

姜黄素对5种非白念珠菌菌丝及生物膜形成的抑制作用

张梦翔^{1,2}, 施高翔^{1,2}, 严园园^{1,2}, 陆克乔^{1,2}, 邵菁^{1,2}, 汪天明^{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** 观察姜黄素对5种非白念珠菌菌丝及生物膜形成的抑制作用。**方法** 测定姜黄素对热带念珠菌 *Candida tropicalis*、光滑念珠菌 *C. glabrata*、近平滑念珠菌 *C. parapsilokis*、克柔念珠菌 *C. Krusei*、季也蒙念珠菌 *C. guilliermondii* 的最小抑菌浓度 (MIC) 以及抑制 50% 生物膜浓度 (SMIC₅₀), 利用光学显微镜观察姜黄素对非白念珠菌菌落形态的影响, 利用倒置显微镜与扫描电镜分别观察姜黄素对非白念珠菌菌丝形成以及生物膜形成的影响。**结果** 姜黄素对热带念珠菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌、克柔念珠菌、季也蒙念珠菌的 MIC 分别为 64、128、256、256、128 μg/mL; SMIC₅₀ 分别为 512、512、>512、>512、512 μg/mL; 倒置显微镜与扫描电镜观察发现姜黄素对5种非白念珠菌菌丝以及生物膜的形成均有抑制作用。光学显微镜观察发现姜黄素能抑制这5种非白念珠菌在固体培养基上菌落周边菌丝的形成。**结论** 姜黄素对5种非白念珠菌菌丝及生物膜的形成具有抑制作用。

关键词: 姜黄素; 非白念珠菌; 菌丝; 生物膜; 热带念珠菌; 光滑念珠菌; 近平滑念珠菌; 克柔念珠菌; 季也蒙念珠菌

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)04-0549-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.04.016

Inhibitory effects of curcumin on hyphal development and biofilm formation of five kinds of non-*Candida albicans*

ZHANG Meng-xiang^{1,2}, SHI Gao-xiang^{1,2}, YAN Yuan-yuan^{1,2}, LU Ke-qiao^{1,2}, SHAO Jing^{1,2}, WANG Tian-ming^{1,2}, WANG Chang-zhong^{1,2}

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

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

Abstract: Objective To observe the inhibitory effects of curcumin on hyphal development and biofilm formation of five kinds of non-*Candida albicans*. **Methods** Serial 2-fold dilution assay was used to determine the MICs of curcumin to *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilokis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*; XTT assay was used to determine the SMIC₅₀ of curcumin to the five non-*C. albicans*. Inverted microscope and scanning electron microscope (SEM) were applied to inspecting the morphological change of non-*C. albicans* treated by curcumin, The dilution method was applied to inspecting the hyphae around the colonies. **Results** The MICs of curcumin to *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilokis*, *C. Krusei*, *C. guilliermondii* were 64, 128, 256, 256, and 128 μg/mL, and the SMIC₅₀ were 512, 512, >512, >512, and 512 μg/mL, respectively. We found that curcumin could inhibit the hyphal and biofilm formation of the five kinds of non-*C. albicans* by observation with inverted microscope and SEM, and curcumin could inhibit the hyphal development around the colonies by observation with optical microscope. **Conclusion** Curcumin could inhibit the hyphal development and biofilm formation of the five kinds of non-*C. albicans*.

Key words: curcumin; non-*Candida albicans*; hyphae; biofilms; *Candida tropicalis*; *Candida glabrata*; *Candida parapsilokis*; *Candida krusei*; *Candida guilliermondii*

近年来,随着人口老龄化的日趋严峻,广谱抗生素、糖皮质激素以及免疫抑制剂的广泛使用,HIV感染者不断增加,加之器官移植等新技术的发展,深部真菌感染的发病率逐渐升高。其中念珠菌属是引起深部真菌感染的主要致病菌^[1-2],临床分离的常见念珠菌主要包括白色念珠菌和非白念珠

收稿日期: 2014-10-06

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: 张梦翔(1991—),男,硕士研究生,从事抗真菌研究。E-mail: tojosaki@126.com

