,26(4): 391-395.
- [3] Kadir T, Gümrü B, Uygun-Can B. Phospholipase activity of *Candida albicans* isolates from patients with denture stomatitis: The influence of chlorhexidine gluconate on phospholipase reduction [J]. *Arch Oral Biol*, 2007, 52(7): 691-696.
- [4] 黄长武,李兴禄,邱君凤,等.白色念珠菌在呼吸道中致病性的研究[J].中华医院感染学杂志,2004,14(7): 721-723.
- [5] 黎小军,谢莲萍,刘建宏,等.产 Lip 菌株的筛选、鉴定与产酶条件优化[J].江西师范大学学报:自然科学版,2014,38(1): 14-18.
- [6] Cao Y Y, Gao Y B, Xu Z, *et al.* cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(2): 584-589.
- [7] Barrett-Bee K, Haves Y, Wilson R G, *et al.* A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts [J]. *J Gen Microbiol*, 1985, 131(5): 1217-1221.
- [8] Knechtle P, Goyard S, Brachat S, *et al.* Phosphatidylinositol-dependent phospholipases C *l*c2 and *l*c3 of *Candida albicans* are dispensable for morphogenesis and host-pathogen interaction [J]. *Res Microbiol*, 2005, 156(7): 822-829.
- [9] Albrecht A, Felk A, Pichova I, *et al.* Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(2): 688-694.
- [10] Hube B, Stehr F, Bossenz M, *et al.* Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterization and expression analysis of a new gene family with at least ten members [J]. *Arch Microbiol*, 2000, 174(5): 362-374.
- [11] Lan D M, Yang N, Wang W K, *et al.* A novel cold-active lipase from *Candida albicans*: cloning, expression and characterization of the recombinant enzyme [J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(6): 3950-3965.
- [12] Singleton D R, Masuoka J, Hazen K C. Cloning and analysis of a *Candida albicans* gene that affects cell surface hydrophobicity [J]. *Bacteriol*, 2001, 183(12): 3582-3588.