

## 诃子水提取物对球形马拉色菌及其生物被膜的抑制作用

蓝诗华<sup>1</sup>, 吴小诗<sup>1</sup>, 刘嘉鑫<sup>1</sup>, 刘瑞杰<sup>1</sup>, 邓榕榕<sup>1\*</sup>, 沈志滨<sup>1,2,3\*</sup>

1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 广东省化妆品工程技术研究中心, 广东 广州 510006

3. 广东省局部精准药物递药制剂工程技术研究中心, 广东 广州 510006

**摘要:**目的 探究诃子水提取物(water extract of *Terminalia chebula*, TRW)对球形马拉色菌的体外抗菌活性及对生物被膜的抑制作用,并初步探讨其抗菌机制。方法 采用微量稀释法测定TRW对马拉色菌的体外抗菌活性;活菌计数法测定TRW对球形马拉色菌作用的时间-杀菌曲线。通过微板法构建球形马拉色菌生物被膜体外模型,用XTT法测定生物被膜代谢活性;采用活菌计数法和扫描电子显微镜分别检测TRW对球形马拉色菌生物被膜活菌量以及微观形态的影响。采用山梨糖醇保护实验、碘化丙啶(PI)染色分别测定TRW对球形马拉色菌细胞壁和细胞膜的作用影响。结果 TRW对7株马拉色菌的最低抑菌质量浓度为0.90~4.59 mg/mL,其中对TRW敏感性最强的是球形马拉色菌MC14。时间-杀菌曲线结果显示TRW对MC14整个生长周期均有抑制作用。球形马拉色菌MC14生物被膜的初黏附期、聚集期和成熟期分别为0~24 h、24~96 h和96~168 h。TRW可降低MC14各个阶段生物被膜的活菌量,作用效果由强到弱排列为聚集期>黏附期>成熟期;且对MC14各个阶段的生物被膜均有清除作用,可减少MC14生物被膜中的细菌量和胞外基质,破坏生物被膜的结构。TRW可以通过改变细胞壁通透性、破坏细胞膜完整性产生抗菌作用。结论 TRW不仅对糠秕马拉色菌、球形马拉色菌和限制性马拉色菌有较好的体外抗菌效果,而且对球形马拉色菌不同阶段的生物被膜有清除作用,其抗菌机制与影响细胞膜通透性、细胞壁完整性有关,为TRW在新型抗菌药物研究和应用提供了一定的基础理论和依据。

**关键词:**诃子; 抗菌活性; 球形马拉色菌; 生物被膜; 细胞膜通透性

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)08-2480-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.08.015

## Inhibitory effect of water extract of *Terminalia chebula* on *Malassezia globosa* and biofilm

LAN Shi-hua<sup>1</sup>, WU Xiao-shi<sup>1</sup>, LIU Jia-xin<sup>1</sup>, LIU Rui-jie<sup>1</sup>, DENG Rong-rong<sup>1</sup>, SHEN Zhi-bin<sup>1,2,3</sup>

1. School of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Guangdong Provincial Engineering and Technology Research Center of Cosmetics, Guangzhou 510006, China

3. Guangdong Provincial Engineering and Technology Research Center of Topical Precision Drug Delivery System, Guangzhou 510006, China

**Abstract: Objective** To investigate the antibacterial activity and anti-biofilm effect of water extract of *Terminalia chebula* (TRW) against *Malassezia globosa*, and preliminary explored its antibacterial mechanism. **Methods** Microdilution method was used to determine the antibacterial activity of TRW against *Malassezia in vitro*; The time-kill curve of TRW against *M. globosa* was determined by viable count method. An *in vitro* model of *M. globosa* biofilm was constructed by microplate method; The metabolic activity of biofilm was measured by XTT method. The effect of TRW on the number of viable bacteria in biofilm of *M. globosa* and the microscopic morphology of biofilm were detected by means of viable bacteria counting method and scanning electron microscopy. Sorbitol protection test and PI staining were used to determine the effect of TRW on cell wall and membrane of *M. globosa*. **Results** The minimum inhibitory concentration of TRW to seven *Malassezia* strains were ranged from 0.90 to 4.59 mg/mL, and the most

收稿日期: 2023-01-01

基金项目: 国家重点研发计划“中医药现代化”重点专项项目(2018YFC1707100)

