

## • 药理与临床 •

## 云南重楼正丁醇提取物对白念珠菌生物膜形成的抑制作用

陆克乔<sup>1,2</sup>, 张梦翔<sup>1,2</sup>, 施高翔<sup>1,2</sup>, 严园园<sup>1,2</sup>, 邵菁<sup>1,2</sup>, 吴大强<sup>1,2</sup>, 汪天明<sup>1,2</sup>, 汪长中<sup>1,2\*</sup>

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 观察云南重楼正丁醇提取物(BEPP)对体外白念珠菌生物膜形成的影响。方法 微量稀释法测定 BEPP 最低抑菌浓度(MIC), XTT 法测定生物膜抑制 80%浓度(SMIC<sub>80</sub>), 平板法绘制时间-杀菌曲线, 扫描电镜(SEM)观察生物膜形态结构, 激光共聚焦显微镜(CLSM)观测生物膜厚度, 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测生物膜形成相关基因 HWP1、MP65、SUN41 表达量的变化。结果 BEPP 对白念珠菌的 MIC 为 32~128 μg/mL, 对白念珠菌生物膜的 SMIC<sub>80</sub> 为 128~512 μg/mL, 时间-杀菌曲线显示 BEPP 具有良好的杀菌作用, SEM 观察到 BEPP 有效抑制白念珠菌生物膜形成, CLSM 显示 BEPP 可以降低生物膜厚度, qRT-PCR 检测显示在 BEPP 作用下, HWP1、MP65、SUN41 基因表达量均显著下调。结论 BEPP 可以有效抑制体外白念珠菌生物膜的形成。

**关键词:** 云南重楼; 正丁醇提取物; 白念珠菌; 生物膜; HWP1; MP65; SUN41

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)03-0440-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.03.015

## Inhibition of butanol extract from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* against *Candida albicans* biofilm formation

LU Ke-qiao<sup>1,2</sup>, ZHANG Meng-xiang<sup>1,2</sup>, SHI Gao-xiang<sup>1,2</sup>, YAN Yuan-yuan<sup>1,2</sup>, SHAO Jing<sup>1,2</sup>, WU Da-qiang<sup>1,2</sup>, WANG Tian-ming<sup>1,2</sup>, WANG Chang-zhong<sup>1,2</sup>

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 investigate the effects of butanol extract from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (BEPP) on the biofilm formation of *Candida albicans* *in vitro*. **Methods** Microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). XTT assay was used to determine the SMIC<sub>80</sub>. Flat band method was used to protract the time-kill curve. Scanning electron microscopy (SEM) was used to observe the morphological changes of the biofilm. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) was used to detect the thickness of the biofilm. The quantification real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression changes of genes (EAP1, MP65, and SUN41) of the biofilm cells. **Results** The MIC of BEPP against *C. albicans* strains was determined as 32—128 μg/mL. The SMIC<sub>80</sub> of BEPP against the biofilm of *C. albicans* strains was determined as 128—512 μg/mL. Time-sterilization curve results indicated that BEPP had a promise bactericidal effect. SEM results showed that the formation of *C. albicans* biofilm was inhibited by BEPP, and the morphology of biofilm was also affected by BEPP. The thickness of *C. albicans* biofilm was reduced by BEPP according to CLSM results. Furthermore, qRT-PCR results indicated that expressions of EAP1, MP65, and SUN41 were significantly down-regulated by BEPP. **Conclusion** Our results demonstrate that BEPP inhibits the biofilm formation of *C. albicans* *in vitro*.

**Key words:** butanol extract from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*; *Candida albicans*; biofilms; HWP1; MP65; SUN41

白念珠菌 *Candida albicans* 是临床上常见的条件致病性真菌, 定植于人体皮肤黏膜, 在机体免疫力下降或微生态失衡时能引起皮肤、口腔、阴道甚至系统性感染<sup>[1]</sup>。常规抗真菌药物尽管对白念珠菌

收稿日期: 2015-07-18

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(1408085MH165)

作者简介: 陆克乔, 硕士研究生, 从事抗真菌研究。E-mail: 326835755@qq.com

\*通信作者 汪长中, 教授, 从事抗真菌研究。E-mail: ahwc263@sina.com

具有一定的效果,但由于临床上长期使用,白念珠菌出现耐药性的情况日益严重。白念珠菌耐药性原因较多,生物膜(biofilm)形成是主要因素之一。生物膜是微生物(主要是细菌和真菌)在生物或非生物组织材料表面上形成的一种复杂的三维结构,由菌体及其所分泌的基质所组成<sup>[2]</sup>。生物膜形成后,膜内菌的耐药性比浮游菌增强 10~1 000 倍<sup>[3]</sup>。