*通信作者 汪长中(1963—),教授,从事抗真菌研究。E-mail: ahwc63@sina.com

菌, 如热带念珠菌 *Candida tropicalis*、光滑念珠菌 *C. glabrata*、近平滑念珠菌 *C. parapsilosis*、克柔念珠菌 *C. Krusei*、季也蒙念珠菌 *C. guilliermondii* 等。虽然在念珠菌属中白色念珠菌仍是引起念珠菌感染的主要致病菌种, 但是近年来, 随着真菌感染的病原谱发生改变, 该菌种的临床检出率较以往有所下降, 而该菌属中的非白念珠菌所占的比例逐年上升^[3]。

念珠菌为酵母-菌丝双相菌, 通常酵母相时无致病力, 但当机体免疫力下降时, 念珠菌会转化为菌丝相, 对机体造成损伤^[4]。同时, 菌丝也是念珠菌生物膜的重要组成部分, 在完整的生物膜中, 大量菌丝纵横交织并伴有一定的酵母相, 此时, 对常规抗真菌药如氟康唑等的敏感性大大下降。目前抗真菌药物种类较少, 毒副作用较大, 且耐药菌株不断增多, 因此, 亟需研发新型的抗真菌药物, 而从天然产物中发掘抗真菌药物已成为获取抗真菌药物的一个重要渠道^[5]。

姜黄是一种常用中药, 其主要有效成分姜黄素 (*curcumin*) 具有多方面的药理作用, 如抗炎、抗氧化、抗凝、调血脂、抗动脉粥样硬化及抗肿瘤等^[6]。近期研究发现姜黄素对白色念珠菌有抑制作用^[7], 但姜黄素对非白念珠菌是否也存在抑制作用尚未见报道, 故本实验观察姜黄素对热带念珠菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌、克柔念珠菌、季也蒙念珠菌 5 种非白念珠菌菌丝发育及生物膜形成的影响, 旨在为姜黄素将来可能用于此类感染的治疗提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与培养基

姜黄素购于中国食品药品检定研究院 (批号 110823-201004, 质量分数 98%); 二甲基亚砜 (DMSO) 购于天津市光复精细化工研究所, 分析纯; RPMI 1640 培养基 (Gibco 公司)。胎牛血清购于浙江天杭生物科技有限公司, 维生素 K₃ 购于 Sigma 公司, YPD 琼脂购于北京路桥技术有限公司 (批号 130107), pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, KH₂PO₄ 0.24 g, Na₂HPO₄·12H₂O 3.628 g, 溶于 800 mL 蒸馏水中, 用盐酸调 pH 值为 7.4, 蒸馏水定容至 1 000 mL, 高压灭菌后 -4 °C 保存), 戊二醛 (25%) 购于国药集团化学试剂有限公司, 氟康唑对照品购于中国食品药品检定研究院 (批号 100314-201204)。

1.2 仪器

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), CX21 型光学显微镜, CKX41-32 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司), Sirion200 扫描电镜 (美国 FEI 公司), 96 孔微量培养板、24 孔微量培养板 (美国 Coming 公司)。

1.3 菌株

热带念珠菌标准株 (ATCC 750)、光滑念珠菌标准株 (ATCC 2340)、近平滑念珠菌标准株 (ATCC 22019)、克柔念珠菌标准株 (ATCC 1182)、季也蒙念珠菌标准株 (ATCC 6260) 均购自南京便诊生物科技有限公司。

1.4 菌悬液的配制

从 4 °C 保存的沙氏固体培养基上挑取非白念珠菌单菌落, 接种至 RPMI 1640 培养液中, 37 °C、200 r/min 培养 16 h, 用血细胞计数板计数, 再用 RPMI 1640 培养液稀释至 2×10^6 CFU/mL, 备用。

1.5 对非白念珠菌最小抑菌浓度 (MIC) 的测定

将 100 μ L 菌液 (2×10^3 CFU/mL) 接种于 96 孔板中, 分别加入 100 μ L (终质量浓度为 512、256、128、64、32、16、8、4 μ g/mL) 姜黄素, 并设未加药的对照组和阳性药氟康唑 (终质量浓度为 8、4、2、1、0.5、0.25 μ g/mL) 组, 以下实验均设对照与阳性对照组, 37 °C 培养 48 h。观察结果, 以肉眼观察无菌生长的最小药液稀释浓度为 MIC, 实验重复 3 次。

