

基于高通量测序技术探究白鲜碱对红色毛癣菌体外抑菌作用

刘登宇¹, 高璐², 吴建美³, 尉迟邈¹, 曲琳^{1, 3*}

1. 内蒙古科技大学 包头医学院, 内蒙古 包头 014000

2. 内蒙古医科大学, 内蒙古 呼和浩特 010107

3. 内蒙古综合疾病预防控制中心, 内蒙古 呼和浩特 010020

摘要: 目的 研究白鲜碱对皮肤浅部真菌红色毛癣菌的体外抑菌作用。方法 采用液基稀释法测定白鲜碱对红色毛癣菌的最低抑菌浓度 (MIC); 采用高通量测序技术对白鲜碱(25.0、12.5 $\mu\text{g/mL}$)作用的红色毛癣菌进行转录组测序, 对测序序列进行处理和生物学信息分析, 进行差异表达基因、基因本体论 (GO) 功能显著性和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析等。结果 液基稀释法结果表明, 白鲜碱对红色毛癣菌的 MIC 为 50 $\mu\text{g/mL}$ 。高通量测序结果显示, 对照组与白鲜碱 25.0 $\mu\text{g/mL}$ 组比较, 差异基因总数为 890 个; 其中上调表达 384 个, 下调表达 542 个。白鲜碱作用后红色毛癣菌的差异基因主要表现于细胞膜结构、膜固有成分、氧化还原酶活性、对药物的反应和细胞色素复合体等。白鲜碱作用后红色毛癣菌在代谢途径、MAPK 信号通路、ABC 转运蛋白合成、色氨酸代谢等富集通路相关基因均有显著性改变 ($P < 0.05$)。结论 白鲜碱对红色毛癣菌的抑菌机制可能与抑制细胞膜结构的完整性、影响红色毛癣菌的能量代谢、降低耐药性等途径有关。

关键词: 白鲜碱; 红色毛癣菌; 高通量测序技术; 抑菌

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2021) 12-2563-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.12.006

In vitro antibacterial activity of dictamnine against *Trichophyton rubrum* based on high-throughput sequencing

LIU Dengyu¹, GAO Lu², WU Jianmei³, YU Chimiao¹, QU Lin^{1,3}

1. Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014000, China

2. Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010107, China

3. Inner Mongolia Center for Comprehensive Disease Control and Prevention, Hohhot 010020, China

Abstract: Objective To study the antibacterial effect of dictamnine on *Trichophyton rubrum*. **Methods** The minimal inhibitory concentration (MIC) of dictamnine against *Trichophyton rubrum* was determined by liquid based dilution method. The transcriptome of *Trichophyton rubrum* treated with dictamnine was sequenced by high-throughput sequencing technology, and the sequencing sequence was processed and the biological information was analyzed to analyze the differentially expressed genes, the significance of GO function and KEGG metabolic pathway. **Results** the MIC of dictamnine against *Trichophyton rubrum* was 50 $\mu\text{g/mL}$. The results of high-throughput sequencing showed that there were 890 differentially expressed genes in the control group compared with the high-dose group, including 384 up-regulated genes and 542 down regulated genes. The differential genes of *Trichophyton rubrum* treated with dictamnine were mainly expressed in cell membrane structure, membrane intrinsic components, oxidoreductase activity, drug response and cytochrome complex. There were significant changes in metabolic pathway, MAPK signaling pathway, ABC transporter synthesis and tryptophan metabolism of *Trichophyton rubrum* after dictamnine treatment ($P < 0.05$). **Conclusion** The antibacterial mechanism of dictamnine against *Trichophyton rubrum* may be related to inhibiting the integrity of cell membrane structure, affecting the energy metabolism of *Trichophyton rubrum* and reducing drug resistance.

Key words: dictamnine; *Trichophyton rubrum*; high-throughput sequencing; antibacterial

收稿日期: 2021-05-16

基金项目: 内蒙古自治区科技计划项目(201802117)

第一作者: 刘登宇(1992—),男,预防医学专业。E-mail:2486618850@qq.com

*通信作者: 曲琳 E-mail:645148666@qq.com

红色毛癣菌是皮肤真菌病的主要致病真菌,主要感染皮肤角质层、指甲,导致皮肤浅部真菌病^[1]。以往对红色毛癣菌的研究主要集中在流行病学和临床治疗方面^[2]。传统的抗真菌药物治疗皮肤浅部真菌病,如特比萘芬,随着用量越来越多,它的耐药、副作用和毒性等均显现出来。中草药具有抗菌谱广、疗效高、价格低廉等优点^[3]。白鲜碱是芸香科植物白鲜皮 *Dictamnii Cortex* 的活性成分,属于生物碱的一种,具有降血压、活血化瘀和抗菌等活性^[4]。有研究显示,白鲜碱可以抑制稻瘟病菌的活性^[5]。Pfyffer等^[6]发现,白鲜碱可以影响真菌DNA,导致真菌生长受抑制。高通量测序技术在近些年发展快速,在微生物学的研究中取得了丰富的成果^[7]。有研究者运用高通量测序的方法研究牛蒡子等5味中药合剂对须癣毛癣菌、犬小孢子菌等真菌的作用,发现中药合剂可以下调 *Pdr1p* 和 *Pdr3q* 基因的表达,而 *Pdr1p* 和 *Pdr3q* 转录因子负责调节多重耐药性,说明该合剂通过上调破坏细胞膜和细胞核的相关基因的表达,如基因编码肌醇-1-磷酸盐合酶(*INO1*),降低真菌的耐药性^[8]。

