

## • 药理与临床 •

## 白头翁汤正丁醇提取物对酸性条件下白念珠菌 pH 突变株黏附的影响

汪云霞<sup>1,2,3</sup>, 马克龙<sup>1,2,3</sup>, 王 艳<sup>1,2,3</sup>, 吴大强<sup>1,2,3</sup>, 邵 菁<sup>1,2,3</sup>, 汪天明<sup>1,2,3</sup>, 汪长中<sup>1,2,3</sup>

1. 安徽中医药大学中西医结合学院, 安徽 合肥 230012
2. 安徽省中医药科学院中西医结合研究所, 安徽 合肥 230012
3. 中药复方安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012

**摘要:**目的 基于 pH 信号通路探讨白头翁汤正丁醇提取物 (butyl alcohol extract of Baitouweng Decoction, BAEB) 对白念珠菌黏附的影响。方法 Spot assay 检测酸性条件下 pH 突变株的活性; XTT 法检测酸性条件下 pH 突变株黏附时的代谢活力; 荧光显微镜观察酸性条件下 pH 突变株细胞黏附活力; 正辛烷容纳法测定酸性条件下 pH 突变株疏水性; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测酸性条件下 pH 突变株黏附相关基因的表达。结果 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BAEB 对共培养 24、48 h 的 pH 突变株的活性影响不大; phr2/phr2 在酸性条件下代谢活性低, 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BAEB 可明显抑制白念珠菌野生株 (WT)、PHR2 回补菌株、rim101/rim101、RIM101 回补菌株的代谢活性, 对 phr2/phr2 代谢活性影响不大; 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BAEB 可明显抑制 WT、PHR2 回补菌株、rim101/rim101、RIM101 回补菌株的细胞黏附活力, phr2/phr2 加药前后细胞黏附活性无明显变化; 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BAEB 对 WT、phr2/phr2、PHR2 回补、rim101/rim101 及 RIM101 回补菌株的细胞表面疏水性影响不明显; qRT-PCR 法检测 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BAEB 对 pH 突变株在酸性条件下黏附相关基因作用不明显, 但 1 024  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BAEB 则对大多数黏附相关基因有明显抑制作用。结论 BAEB 在酸性条件下能一定程度抑制白念珠菌的黏附。

**关键词:** 白头翁汤; 正丁醇提取物; pH 信号通路; PHR2 基因; RIM101 基因; 白念珠菌; 黏附

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2019)24 - 6009 - 08

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.24.014

## Effects of butyl alcohol extract of Baitouweng Decoction on *Candida albicans* adhesion based on pH-mutant strains under acidic conditions

WANG Yun-xia<sup>1,2,3</sup>, MA Ke-long<sup>1,2,3</sup>, WANG Yan<sup>1,2,3</sup>, WU Da-qiang<sup>1,2,3</sup>, SHAO Jing<sup>1,2,3</sup>, WANG Tian-ming<sup>1,2,3</sup>, WANG Chang-zhong<sup>1,2,3</sup>

1. Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012, China
2. Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Anhui Academy of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012, China
3. Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula of Anhui Province, Hefei 230012, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect and mechanism of butyl alcohol extract of Baitouweng Decoction (BAEB) on adhesion of *Candida albicans* based on pH signaling pathway. **Methods** Spot assay method was used to detect the sensitivity of pH mutants to BAEB under acidic conditions. XTT assay was used to detect the effect of BAEB on metabolic activity of pH mutants. The effect of BAEB on the adhesion activity of pH mutants was observed by fluorescence microscopy. The effect of BAEB on hydrophobicity of pH mutant was determined by *n*-octane inclusion method. The effect of BAEB on the expression of adhesion genes related to pH mutants was detected by qRT-PCR. **Results** Under acidic conditions, spot assay observation showed that pH mutants were less sensitive to BAEB, 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BAEB interfered with pH mutants for 24 h and 48 h, there was no significantly

收稿日期: 2019-07-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81573725); 国家自然科学基金项目 (81774034); 安徽中医药大学重点项目 (2017fzd012); 安徽省教育厅重点项目 (KJ2017A301); 安徽省教育厅重点项目 (KJ2018A0276)

作者简介: 汪云霞 (1992—), 女, 硕士, 主要从事中药抗真菌研究。Tel: 15256553163 E-mail: 1084731363@qq.com

\*通信作者 汪长中, 博士生导师, 教授, 主要从事中医药抗真菌感染研究。Tel: 13956096007 E-mail: ahwc63@sina.com

decrease in bacterial colony. XTT assay showed that the metabolic activity of WT, PHR2 complementation, rim101/rim101 and RIM101 complementation was significantly inhibited in 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BAEB, and there was no significantly difference in the inhibition of phr2/phr2 metabolic activity. Fluorescence microscopy showed that the cell adhesion activity of WT, PHR2 complementation, rim101/rim101, RIM101 complementation was significantly inhibited in 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BAEB, the cell adhesion activity of phr2/phr2 had no obvious effect in 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BAEB. The n-octane inclusion method showed that the effect of 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BAEB on the cell surface hydrophobicity of WT, phr2/phr2, PHR2 complementation, rim101/rim101, RIM101 complementation was not significant. The qRT-PCR assay showed that the adhesion genes of pH mutants was inhibited in 1024  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BAEB. **Conclusion** Under acidic conditions, the *Candida albicans* pH mutants was inhibited by BAEB to a certain extent.