1.6 对非白念珠菌抑制生物膜 50% 浓度 (SMIC₅₀) 的测定

将菌液浓度调至 2×10^6 CFU/mL, 姜黄素质量浓度同 “1.5” 项, 37 °C 培养 24 h 后, 每孔加入甲基四氮盐 (XTT) 60 μ L (临用前加入终质量浓度 1 μ g/mL 的维生素 K₃), 继续 37 °C 避光培养 2 h 后 492 nm 波长处测定吸光度 (A) 值。以对照组 A 值的 50% 为 SMIC₅₀, 实验重复 3 次。

1.7 倒置显微镜下观察姜黄素对非白念株菌菌丝形成的影响

将 100 μ L 菌液 (2×10^6 CFU/mL) 接种于 96 孔板中, 分别加入 100 μ L (终质量浓度为 512、256、128 μ g/mL) 姜黄素, 37 °C 分别培养 2、4 h。倒置显微镜下观察并拍摄各菌株形态的变化。

1.8 YPD 固体培养基上观察姜黄素对非白念珠菌菌落形态的影响

配制 YPD 固体培养基 (加入 10% 胎牛血清), 分别加入终质量浓度为 512、256、128 μ g/mL 的姜黄素。用倍比稀释法将非白念珠菌菌悬液稀释至 20 CFU/mL, 用微量移液器吸取 100 μ L, 均匀涂布于 YPD 固体培养基上。在 37 °C 培养箱中培养 4 d 后

取出,用光学显微镜观察并用相机拍摄其菌落形态。

1.9 扫描电镜观察姜黄素对非白念珠菌生物膜的影响

将1 mL菌液(2×10^6 CFU/mL)接种24孔板中,分别加入1 mL(终质量浓度为512、256、128 $\mu\text{g/mL}$)的姜黄素。菌药混合后加入经过灭菌处理的医用导管片,放入37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养24 h后,将待检测的导管片标本取出,以PBS缓冲液轻洗2次,于预冷2.5%戊二醛溶液中避光固定3 h,用PBS缓冲液轻洗2次,乙醇梯度脱水(30%, 10 min; 70%, 10 min; 100%,

10 min),过夜干燥后镀金,使用扫描电镜观察并拍照。

2 结果

2.1 姜黄素对非白念珠菌的MIC与SMIC₅₀

姜黄素对5种非白念珠菌的MIC与SMIC₅₀见表1。

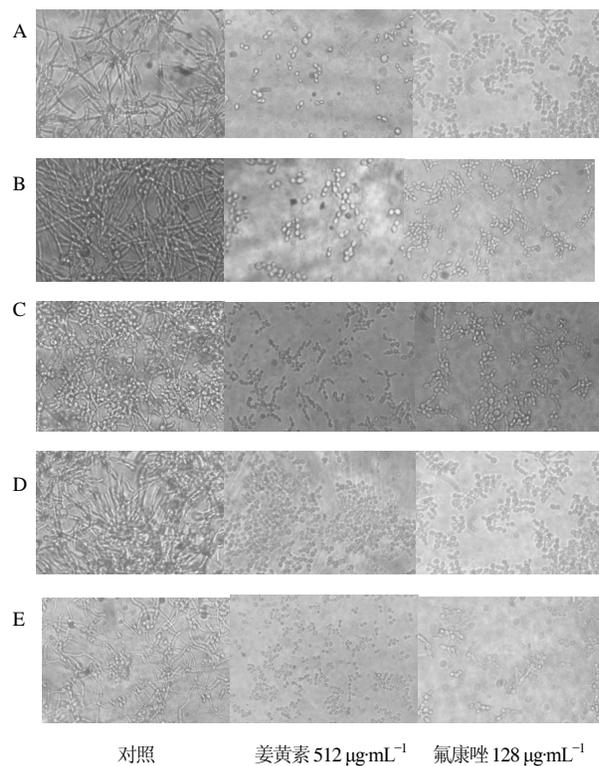
2.2 姜黄素对非白念珠菌菌丝形成影响

倒置显微镜下发现,培养4 h后,对照组5种非白念珠菌均出现菌丝,呈交织状态,而姜黄素组(512 $\mu\text{g/mL}$)与氟康唑组的5种非白念珠菌仅为酵母相,偶见出芽(图1)。