本研究参照美国临床和实验室标准协会(CLSI)^[9]提出的丝状真菌的药敏方案,高通量测序分析,初步揭示白鲜碱抗真菌作用的分子机制,揭示白鲜碱作为新型抗真菌药物的开发潜力,为下一步开发新型抗菌中药提供参考。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

白鲜碱标准品(北京索莱科技有限公司,规格20 mg,批号1027A023,质量分数 $\geq 98\%$);二甲基亚砜(DMSO,索莱宝生物科技有限公司,批号20190911H);取10 mg白鲜碱溶于1 mL DMSO,配成10 mg/mL白鲜碱溶液,混匀后置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

马铃薯琼脂培养基(SDA,青岛高科技工业园海博生物技术有限公司);0.5%葡萄糖肉汤培养基(北京路桥技术股份有限公司);Trizol试剂盒(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA);Ribo-Zero-TM磁性试剂盒(Epicentre, Madison, WI, USA);QiaQuick PCR提取试剂盒(Qiagen, Venlo, 荷兰)。

1.2 主要仪器

生物安全柜(山东博科生物技术有限公司);压力蒸汽灭菌锅(ALP Co, Ltd);恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);干燥箱[宾德环境试验设备(上海)有限公司];血细胞计数板(上海市求精生

化试剂仪器有限公司);天平(ISO9001);96孔板、培养皿(北京陆桥技术股份有限公司);Illumina Novaseq 6000(中国广州Gene Denovo Biotechnology Co.);Agilent 2100生物分析仪(Agilent Technologies, Palo Alto, USA)。

1.3 实验菌株与培养基

红色毛癣菌 *Trichophyton rubrum*, 菌种编号BNCC 340195,从北京北纳创联生物技术研究院(BNCC)购买,且附有鉴定证书。取 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的菌种,挑取磁珠接种至SDA, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养7 d,复苏。

2 方法

2.1 液基培养法

2.1.1 菌悬液制备 在内蒙古自治区综合预防疾病控制中心毒理科消杀实验室,将红色毛癣菌接种于SDA上,并将其放置恒温培养箱中进行培养,温度 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$,培养时间为7~14 d。

用提前配制好的无菌生理盐水加聚山梨醇酯20(0.85%)进行冲洗菌,吸取2~3 mL生理盐水轻轻的冲洗菌丝及孢子,无菌环轻轻刮取,微量移液枪吸取菌悬液,将其放置于灭菌EP管中,为原液,然后用振荡器震荡15 s,用肉汤进行1 000倍稀释,将其浓度控制在 $4\times 10^5\sim 5\times 10^6$ CFU/mL备用^[8]。

2.1.2 白鲜碱对红色毛癣菌的最低抑菌浓度(MIC)检测 参照CLSI提出的丝状真菌的药敏方案^[9],准备好96孔板,将白鲜碱稀释为9个质量浓度,分别为400.000 0、200.000 0、100.000 0、50.000 0、25.000 0、12.500 0、6.250 0、3.125 0、1.562 5 $\mu\text{g/mL}$,放置于2~10孔中。首先放100 μL 的肉汤培养基,置3~11孔中,第2个孔加200 μL 的800 $\mu\text{g/mL}$ 的白鲜碱,运用倍比稀释法将第2孔中的中药吸出100 μL 至第3孔混合均匀,再吸第3个孔100 μL 的白鲜碱置于下一孔,依次稀释至10孔。最后使2~10孔中均有100 μL 的药液,第11孔为对照组,不含药。再将稀释1 000倍的菌悬液加至2~11孔中,每个孔加100 μL 。放置 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养7 d,观察白鲜碱对红色毛癣菌的MIC^[10-12]。

2.2 测序样本的制备

准备好24孔板,直径14 mm,将白鲜碱用肉汤培养基分别稀释成高、低质量浓度(25.0、12.5 $\mu\text{g/mL}$)分别放置于1~4孔中,每个剂量2个孔,每孔2 mL,再加入50 μL 菌悬液,5~6孔作为对照组,不加药。放置 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养7 d,准备收集菌体。

①吸取1 mL菌液至1.5 mL离心管中,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

条件下,7 000 r/min 离心 5 min 收集菌体;②加入 1 mL PBS 缓冲液,上下轻柔颠倒使菌体散开,勿剧烈震荡,7 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,重复 2~3 次,至上清澄清透明;③吸弃上清,不能有任何液体残留,标记好样品名称和日期,迅速液氮速冻 15 min 以上,随后保存于-80 °C 冰箱中。

2.3 测序结果的质量检测与分析

2.3.1 总 RNA 抽提、cDNA 文库构建和转录组测序 使用 Trizol 试剂盒提取总 RNA。在 Agilent 2100 生物分析仪上评估 RNA 质量,并使用无 RNase 琼脂糖凝胶电泳检查。提取总 RNA 后,用 Oligo(dT)富集真核细胞 mRNA。通过 Ribo-Zero-TM 磁性试剂盒去除 rRNA 富集原核 mRNA。然后用片段缓冲液将富集的 mRNA 片段化为短片段,用随机引物将其逆转录为 cDNA。用 DNA 聚合酶 I、RNA 酶 H、dNTP 和缓冲液合成第二链 cDNA。然后用 QiaQuick PCR 提取试剂盒纯化 cDNA 片段,末端修复,添加碱基,连接到 Illumina 测序适配器。连接产物经琼脂糖凝胶电泳、PCR 筛选,由 Illumina Novaseq6000 进行扩增和测序。