**Key words:** Baitouweng Decoction; butyl alcohol extract; pH signaling pathway; PHR2 gene; RIM101 gene; *Candida albicans*; adhesion

白念珠菌 *Candida albicans* 是人体条件致病性真菌, 常定植于阴道、口腔等黏膜部位, 在菌群失调或免疫力低下时可引起黏膜感染, 严重时甚至可引起系统性感染<sup>[1]</sup>。外阴阴道念珠菌病(vulvovaginal candidiasis, VVC) 是已婚女性中最常见的生殖道黏膜真菌感染性疾病。VVC 时, 白念珠菌大量繁殖并黏附于阴道上皮细胞, 进一步通过酵母-菌丝相转化、外分泌酶(蛋白酶、磷脂酶、脂肪酶)及新型毒素 candidalysin 的释放等机制造成黏膜炎症性损伤。中药治疗 VVC 具有独特优势, 近年来发现, 中药复方白头翁汤在临床上治疗 VVC 具有显著疗效<sup>[2]</sup>。本课题组对白头翁汤采用多种方法提取并进行比较, 发现其正丁醇提取部位的抗真菌作用最明显<sup>[3]</sup>。由于女性阴道是酸性环境, 且菌体对阴道上皮的黏附作用是形成 VVC 的先决条件, 因此如何有效抑制菌体在酸性条件下的黏附作用对于治疗 VVC 至关重要<sup>[4-7]</sup>。本实验利用白念珠菌 pH 突变株从 pH 信号通路角度探讨白头翁汤正丁醇提取物(butyl alcohol extract of Baitouweng Decoction, BAEB)对酸性 pH 条件下白念珠菌黏附作用的影响以阐明其抗 VVC 的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 菌株

白念珠菌野生株(wild type, WT)与 phr2/phr2 缺失突变株、PHR2 回补株、rim101/rim101 缺失突变株、RIM101 回补株由中国科学院微生物研究所真菌学国家重点实验室黄广华教授惠赠。

### 1.2 药物

白头翁汤组方药材白头翁、秦皮、黄连、黄柏均购于安徽中医药大学第一附属医院中药房, 并经安徽中医药大学药学院刘守金教授鉴定, 分别为毛茛科植物白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bge.) Regel 的干燥根、木犀科植物白蜡树 *Fraxinus chinensis* Roxb. 的干燥枝皮、毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis*

Franch. 的干燥根茎、芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮, 药材按照质量比 5:4:2:4 进行配比, 将白头翁汤组方药材粉碎后倒入烧瓶, 置于 80%乙醇中 70  $^{\circ}\text{C}$  加热回流提取 3 次, 每次 3 h, 滤过后合并滤液, 滤液分别用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇梯度萃取 3 次, 萃取液 65  $^{\circ}\text{C}$  旋转蒸发, 然后干燥结晶, 得到白头翁汤各溶剂提取物, 经过活性筛选发现 BAEB 体外抗白念珠菌的活性最强<sup>[3]</sup>。HPLC 检测得到 BAEB 含有小檗碱 315.26 mg/g、白头翁皂苷 174.81 mg/g、秦皮甲素 46.91 mg/g。

### 1.3 试剂

甲基四氮盐(XTT, 合肥博美生物有限公司); 维生素 K3(美国 Alexis 公司); 荧光二乙酸酯(FDA, Sigma 公司); 正辛烷(国药集团化学试剂有限公司); pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PBS, 博士德技术有限公司); 盐酸标准溶液(深圳市安泽科技有限公司); PCR 试剂盒(包括总 RNA 提取, RNA 逆转录, 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)试剂盒, 日本东洋坊公司); 引物(由相关文献或 Gene Bank 中查找序列并委托上海生工生物工程有限公司进行合成)。

### 1.4 仪器

ABI Spectra Max M2e 多功能酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司]; 倒置荧光显微镜(德国徕卡公司); ABI7500 荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司)。

## 2 方法

### 2.1 菌液配制

从 4  $^{\circ}\text{C}$  保存的沙氏培养平板上挑取不同实验株的白念珠菌单菌落, 接种至液体沙氏培养液, 30  $^{\circ}\text{C}$  摇床过夜培养, 离心收集菌体, 血细胞计数板计数, RPMI 1640 (pH 4.0, 盐酸调节 pH 值, 下同) 培养液稀释至  $2 \times 10^3$ 、 $2 \times 10^6$  CFU/mL 备用。

## 2.2 Spot assay 检测 pH 突变株的菌落形成<sup>[7]</sup>

首先以 RPMI 1640 (pH 4.0) 培养液稀释  $2 \times 10^6$  CFU/mL 的不同实验株白念珠菌菌液, 将菌液稀释成  $2 \times 10^5$  CFU/mL, 再按 10 倍稀释直至 200 CFU/mL, 然后配制 512  $\mu\text{g/mL}$  [<sup>3</sup>B]BAEB (临用前, 以生理盐水稀释配制) 的含药 YPD 固体培养基 (调 pH 4.0) 与不含药物的空白培养基 (pH 4.0, 盐酸调节 pH), 最后依次取 3  $\mu\text{L}$  不同浓度的实验株白念珠菌菌液点种在固体培养基上, 37  $^{\circ}\text{C}$  分别培养 24、48 h 后取出, 观察菌落 (CFU) 形成情况并拍照。

