

Gomisin M1 协同氟康唑对耐药白念珠菌毒力因子的作用研究

王应仙^{1,4}, 李俊^{1,4}, 秦定梅^{1,4}, 张路梅^{1,4}, 王梦如², 袁恺³, 廖一川^{1,4}, 李家生^{1,4}, 肖伟烈^{1,2*}, 王睿睿^{1,4*}

1. 云南中医药大学中药学院, 云南 昆明 650500

2. 云南大学 自然资源药物化学教育部重点实验室和云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 云南 昆明 650500

3. 云南中医药大学第二临床医学院, 云南 昆明 650500

4. 云南省民族特色养生产理与健康产品工程实验室, 云南 昆明 650500

摘要:目的 探讨 gomisin M1 (从五味子科植物中提取的木脂素类成分) 联合氟康唑抗耐药白念珠菌的作用及其机制。方法 采用倍比微量稀释法检测 gomisin M1 联合氟康唑对白念珠菌的最小抑菌浓度; 通过时间-生长曲线动态观察 gomisin M1 联合氟康唑对白念珠菌的抑制作用; 采用倒置显微镜观察 gomisin M1 联合氟康唑在 Spider 和 SD+10%胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 液体培养基中对白念珠菌菌丝生长的影响; 采用卵黄琼脂平板法测定 gomisin M1 联合氟康唑对白念珠菌胞外磷脂酶活性的影响; 采用 qRT-PCR 法检测 gomisin M1 联合氟康唑对白念珠菌菌丝相关基因及水解酶相关基因表达的影响。结果 Gomisin M1 联合氟康唑对耐药白念珠菌具有明显的抑制作用, 并能明显抑制耐药白念珠菌菌丝的生长; Gomisin M1 联合氟康唑能够降低白念珠菌胞外磷脂酶活性, 显著下调菌丝相关基因 *RAS1*、*CDC35*、增强丝状生长蛋白 1 (enhanced filamentous growth protein 1, *EFG1*)、细胞伸长蛋白 1 (cell elongation protein 1, *ECE1*)、凝集素样蛋白 3 (agglutinin-like protein 3, *ALS3*)、菌丝壁蛋白 (hyphal wall protein, *HWPI*) 和水解酶相关基因分泌型天冬氨酸蛋白酶 1 (secreted aspartyl protease 1, *SAP1*)、*SAP2*、*SAP3* 以及磷脂酶 B1 (phospholipase B1, *PLB1*) 的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 Gomisin M1 协同氟康唑能够抑制耐药白念珠菌菌丝形成相关蛋白和胞外磷脂酶等毒力因子的表达, 从而发挥抗菌作用。

关键词: gomisin M1; 氟康唑; 白念珠菌; 耐药性; 毒力因子

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)03-0743-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.03.013

Effect of gomisin M1 combined with fluconazole on virulence factors of drug-resistant *Candida albicans*

WANG Ying-xian^{1,4}, LI Jun^{1,4}, QIN Ding-mei^{1,4}, ZHANG Lu-mei^{1,4}, WANG Meng-ru², YUAN Kai³, LIAO Yi-chuan^{1,4}, LI Jia-sheng^{1,4}, XIAO Wei-lie^{1,2}, WANG Rui-rui^{1,4}

1. College of Chinese Materia Medica, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

2. Key Laboratory of Natural Resources Medicinal Chemistry of Ministry of Education and State Key Laboratory of Conservation and Utilization of Biological Resources in Yunnan, Yunnan University, Kunming 650500, China

3. Second Clinical Medical School, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

4. Engineering Laboratory for National Health Theory and Product of Yunnan Province, Kunming 650500, China

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of gomisin M1 (lignans extracted from Schisandraceae plants) combined with fluconazole against drug-resistant *Candida albicans*. **Methods** Multiple microdilution method was used to detect the minimum inhibitory concentration of gomisin M1 combined with fluconazole against *C. albicans*. Time-growth curve was used to observe the inhibitory effect of gomisin M1 combined with fluconazole on *C. albicans*. Inverted microscope was used to detect the effect of gomisin

收稿日期: 2021-09-18

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金资助项目 (81660737); 云南省科技计划中医联合重点项目 (2017FF117[-003]); 云南省科学技术厅—云南中医药大学应用基础研究联合专项 (2017FF116[-028]); 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (2014Y238); 云南省生物资源保护与利用国家重点实验室开放基金资助项目 (2021KF004)

作者简介: 王应仙 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为真菌感染。E-mail: 1441542085@qq.com

***通信作者:** 王睿睿, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事真菌感染免疫。E-mail: wangruiyucm@126.com

肖伟烈, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事天然活性分子的发现及新药研发。E-mail: xiaoweilie@ynu.edu.cn

M1 combined with fluconazole on hyphae formation in Spider and SD + 10% fetal bovine serum (FBS) liquid medium. Yolk agar plate method was used to determine the effect of gomisin M1 combined with fluconazole on extracellular phospholipase activity of *C. albicans*. qRT-PCR method was used to detect the effect of gomisin M1 combined with fluconazole on gene expressions of mycelium-related proteins and hydrolase. **Results** Gomisin M1 combined with fluconazole had a significant inhibitory effect on drug-resistant *C. albicans* and significantly inhibited the hyphae growth of drug-resistant *C. albicans*. Gomisin M1 combined with fluconazole reduced *C. albicans* extracellular phospholipase activity, significantly inhibited hypha-related genes *RAS1*, *CDC35*, enhanced filamentous growth protein 1 (*EFG1*), cell elongation protein 1 (*ECE1*), agglutinin-like protein 3 (*ALS3*), hyphal wall protein (*HWPI*) and hydrolase-related genes secreted aspartyl protease 1 (*SAP1*), *SAP2*, *SAP3* and phospholipase B1 (*PLB1*) expressions ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** Gomisin M1 combined with fluconazole can play an antifungal role through inhibiting the expression of virulence factors including hyphae formation related proteins and extracellular phospholipase of drug-resistant *C. albicans*.