2.3.2 差异基因功能注释 用 DESeq2 软件^[13]对每 2 个不同组进行 RNA 差异表达分析,①对 readcount 进行标准化;②根据模型进行假设检验概率(P_{value})的计算;③最后进行多重假设检验校正,得到错误发现率(FDR)值。差异基因的筛选标准 $|\log_2(\text{FC})| > 1, \text{FDR} < 0.05$ 。

Gene Ontology(简称 GO)是一个国际化的基因功能分类体系,提供了一套动态更新的标准词汇表来全面描述生物体中基因和基因产物的属性。GO 总共有 3 个本体(ontology),分别描述基因的功能、细胞组分和参与的生物过程。

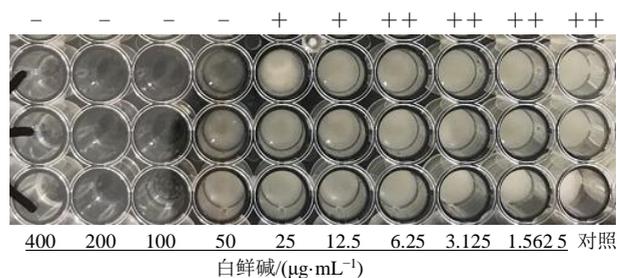
KEGG 是有关 Pathway 的主要公共数据库。Pathway 显著性富集分析以 KEGG pathway 为单位,应用超几何检验,找出与整个基因组背景相比,在差异基因中显著性富集的 pathway。

利用 GO 数据库对所有差异基因进行注释,通过 KEGG 数据库对差异基因进行通路分析,采用超几何分布计算差异基因显著富集的 GO 条目和 KEGG 通路, $P < 0.05$ 为显著富集。

3 结果

3.1 白鲜碱对红色毛癣菌的 MIC 值

真菌培养 7 d 后,从恒温培养箱中取出 96 孔板,结果见图 1。白鲜碱对红色毛癣菌的 MIC 值为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,抑制率 50% 的药液质量浓



“++”表示大量真菌生长;“+”表示少量真菌生长;“-”表示无真菌生长
“++”indicates a large number of fungal growth; “+”indicates a small amount of fungal growth; “-”indicates no fungal growth

图 1 液基培养法白鲜碱作用后红色毛癣菌生长情况

Fig. 1 Growth of *Trichophyton rubrum* treated with dictamnine by liquid medium culture method

度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,抑制率 25% 的药液质量浓度为 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3.2 白鲜碱药液对红色毛癣菌高通量测序结果

3.2.1 白鲜碱作用后红色毛癣菌的差异基因整体统计 3 组两两对比分析,红色为表达量上调的基因,蓝色为表达量下调的基因。对照组与白鲜碱 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组比较上调基因数 348 个,下调基因数 542 个,总数为 890 个;对照组与白鲜碱 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组比较上调基因数 21 个,下调基因数 20 个,总数为 41 个;白鲜碱 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组比较上调基因数 294 个,下调基因数 462 个,总数为 756 个。测序结果的整体差异基因见图 2。

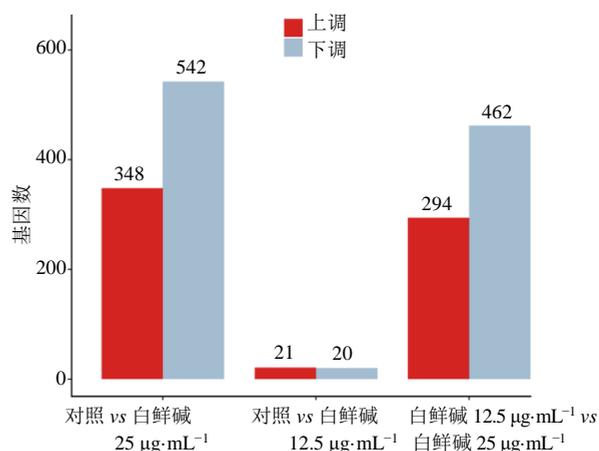


图 2 白鲜碱对红色毛癣菌作用后差异基因

Fig. 2 Gene difference of *Trichophyton rubrum* after treatment of dictamnine

3.2.2 GO 富集分析 GO 富集差异气泡图显示,与对照组比较,白鲜碱 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组菌株参与生殖、代谢、对刺激物反应、多细胞生物过程等的差异基因集合有 59 个,差异显著($P < 0.05$);细胞组成成分包括细胞膜固有结构、细胞器膜、线粒体固有成分和甘露糖基转移酶复合物等差异基因集合 11 个,差

异显著 ($P < 0.05$); 分子功能包括运输活动、抗氧化活性、信号传感器活动、核酸结合转录因子活性、转录因子活性和蛋白质结合等差异基因集合 27 个, 差异显著 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 白鲜碱 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组分子功能主要有 18 个差异基因合集, 包括氧化还原酶活性、单加氧酶活性、水解酶活性等, 差异显著 ($P < 0.05$); 细胞组成成分包括细胞膜固有结构和异染色质等差异基因集合 3 个, 差异显著 ($P < 0.05$); 生物学过程差异基因只有 RNA 沉默基因这 1 个合集, 差异显著 ($P < 0.05$)。白鲜碱 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与白鲜碱 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组比较结果和白鲜碱 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与对照组比较结果一致。结果见图 3~5。