表1 姜黄素对5种非白念珠菌的MIC与SMIC₅₀

Table 1 MIC and SMIC₅₀ of curcumin to five kinds of non-*C. albicans*

药物	MIC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)				
	热带念珠菌	光滑念珠菌	近平滑念珠菌	克柔念珠菌	季也蒙念珠菌
姜黄素	64	128	256	256	128
氟康唑	0.5	0.5	2	2	1
药物	SMIC ₅₀ /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)				
	热带念珠菌	光滑念珠菌	近平滑念珠菌	克柔念珠菌	季也蒙念珠菌
姜黄素	512	512	>512	>512	512
氟康唑	128	64	256	256	128



对照 姜黄素 512 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氟康唑 128 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
 A-热带念珠菌 B-光滑念珠菌 C-近平滑念珠菌 D-克柔念珠菌 E-季也蒙念珠菌,下同
 A-*C. tropicalis* B-*C. glabrata* C-*C. parapsilosis* D-*C. krusei*
 E-*C. guilliermondii*, same as below

图1 姜黄素对5种非白念珠菌菌丝形成的影响(倒置显微镜)
 Fig. 1 Effect of curcumin on hyphal formation of five kinds of non-*C. albicans* (inverted microscope)

2.3 姜黄素对非白念珠菌菌落边缘菌丝的影响

在加入10%胎牛血清的YPD培养基上经过37 $^{\circ}\text{C}$ 、4 d的培养后,对照组5种非白念珠菌菌落周围出现大量密集的菌丝,不仅在培养基表面延伸,还渗入培养基内部。而姜黄素组与氟康唑组的5种非白念珠菌菌落表面光滑,无菌丝延伸,见图2。

2.4 姜黄素对非白念珠菌生物膜形态的影响

经扫描电镜观察发现,培养24 h后,对照组5种非白念珠菌均形成生物膜,其内部有大量菌丝,菌丝相与酵母相纵横交织。而姜黄素组与氟康唑组的5种非白念珠菌多数为酵母相,呈单层或简单多层,很少见菌丝相,见图3。

3 讨论

白色念珠菌虽是导致念珠菌病的主要菌种,但据统计,1998—2007年,我国部分地区白色念珠菌在念珠菌病中的分离率已由65.2%降至57.8%,而各种非白念珠菌所占的比例有所上升,其中热带念珠菌12.8%,近平滑念珠菌10.8%,光滑念珠菌10.8%,其他非白念珠菌16.8%,且呈持续上升的趋势^[8]。由此可见,念珠菌病的病原谱已经发生较大的改变,加之念珠菌对常用的抗真菌药物如氟康唑、伊曲康唑等的耐药性也不断上升,因此寻找新的毒副作用低的治疗念珠菌病药物是一个重要趋势。

念珠菌的耐药性与其形成生物膜密切相关。念珠菌生物膜是由大量念珠菌细胞不可逆地与生物或

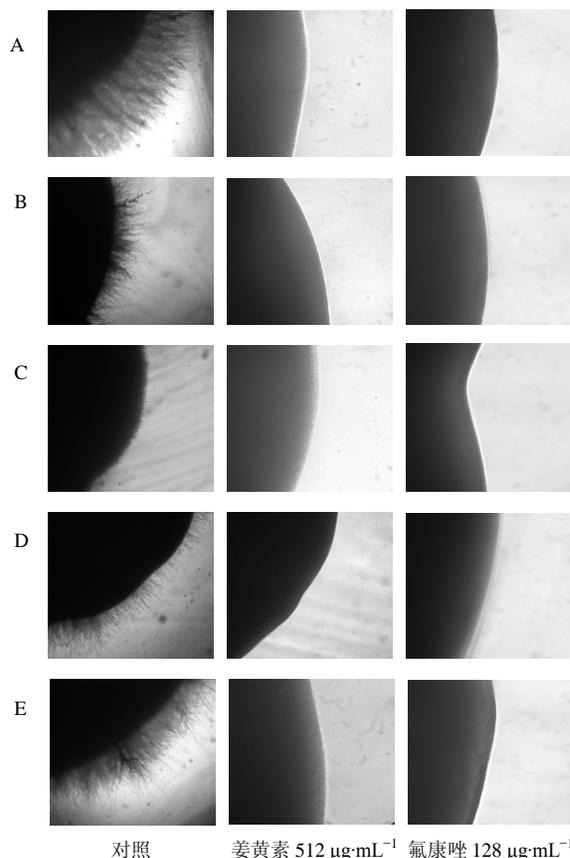


图 2 姜黄素对 5 种非白念珠菌菌落中菌丝的影响 (光学显微镜)