Key words: gomisin M1; fluconazole; *Candida albicans*; resistance; virulence factors

白念珠菌 *Candida albicans* 是一种与人体共生的机会性致病真菌，存在于宿主皮肤、口腔、胃肠道、泌尿生殖道的黏膜上。在健康宿主中不引起疾病，但是当宿主免疫力、内环境菌群和其他因素改变时，可导致白念珠菌过度生长，进而引起浅表黏膜感染，甚至发展成为侵袭性念珠菌病^[1]。白念珠菌引起的侵袭性真菌感染的发病率逐年上升，死亡率超过 40%^[2]。目前抗真菌药物效率低、可利用度低、对宿主的不良反应多，加之临床用药的不合理导致耐药等问题，真菌防治面临严峻的挑战^[3-4]。因此，寻找新型、有效、低毒的抗真菌药物或新靶点的协同增效真菌药物具有重要的意义。

五味子科植物是一类重要的药用植物，历史悠久、药效良好、分布广泛，主要成分为木脂素类、萜类、挥发油类和有机酸类^[5]。其中木脂素类化合物药理作用广泛，涉及消化系统、心血管系统、中枢神经系统、生殖系统等方面^[6]。Gomisin M1 (GM1, 图 1) 是从五味子科植物中提取的木脂素类化合物^[7]，具有清除自由基、抗艾滋病等作用^[8-9]。本课题组前期研究发现 GM1 具有协同氟康唑抑制耐药白念珠菌的活性，本研究旨在阐明 GM1 协同氟康唑抗白念珠菌的机制，为进一步开发联合抗耐药真菌药物提供靶点和研究思路。

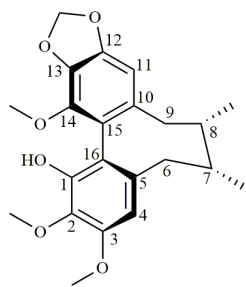


图 1 GM1 结构式

Fig. 1 Structural formula of GM1

1 材料

1.1 菌株

白念珠菌 SC5314 (ACTT®MYA-2876™) 购自美国 ATCC 菌种保藏中心；SC5314 氟康唑耐药菌 (SC5314-FR)：用氟康唑诱导敏感菌 SC5314 使其对氟康唑耐药；ATCC10231 氟康唑耐药菌 (ATCC10231-FR)：用氟康唑诱导标准株 ATCC10231 使其对氟康唑耐药，ATCC10231 (ACTT®10231-MINI-PACK™) 由中科院昆明植物研究所白雪工程师惠赠；CA23、CA187、CA381、CA808、CA4508 均为临床分离菌株，由昆明医科大学第一附属医院皮肤性病科李玉叶教授惠赠。

1.2 药品与试剂

GM1 由云南大学教育部自然资源药物化学重点实验室肖伟烈研究员提取所得，质量分数为 99.044%；氟康唑分散片 (批号 200117) 购自南昌弘益药业有限公司；二甲基亚砜 (DMSO, 批号 EZ6789B127) 购自天津市化学试剂一厂；沙氏液体培养基 (批号 1097061)、沙氏固体培养基 (批号 1106401) 购自环凯微生物科技有限公司；无菌 PBS 溶液 (批号 GP20060700911) 购自武汉塞维尔生物科技有限公司；cDNA 逆转录试剂盒 (批号 0000499195)、qRT-PCR 试剂盒 (批号 0000497768) 购自美国 Promega 公司；Trizol (批号 252612) 购自上海罗氏制药有限公司；氯仿 (批号 20191015) 购自汕滇药业有限公司；营养肉汤 Nutrient Broth (批号 531F031) 购自北京索莱宝科技有限公司；甘露醇 (批号 20181010) 购自北京博奥拓达科技有限公司；磷酸氢二钾 (批号 181024) 购自西陇科学股份有限公司；Yeast Nitrogen Base (YNB, 批号 PM291712100) 购自北京酷来博科技有限公司；葡萄糖 (批号 EZ2811F128) 购自广州赛国生物科技有

限公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号 2148169CP) 购自美国 Gibco 公司; 环磷腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP, 批号 66069) 购自美国 MCE 公司。

1.3 仪器

生物安全柜 (新加坡 ESCO 公司); HWS-250 型恒温恒湿培养箱 (上海双旭电子有限公司); AR24CN 型电子分析天平 (美国奥豪斯实验室仪器有限公司); Plus 384 酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); 血细胞计数板 (上海求精生化试剂仪器有限公司); 96 孔细胞培养板 (无锡耐思生命科技股份有限公司); 低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); 倒置生物显微镜 (德国卡尔蔡司公司); Nanodrop 超微量分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); LihgtCycler qRT-PCR 仪 (上海罗氏制药有限公司)。

2 方法

2.1 菌悬液的制备与培养基的配制

2.1.1 菌悬液的制备 实验所用白念珠菌菌种采用 30% 甘油保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 用接种环取适量菌液稀释后在沙氏琼脂培养基上复苏, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 24 h 后, 挑取单一菌落在沙氏琼脂培养基继续培养 24 h, 连续传代 2 次, 使菌株处于最佳生长状态, 血细胞计数板计数, 沙氏液体培养基稀释至 1×10^5 CFU/mL 备用。