## 2.3 XTT 法检测 pH 突变株黏附时的代谢活性<sup>[8]</sup>

称取固体 BAEB 后与 RPMI 1640 培养液 (pH 4.0) 混合并使其完全溶解, 配制成质量浓度为 512  $\mu\text{g/mL}$  的 BAEB 含药培养基。分别取 100  $\mu\text{L}$  不同实验株白念珠菌菌液 ( $2 \times 10^6$  CFU/mL) 与 100  $\mu\text{L}$  终质量浓度为 512  $\mu\text{g/mL}$  的 BAEB 加入 96 孔微量培养板中, 并设不加药物干预的对照组, 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱分别培养 0、2、4 h 后, 用微量移液器吸弃上层培养基, 并用 PBS 漂洗 3 次, 最后各孔加入新配制的 XTT (50 mg XTT, 临用前溶解于 500 mg/L 林格液中并滤过除菌, 加入用丙酮稀释过的维生素 K3 10 mmol/L) 50  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  避光继续培养 2 h 后, 使用酶标仪于 492 nm 波长处测定吸光度 ( $A_{492}$ ) 值。

## 2.4 荧光显微镜观察 pH 突变株黏附时的活力<sup>[9]</sup>

同上述“2.3”项, 配制质量浓度为 512  $\mu\text{g/mL}$  的 pH 4.0 的 BAEB 含药培养基。分别取 1 mL 不同实验株白念珠菌菌液 ( $2 \times 10^6$  CFU/mL) 与 1 mL 终质量浓度为 512  $\mu\text{g/mL}$  的 BAEB 含药培养基加入 24 孔微量培养板中, 并设不加药物干预的对照组, 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱分别培养 0、4 h 后, 用新配制的 FDA 荧光染料 37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 0.5 h, 荧光显微镜发射波长 460 nm 下观察并拍照。

## 2.5 正辛烷容纳法测定 pH 突变株的疏水性<sup>[10]</sup>

同上述“2.3”项, 配制质量浓度为 512  $\mu\text{g/mL}$  的 pH 4.0 的 BAEB 含药培养基。分别取 1 mL 不同实验株白念珠菌菌液 ( $2 \times 10^6$  CFU/mL) 与 1 mL 终质量浓度为 512  $\mu\text{g/mL}$  的 BAEB 加入 24 孔板中, 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 24 h 后, 2 500 r/min 离心 10 min, 再用无菌 PBS 重悬菌体, 之后每组用移液枪吸取 1.2 mL 菌悬液加入另一洁净试管内, 同时加入 0.3 mL 正辛烷。使用涡旋振荡器旋涡混匀 3 min 后, 静置, 待两相液体完全分离。立即测定上层正辛烷

的  $A_{600}$  值与下层 PBS 的  $A_{600}$  值, 并拍照, 计算细胞表面疏水性 (CSH)。

$$\text{CSH} = \text{正辛烷 } A_{600} \text{ 值} / \text{PBS } A_{600} \text{ 值}$$

## 2.6 qRT-PCR 检测 pH 突变株黏附相关基因的表达<sup>[11]</sup>

### 2.6.1 总 RNA 的提取

2 mL 不同实验株白念珠菌菌液 ( $2 \times 10^6$  CFU/mL) 与 2 mL 终质量浓度 512  $\mu\text{g/mL}$  BAEB 含药培养基混合, 并设不加药物干预的对照组, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 4 h 后, 离心收集菌体, 无菌 PBS 冲洗 3 次后进行总 RNA 提取, 调节 RNA 浓度, 使模板量一致, 具体操作方法参照 ToyoBo 公司 MagExtractor-RNA-提取试剂说明书进行。

### 2.6.2 逆转录 cDNA

6  $\mu\text{L}$  RNA 预变性 (65  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min  $\rightarrow$  4  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min), 然后加入混合液 [4  $\times$  DNA Master Mix (55  $\mu\text{L}$ )、gDNA Remover (1.1  $\mu\text{L}$ )] 2  $\mu\text{L}$ , 5 RT-Master MixII 2  $\mu\text{L}$  混合后按如下条件进行逆转录: 50  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min  $\rightarrow$  98  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min  $\rightarrow$  4  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min 反应完成后将 cDNA 稀释 10 倍备用。

### 2.6.3 引物的设计与合成

基因序列从 NCBI 获得, 并用 Oligo7.0 软件设计所需引物, 委托上海生物工程股份有限公司合成引物, 各引物情况见表 1。

表 1 各引物序列  
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5' $\rightarrow$ 3')
ACT1-F	ACCGAAGCTCCAATGAATCC
ACT1-R	CCGGTGGTTCTACCAGAAGAG
ALS1-F	GGATCTGTTACTGGTGGAGCTGTTG
ALS1-R	ATGTGTTGGTTGAAGGTGAGGATGAG
ALS3-F	CCAGGTGGCACTGATTCGGTTATC
ALS3-R	TGGAGGAGCGGTAATGGTAGTGG
HWP1-F	TGACTATCCACAAGCCACAAGAAC
HWP1-R	GTCACAAGGAACACTAGGTTGAGGAG
EPA1-F	ATCTACCTCCTACACGACTGACACTG
EPA1-R	TGTATGAGAACAAGAACC GCCATCAC
ALA1-F	GGCTACGTGTTACACACTGGT
ALA1-R	TCAACGCCATCTCCAAGGAC
INT1-F	TCGTGGTGATGATGATGGATTGGC
INT1-R	TGGCAGGCTTGCTTGATATGGAC
SUN41-F	GGTGCTGGTTATGCTAATGGTATTGC
SUN41-R	CCACTAACGGTAGAGCCTGATTAC
CSH1-F	AGCAGTCTTAGACAACAAGCAATGG
CSH1-R	TGGAGACACCGGCAATTGGAATC