鉴于现有抗真菌药物对肝肾等主要脏器的毒副作用以及生物膜形成等原因所产生的耐药性,亟需寻找更多的抗真菌药物。研究表明,大量中药(复方、单味药以及有效成分)具有良好的抗真菌活性<sup>[4]</sup>。本课题组近期在对抗真菌中药筛选研究中发现云南重楼(滇重楼) *Paris polyphylla* Smith. var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 具有显著的抗白念珠菌作用。为了更接近有效部位或组分又不失中药多成分、多效应的特点,本研究对云南重楼饮片采用多种溶剂萃取,得到相应的提取物。经比较得出,云南重楼提取物的石油醚、醋酸乙酯萃取物不仅有效成分少,且无明显抗白念珠菌的效果,而云南重楼正丁醇提取物(butanol extract from *Paris polyphylla*, BEPP)具有显著的抗白念珠菌作用。本研究拟探讨 BEPP 对白念珠菌生物膜形成的干预作用,初步探讨其作用机制。

## 1 材料

### 1.1 菌株

白念珠菌标准株 SC5314 由第二军医大学药学院姜远英教授惠赠,临床株由安徽省立医院检验科鲁怀伟主任惠赠。

### 1.2 主要试剂

阳性对照药氟康唑(FCZ,中国食品药品检定研究院,批号 100314);25%戊二醛溶液(国药集团化学试剂有限公司);RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司);甲基四氮盐(XTT,加拿大 BBI 公司);维生素 K3(博美公司);无水乙醇(上海苏懿化学试剂有限公司);溶壁酶、HEPES 试剂(Sigma 公司);Total RNA 提取试剂、逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)反应试剂(日本 ToyoBo 公司);引物(上海生工生物工程有限公司);FUN 1(Invitrogen 公司)。

### 1.3 药物

云南重楼中药饮片购于安徽亳州济人药业有限公司,经安徽省中医院高家荣主任药师鉴定为云南重楼 *Paris polyphylla* Smith. var. *yunnanensis*

(Franch.) Hand. -Mazz. 的干燥根茎。将云南重楼药材置于 75%乙醇中加热回流提取 3 次,每次 2 h,合并滤液,再用水饱和正丁醇萃取 3 次,将正丁醇萃取液合并,65 ℃旋转蒸发至干,得到 BEPP<sup>[5]</sup>。BEPP 主要成分为云南重楼总皂苷,经检测其质量分数为 56.83%。

## 1.4 仪器

DPH-9162 型电热恒温培养箱(上海一恒科技有限公司);聚苯乙烯 96 孔微量培养板(美国 Corning 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(上海美谷分子仪器有限公司);I7000 荧光定量 PCR 仪(美国生物应用系统公司),Sirion 200 型扫描电镜(scanning electron microscopy, SEM, 荷兰 FEI 公司),激光共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscopy, CLSM, 德国徕卡公司),HVS-GB 型真空蒸镀仪(上海铂锐仪器有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 菌液的配制

从 4 ℃保存的沙氏培养基上挑取白念珠菌单菌落,接种至 5 mL 沙氏液体培养基中,于 37 ℃、200 r/min 振荡培养 16 h,使白念珠菌处于对数生长期,用血细胞计数板计数,以 RPMI 1640 培养基将菌液稀释到  $2 \times 10^6$  CFU/mL 备用<sup>[6]</sup>。

### 2.2 MIC 的测定<sup>[7]</sup>

根据美国临床试验标准化委员会(NCCLS)的 M27-A 方案的微量稀释法,将菌液浓度调整为  $2 \times 10^3$  CFU/mL,用 RPMI 1640 培养基将 BEPP 按倍比稀释成 10 个质量浓度:2 048、1 024、512、256、128、64、32、16、8、4  $\mu\text{g/mL}$ ,在 96 孔板中的第 1~10 列依次加入配好的不同质量浓度的 100  $\mu\text{L}$  BEPP 和 100  $\mu\text{L}$  菌液,在第 11 列加入 100  $\mu\text{L}$  RPMI 1640 培养基和 100  $\mu\text{L}$  菌液作为对照组,第 12 列加入 200  $\mu\text{L}$  RPMI 1640 培养基,使 96 孔板上的第 1~11 列的菌液浓度最终为  $1 \times 10^3$  CFU/mL。设置阳性对照药 FCZ (0.25~1 024  $\mu\text{g/mL}$ )。恒温 37 ℃培养 48 h,以肉眼观察 96 孔板中无菌生长的最小药物稀释浓度作为 MIC,以上操作重复 3 次。