2.1.2 Spider 液体培养基的配制 称取营养型肉汤 Nutrient Broth 3 g, 加入 300 mL 纯水, $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 30 min, 冷却至 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 加入甘露醇 3 g、磷酸氢二钾 0.6 g, 混匀, 冷却后于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.1.3 SD 液体培养基的配制 分别量取 255、15、30 mL 纯水于 3 个试剂瓶中, $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min, 纯水冷却至 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 将 2.01 g $1\times\text{YNB}$ 倒入装有 10 mL 纯水的试剂瓶中, 4 g 葡萄糖倒入装有 20 mL 纯水的试剂瓶中, 分别混匀后, 再将 3 种不同溶液混在一起, 摇匀, 冷却至室温后置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

2.2 最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 的测定^[10]

精密称取 50 mg GM1 溶于 0.5 mL DMSO, 配制成质量浓度为 100 mg/mL 的 GM1 储备液, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用; 取 1 片氟康唑分散片研成粉末后加入 1 mL DMSO, 配制成质量浓度为 50 mg/mL 的氟康唑储备液, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

用沙氏液体培养基将 GM1 和氟康唑储备液分别稀释为 400 $\mu\text{g/mL}$, 作为初始最大质量浓度, 接

着采用 5 倍倍比稀释法进行稀释, 设置空白组 (无药无菌)、对照组 (无药有菌)、氟康唑组、GM1 组及 GM1 联合氟康唑组。各孔中 DMSO 的含量均低于 1%。将制备好的培养板置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温恒湿培养箱中培养 24 h, 用酶标仪测定 625 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算抑制率、抑菌 80% 的最小浓度 (MIC_{80}) 和部分抑菌联合指数 (fractional inhibitory concentration index, FICI), 上述实验重复操作 3 次。其中 $\text{FICI}\leq 0.5$ 为协同作用, $0.5<\text{FICI}\leq 4$ 为无相互作用, $\text{FICI}>4$ 为拮抗作用。

$$\text{抑菌率} = 1 - (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

$$\text{FICI} = \text{MIC}_{\text{A}} / \text{A} + \text{MIC}_{\text{B}} / \text{B}$$

A、B 分别为 2 药单用时的 MIC 值, MIC_{AB} 为 2 药联用时的 MIC 值; 药物单用时若无 MIC 值, 则使用药物最大浓度的 2 倍代替 MIC 值进行计算

2.3 时间-生长曲线

取对数生长期的白念珠菌置于沙氏液体培养基中, 调整菌悬液浓度为 1×10^5 CFU/mL, 制备含药或不含药的白念珠菌细胞悬浮液, 设置对照组 (无药有菌)、氟康唑 (24 $\mu\text{g/mL}$) 组、GM1 (12、24 $\mu\text{g/mL}$) 组及 GM1 联合氟康唑组, 恒温摇床 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养 48 h。分别于 0、2、4、6、8、12、16、24、36、48 h, 于超净工作台下取样 200 μL , 检测 625 nm 波长下的 A 值。以时间为横坐标, 所测得的 A 值为纵坐标绘制曲线, 得到不同质量浓度药物对白念珠菌的生长曲线。

2.4 倒置显微镜观察真菌形态

设置对照组 (无药有菌)、氟康唑 (24 $\mu\text{g/mL}$) 组、GM1 (24 $\mu\text{g/mL}$) 组及 GM1 联合氟康唑组, 分别用 SD+10% FBS 和 Spider 液体培养基制备含药或不含药的白念珠菌细胞悬浮液, 菌悬液浓度为 1×10^5 CFU/mL, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温恒湿培养箱中孵育, 于 2、4、8 h 采用倒置显微镜拍照, 观察各组菌丝生长情况。

2.5 GM1 联合氟康唑对白念珠菌细胞外磷脂酶活性的影响

设置对照组 (无药有菌)、氟康唑 (24 $\mu\text{g/mL}$) 组、GM1 (24 $\mu\text{g/mL}$) 组及 GM1 联合氟康唑组, 取对数生长期的白念珠菌置于沙氏液体培养基中, 制备含药或不含药的白念珠菌细胞悬浮液, 菌悬液浓度均为 1×10^5 CFU/mL。吸取 10 μL 菌液滴加至卵黄培养基上, 每组设计 3 个重复样本, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温恒湿培养箱中培养 72 h。观察到菌落周围产生大小不同的沉淀圈, 用尺子测定菌落直径和沉淀圈直

径, 两者的比值称为 Pz, 磷脂酶活性由 Pz 值表示。其中, Pz=1, 表明磷脂酶阴性; Pz=0.90~0.99, 表明磷脂酶活性极低; Pz=0.80~0.89, 表明磷脂酶活性低; Pz=0.70~0.79, 磷脂酶活性高; Pz≤0.69, 表明磷脂酶活性极高。

2.6 GM1 联合氟康唑对白念珠菌菌丝相关基因、水解酶相关基因表达的影响

2.6.1 菌株样品的制备

取对数生长期的白念珠菌置于沙氏液体培养基中, 制备含药或不含药的白念珠菌细胞悬浮液, 设置对照组(无药有菌)、氟康唑(24 μg/mL)组、GM1(24 μg/mL)组及 GM1 联合氟康唑组, 菌悬液浓度均为 1×10⁵ CFU/mL。各组在 37 ℃、150 r/min 恒温摇床培养 16 h, 离心, 用 PBS 溶液清洗 3 次, 收集细胞沉淀备用。