**2.6.4 qRT-PCR 反应** 采用 SYBR 荧光法, 反应体系 25  $\mu\text{L}$ : 2 $\times$ SYBR Green RealtimeMix 12.5  $\mu\text{L}$ 、上下游引物 (10 mol/L) 各 1  $\mu\text{L}$ 、cDNA 0.5  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 10  $\mu\text{L}$ 。预变性 95  $^{\circ}\text{C}$ 、60 s; 反应条件为: 变性 95  $^{\circ}\text{C}$ 、15 s $\rightarrow$ 退火 50  $^{\circ}\text{C}$ 、15 s $\rightarrow$ 延伸 72  $^{\circ}\text{C}$ 、45 s, 共 40 循环。采用 qRT-PCR 仪进行扩增反应。每个样品均设置 3 个重复组, 实验重复 3 次。定量分析内参基因为 ACT1, qRT-PCR 分别测定目的基因 ALS3、ALS1、SUN41、HPS90、UME6、PGA10 及内参 ACT1 的 C<sub>t</sub> 值, 实验结果取其平均值, 基因表达水平用倍数 (2<sup>- $\Delta\Delta\text{C}_t$</sup>  法) 变化来表示。

**2.7 统计学处理**

数据应用 SPSS 23 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 BAEB 对白念珠菌 pH 突变株菌落形成的影响**

结果如图 1 所示, 不加药物干预的条件下, 恒温培养 24 h 后, phr2/phr2 菌株的活性低, 菌落几乎没有, PHR2 基因的回补恢复了菌株的活性; 加入 BAEB 干预后, 各菌株的活性无明显性的变化。恒温培养 48 h, 各菌株的菌落数增多, 除 phr2/phr2 菌株外表粗糙、稀疏, 其他菌株菌落均光滑圆润。

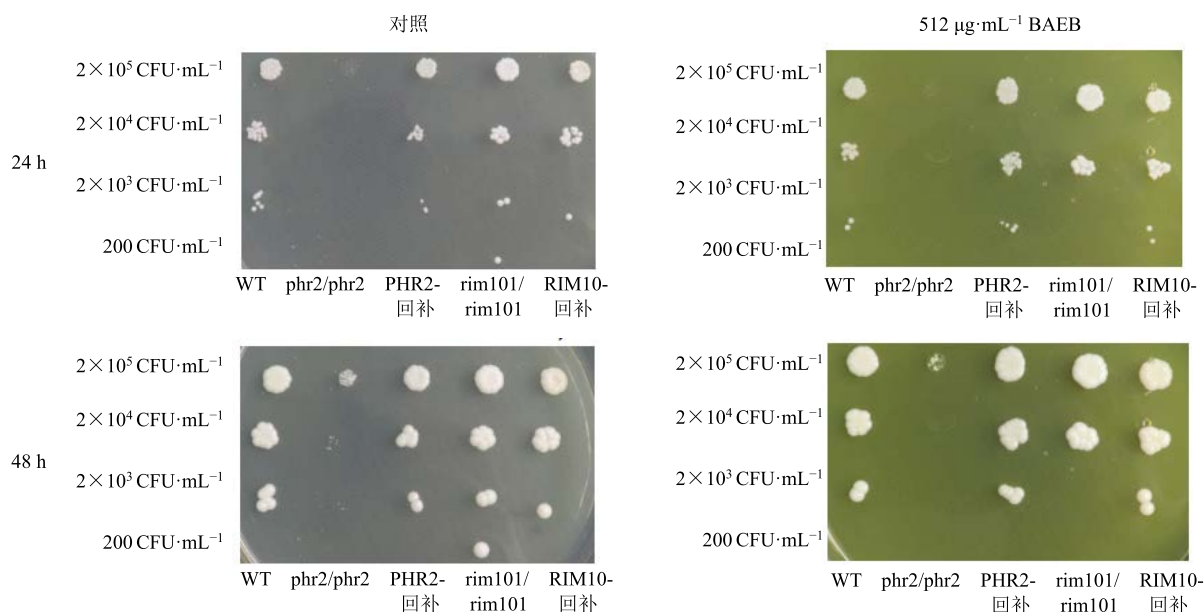


图 1 BAEB 对白念珠菌 pH 突变株菌落形成的影响

Fig. 1 Effect of BAEB on activity of *Candida albicans* pH mutants

**3.2 BAEB 对白念珠菌 pH 突变株黏附时代谢活性的影响**

结果显示, 不加药物干预的条件下 (图 2), 与野生株 (WT) 相比, phr2/phr2 菌株恒温培养 4 h 后, 黏附时代谢活性降低, 差异显著 ( $P < 0.01$ )。加入 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BAEB 干预后, phr2/phr2 菌株在 0、2 h 的代谢活性与 WT、PHR2 回补菌株、rim101/rim101 菌株、RIM101 回补菌株在 0、2、4 h 时间段的代谢活性均显著降低 ( $P < 0.01$ ), 见图 2。

**3.3 BAEB 对白念珠菌 pH 突变株黏附时活力的影响**

培养 0 h, phr2/phr2 与 PHR2 回补在 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BAEB 干预前后荧光强度均较高, 区别不明显。而