### 2.3 生物膜抑制 80%浓度(SMIC<sub>80</sub>)的测定<sup>[8]</sup>

XTT 溶液的配制:XTT 粉末以林格液溶解,使其质量浓度为 0.5 g/L,用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜滤过后储存于 -20 ℃。维生素 K3 用丙酮溶解稀释到浓度为 10 mmol/L,置于 -20 ℃储存。实验前向 XTT 溶液中加入

入维生素 K3 溶液,使维生素 K3 的浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$ 。

除 96 孔板上的第 1~11 列的菌液浓度最终为  $1 \times 10^6$  CFU/mL、设置 FCZ (2~1 024  $\mu\text{g/mL}$ ) 外,其余操作均同“2.2”项。恒温 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 至生物膜成熟后,吸弃上清液,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 1 次后,每孔中加入 50  $\mu\text{L}$  XTT-维生素 K3 溶液,避光孵育 2 h。使用多功能酶标仪检测 490 nm 处各孔的吸光度( $A$ )值。与对照组相比,以  $A$  值降低 80% 的药物浓度为  $\text{SMIC}_{80}$ ,以上操作重复 3 次。

#### 2.4 白念珠菌 SC5314 生物膜抑制率的检测

将 BEPP 按倍比稀释成 7 个质量浓度: 2 048、1 024、512、256、128、64、32  $\mu\text{g/mL}$ ,在 96 孔板 1~7 列中分别加入各质量浓度的 100  $\mu\text{L}$  BEPP 和 100  $\mu\text{L}$   $2 \times 10^6$  CFU/mL 的菌液,在第 8 列中加入 100  $\mu\text{L}$  RPMI 1640 培养基和 100  $\mu\text{L}$   $2 \times 10^6$  CFU/mL 的菌液作为对照组,第 9 列加入 200  $\mu\text{L}$  RPMI 1640 培养基。恒温 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 至生物膜成熟后,XTT 代谢实验检测 SC5314 生物膜,方法同“2.3”项。按公式计算生物膜抑制率。

$$\text{生物膜抑制率} = 1 - A_{\text{处理组}} / A_{\text{对照组}}$$

#### 2.5 白念珠菌 SC5314 时间-杀菌曲线<sup>[9]</sup>

取 3 mL  $2 \times 10^6$  CFU/mL 菌液与 3 mL 质量浓度分别为 256、128、64、32、0  $\mu\text{g/mL}$  的 BEPP 以及 256  $\mu\text{g/mL}$  FCZ 分别混合置于 6 个试管中。将上述所有试管置于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱,分别在培养 0、2、4、8、12、24 h,取菌液 100  $\mu\text{L}$ ,用 PBS 按 10 倍系列稀释。将原菌液和各个稀释倍数的菌液分别取 100  $\mu\text{L}$  均匀涂布于沙氏琼脂培养基平皿上,将平皿置于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 48 h,计数,菌落数  $> 20$  方可

计入结果。以 lgCFU 为纵轴作时间-杀菌曲线。

#### 2.6 SEM 观察白念珠菌 SC5314 生物膜形态<sup>[10]</sup>

取 1 mL  $2 \times 10^6$  CFU/mL 菌液与 1 mL 质量浓度分别为 256、128、64、0  $\mu\text{g/mL}$  BEPP 以及 256  $\mu\text{g/mL}$  FCZ 混合置于 6 孔板,每孔中再分别放入经 75%乙醇浸泡 24 h 的 1 cm 的硅胶导管,恒温 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 后,将导管取出,用无菌 PBS 清洗 3 次,置 2.5% 戊二醛中,避光 4  $^{\circ}\text{C}$  放置 2 h,取出导管用无菌 PBS 洗 3 次,依次置于 35%、50%、75%、95%乙醇,无水乙醇逐级脱水 10 min,室温干燥后,经 HVS-GB 型真空蒸镀仪喷金后,用 SEM 观察、拍照。

#### 2.7 CLSM 观察白念珠菌 SC5314 生物膜厚度<sup>[11]</sup>

取 1 mL  $2 \times 10^6$  CFU/mL 菌液与 1 mL 质量浓度分别为 256、128、64、0  $\mu\text{g/mL}$  BEPP 以及 256  $\mu\text{g/mL}$  FCZ 混合置于 CLSM 培养皿中,恒温 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 后,吸弃上清液,用 GH 缓冲液清洗,加入 FUN1 荧光染料,避光染色 0.5 h 后,以 CLSM 观察、拍照。