3.2.3 白鲜碱药液作用后红色毛癣菌的 KEGG 富集分析 KEGG 富集条形图显示, 横坐标为该 pathway 基因数目占有差异基因数目的百分比, 颜色越深 Q 值越小, 柱子上的数值为该 pathway 数量及 Q 值。与对照组比较, 白鲜碱 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组差异表达基因涉及 92 条通路, 显著富集的通路有 18 条 ($P < 0.05$), 包括代谢途径、MAPK 信号通路、ABC 转运蛋白合成、色氨酸代谢等, 其中代谢途径占有所有带有路径注释的基因的 43.9% (图 6)。与对照组比较, 白鲜碱 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组差异表达基因涉及 5 条通路, 显著富集的通路有 4 条 ($P < 0.05$), 包括色氨酸代谢、戊糖和葡萄糖醛酸酯的相互转化、脂肪酸降解等, 其中色氨酸代谢占有所有带有路径注释基因

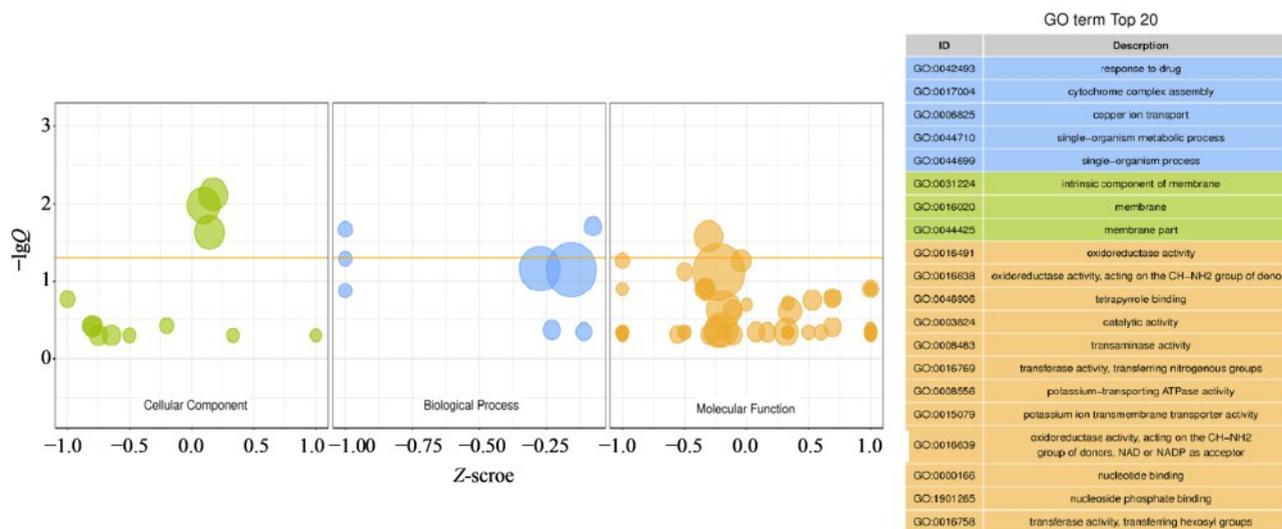


图3 白鲜碱 25.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组与对照组 GO 富集差异气泡图
Fig. 3 Bubble chart of GO enrichment difference between dictamnine 25.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group and control group

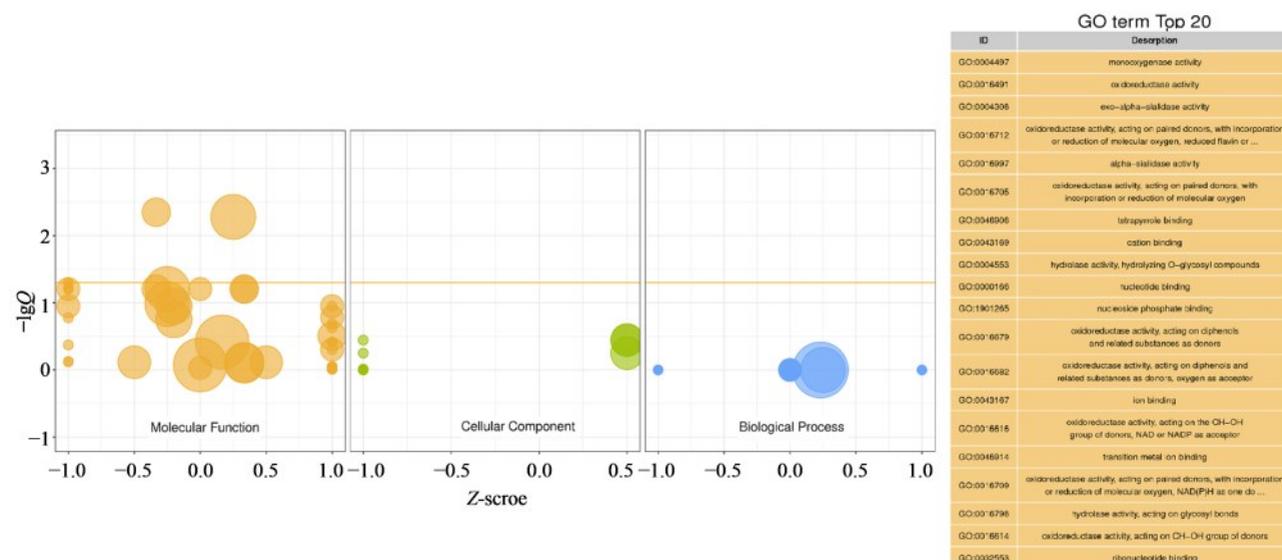


图4 白鲜碱 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组与对照组 GO 富集差异气泡图
Fig. 4 Bubble chart of GO enrichment difference between dictamnine 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and control group