2.6.2 液氮研磨法提取总 RNA 和 cDNA 的合成

液氮研磨法将“2.6.1”项下的菌沉淀提取 RNA, 用超微量紫外分光光度仪测定 RNA 浓度, 并用 1% 琼脂糖凝胶电泳测定 RNA 纯度, 然后按反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA, 采用 20 μL 的体系, 加入 RNA 的总量为 1000 ng。

2.6.3 qRT-PCR 分析

菌丝相关基因 *RAS1*、*CDC35*、增强丝状生长蛋白 1 (enhanced filamentous growth protein 1, *EFG1*)、细胞伸长蛋白 1 (cell elongation protein 1, *ECE1*)、凝集素样蛋白 3 (agglutinin-like protein 3, *ALS3*)、菌丝壁蛋白(hyphal wall protein, *HWPI*) 和水解酶相关基因分泌型天冬氨酸蛋白酶 1 (secreted aspartyl protease 1, *SAP1*)、*SAP2*、*SAP3* 以及磷脂酶 B1 (phospholipase B1, *PLB1*)、*PLB2* 引物序列见表 1, 将引物稀释为 10 μmol (现配现用), 设计 96 孔板上样顺序, 每个样品设 3 个复孔, 用水为模板作阴性对照。qRT-PCR 反应体系为 20 μL, 采用 3 步法进行 PCR 扩增。扩增反应结束后, 以各基因的表达情况 2^{-ΔΔCt} 值法进行相对定量分析。

2.7 外源性 cAMP 实验

设置对照组(无药有菌)、氟康唑(24 μg/mL)组、GM1(24 μg/mL)组及 GM1 联合氟康唑组, 分别用 SD+10% FBS 和 Spider 液体培养基制备 8 份含药或不含药的白念珠菌细胞悬浮液, 其中 4 份加入终浓度为 10 mmol/L 的 cAMP, 其余 4 份不加 cAMP, 调整菌量为 1×10⁵ CFU/mL, 于 37 ℃恒温恒湿培养箱中孵育 8 h 后, 采用倒置显微镜拍照, 观察各组菌丝形态。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'-3')	长度/bp
<i>RAS1</i>	F: GTGGTGTGGTAAATCCGCTT R: TCATGGCCAGATATTCTTCTTGTC	178
<i>CDC35</i>	F: ACTTGGTGACTGCAGACTGG R: ACCCATACGAACCGACAACC	110
<i>EFG1</i>	F: AATGTGGCCCAAATGACACG R: GCCATGGCCAATGCTCTTTC	131
<i>ECE1</i>	F: GCCACTGGTGTCAACAATCC R: AGTTTCCAGGACGCCATCAA	123
<i>ALS3</i>	F: TGTTCCTGCCGGTTATCGTC R: GAAAGGTGCACGTTGCCAAT	124
<i>HWPI</i>	F: CCGGAATCTAGTGCTGTCGT R: GCAGCACCGAAAGTCAATCTC	185
<i>SAP1</i>	F: GCTACGCTAACGGTCAACCT R: AGCAGCAATGTTTGAAGCAGA	170
<i>SAP2</i>	F: CAATGAAGCCGGTGGTAG R: GTGGCAGCATCTGGAGAA	108
<i>SAP3</i>	F: TCAAGCTGGTCAAGGACAAGA R: ATCGGCAAATTGTTGCTTTGTG	196
<i>SAP4</i>	F: TGCCGATGGTTCTGTTGC R: CCTGGTGGCTTCGTTGCT	154
<i>PLB1</i>	F: CATTCAAGTGGCGGAGGGTAT R: TCCAATAACCACGATCCACC	155
<i>PLB2</i>	F: TGGGAGAGCTTTGAGTCACC R: GAGCACAGTGTTTGGTTCCC	154
<i>ACT1</i>	F: ACGGTGAAGAAGTTGCTGCT R: TGGATTGGGCTTCATCACCA	180

2.8 统计学方法

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Graphpad prism 8 软件进行数据处理, 数据采用独立样本 *t* 检验方法分析。

3 结果

3.1 GM1 联合氟康唑对耐药白念珠菌的抑制作用

采用微量稀释法测定 GM1 联合氟康唑对耐药白念珠菌的抑制作用, 如表 2 所示, GM1 和氟康唑单用对多株耐药白念珠菌均无效, 但二者联用抑菌效果明显, FICI 均小于 0.5, 表现出显著协同作用。

3.2 时间-生长曲线

7 株耐药株的 MIC 值都相差不大, 且 CA23 菌相比其他 6 株较稳定, 易于培养, 故选定 CA23 为研究菌株。绘制不同质量浓度的药物作用于白念珠菌的时间-生长曲线, 如图 2 所示, 对照组、氟康唑组和 GM1 组的菌体生长周期大致相同, 而 GM1 联合氟康唑组在 8~36 h 的 *A* 值均低于对照组, 说明 GM1 联合氟康唑组在 8~36 h 对 CA23 的生长具有显著的抑制作用。

表 2 GM1 联合氟康唑对耐药白念珠菌的抑制作用

Table 2 Inhibitory effects of GM1 combined with fluconazole on drug-resistant *C. albicans*