作者简介: 蓝诗华, 硕士研究生, 研究方向为中药药效评价与应用。E-mail: 794789858@qq.com

\*通信作者: 沈志滨, 博士, 教授, 从事中药药效物质基础及新药研发研究。E-mail: szb8113@126.com

邓榕榕, 硕士, 从事中药药效物质基础及新药研发研究。E-mail: dengrongrong1009@126.com

sensitive to TRW was *M. globosa* MC14. The results of time-kill curve showed that TRW inhibited the entire growth cycle of MC14. The initial adhesion period, aggregation period and mature period of MC14 biofilm were 0—24 h, 24—96 h and 96—168 h, respectively. TRW could reduce the number of viable bacteria in biofilm at each stage of MC14, and the effect was as following: aggregation stage > adhesion stage > mature period. TRW could clear the biofilm at all stages of MC14, reduce the number of bacteria and extracellular matrix in MC14 biofilm, and destroy the structure of biofilm. TRW could produce antibacterial effect by changing the permeability of cell wall and destroying the integrity of cell membrane. **Conclusion** TRW not only has a good antibacterial effect on *M. furfur*, *M. globosa* and *M. restricta* *in vitro*, but also can remove the biofilm of *M. globosa* at different stages. Its antibacterial mechanism is related to the influence on cell membrane permeability and cell wall integrity, which provides a certain basic theory and basis for the research and application of TRW in new antibacterial drugs.

**Key words:** *Terminalia chebula* Retz.; antifungal activity; *Malassezia globosa*; biofilm; cell membrane permeability

头皮屑亦被称为轻型脂溢性皮炎，头皮微生态失衡与其发病原因密切相关，其中马拉色菌为主要致病真菌<sup>[1-2]</sup>。研究显示，在头皮屑/脂溢性皮炎患者头皮中分离出球形马拉色菌 *Malassezia globosa*、限制性马拉色菌 *M. restricta* 和糠秕马拉色菌 *M. furfur* 的定植率分别为 36.2%、31.3%、15.7%<sup>[3]</sup>。为了抑制致病菌，对真菌有显著抑制或杀灭作用的吡啶硫酮锌（zinc pyrithione, ZPT）在日化领域被广泛应用。但长期使用 ZPT 会对皮肤产生毒性，且反复使用易导致耐药<sup>[4-5]</sup>。ZPT 已被欧盟委员会移入化妆品禁用物质清单。因此，日化领域急需找到能替代 ZPT 的天然无毒、无耐药性的抗菌添加剂。国内外研究表明，球形马拉色菌等会在头皮表面定植并形成生物被膜，真菌生物被膜的形成会大大增加其对抗菌剂的耐药性<sup>[6-7]</sup>。

本课题组前期探讨了 30 种中药提取物对限制性马拉色菌的抗菌活性，发现诃子提取物对其具有显著的抗菌活性<sup>[8-9]</sup>。诃子 *Terminalia chebular* Retz. 是使君子科榄仁树属的干燥成熟果实，属于藏药的基础药物，被视为“药中之王”，临床药理研究表明诃子具有抗菌、抗过敏等作用<sup>[10-12]</sup>。但目前尚未有诃子对马拉色菌抗生物被膜形成作用和抗菌机制的相关报道。因此，本研究继续深入探讨诃子提取物对球形马拉色菌、糠秕马拉色菌、限制性马拉色菌的体外药敏作用，并进一步构建球形马拉色菌不同阶段的生物被膜，探究诃子水提物对球形马拉色菌生物被膜形成的作用及其抗菌机制。以期诃子在预防和治疗马拉色菌生物被膜相关耐药性感染的药物研发和在日化领域中的应用提供有价值的理论基础。

## 1 材料

### 1.1 菌株

球形马拉色菌临床株 MC14 和糠秕马拉色菌临床株 Y17d、Y19a、Y19b 以及标准株 Y17c、Y17e

均购自中国医学科学院皮肤研究所。限制性马拉色菌标准株 CICC 33081 购自中国工业微生物菌种保藏中心。

### 1.2 药材

诃子（产地云南，批号 181120）购自北京同仁堂，经广东药科大学严寒静教授鉴定为君子科植物诃子 *T. chebular* Retz. 的干燥成熟果实。

### 1.3 药品与试剂

改良 Dixon 培养基（批号 20190401）购自海博生物技术有限公司；对照品诃黎勒酸（质量分数 > 95%，批号 PS1730-0010MG）购自成都普思生物科技股份有限公司；ZPT（质量分数为 96%，批号 C10319727）；酮康唑（质量分数 ≥ 98%，批号 C10097279）购自上海麦克林生化科技有限公司；XTT（批号 CX30182035）购自北京酷来搏科技有限公司；结晶紫（批号 20181202）购自美国 Amresco 公司；山梨糖醇（批号 C11391323）购自上海麦克林生化科技有限公司；碘化丙啶（PI）细胞凋亡试剂盒（批号 20201118）购自江苏凯基生物技术股份有限公司。

### 1.4 仪器

JSM-7610F 型 Plus 场发射扫描电子显微镜（SEM，日本电子株式会社）；iMark 酶标仪（美国 Bio-Rad 公司）；DHP-9032B 型电热恒温培养箱（上海一恒科学仪器有限公司）；Lab-1A-80E 型冷冻干燥机（北京博医康实验仪器有限公司）。