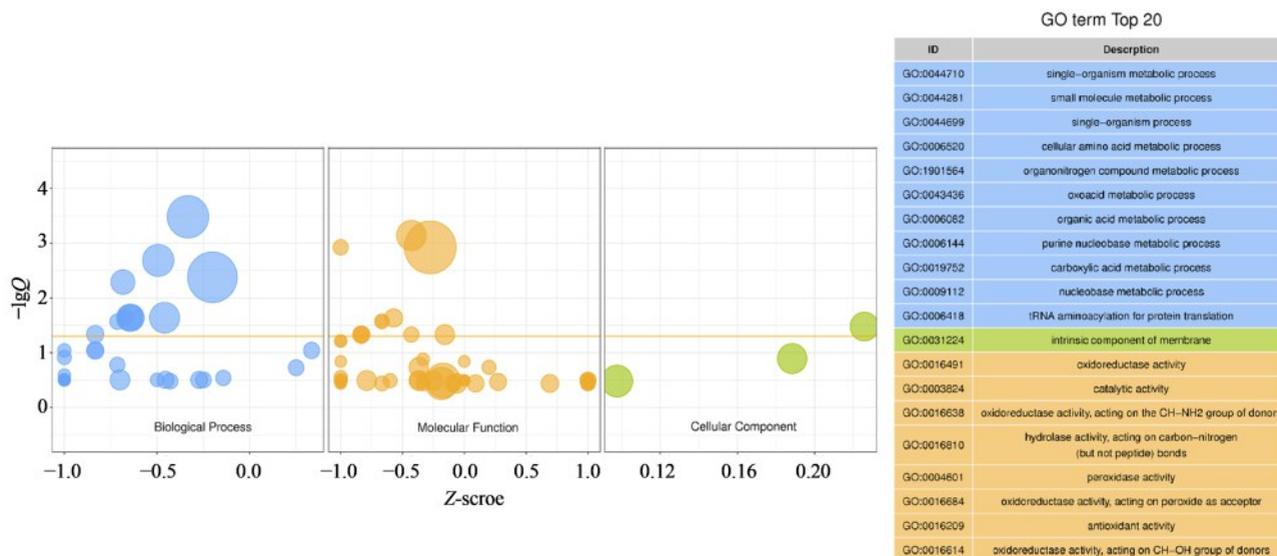


图5 白鲜碱 25.0 µg·mL⁻¹ 与 12.5 µg·mL⁻¹组 GO 富集差异气泡图
Fig. 5 Bubble chart of GO enrichment difference between dictamnine 25.0 µg·mL⁻¹ and 12.5 µg·mL⁻¹ group

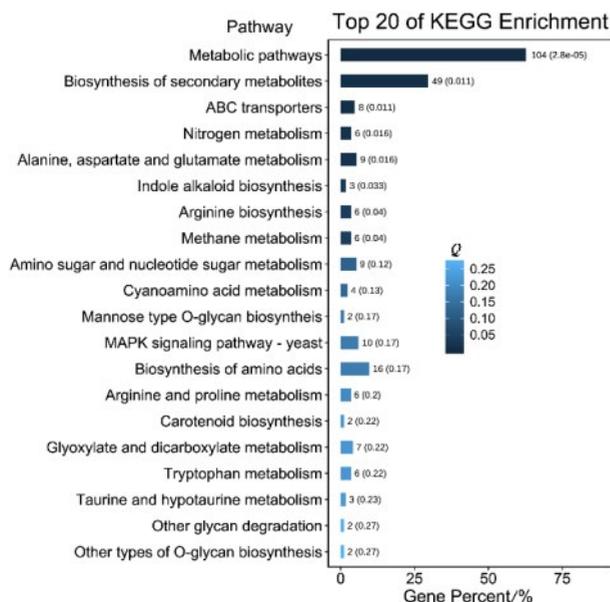


图6 白鲜碱 25.0 µg·mL⁻¹组与对照组 KEGG 富集条形图
Fig. 6 Bar chart of KEGG enrichment in dictamnine 25.0 µg·mL⁻¹ group and control group