Fig. 2 Effect of curcumin on hyphae on solid medium of five kinds of non-*C. albicans* (optical microscope)

非生物组织表面接触后由自身产生的细胞外基质包裹着活菌细胞形成的微生态, 以生物膜状态存在的念珠菌对抗菌药物的敏感性要下降几十倍甚至上千倍。念珠菌生物膜的发育过程大致经过黏附、微菌落形成、菌丝发育、生物膜成熟、生物膜细胞分散并再定植等阶段^[9], 其中菌丝是念珠菌生物膜结构的重要组成部分, 且念珠菌一般在由酵母相转化为菌丝相时才具有致病性。菌丝相细胞不仅可避免宿主吞噬细胞的作用, 其分泌的细胞壁黏附素也有助于侵袭组织细胞, 进而引起感染^[10]。

本实验结果显示, 姜黄素对这 5 种非白念珠菌中的热带念珠菌、光滑念珠菌、季也蒙念珠菌的 MIC 分别是 64、128、128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 对另外 2 种念珠菌的 MIC 均为 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 姜黄素对热带念珠菌、光滑念珠菌、季也蒙念珠菌的 SMIC₅₀ 均为 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 对另外两种念珠菌的 SMIC₅₀ 均大于 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 表明姜黄素对浮游状态及生物膜状态的热带念珠菌、光滑念珠菌、季也蒙念珠菌的抑制效果

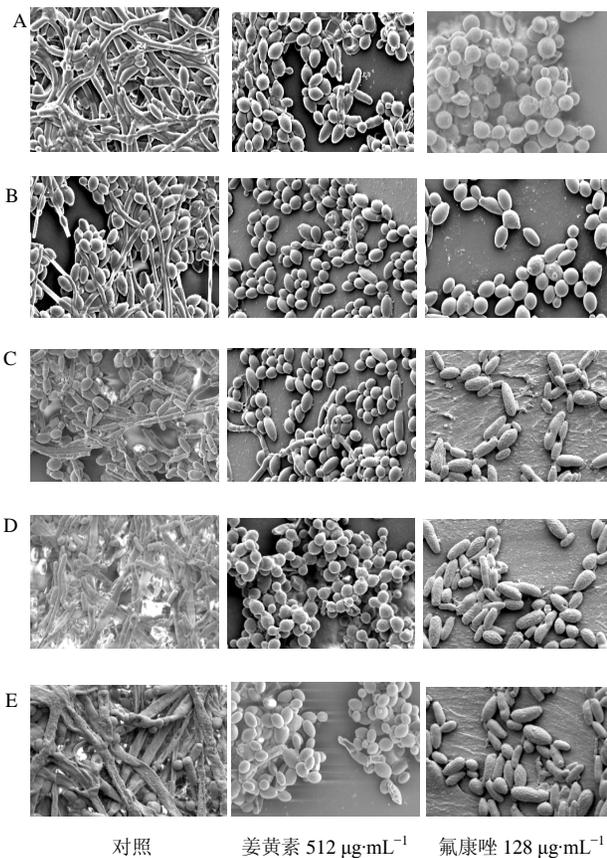


图 3 姜黄素对 5 种非白念珠菌生物膜形态的影响 (电镜)

Fig. 3 Effect of curcumin on biofilm formation of five kinds of non-*C. albicans* (SEM)

要强于另外 2 种念珠菌, 提示姜黄素对这 5 种非白念珠菌尤其是热带念珠菌、光滑念珠菌、季也蒙念珠菌的生长具有较强的抑制作用。

在形态学上, 倒置显微镜观察发现, 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 姜黄素能够对这 5 种非白念珠菌的菌丝形成产生抑制, 势必会影响下一步生物膜的形成。扫描电镜观察也显示, 对照组中 5 种非白念珠菌生物膜完整, 其中菌丝互相交织并伴有酵母相, 在 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 姜黄素作用下, 这 5 种念珠菌只能形成单层或简单复层的只有酵母相细胞构成的生物膜, 已完全失去了作为生物膜骨架的菌丝, 这样的生物膜结构不牢固。在对照组即未加入姜黄素的固体 YPD 培养基上, 这 5 种非白念珠菌的菌落表面粗糙, 有丝化现象, 且周围有大量菌丝延伸, 与培养基结合牢固^[11], 而在加入姜黄素的固体培养基上, 这 5 种非白念珠菌的菌落呈光滑圆形, 周围界限分明, 没有菌丝形成。