WT, rim101/rim101, RIM101 回补在 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BAEB 干预后荧光强度有所减弱。

培养 4 h 后, 不加药物干预的 WT、rim101/rim101、RIM101 回补的荧光强度增强, 但 phr2/phr2、PHR2 回补的荧光强度增强不明显。加入 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BAEB 干预后, WT、PHR2 回补、rim101/rim101、RIM101 回补的荧光强度明显降低, 但 phr2/phr2 荧光强度变化不明显, 见图 3。

**3.4 BAEB 对 pH 突变株疏水性的影响**

试管内的上下液相分层, 从上层的烃相的浑浊度来看, WT、phr2/phr2、PHR2 回补、rim101/rim101、RIM101 回补各菌株在加入 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BAEB 作用后与不加药时相比, 无明显变化。见图 4。

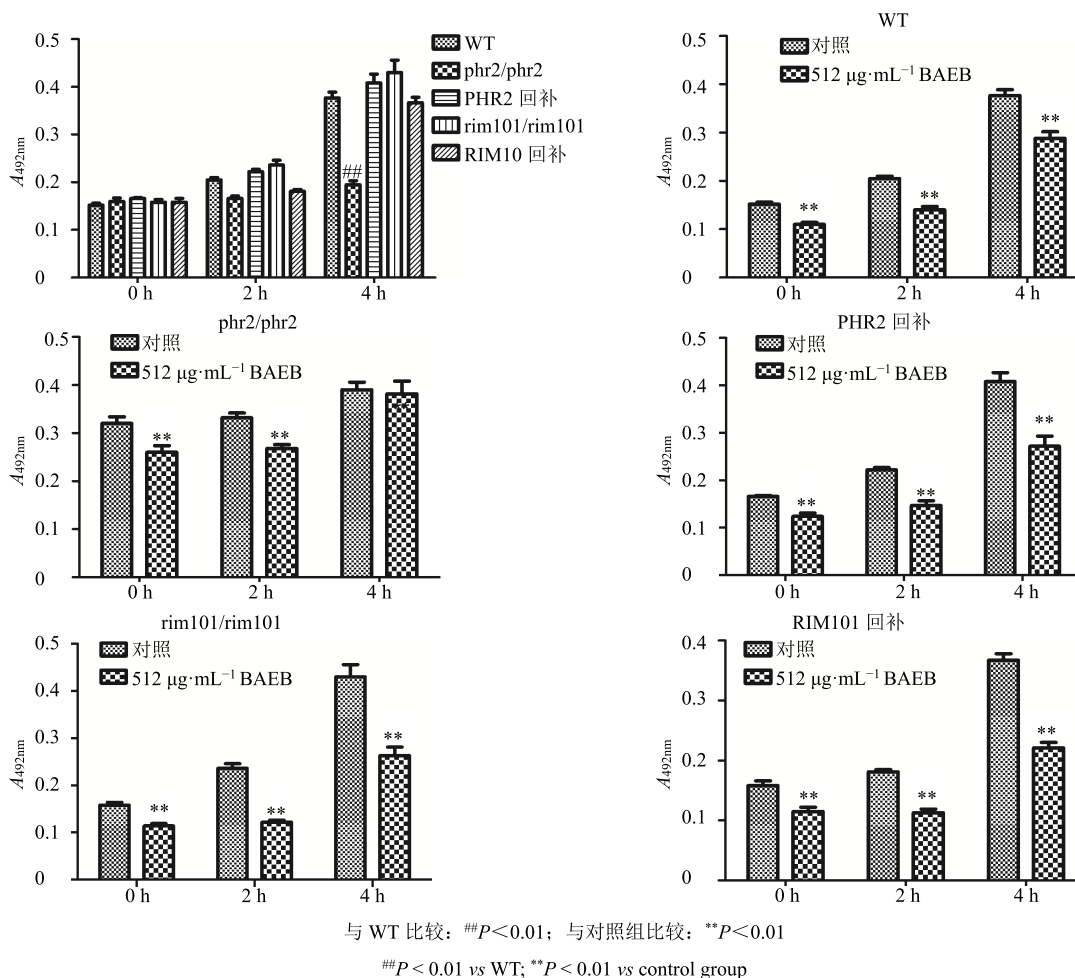


图 2 BAEB 对白念珠菌 pH 突变株黏附时代谢活性的影响  
Fig. 2 Effect of BAEB on adhesion of *Candida albicans* pH mutants

### 3.5 BAEB 对 pH 突变株黏附相关基因表达的影响

结果如表 2 所示, PHR2 基因的缺失造成 ALS1 基因下调, ALS3、HWP1、EAP1、ALA1、INT1、SUN41、CSH1 基因上调。RIM101 基因缺失造成 ALS1、EAP1、INT1 基因下调, ALS3、HWP1、ALA1、SUN41、CSH1 基因表达稳定。

加入 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BAEB 干预后, WT、phr2/phr2、PHR2 回补菌株、rim101/rim101、RIM101 回补菌株的黏附基因表达无明显上升或者下降趋势(表 3)。为了进一步探究黏附基因表达量是否与 BAEB 呈浓度相关,加入 1 024  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BAEB 干预后, WT 野生株 EAP1、INT1、CSH1 基因出现下调,对于 PHR2 基因缺失或回补菌株的基因表达无明显影响。RIM101 回补菌株 EAP1、ALA1、INT1、SUN41、CSH1 基因出现下调(表 4)。