菌株	MIC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			FICI
	氟康唑	GM1	氟康唑+GM1	
CA23	>200	>200	24.30 ± 1.87	0.12
CA187	>200	>200	22.92 ± 0.76	0.11
CA381	>200	>200	25.93 ± 1.22	0.13
CA808	>200	>200	24.57 ± 1.08	0.12
CA4508	>200	>200	25.37 ± 0.04	0.13
SC5314-FR	>200	>200	24.15 ± 2.35	0.12
ATCC10231-FR	>200	>200	26.02 ± 1.01	0.13

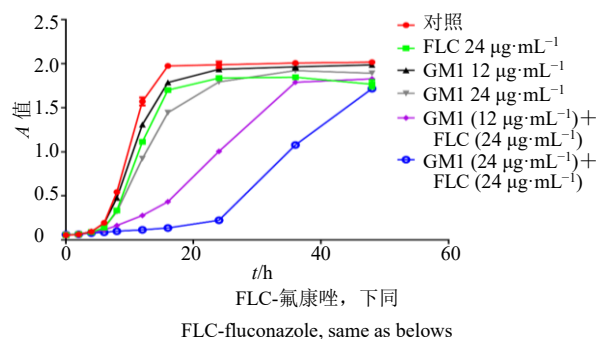


图 2 时间-生长曲线

Fig. 2 Time-growth curve

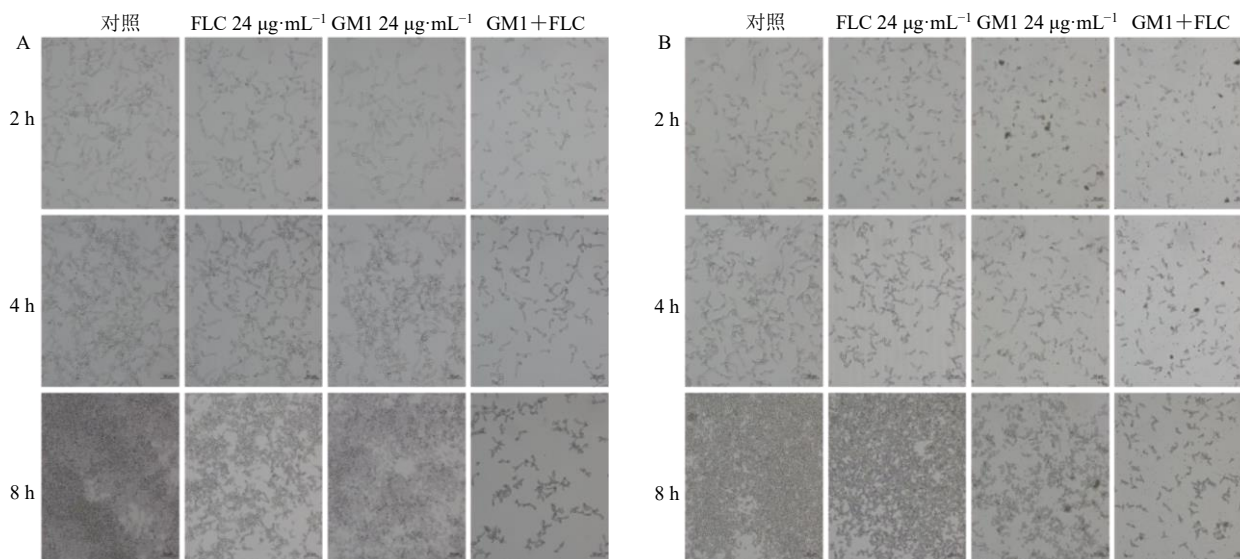


图 3 GM1 联合氟康唑对 SD+10% FBS (A) 和 Spider 液体培养基 (B) 中耐药白念珠菌菌丝形成的影响 ($\times 200$)

Fig. 3 Effect of GM1 combined with fluconazole on hyphae formation of drug-resistant *C. albicans* in SD + 10% FBS (A) and Spider liquid medium (B) ($\times 200$)

抑制作用；但 GM1 联合氟康唑后，在 2 种液体培养基中都能显著抑制耐药白念珠菌菌丝的形成。

3.4 GM1 联合氟康唑对白念珠菌细胞外磷脂酶活性的影响

采用卵黄琼脂平板法测定 GM1 联合氟康唑对白念珠菌胞外磷脂酶的活性，Pz 值越低，表明磷脂酶产生越多，活性越强。如表 3 所示，对照组磷脂

3.3 GM1 联合氟康唑对耐药白念珠菌菌丝形成的影响

通过倒置显微镜观察 GM1 联合氟康唑对耐药白念珠菌菌丝形成的影响，如图 3 所示，在 Spider 和 SD+10% FBS 液体培养基中，对照组的白念珠菌在 2 h 能形成较长且交错的菌丝，随着时间的推移，8 h 能形成致密、错综复杂、相互缠绕重叠的菌丝；氟康唑单用对耐药白念珠菌菌丝的形成无明显的抑制作用；GM1 单用在 SD+10% FBS 液体培养基无抑制作用，而在 Spider 液体培养基中有一定的

表 3 GM1 联合氟康唑对白念珠菌细胞外磷脂酶活性的影响
Table 3 Effect of GM1 combined with fluconazole on extracellular phospholipase activity of *C. albicans*

组别	剂量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Pz	磷脂酶活性
对照	—	0.67 ± 0.02	极高
FLC	24	0.77 ± 0.03	高
GM1	24	0.69 ± 0.03	极高
GM1+FLC	24+24	0.88 ± 0.03	低

酶活性极高,加入氟康唑后可轻微抑制磷脂酶活性,加入 GM1 未影响磷脂酶活性,但当二者联用时,白念珠菌胞外磷脂酶活性显著降低。表明 GM1 联合氟康唑可以抑制白念珠菌胞外磷脂酶的活性,从而发挥抗真菌作用。