结合前述 Garcia-Gomes 等^[7]的发现及本实验的结果, 提示姜黄素具有一定的抑制念珠菌的效果。沃兴德等^[12]报道, 以 500 mg/kg 的姜黄素对大鼠进

行长期毒性实验,结果显示其对大鼠各项生理指标无任何影响,表明姜黄素是一种安全的中药活性成分,因而具有一定的治疗念珠菌病的潜在价值。多项研究已明确,姜黄素具有抗癌作用,其作用机制与通过某些信号传导通路诱导癌细胞凋亡有关^[13-14]。姜黄素对念珠菌菌丝及生物膜的抑制是否也通过一定的信号传导途径发挥作用,值得进一步研究。

参考文献

- [1] Pfaller M A, Diekema D J, Rinaldi M G, et al. Results from the artemis disk global antifungal surveillance study: a 6. 5-year analysis of the worldwide susceptibility of yeasts to fluconazole and voriconazole using standardized disk diffusion testing [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 41(12): 5848-5849.
- [2] Antoniadou A, Torres H A, Lewis R E, et al. Candidemia in a tertiary care cancer center: *in vitro* susceptibility and its association with outcome of initial antifungal therapy [J]. *Medicine*, 2003, 82(5): 309-321.
- [3] Barchiesi F, Falconi D, Francesco L, et al. *In vitro* activities of terbinafine in combination with fluconazole and itraconazole against isolate of *Candida albicans* with reduced susceptibility to azoles [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 41(8): 1812-1814.
- [4] Finkel J S, Mitchell A P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(2): 109-118.
- [5] Kumar A, Dhamgaye S, Maurya I K, et al. Curcumin targets cell wall integrity via calcineurin-mediated signaling in *Candida albicans* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(1): 167-175.
- [6] Hiller E, Heine S, Brunner H, et al. *Candida albicans* *Sun41*, a putatively cosidase, is involved in morphogenesis, cell wall biogenesis, and biofilm formation [J]. *Eukaryot Cell*, 2007, 6(11): 2056-2065.
- [7] Garcia-Gomes A S, Curvelo J A R, Soares R M A, et al. Curcumin acts synergistically with fluconazole to sensitize a clinical isolate of *Candida albicans* showing a MDR phenotype [J]. *Med Mycol*, 2012, 50(1): 26-32.
- [8] Wu J Q, Zhu L P, Ou X T, et al. Epidemiology and risk factors for *non-Candida albicans* candidemia in non-neutropenic patients at a Chinese teaching hospital [J]. *Med Mycol*, 2011, 49(5): 552-555.
- [9] Bonhomme J, d'Enfert C. *Candida albicans* biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2013, 16(4): 398-403.
- [10] Dovigo L N, Carmello J C, de Souza Costa C A, et al. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis [J]. *Med Mycol*, 2013, 51(3): 243-251.
- [11] Tsang P W K, Wong A P K, Yang H P. Purpurin Triggers Caspase-Independent Apoptosis in *Candida dubliniensis* Biofilms [J]. *PloS One*, 2013, 8(12): e86032.
- [12] 沃兴德, 洪行球, 高承贤, 等. 姜黄素长期毒性试验 [J]. 浙江中医学院学报, 2000, 24(1): 61-65.
- [13] 李小江, 贾英杰, 张文治, 等. 姜黄素对 A549 细胞亚群 SP 及 NON-SP 细胞凋亡的诱导作用 [J]. 中草药, 2013, 44(18): 2581-2584.
- [14] Abouzeid A H, Patel N R, Sarisozen C, et al. Transferrin-targeted polymeric micelles co-loaded with curcumin and paclitaxel: efficient killing of paclitaxel-resistant cancer cells [J]. *Pharm Res*, 2014, 31(8): 1-8.