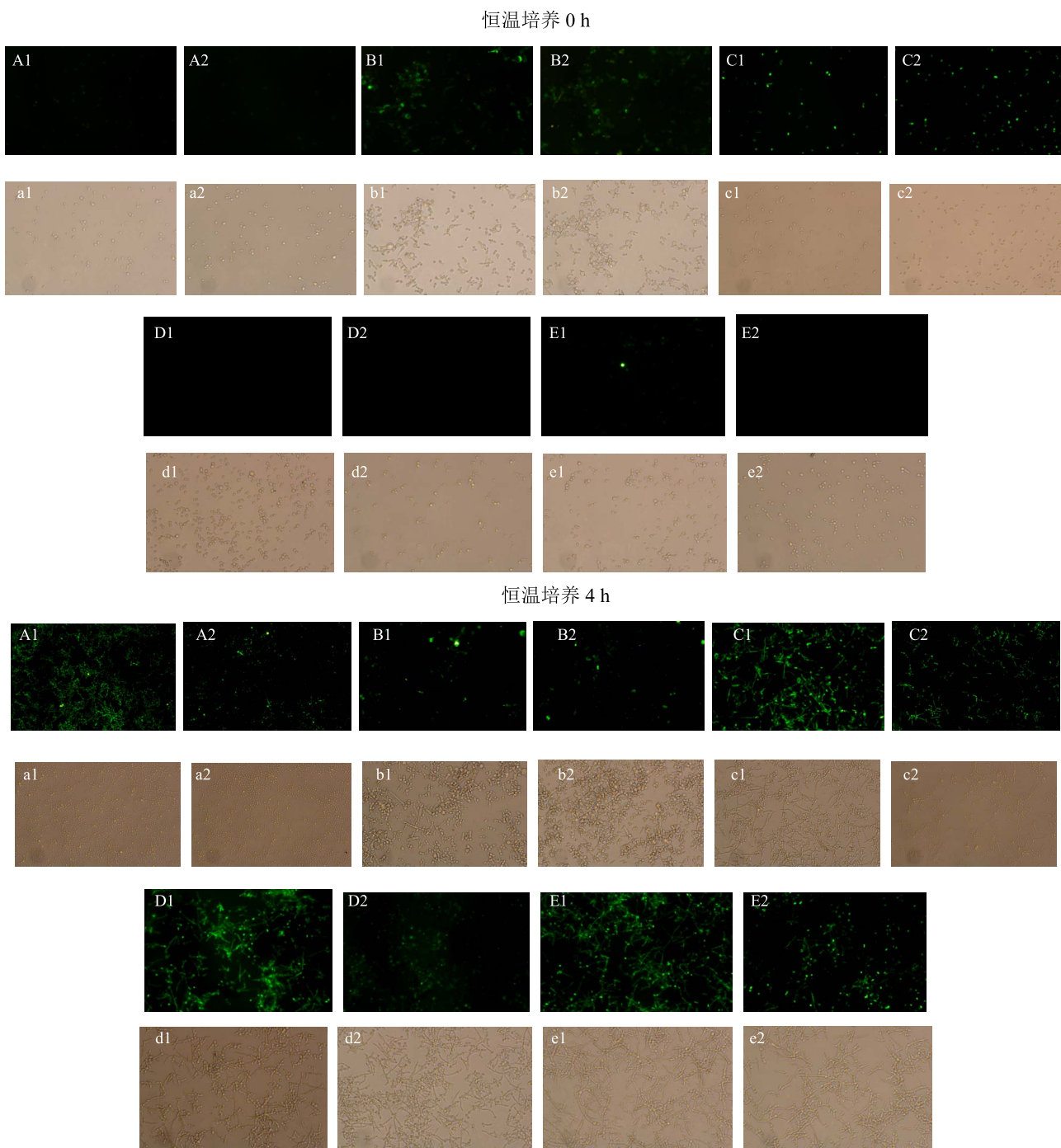
## 4 讨论

在白念珠菌感染过程中,其结构最外层细胞壁

上的黏附素(adhesin)通过与宿主细胞上的受体相互作用,发生定植(colonization),成为感染的先决条件。白念珠菌细胞壁上的黏附素是由多种基因表达的蛋白或糖蛋白,其表达过程受到如环境 pH 等多种因素影响。

pH 信号通路(也称 RIM101 通路)是白念珠菌细胞内一条保守的信号转导通路。该通路不仅调控白念珠菌对环境 pH 的应答,同时也参与白念珠菌的黏附以及生物膜形成等多种生物学特征的调控。在 pH 信号通路所涉及的相关基因中,PHR2 基因在 pH 值小于 5.5 的酸性条件下才能表达,并受到转录因子 Rim101p 的调控。而 Rim101p 是一种 DNA 结合蛋白,在酸或碱性 pH 条件下均可表达<sup>[11-15]</sup>。

人体阴道 pH 值在 4.0~4.5。本研究主要是体外观察对治疗 VVC 有明确疗效的 BAEB 对阴道酸性 pH 下白念珠菌黏附特性的影响,故实验选择在酸性 pH 条件下进行。从 Spot assay 实验结果可看到,