#### 2.8 qRT-PCR 检测白念珠菌 SC5314 生物膜相关基因的表达

**2.8.1 总 RNA 的提取** 3 mL  $2 \times 10^6$  CFU/mL 菌液与 3 mL 质量浓度分别为 0、64、128、256  $\mu\text{g/mL}$  BEPP 混合,37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 作用 24 h 后,离心(8 000 r/min, 5 min)收集菌体,用无菌 PBS 冲洗 3 次后进行总 RNA 提取,调节 RNA 浓度,使菌体模板量一致。操作方法按照 RNA 提取试剂说明书进行。

**2.8.2 引物的设计与合成** 所需基因序列由 NCBI 基因库查得,Primer Premier 5.0 软件设计引物,委托上海生工生物工程有限公司合成,各引物序列见表 1。

表 1 白念珠菌生物膜形成相关基因引物序列

Table 1 Related gene primer sequences for formation of *C. albicans* biofilm

| 引物名称  | 正向引物 (5'-3')       | 反向引物 (5'-3')       | 长度/bp |
|-------|--------------------|--------------------|-------|
| HWP1  | AGGTAGACGGTCAAGGTC | TGGTTGTTGTTGTGGGTA | 18    |
| MP65  | TCAACACTGAACACCTC  | ATACCTTTAGCACCACCA | 18    |
| SUN41 | TGATAAATCCGAAGAAAC | AACCACCAGTTGAAGATG | 18    |
| ACT1  | TTGATTGGCTGGTAGAA  | ATGGCAGAAGATTGAGAA | 18    |

**2.8.3 逆转录为 cDNA** 根据逆转录试剂盒说明书进行,反应液配制均于冰上操作。具体如下: 6  $\mu\text{L}$  RNA 变性 (65  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min),加入其他反应试剂 [4  $\times$  DNA Master (55  $\mu\text{L}$ ): gDNA Remover (1.1  $\mu\text{L}$ )] 2  $\mu\text{L}$ , 5  $\times$  RT-Master Mix II 2  $\mu\text{L}$  混合后按如下条件进行逆转录: 50  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min;

98  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min; 4  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min。反应完成后将 cDNA 稀释 10 倍,置于 -80  $^{\circ}\text{C}$  备用。

**2.8.4 qRT-PCR 反应** 采用 qRT-PCR 试剂盒,总反应体系为 25  $\mu\text{L}$ : 2  $\times$  SYBR Green Real time PCR 12.5  $\mu\text{L}$ , 正向引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 反向引物 1  $\mu\text{L}$ , cDNA 0.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 10  $\mu\text{L}$ 。扩增反应在 ABI

7000 荧光定量 PCR 仪上进行, 反应条件: 预变性 95 °C、60 s; 扩增定量程序 40 个循环, 循环参数为变性 95 °C、15 s; 退火 55 °C、15 s; 延伸 72 °C、45 s; 熔解曲线: 60~95 °C, 加热速率为 0.1 °C/s。每个样品均设置 3 重复, 实验重复 3 次。

**2.8.5 定量分析** qRT-PCR 分析分别测定目的基因 HWP1、MP65、SUN41 及内参 ACT1 的  $C_t$  值, 实验结果取其平均值。基因表达水平用倍数变化来表示 ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法)。

## 2.9 统计学处理

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

## 3 结果

### 3.1 对白念珠菌 SC5314 以及临床株的 MIC 以及 SMIC<sub>80</sub>

除标准 SC5314 和临床 1302 菌株, 其余菌株对 FCZ 的 MIC 都大于 64  $\mu\text{g/mL}$ , 为耐药菌株, 所有菌株对 FCZ 的 SMIC<sub>80</sub> 均大于 1 024  $\mu\text{g/mL}$ 。BEPP 对白念珠菌的 MIC 在 32~128  $\mu\text{g/mL}$ , SMIC<sub>80</sub> 在 128~512  $\mu\text{g/mL}$ 。相对于 FCZ, BEPP 对白念珠菌生物膜形成的抑制效果更好。结果见表 2。