3.5 GM1 联合氟康唑对白念珠菌菌丝相关基因和水解酶相关基因表达的影响

采用 qRT-PCR 法检测 GM1 联合氟康唑对耐药白念珠菌菌丝相关基因表达的影响,如图 4 所示,与对照组相比,GM1 联合氟康唑组 *RAS1*、*CDC35*、

EFG1、*ECE1*、*ALS3*、*HWPI* 基因表达水平显著下调 ($P<0.01$)。

为了评价 GM1 联合氟康唑对耐药白念珠菌水解酶的作用,采用 qRT-PCR 法测定 *SAP1*、*SAP2*、*SAP3* 和 *PLB1*、*PLB2* 的表达。如图 5 所示,与对照组相比,GM1 联合氟康唑组胞外磷脂酶活性相关基因 *PLB1* 和分泌型天冬氨酸蛋白酶相关基因 *SAP1*、*SAP2*、*SAP3* 的表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01),说明 GM1 与氟康唑联用可以抑制白念珠菌磷脂酶和分泌型天冬氨酸蛋白酶活性,从而发挥抗真菌作用。

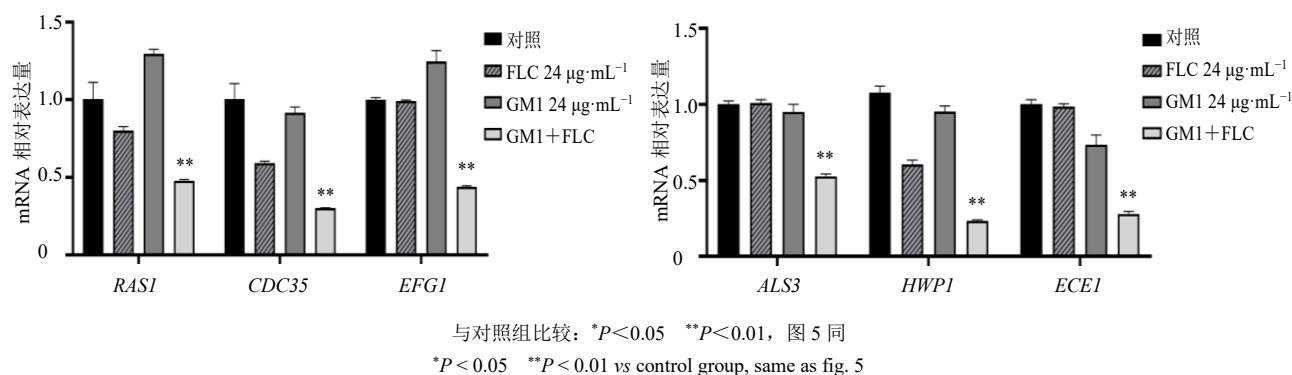


图 4 GM1 联合氟康唑对白念珠菌菌丝相关基因表达的影响

Fig. 4 Effect of GM1 combined with fluconazole on mycelium-related genes expressions of *C. albicans*

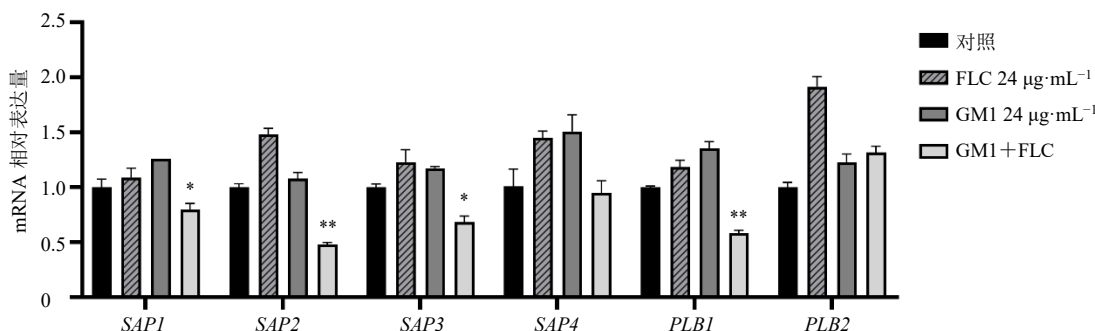


图 5 GM1 联合氟康唑对白念珠菌水解酶相关基因表达的影响

Fig. 5 Effect of GM1 combined with fluconazole on hydrolase-related genes expressions of *C. albicans*

3.6 外源性 cAMP 实验

cAMP 为菌丝生长相关 Ras1/cAMP/蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 信号通路的第二信使,通过向白念珠菌菌悬液中添加外源性的 cAMP,研究外源性 cAMP 是否会逆转 GM1 联合氟康唑对白念珠菌菌丝形成的抑制作用,从而验证菌丝抑制的机制是否与 Ras1/cAMP/PKA 信号通路有关。如图 6 所示,加入外源性 cAMP 后,白念珠菌菌丝的形成更加密集,并且药物联合组在 SD+10% FBS 和 Spider 液体培养基中,菌丝的形成相比未加外源性

cAMP 都有一定的恢复,表明外源性 cAMP 的加入可以部分逆转 GM1 联合氟康唑对白念珠菌所产生的抑制作用。

4 讨论

白念珠菌是念珠菌病的主要病原体,在机体免疫功能受损情况下,白念珠菌可以引起危及生命的全身感染^[1]。白念珠菌的毒力特征取决于酵母菌和菌丝体之间的形态转换、黏附素和侵袭素的表达、生物膜的形成、表型转换、水解酶的分泌等^[12]。毒力因子指病原体表达或分泌的与致病性相关的物