A1-WT A2-WT (512  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  BAEB) B1-phr2/phr2 B2-phr2/phr2 (512  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  BAEB) C1-PHR2 回补 C2-PHR2 回补 (512  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  BAEB) D1-rim101/rim101 D2-rim101/rim101 (512  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  BAEB) E1-RIM101 回补 E2-RIM101 回补 (512  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  BAEB)  
a1~e2 为 A1~E2 相对应明场视野下的成像, 图 4 同

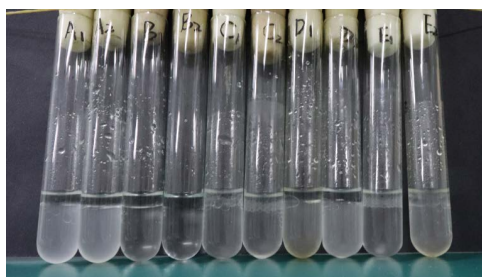
A1-WT A2-WT (512  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  BAEB) B1-phr2/phr2 B2-phr2/phr2 (512  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  BAEB) C1-PHR2 complementation C2-PHR2 complementation (512  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  BAEB) D1-rim101/rim101 D2-rim101/rim101 (512  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  BAEB) E1-RIM101 complementation E2-RIM101 complementation (512  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  BAEB) a1—e2 were images of responding strains tested under bright fields, same as figure 4

图 3 BAEB 对白念珠菌 pH 突变株黏附时活力的影响

Fig. 3 Effect of BAEB on adhesion activity of *Candida Albicans* pH mutants

phr2/phr2 菌株的活性低, 菌落几乎肉眼不可见。BAEB 干预下的 pH 突变株菌落数 (CFU/mL) 无明显变化, 推测 pH 突变株在酸性条件相处于酵母相,

BAEB 对其作用较小, 因此加入药物干预后 pH 突变株的菌落数无明显变化。表明 pH 值对于药物敏感性有影响, 但这种条件下药物敏感性低的详细机



A1 A2 B1 B2 C1 C2 D1 D2 E1 E2

图 4 BAEB 对 pH 突变株疏水性的影响

Fig. 4 Effect of BAEB on CSH of *Candida albicans* pH mutants

制有待进一步探讨。

甲基四氮盐 (XTT) 在线粒体脱氢酶作用下降解为棕色甲臞产物, 通过颜色变化来反映细胞活性, 常用于检测白念珠菌生物膜细胞代谢活性。实验结果发现 BAEB 作用下, WT、PHR2 回补、rim101/rim101、RIM101 回补菌株在黏附阶段的 0、2、4 h 的细胞代谢活性均降低, 但 phr2/phr2 的细胞代谢在 4 h 时间段无明显变化。同时本实验使用 FDA 荧光染料对 pH 突变株的细胞活力进行形态活力检测。FDA 是一种非荧光性疏水性荧光素衍生物, 它可以穿透细胞膜进入细胞, 通过细胞内酯酶

表 2 PHR2、RIM101 缺失与回补对白念珠菌黏附相关基因表达的影响

Table 2 Effects of PHR2, RIM101 deletion and replenishment on *Candida albicans* adhesion-related gene expression

菌株	ALS1	ALS3	HWP1	EAP1	ALA1	INT1	SUN41	CSH1
phr2/phr2	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
PHR2 回补菌株	↓	↑	—	—	↑	↑	—	—
rim101/rim101	↓	—	—	↓	—	↓	—	—
RIM101 回补菌株	↓	—	—	↑	—	—	—	—

与 WT 比较, ↑表示上调倍数大于 2, ↓表示下调倍数大于 2, —表示变化不明显, 下同

Compared with WT, ↑denotes upregulation greater than 2, ↓denotes downregulation greater than 2, — denotes no significant change, same as following tables

表 3 512 μg·mL<sup>-1</sup> BAEB 对 pH 突变株黏附相关基因表达的影响

Table 3 Effect of 512 μg·mL<sup>-1</sup> BAEB on expression of adhesion genes in *Candida albicans* pH mutants

菌株	ALS1	ALS3	HWP1	EAP1	ALA1	INT1	SUN41	CSH1
WT	—	—	—	—	—	—	—	—
phr2/phr2	—	↓	—	—	—	—	—	—
PHR2 回补菌株	—	↑	—	—	—	—	—	—
rim101/rim101	—	—	—	—	—	—	—	—
RIM101 回补菌株	—	—	—	—	—	—	—	—

表 4 1 024 μg·mL<sup>-1</sup> BAEB 对 pH 突变株黏附相关基因表达的影响

Table 4 Effect of 1 024 μg·mL<sup>-1</sup> BAEB on expression of adhesion genes in *Candida albicans* pH mutants

菌株	ALS1	ALS3	HWP1	EAP1	ALA1	INT1	SUN41	CSH1
WT	↑	↑	—	↓	—	↓	—	↓
phr2/phr2	—	↓	—	—	—	—	—	—
PHR2 回补菌株	—	—	—	—	—	—	↓	↓
rim101/rim101	↑	↓	—	—	—	—	↓	—
RIM101 回补菌株	—	—	—	↓	↓	↓	↓	↓

催化水解二乙酸酯基团, 产生具有高强度的荧光产物荧光素。因此这种绿色荧光可以作为一种细胞活力的标签。实验结果中可得 pH 突变株在培养 0 h 条件下细胞活力都较弱, 荧光强度较弱, 培养 4 h 后, 以不加药物干预作为对照, 可发现 BAEB 均能

有效抑制 WT、PHR2 回补、rim101/rim101、RIM101 回补菌株的活性, 荧光强度较弱与对照组, 但 phr2/phr2 的细胞活力却无明显变化, 荧光强度前后无较大差异。