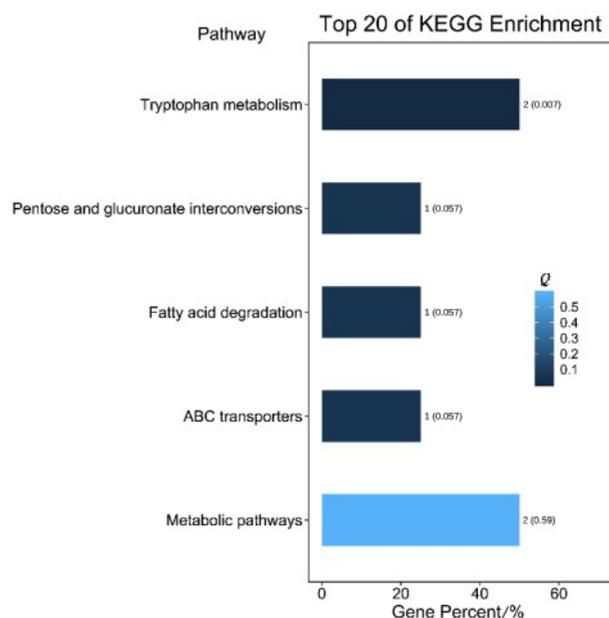


图7 白鲜碱 12.5 µg·mL⁻¹组与对照组 KEGG 富集条形图
Fig. 7 Bar chart of KEGG enrichment in dictamnine 12.5 µg·mL⁻¹ and control group

的 1.57% (图 7)。与白鲜碱 12.5 µg/mL 组比较,白鲜碱 25.0 µg/mL 组差异表达基因涉及 90 条通路,显著富集的通路有 22 条 ($P < 0.05$),包括氨酰-tRNA 的生物合成、谷胱甘肽代谢、氮代谢等(图 8)。

4 讨论

近些年,抗菌药物不断发展,常见的抗真菌药物可以分为抑制真菌细胞膜的合成、影响真菌细胞壁的成分、抑制真菌细胞核的作用、影响真菌的能量代谢^[14-17]。虽然医疗人员在皮肤浅部真菌病的预防和治疗方面取得了很大进展,但真菌病易复发,使真菌对已有的抗真菌药出现耐药性,导致治疗效

果越来越差,所以寻找治疗真菌效果好、副作用小的药物迫在眉睫^[18]。

有研究报道,白鲜碱对酵母菌属有抑制其生物膜和细胞周期的作用^[19]。施琳俊等^[20]发现白鲜碱能抑制白色念珠菌生物膜的活性。本研究发现,白鲜碱能够影响红色毛癣菌细胞结构的完整性,通过 *PMCl*、*Elo2*、*HMA5* 等基因,使红色毛癣菌的细胞膜固有成分、细胞器膜、线粒体、线粒体膜、甘露糖基转移酶复合物等的合成受损,从而抑制其生长。

真菌的生命活动、致病性和毒力离不开能量供

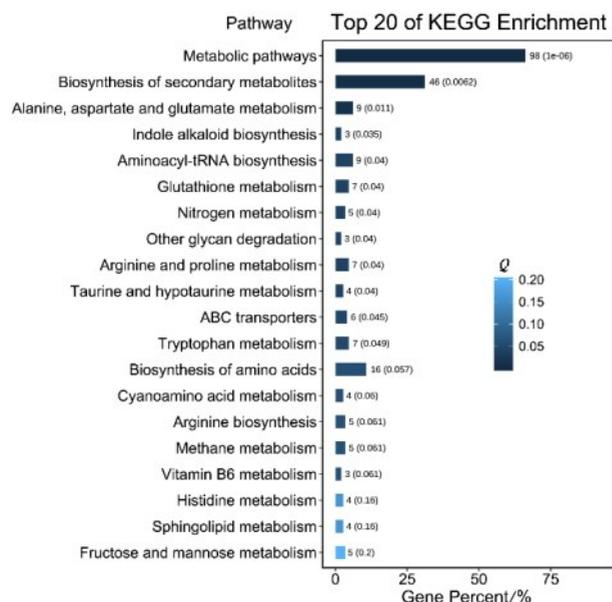


图8 白鲜碱25.0 µg·mL⁻¹与12.5 µg·mL⁻¹组KEGG富集条形图
Fig. 8 Bar chart of KEGG enrichment in dictamnine 25.0 µg·mL⁻¹ and 12.5 µg·mL⁻¹ group

应^[21]。线粒体是真菌的主要产能的细胞器,线粒体受损会使真菌的生长受到抑制^[22]。本研究显示,白鲜碱作用后红色毛癣菌的氧化过程和蛋白转运过程都受到影响,包括影响氧化还原酶活性、裂解酶活性、脂肪酶活性、MAPK 信号通路、ABC 转运蛋白合成、色氨酸代谢、同源重组、硫代谢、非同源末端连接和谷胱甘肽代谢等导致菌体呼吸代谢受到抑制,起到抑制生长的作用。白鲜碱破坏红色毛癣菌的线粒体结构完整性,使一些具有催化活性、转运活性和抗氧化活性的酶受到影响,白鲜碱还可以调节 Nox1 基因,使红色毛癣菌产生氧化应激,氧化应激导致核酸结合转录因子活性、蛋白质结合受到影响,从而导致红色毛癣菌的 DNA、蛋白质的合成受到影响,使红色毛癣菌的生长受到抑制。苹果酸脱氢酶是生物糖代谢的重要酶之一,可催化苹果酸和草酰乙酸之间的转化,有研究表明苦丁茶等多种中药提取物与苹果酸脱氢酶结合后,苹果酸脱氢酶在菌体内含量降低,导致菌内的呼吸代谢作用受到抑制,起到抑菌的作用^[23]。有研究称真菌产生抗药性与药泵蛋白有密切联系,其中药泵蛋白 MFS 和 ABC 家族成员广泛参与真菌抗药^[24-26]。本研究发现,白鲜碱对红色毛癣菌的药泵蛋白 MFS 基因有影响,其中上调 MFS 多药转运体、MFS 糖转运蛋白和下调结构基因蛋白等基因,上调 ABC 家族成员 ABC 药物转运体(ABCB1)、多耐药基因 MDR1、3、5 等基因,使红色毛癣菌抗药性降低。此外经过白鲜碱作用后,调高了控制硫氧还蛋白还原酶的基因 ARB_