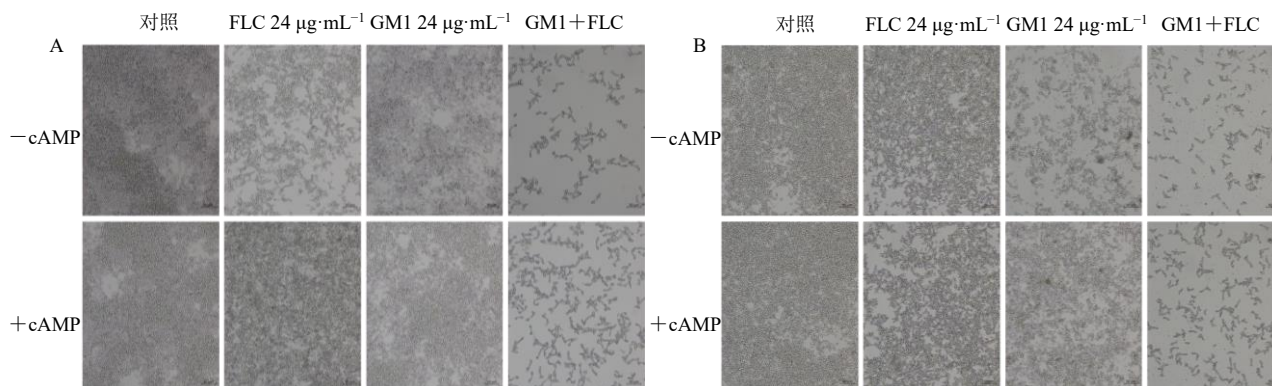


图 6 外源性 cAMP 对 SD+10% FBS (A) 和 Spider 液体培养基 (B) 中白念珠菌菌丝形成的影响 (×200)

Fig. 6 Effect of exogenous cAMP on hyphae formation of *C. albicans* in SD + 10% FBS (A) and Spider liquid medium (B) (× 200)

白念珠菌的毒力因子包括上述毒力特征表现过程中分泌的念珠菌素、黏附素、水解酶、耐药蛋白、蛋白酶及其他相关蛋白和分子等^[13]。伴随着念珠菌病的高发病率和高死亡率以及耐药性，新型治疗策略的开发愈发重要，毒力因子在白念珠菌病发病机制中尤其重要，因此，以毒力因子为靶点是抗真菌药物开发的一种极具吸引力的新途径^[14]。

本研究结果显示，GM1 联合氟康唑对 5 株临床耐药白念珠菌（CA23、CA187、CA381、CA808、CA4508）和 2 株耐氟康唑白念珠菌（SC5314-FR、ACTT10231-FR）均具有协同抗菌作用，MIC₈₀ 值为 22~26 μg/mL，表明 GM1 联合氟康唑对于唑类耐药菌株具有普遍的协同抗菌作用，且效果显著。后续实验选取 CA23 为研究对象，探讨 GM1 协同氟康唑对白念珠菌的作用及机制。通过时间-生长曲线，发现 GM1（24 μg/mL）联合氟康唑（24 μg/mL）组在 8~36 h 动态抑菌效果最佳，具有良好的协同抑制效果，并以此药物质量浓度处理后续实验菌株，进一步验证其协同作用。

白念珠菌酵母和菌丝之间的形态转换在白念珠菌的毒力中发挥着重要的作用^[14]。研究发现，白念珠菌的菌丝形态是其主要的致病形式，且在感染过程中起着关键作用，可以促进组织穿透和免疫细胞的逃逸^[12,14]。因此，抑制白念珠菌菌丝的形成，可能会抑制其对宿主的致病性。本研究采用 Spider 和 SD+10% FBS 2 种菌丝诱导液体培养基，发现 8 h 后，GM1 组和氟康唑组白念珠菌形成大量密集细长的菌丝，GM1 联合氟康唑组的菌丝很少，仅有少量的假菌丝形，其余大部分多为酵母形态，表明 GM1 联合氟康唑能够有效抑制白念珠菌菌丝的形成。

Ras1/cAMP/PKA 信号通路在白念珠菌的生长、酵母-菌丝转换、白色-不透明转换、有性繁殖、生物膜形成等发面发挥重要的作用^[15-16]。在胞外因子（如 *N*-乙酰葡萄糖胺、血清、pH、温度等）的刺激下，Ras1 蛋白转化为活性形式，并激活腺苷酸环化酶合成第二信使 cAMP，进而激活 Ras1/cAMP/PKA 信号通路调节菌丝的生长^[17-18]。EFG1 参与 Ras1/cAMP/PKA 信号通路的调控，其表达上调能迅速激活一系列菌丝特异性基因如 *HWPI*、*ECE1*、*ALS3* 的表达^[19-21]。为了明确 GM1 与氟康唑联用对白念珠菌菌丝抑制作用的信号通路，采用 qRT-PCR 法检测了菌丝相关基因的表达情况，结果显示，GM1 联合氟康唑能够显著下调上述信号通路中关键基因 *RAS1*、*CDC35*、*EFG1*、*ECE1*、*ALS3*、*HWPI* 的表达水平。为了进一步验证 GM1 联合氟康唑对白念珠菌菌丝的抑制作用是否与 Ras1/cAMP/PKA 信号通路有关，通过加入外源性 cAMP 观察菌丝的形成情况，结果显示，加入外源性 cAMP 后，GM1 联合氟康唑组的菌丝部分恢复，表明 GM1 联合氟康唑抑制白念珠菌菌丝形成的作用与 Ras1/cAMP/PKA 信号通路有关。