表 2 BEPP 对白念珠菌的 MIC 及 SMIC<sub>80</sub>  
Table 2 MIC and SMIC<sub>80</sub> of BEPP to *C. albicans*

| 菌株     | BEPP/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) |                    | FCZ/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) |                    |
|--------|-------------------------------------------|--------------------|------------------------------------------|--------------------|
|        | MIC                                       | SMIC <sub>80</sub> | MIC                                      | SMIC <sub>80</sub> |
| 1302   | 64                                        | 256                | 4                                        | >1 024             |
| 1301   | 64                                        | 128                | >1 024                                   | >1 024             |
| 1303   | 64                                        | 256                | >1 024                                   | >1 024             |
| 1402   | 32                                        | 128                | >1 024                                   | >1 024             |
| 3044   | 128                                       | 256                | >1 024                                   | >1 024             |
| 3049   | 64                                        | 256                | >1 024                                   | >1 024             |
| 3463   | 128                                       | 256                | >1 024                                   | >1 024             |
| 3051   | 64                                        | 256                | >1 024                                   | >1 024             |
| 2141   | 64                                        | 256                | 1 024                                    | >1 024             |
| Z1409  | 128                                       | 256                | >1 024                                   | >1 024             |
| Z1407  | 128                                       | 256                | >1 024                                   | >1 024             |
| 1107   | 128                                       | 512                | >1 024                                   | >1 024             |
| 1304   | 64                                        | 256                | 64                                       | >1 024             |
| 2003   | 64                                        | 256                | >1 024                                   | >1 024             |
| SC5314 | 32                                        | 256                | 0.5                                      | >1 024             |

### 3.2 对 SC5314 生物膜抑制率的影响

通过 XTT 代谢实验表明, BEPP 对白念珠菌生物膜形成的抑制作用呈剂量依赖性, 当 BEPP 质量浓度为 16  $\mu\text{g/mL}$  时, 对生物膜形成几乎无抑制作用。随着药物质量浓度的升高, BEPP 对生物膜形成的抑制作用也相应增强, 当质量浓度为 256  $\mu\text{g/mL}$  时, 即可有效抑制 80%左右的生物膜形成。结果见图 1。

### 3.3 对白念珠菌 SC5314 的时间-杀菌曲线

当药物质量浓度在 32  $\mu\text{g/mL}$  以下时, 几乎无杀菌作用, 与对照组差别不大, 当药物质量浓度提高至 256  $\mu\text{g/mL}$ , 白念珠菌 SC5314 的生长受到明显抑制, 从 4 h 开始, lgCFU 下降到 3 以下, 说明杀菌效果良好。结果见图 2。

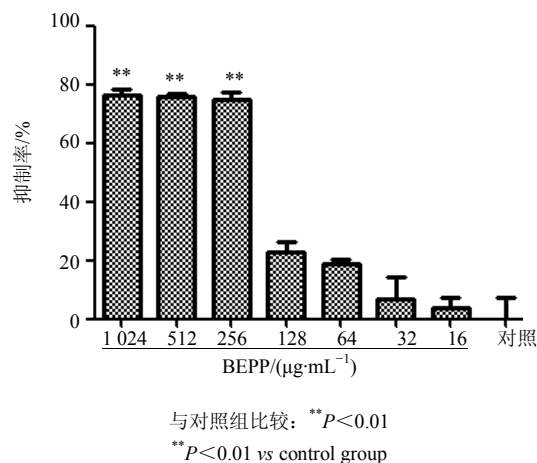


图 1 BEPP 对白念珠菌 SC5314 生物膜形成的抑制率 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 1 Inhibitory rates of BEPP at different concentration on biofilm formation of SC5314 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

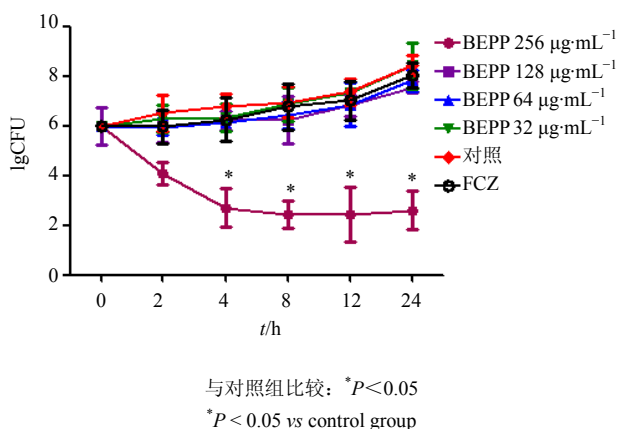


图 2 BEPP 对白念珠菌 SC5314 的时间-杀菌曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 2 Time-sterilization curves of BEPP against SC5314 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 3.4 对白念珠菌 SC5314 生物膜形态结构的影响