06224,也使红色毛癣菌的抗药性降低。有研究显示外排泵基因 Hp0605、Hp0606、Hp1328 表达量的上调与耐药基因突变共同导致了幽门螺杆菌的多重耐药^[27]。还有研究表明经香莲外洗液、丁香酚、小檗碱以及丁香酚、小檗碱的混合液诱导培养,可以显著降低白念珠菌临床耐药菌株的 CDR1、CDR2、MDR1 3 种外排泵相关耐药基因的表达水平,并明显抑制其编码的外排泵蛋白的外排功能^[27]。

本研究考察了白鲜碱对红色毛癣菌的抗真菌活性,还观察到白鲜碱对红色毛癣菌 MIC 值、及其对细胞生物合成相关基因表达的影响,结果表明,白鲜碱对红色毛癣菌具有抗真菌作用,而且随着浓度的提高这种抑菌性更好。白鲜碱对红色毛癣菌的抑制作用机制是:通过影响细胞结构、生物过程、分子功能抑制红色毛癣菌和须癣毛癣菌的生长,降低耐药性,破坏细胞结构完整,影响菌体正常代谢功能,蛋白转运功能等。

本研究基于高通量测序分析,初步揭示了白鲜碱抗真菌作用的分子机制,揭示了白鲜碱作为新型抗真菌药物的开发潜力,实验室接下来还要针对其他中药的抗菌性从代谢组学和蛋白质组学开展研究,希望可以为下一步开发新型抗菌中药提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- 马元龙, 张洲, 吕新翔, 等. 内蒙古医科大学附属医院 47 年浅部真菌病及病原菌分析 [J]. 实用皮肤病学杂志, 2019, 12(3): 151-154.
Ma Y L, Zhang Z, Lv X X, et al. Analysis of superficial mycosis and pathogenic fungi in affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University in the past 47 years [J]. J Pract Dermatol, 2019, 12(3): 151-154.
- 郑文爱, 乔凤, 唐小正, 等. 351 株甲真菌病病原菌临床分布及体外药敏试验 [J]. 中国感染控制杂志, 2020, 19(9): 829-834.
Zheng W A, Qiao F, Tang X Z, et al. Clinical distribution and *in vitro* drug susceptibility testing of 351 strains of onychomycosis pathogens [J]. Chin J Infect Control, 2020, 19(9): 829-834.
- 曲芯瑶, 李珊山, 曲悦, 等. 10 种中药单体对球形孢子丝菌的体外抗真菌作用研究 [J]. 中国真菌学杂志, 2020, 15(3): 145-149.
Qu X Y, Li S S, Qu Y, et al. *In vitro* antifungal susceptibility of 10 Chinese herbal monomers against *Sporothrix globosa* [J]. Chin J Mycol, 2020, 15(3): 145-149.