## 2 方法

### 2.1 样品制备

**2.1.1 诃子水提物和醇提物制备** 干燥诃子果肉粉碎后过 80 目筛，准确称取 50 g，加溶剂提取 2 次，第 1 次加入 10 倍量水或 95%乙醇提取 1.5 h，第 2 次加入 8 倍量水或 95%乙醇提取 1 h；分别合并 2 次滤液，浓缩冷冻干燥，置于 4 °C 冰箱备用。经测

定,诃子水提取物冻干粉的生药量为 1.53 g/g,其中含诃黎勒酸以生药量计 54.47  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ;诃子醇提取物冻干粉的生药量为 3.01 g/g,其中含诃黎勒酸以生药量计 83.68  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。

**2.1.2 药液制备** 诃子水提取物与诃子醇提取物冻干粉,分别用二甲基亚砷溶解配制成质量浓度为 600 mg/mL 的药物贮备液。ZPT 和酮康唑分别用二甲基亚砷溶解配制成质量浓度为 10 mg/mL 的药物贮备液,备用。

**2.1.3 菌悬液制备** 将受试菌菌液分别活化培养至对数生长期时,挑取单菌落接种于改良 Dixon 液体培养基中,于 220 r/min 摇床中 32  $^{\circ}\text{C}$  恒温孵育 48 h。采用菌液倍比稀释法配成终浓度为  $1 \times 10^6$  CFU/mL 菌液,作为实验菌悬液。

## 2.2 诃子提取物对马拉色菌体外抑菌活性测定

**2.2.1 最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 和最低杀菌浓度 (minimal fungicidal concentration, MFC) 的测定** 参照美国临床实验室标准化协会 (CLSI) 制定的 M27-A4 方案的微量稀释法测定马拉色菌的 MIC 和 MFC<sup>[13]</sup>。在无菌 96 孔板中加入药物,稀释质量浓度为 0.023~12.000 mg/mL (即诃子水提取物含生药量 0.04~18.36 mg/mL、诃子醇提取物含生药量 0.07~36.12 mg/mL),再加入“2.1.3”项下所制菌悬液混合,同时设置生长对照孔和空白对照孔。置于恒温培养箱中 32  $^{\circ}\text{C}$  恒温孵育 7 d。肉眼观察无菌生长的各孔中,浓度最低者即为 MIC。吸取无菌生长所在孔的培养液 10  $\mu\text{L}$  接种于固体培养基上,32  $^{\circ}\text{C}$  恒温孵育 7 d 后无菌落生长的最低药物浓度即为 MFC。

**2.2.2 时间-杀菌曲线** 将诃子水提取物组和 ZPT 组分别设置 3 个反应浓度 (1/2 MIC、MIC 和 2 MIC),与菌液混匀,同时设置生长对照组,32  $^{\circ}\text{C}$  下恒温振荡培养。各组每隔 2 h 取培养液合理稀释后,取 20  $\mu\text{L}$  均匀涂布在固体培养基上,32  $^{\circ}\text{C}$  孵育 18~24 h 后计算菌落数。根据实验结果,以时间为横坐标,lg 活菌量为纵坐标绘制时间-杀菌曲线<sup>[14]</sup>。

## 2.3 诃子水提取物抗球形马拉色菌生物被膜活性的测定

**2.3.1 XTT 法检测球形马拉色菌生物被膜体外模型的建立** 将 MC14 菌液接种至平底 96 孔板中,于 32  $^{\circ}\text{C}$  分别培养 0、12、24、48、72、96、120、144、168 h,以改良 Dixon 培养基作空白对照组。在相应的时间段,弃去培养基后用 PBS 冲洗,每孔

加入 100  $\mu\text{L}$  的 XTT 工作液 (现配现用),37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 2 h,取 100  $\mu\text{L}$  用酶标仪检测 490 nm 处的吸光度 ( $A$ ) 值,以时间为横坐标, $A_{490}$  为纵坐标,绘制生物被膜内真菌生长曲线。

**2.3.2 活菌计数法测定药物对生物被膜活菌量的影响** 根据“2.3.1”项下生物被膜体外模型建立结果,确定黏附期、聚集期、成熟期的生物被膜并建立后,用 PBS 漂洗;分别加入 5 个梯度浓度药物 200  $\mu\text{L}$  (1/2~8 MIC 的诃子水提取物和 ZPT)。生长对照组只加空白培养基,32  $^{\circ}\text{C}$  培养 5 d,吸弃培养基和药液,PBS 漂洗,用作后续测定。