水解酶如分泌型天冬氨酸蛋白酶、磷脂酶和脂肪酶是白念珠菌最重要的毒力因子之一^[22]，这些酶的缺失或表达减少可能导致念珠菌的毒力降低^[23]。本研究通过卵黄琼脂培养基测定 GM1 和氟康唑单用及联用对白念珠菌胞外磷脂酶活性的影响，发现 GM1 与氟康唑联用时，白念珠菌的胞外磷脂酶活性显著降低。qRT-PCR 实验结果显示，GM1 联合氟康唑组的胞外磷脂酶活性相关基因 *PLB1* 和分泌型天冬氨酸蛋白酶相关基因 *SAP1*、*SAP2*、*SAP3* 的表达

水平下降,表明 GM1 与氟康唑联用时可以抑制白念珠菌磷脂酶和分泌型天冬氨酸蛋白酶活性,从而发挥抗真菌作用。

综上所述,本研究发现 GM1 协同氟康唑可通过抑制白念珠菌毒力因子而发挥抗真菌作用,为 GM1 的进一步开发以及毒力因子作为潜在药物靶点的临床应用奠定了基础,对治疗白念珠菌感染具有重要的意义,其更深入的作用机制和内在关系有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Nobile C J, Johnson A D. *Candida albicans* biofilms and human disease [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2015, 69: 71-92.
- [2] Pfaller M A, Diekema D J. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20(1): 133-163.
- [3] White T C, Holleman S, Dy F, et al. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(6): 1704-1713.
- [4] Denning D W, Bromley M J. Infectious disease. How to bolster the antifungal pipeline [J]. *Science*, 2015, 347(6229): 1414-1416.
- [5] 徐祥云, 彭君. 五味子科植物化学成分研究进展及其常用分离方法 [J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(6): 2645-2647.
- [6] 黄晓东, 任旷. 五味子木脂素研究进展 [J]. *吉林医药学院学报*, 2010, 31(1): 46-49.
- [7] Ikeya Y, Taguchi H, Yosioka I. The constituents of *Schisandra chinensis* Baill. X. The structures of GAMMA-schizandrin and four new lignans, (-)-gomisins L1 and L2, (+)-gomisin M1 and (+)-gomisin M2 [J]. *Chem Pharm Bull*, 1982, 30(1): 132-139.
- [8] Poornima B, Kumar D A, Siva B, et al. Advanced glycation end-products inhibitors isolated from *Schisandra grandiflora* [J]. *Nat Prod Res*, 2016, 30(4): 493-496.
- [9] Chen M, Kilgore N, Lee K H, et al. Rubrisandrins A and B, lignans and related anti-HIV compounds from *Schisandra rubriflora* [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(12): 1697-1701.
- [10] 尹光美, 苏刘艳, 李俊, 等. 棋盘法和倍比微量稀释法在体外联合抗真菌活性药物筛选中的应用研究 [J]. *云南民族大学学报: 自然科学版*, 2019, 28(3): 246-250.
- [11] Mayer F L, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms [J]. *Virulence*, 2013, 4(2): 119-128.
- [12] Pathakumari B, Liang G, Liu W. Immune defence to invasive fungal infections: A comprehensive review [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130: 110550.
- [13] Höfs S, Mogavero S, Hube B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: Virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota [J]. *J Microbiol*, 2016, 54(3): 149-169.
- [14] Vila T, Romo J A, Pierce C G, et al. Targeting *Candida albicans* filamentation for antifungal drug development [J]. *Virulence*, 2017, 8(2): 150-158.
- [15] Hogan D A, Sundstrom P. The Ras/cAMP/PKA signaling pathway and virulence in *Candida albicans* [J]. *Future Microbiol*, 2009, 4(10): 1263-1270.
- [16] Huang G H, Huang Q, Wei Y J, et al. Multiple roles and diverse regulation of the Ras/cAMP/protein kinase A pathway in *Candida albicans* [J]. *Mol Microbiol*, 2019, 111(1): 6-16.
- [17] Biswas S, van Dijck P, Datta A. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans* [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2007, 71(2): 348-376.
- [18] Grahl N, Demers E G, Lindsay A K, et al. Mitochondrial activity and Cyr1 are key regulators of Ras1 activation of *C. albicans* virulence pathways [J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(8): e1005133.
- [19] Mishra S, Rastogi S K, Singh S, et al. Controlling pathogenesis in *Candida albicans* by targeting Efg1 and glyoxylate pathway through naturally occurring polyphenols [J]. *Mol Biol Rep*, 2019, 46(6): 5805-5820.
- [20] Miwa T, Takagi Y, Shinozaki M, et al. Gpr1, a putative G-protein-coupled receptor, regulates morphogenesis and hypha formation in the pathogenic fungus *Candida albicans* [J]. *Eukaryot Cell*, 2004, 3(4): 919-931.
- [21] Fan Y, He H, Dong Y, et al. Hyphae-specific genes HGC1, ALS3, HWP1, and ECE1 and relevant signaling pathways in *Candida albicans* [J]. *Mycopathologia*, 2013, 176(5/6): 329-335.
- [22] 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.
- [23] Li X, Hou Y, Yue L, et al. Potential targets for antifungal drug discovery based on growth and virulence in *Candida albicans* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(10): 5885-5891.

[责任编辑 李亚楠]