经 SEM 观察发现, 对照组大量菌丝错综交叉并包裹酵母相, 形成成熟的生物膜结构。在 64、128  $\mu\text{g/mL}$  BEPP 作用下, 仍可见一定的生物膜形态, 当 BEPP 达到 256  $\mu\text{g/mL}$  时, 白念珠菌生物膜结构完全消失, 只有少量的酵母相存在。结果见图 3。

### 3.5 对白念珠菌 SC5314 生物膜厚度的影响

根据荧光强度所对应的生物膜活细胞数, 对照组所显示的生物膜最厚, 而加入 BEPP 干预后, 荧

光强度随药物质量浓度的不断增高而逐渐减弱, 当 BEPP 为 256  $\mu\text{g/mL}$  时, 只能观察到微弱的荧光信号。结果见图 4。

### 3.6 对白念珠菌 SC5314 生物膜相关基因表达的影响

与对照组比较, 当 BEPP 质量浓度在 64、128、256  $\mu\text{g/mL}$  时, HWP1 表达分别下调了 25.9%、67.1%、87.8%, MP65 表达分别下调了 43.5%、72.0%、85.0%, SUN41 表达分别下调了 37.5%、86.5%、88.9%。结果见图 5。

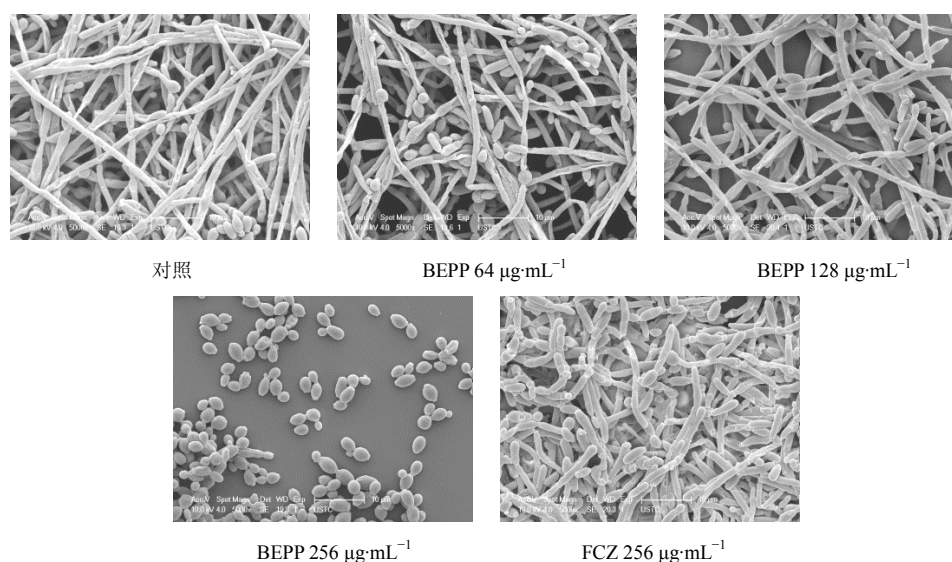


图 3 SEM 观察 BEPP 对白念珠菌 SC5314 生物膜形态结构的影响

Fig. 3 Effects of BEPP on biofilms morphological structures of SC5314 observed by SEM