- [4] 梁晓英, 郭娜, 王丽莎, 等. 白鲜碱体外抗白色念珠菌活性研究 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(16): 21-24.
Liang X Y, Guo N, Wang L S, et al. Study on *in vitro* antifungal activity of dictamnine against *Candida albicans* [J]. Chin Agric Sci Bull, 2009, 25(16): 21-24.
- [5] Yang G H, Chen D F. Alkaloids from the roots of *Zanthoxylum nitidum* and their antiviral and antifungal effects [J]. Chem Biodivers, 2008, 5(9): 1718-1722.
- [6] Pfyffer G E, Towers G H. Photochemical interaction of dictamnine, a furoquinoline alkaloid, with fungal DNA [J]. Can J Microbiol, 1982, 28(5): 468-473.
- [7] 刘登宇, 吴建美, 曲琳. 中药合剂对皮肤浅部真菌病致病菌作用的现状 [J]. 医学动物防制, 2020, 36(12): 1161-1163.
Liu D Y, Wu J M, Qu L. Present situation of the effects of traditional Chinese medicine mixture on the pathogenic bacteria of superficial dermatomycosis [J]. J Med Pest Control, 2020, 36(12): 1161-1163.
- [8] 段妍, 李睿亚, 王剑, 等. 基于高通量测序探究中药合剂对皮肤浅部真菌病作用机制的研究现状 [J]. 内蒙古医学杂志, 2019, 51(8): 938-940.
Duan Y, Li R Y, Wang J, et al. Research status of mechanism of action of TCM mixture on superficial cutaneous mycosis based on high-throughput sequencing [J]. Inn Mong Med J, 2019, 51(8): 938-940.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically* [M]. Ninth Edition. CLSI document MO7-A9. Pennsylvania: Wayne, PA, 2012: 13-16.
- [10] 李治建, 古力娜·达吾提, 肖威, 等. 地锦草提取物抗真菌作用及对皮肤真菌超微结构的影响 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 758-763.
Li Z J, Gulnar D W T, Xiao W, et al. Antifungi of *Euphorbia humifusa* extract and its effect on ultrastructure of dermatophytes [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2009, 40(5): 758-763.
- [11] 荣在丽, 魏春波, 王刚生, 等. 山苍子油对皮肤癣菌的药物敏感性及临床试验 [J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2006, 22(3): 247-248.
Rong Z L, Wei C B, Wang G S, et al. Clinical study on drug sensitivity of *Litsea cubeba* oil to dermatophytes [J]. China J Lepr Skin Dis, 2006, 22(3): 247-248.
- [12] 李治建, 赵明月, 古力娜·达吾提, 等. 地锦草有效部位对红色毛癣菌细胞膜合成及 MEP、SUB 基因表达的影响 [J]. 药学学报, 2014, 49(2): 273-276.
LI Z j, ZHAO M y, Gulnar D W T, et al. Action of *Euphorbia humifusa* effective fraction on membrane biosynthesis and the gene expression of proteases MEP and SUB of *Trichophyton rubrum* [J]. Acta Pharm Sin, 2014, 49(2): 273-276.
- [13] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J]. Genome Biol, 2014, 15(12): 550.
- [14] 林楚怡, 张春荣, 沈志滨. 基于转录组分析香鳞毛蕨乙醇提取物抑制红色毛癣菌的机制研究 [J]. 广东药科大学学报, 2019, 35(2): 246-251.
Lin C Y, Zhang C R, Shen Z B. Inhibition mechanism of alcohol extracts from *Dryopteris fragrans* (L.) Schott on *Trichophyton rubrum* based on transcriptome analysis [J]. J Guangdong Pharm Univ, 2019, 35(2): 246-251.
- [15] 吕婧, 王万能, 张潇骏, 等. 抗红色毛癣菌药物靶标研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2014, 23(24): 2886-2891.
Lü J, Wang W N, Zhang X J, et al. Progress in research of targets for anti-*Trichophyton rubrum* drugs [J]. Chin J New Drugs, 2014, 23(24): 2886-2891.
- [16] Joseph S, Karnik S, Nilawe P, et al. ClassAMP: a prediction tool for classification of antimicrobial peptides [J]. IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform, 2012, 9(5): 1535-1538.
- [17] Rathinasamy K, Jindal B, Asthana J, et al. Griseofulvin stabilizes microtubule dynamics, activates p53 and inhibits the proliferation of MCF-7 cells synergistically with vinblastine [J]. BMC Cancer, 2010, 10: 213.
- [18] 吴绍熙. 现代医学真菌检验手册 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2005: 17-106.
Wu S X. *Handbook of Modern Medical Fungal Examination* [M]. Beijing: China Union Medical College Press, 2005: 17-106.
- [19] Liu H, Wang Y C. The function and regulation of budding yeast Swe1 in response to interrupted DNA synthesis [J]. Mol Biol Cell, 2006, 17(6): 2746-2756.
- [20] 施琳俊, 薛婷君, 吴岚, 等. 白鲜碱对白色念珠菌体外抑制作用初探 [J]. 临床口腔医学杂志, 2011, 27(11): 654-657.
Shi L J, Xue T J, Wu L, et al. *In vitro* antifungal activity of dictamnine against *Candida albicans* [J]. J Clin Stomatol, 2011, 27(11): 654-657.
- [21] 王胜强. 基于转录组与真菌病毒侵染解析皮落青霉味鲜胺抗机制 [D]. 武汉: 华中师范大学, 2020.
Wang S Q. Based on transcriptome and mycovirus infection to analyze *Penicillium crustosum* prochloraz-resistance mechanisms [D]. Wuhan: Central China Normal University, 2020.
- [22] Prasad R, Shah A H, Rawal M K. Antifungals: mechanism of action and drug resistance [J]. Adv Exp

- Med Biol, 2016, 892: 327-349.
- [23] 杨睿, 王倩, 王海涛, 等. 苦丁茶等10味中草药抑菌作用研究 [J]. 安徽农学通报, 2009, 15(6): 34-36, 41.
Yang R, Wang Q, Wang H T, et al. Study on bacteriostasis of 10 kinds of Chinese herbal medicines such as broadleaf holly leaf [J]. Anhui Agric Sci Bull, 2009, 15 (6): 34-36, 41.
- [24] Hellin P, King R, Urban M, et al. The adaptation of *Fusarium culmorum* to DMI fungicides is mediated by major transcriptome modifications in response to azole fungicide, including the overexpression of a PDR transporter (FcABC₁) [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 1385.
- [25] Monk B C, Keniya M V, Sabherwal M, et al. Azole resistance reduces susceptibility to the tetrazole antifungal VT-1161 [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63(1): 02114-02118.
- [26] 王春梅, 何启盖, 操继跃. 细菌多重耐药泵的研究进展 [J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(4): 455-467.
Wang C M, He Q G, Cao J Y. Multidrug efflux systems involved in resistance to antibacterial drugs [J]. Chin J Animal Vet Sci, 2011, 42(4): 455-467.
- [27] 周帆. 黄连素在幽门螺杆菌多重耐药与外排泵基因调控中的作用研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2019.
Zhou F. The role of berberine playing in *Helicobacter pylori* of multi-drug resistance and adjustments of efflux pump genes [D]. Shanghai: Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 2019.

[责任编辑 兰新新]