CSH 介导白念珠菌对宿主细胞或非生命基质

的黏附能力，且疏水性的强弱与黏附程度呈正比。另外，CSH 有助于菌体抵御吞噬细胞的杀伤作用。因此，CSH 被认为是白念珠菌的一个重要毒力因子<sup>[16]</sup>。CSH 与细胞壁表面结构密切相关。很多药物就是通过干预 CSH 而发挥其抗黏附功能。本课题组前期的研究<sup>[3]</sup>发现，1 024  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BAEB 干预能显著降低白念珠菌野生株 WT 的 CSH，但本研究中检测 CSH 给予的是剂量相对较小的 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BAEB，对 WT 及其他 4 种 pH 突变株给药前后未显示出明显影响。但实验观察到，phr2/phr2 和 rim101/rim101 这 2 种突变株的上层液相几乎无浑浊，即疏水性下降，表明 PHR2 和 RIM101 基因的存在对于维持白念珠菌的 CSH 起到了一定的作用。

实验进一步从基因层面揭示 BAEB 对 pH 突变株黏附影响的分子基础。结果表明，512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BAEB 作用后，黏附相关基因表达的变化不明显，但当 BAEB 质量浓度提高至 1 024  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时，除了个别基因（如 HWP1）无明显变化，其他基因表达的下调都超过 2 倍，表明较高质量浓度 BAEB 可能基于 pH 通路进而影响某些黏附相关基因的表达从而发挥其抑制白念珠菌的黏附。

BAEB 在近年来以普通白念珠菌为对象的系列研究中一直是 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。本研究中，采用了与黏附相关的 pH 突变株，由于突变株遗传背景的显著差异，造成其对 BAEB 的敏感性的下降。但也观察到 1 024  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BAEB 对 CSH 及黏附相关基因的明显下调作用，表明一定剂量的 BAEB 在酸性条件下能一定程度抑制白念珠菌的黏附作用，这为从黏附角度防治白念珠菌感染提供了新思路。但 BAEB 在酸性条件下基于 pH 信号通路对白念珠菌黏附干预的确切机制尚有待于进一步揭示。

#### 参考文献

- [1] Nikou S A, Kichik N, Brown R, *et al.* *Candida albicans*: Interactions with mucosal surfaces during health and disease [J]. *Pathogens*, 2019, doi: 10.3390/pathogens8020053.
- [2] Naglik J R, Challacombe S J, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, 67(3): 400-428.
- [3] 张梦翔, 夏丹, 施高翔, 等. 白头翁汤正丁醇提取物对白念珠菌 VVC 临床株黏附作用的影响 [J]. 中国真菌学杂志, 2015, 10(1): 25-29.
- [4] Moyes D L, Wilson D, Richardson J P, *et al.* Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection [J]. *Nature*, 2016, 532(7597): 64-68.
- [5] Schaller M, Borelli C, Korting H C, *et al.* Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans* [J]. *Mycoses*, 2005, 48(6): 365-377.
- [6] 王慧, 芦广庆, 杨宝鹏, 等. CCH1 或 MIDI 基因缺失对白念珠菌药物耐受性及致病性的影响 [J]. 生物工程学报, 2012, 28(6): 726-736.
- [7] 赵柳娅, 蒋京辰, 姜远英, 等. 黄芩素与氟康唑协同抗白念珠菌生物被膜作用研究 [J]. 中国真菌学杂志, 2014, 9(2): 70-74.
- [8] Gelis S, de Groot P W, Castillo L, *et al.* Pga13 in *Candida albicans* is localized in the cell wall and influences cell surface properties, morphogenesis and virulence [J]. *Fung Genetics Biol*, 2012, 49(4): 322-331.
- [9] Gomez-Raja J, Davis D A. The  $\beta$ -arrestin-like protein Rim8 is hyperphosphorylated and complexes with Rim21 and Rim101 to promote adaptation to neutral-alkaline pH [J]. *Eukaryot Cell*, 2012, 11(5): 683.
- [10] 李丹, 崔凡, 熊俊浩. 白念珠菌对宿主的黏附机制 [J]. 中国真菌学杂志, 2014, 9(5): 316-320.
- [11] Calderon J, Zavrel M, Ragni E, *et al.* PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans* encoding a glucan-remodelling enzyme, is required for adhesion and invasion [J]. *Microbiology*, 2010, 156(Pt 8): 2484-2494.
- [12] Selvig K, Alspaugh J A. pH response pathways in fungi: Adapting to host-derived and environmental signals [J]. *Mycobiology*, 2011, 39(4): 249-256.
- [13] Davis D A. How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: The link to virulence [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2009, 12(4): 365-370.
- [14] Wang H, Liang Y, Zhang B, *et al.* Alkaline stress triggers an immediate calcium fluctuation in *Candida albicans* mediated by Rim101p and Crz1p transcription factors [J]. *FEMS Yeast Res*, 2011, 11(5): 430-439.
- [15] Fonzi W A. PHR1 and PHR2 of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking, of  $\beta$ -1,3- and  $\beta$ -1,6-glucans [J]. *J Bacteriol*, 1999, 181(22): 7070-7079.
- [16] De Souza R D, Mores A U, Cavalca L, *et al.* Cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* isolated from elder patients undergoing denture-related candidosis [J]. *Gerodontology*, 2009, 26(2): 157-161.