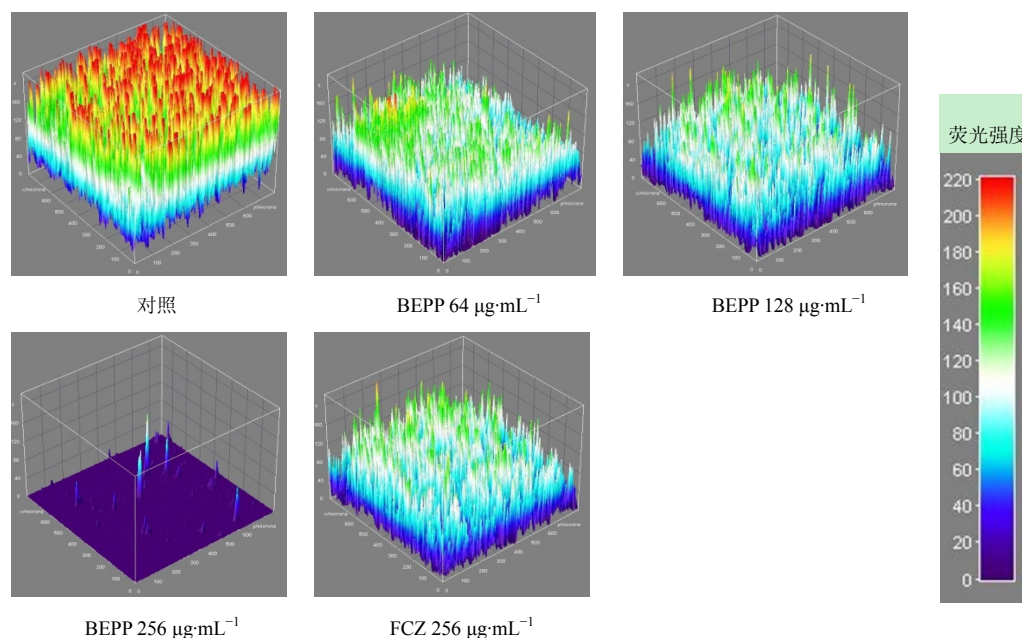


图 4 CLSM 观察 BEPP 对白念珠菌 SC5314 生物膜的影响

Fig. 4 Effects of BEPP on biofilms framework of SC5314 observed by CLSM



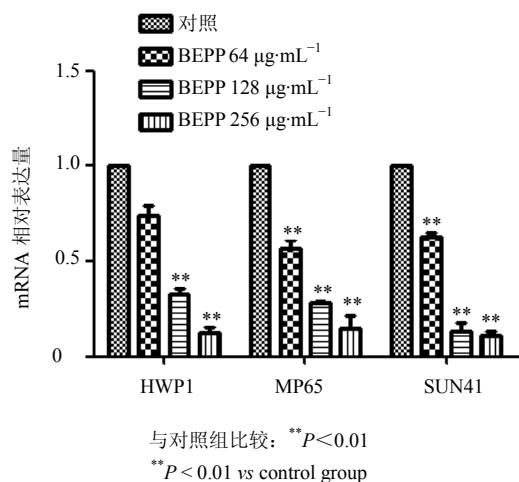


图 5 BEPP 对白念珠菌 SC5314 生物膜相关基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 5 Effect of BEPP on gene expression of *C. albicans* biofilm ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

#### 4 讨论

云南重楼属于百合科重楼属植物的干燥根茎，主要分布于我国的四川、云南、贵州等地，其主要用于清热解毒、治疗癌症、消肿止痛等<sup>[12-13]</sup>。药理学实验表明，云南重楼具有广谱的抗微生物活性，对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、宋内氏痢疾杆菌、黏质沙雷氏菌具有较好的抑制效果，尚有一定的抗病毒作用<sup>[14]</sup>，但云南重楼对真菌尤其是白念珠菌生物膜的影响尚未见报道。

本实验发现，BEPP 对白念珠菌标准株 SC5314 以及临床菌株的 MIC 范围在 32~128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，表明其对白念珠菌悬浮菌具有较强抑制作用；SMIC<sub>80</sub> 的范围在 128~512  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，显示其对白念珠菌生物膜也具有良好的干预效应，而阳性对照药 FCZ 的 SMIC<sub>80</sub> 超过 1 024  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，提示 BEPP 抗白念珠菌生物膜作用强于 FCZ。

XTT 是一种四唑氮衍生物，其可与活细胞的线粒体脱氢酶作用，被活细胞还原成棕黄色的甲臢产物。XTT 法利用这一特性检测甲臢产物的 A 值，从而反映活细胞的增殖以及活性状况<sup>[15]</sup>。实验发现，相对于对照组，当 BEPP 在 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时，A 值减小了 80%。而时间-杀菌曲线也验证 BEPP 具有一定的杀菌作用，可进一步抑制白念珠菌的生物膜形成。

SEM 检测发现，相对于对照组的成熟生物膜，随着 BEPP 质量浓度递增，生物膜形成呈剂量依赖性抑制。当 BEPP 质量浓度为 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时，白念

珠菌已不能形成生物膜，只有少量的酵母相细胞存在。利用重构荧光图像的方法，通过 CLSM 观测发现，对照组的生物膜可形成较厚的三维结构，而 BEPP 质量浓度为 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时，CLSM 只能观察到较弱的荧光强度，无生物膜存在。

白念珠菌生物膜形成受到相关基因的调控。HWP1 是首个发现在体内条件下对生物膜形成有显著影响的基因，其表达产物是一种黏附素，可利用共价键与宿主细胞集合，HWP1 基因的缺失菌株在体内外均不能形成完整的生物膜<sup>[16-17]</sup>。MP65 基因参与细胞壁葡聚糖以及黏附素的合成，敲除该基因的菌株也不能形成完整形态生物膜<sup>[18]</sup>。SUN 基因家族包括 SUN41 和 SUN42 两个基因，其中 SUN41 参与菌体细胞壁以及生物膜的形成，缺失该基因的菌株无法正常生成作为生物膜主要结构的菌丝，且对宿主的致病性也大大降低<sup>[19]</sup>。qRT-PCR 结果显示，加入不同质量浓度的 BEPP 均可导致 HWP1、MP65、SUN41 基因呈不同程度的下调，在 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  质量浓度的 BEPP 作用下，HWP1、MP65、SUN41 基因分别下调了 87.8%、85.0%、88.9%。推测 BEPP 抑制白念珠菌生物膜的形成可能与抑制上述生物膜相关基因的表达有关。

本研究表明，BEPP 对耐药性强的白念珠菌生物膜具有显著的抑制作用，这将为拓宽云南重楼潜在的临床用途奠定了基础，同时也丰富了抗真菌药物的来源渠道。但 BEPP 抗白念珠菌生物膜的有效成分与详细的作用机制以及对体内的生物膜干预效应尚有待于进一步揭示。

#### 参考文献

- [1] Mayer F F, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms [J]. *Virulence*, 2013, 4(2): 119-128.
- [2] Bonhnmme J, d'Enfert C. *Candida albicans* biofilm: building a heterogeneous, drug-tolerant environment [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2013, 16(4): 398-403.
- [3] Heather T T, Kaitlin F M, Jessica A E, et al. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance [J]. *Future Microbiol*, 2013, 8(10): 1325-1337.
- [4] 范国君. 中药抗真菌研究进展 [J]. *四川中医*, 2014, 32(8): 185-186.
- [5] 高云涛, 杨利荣, 杨益林, 等. 重楼提取物体外清除活性氧及抗氧化作用研究 [J]. *中成药*, 2007, 29(2): 195-198.
- [6] Tobudic S, Kratzer C, Lassnigg A, et al. *In vitro* activity

- of antifungal combinations against *Candida albicans* biofilms [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(2): 271-274.
- [7] Ansari M J, Al-Ghamdi A, Usmani S, *et al*. Effect of jujube honey on *Candida Albicans* growth and biofilm formation [J]. *Arch Med Res*, 2013, 44(5): 352-360.
- [8] Chavez-Dozal A A, Lown L, Jahng M, *et al*. *In vitro* analysis of finasteride activity against *Candida albicans* urinary biofilm formation and filamentation [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(10): 5855-5862.
- [9] Liu W, Li L P, Zhang J D, *et al*. Synergistic antifungal effect of glabridin and fluconazole [J]. *Plos One*, 2014, 9(7): e103442.
- [10] Andes D, Nett J, Oschel P, *et al*. Development and characterization of an *in vivo* central venous catheter *Candida Albicans* biofilm model [J]. *Infect Immun*, 2004, 72(10): 6023-6031.
- [11] Li D D, Zhao L X, Mylonakis E, *et al*. *In vitro* and *in vivo* activity of pterostilbene against *Candida albicans* biofilms [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(4): 2344-2355.
- [12] 李彤彤, 高飞, 段承俐, 等. 云南重楼中血管内皮生长因子结合因子的活性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(15): 2251-2256.
- [13] 张兰天, 左予桐, 高文远, 等. 云南重楼提取物及化学成分抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2007, 38(3): 422-424.
- [14] 邓子超, 黄玮, 张文生, 等. 云南重楼研究进展 [J]. 中国医药技术经济与管理, 2007, 1(2): 57-63.
- [15] Xie Z H, Thompson A, Kashleva H, *et al*. A quantitative real-time RT-PCR assay for mature *C. albicans* biofilms [J]. *BMC Microbiol*, 2011, doi: 10.1186/1471-2180-11-93.
- [16] Nobile C J, Nett J E, Andes D R, *et al*. Function of *Candida albicans* adhesin hwp1 in biofilm formation [J]. *Eukaryot Cell*, 2006, 5(10): 1604-1610.
- [17] Sundstrom P. Adhesion in *Candida* spp. [J]. *Cell Microbiol*, 2002, 4(8): 461-469.
- [18] Sandini S, La Valle R, De Bernardis F, *et al*. The 65 kDa mannoprotein gene of *Candida albicans* encodes a putative beta-glucanase adhesin required for hyphal morphogenesis and experimental pathogenicity [J]. *Cell Microbiol*, 2007, 9(5): 1223-1238.
- [19] Ekkehard H, Sonja H, Herwig B, *et al*. *Candida albicans* Sun41p, a putative glycosidase, is involved in morphogenesis, cell wall biogenesis, and biofilm formation [J]. *Eukaryotic Cell*, 2007, 6(11): 2056-2065.