生物被膜用药物处理后,用无菌生理盐水稀释后取 100  $\mu\text{L}$  在固体培养基上均匀涂布,分别放置在 32  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 5 d 后,观察并计算平板上菌落数目,以 lg 活菌量推算出每毫升菌液的活菌数。

**2.3.3 SEM 观察药物对不同阶段生物被膜的微观形态结构** 将  $1 \times 10^6$  CFU/mL 的 MC14 菌液接种至放置有细胞爬片的 48 孔板中,分别培养 24、96、168 h 后,用 PBS 漂洗;分别加入 5 个梯度浓度药物 200  $\mu\text{L}$  (1/2~8 MIC 的诃子水提取物和 ZPT)。生长对照组只加空白培养基,32  $^{\circ}\text{C}$  培养 5 d,吸弃培养基和药液,取出爬片,用 PBS 漂洗;加入 2.5%戊二醛固定液于 4  $^{\circ}\text{C}$  固定过夜;随后使用系列梯度乙醇对样品进行梯度洗脱,最后以 100%叔丁醇置换乙醇。室温挥干,喷金进行 SEM 观察<sup>[15]</sup>。

## 2.4 诃子水提取物抗马拉色菌机制的研究

**2.4.1 诃子水提取物对球形马拉色菌 MC14 细胞壁通透性的影响** 在 96 孔板中加入药物倍比稀释液 (诃子水提取物终质量浓度为 0.035~18.360 mg/mL、ZPT 终质量浓度为 0.19~100.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 各 100  $\mu\text{L}$ ,山梨糖醇组加 50  $\mu\text{L}$  山梨糖醇溶液 (终浓度为 0.8 mol/L),并设置无山梨糖醇对照,随后加入菌液,同时设置阴性对照和生长对照。于 32  $^{\circ}\text{C}$  静置孵育,读取 MIC 值时,没有可见真菌生长的孔对应的浓度为 MIC 值,实验重复 3 次。

**2.4.2 诃子水提取物对球形马拉色菌 MC14 细胞膜完整性的影响** 取 1 mL 菌液与 1 mL 终浓度分别为 0、1/2 MIC、MIC、2 MIC 的诃子水提取物和阳性对照药 ZPT 于 12 孔板中混合,32  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 24 h 后取出离心收集菌体并用 PBS 洗涤,每 95  $\mu\text{L}$  悬液中加入 5  $\mu\text{L}$  碘化丙啶 (PI) 染液,4  $^{\circ}\text{C}$  避光染色 5 min,滴加于载玻片上,用激发波长和发射波长分别为 536 nm 和 617 nm 的绿色荧光显微镜观察并拍照。

## 2.5 统计学分析

所有实验数据均在相同的条件下重复3次，数据分析采用 graphpad 14.0 统计学软件，计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示，两组之间比较采用独立样本 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

## 3 结果

### 3.1 诃子提取物对马拉色菌体外抑菌活性测定

3.1.1 诃子提取物对马拉色菌 MIC 和 MFC 的测定如表 1 所示，诃子水提取物、诃子醇提取物和 ZPT 对马

拉色菌的 MIC 分别为 0.90~4.59 mg/mL、2.09~18.06 mg/mL 和 0.95~3.12  $\mu\text{g/mL}$ ；MFC 分别为 3.03~60.2 mg/mL、2.09~18.06 mg/mL 和 1.30~5.72  $\mu\text{g/mL}$ 。表明诃子水提取物和醇提取物对 7 株马拉色菌均具有良好的抗菌作用，其中球形马拉色菌 MC14 对诃子水提取物和醇提取物的敏感性最强，且诃子水提取物 MIC 值 ( $0.90 \pm 0.59$ ) mg/mL < 诃子醇提取物 MIC 值 ( $2.09 \pm 0.85$ ) mg/mL，ZPT MIC 值 ( $0.97 \pm 0.47$ )  $\mu\text{g/mL}$  < 酮康唑 MIC 值 ( $4.29 \pm 2.03$ )  $\mu\text{g/mL}$ 。

表 1 诃子对马拉色菌的 MIC 和 MFC ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 1 MIC and MFC of *T. chebular* against *Malassezia* ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

菌株编号	菌种	诃子水提取物/(mg·mL <sup>-1</sup> )		诃子醇提取物/(mg·mL <sup>-1</sup> )		ZPT/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )		酮康唑/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	
		MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
MR	限制性马拉色菌	1.12 ± 0.64	6.25 ± 1.63	3.94 ± 2.52	31.01 ± 7.17	0.95 ± 0.30	2.62 ± 1.13	0.63 ± 0.54	4.22 ± 1.35
MC14	球形马拉色菌	0.90 ± 0.59	3.03 ± 1.04	2.09 ± 0.85	6.01 ± 2.13	0.97 ± 0.47	2.21 ± 1.28	4.29 ± 2.03	10.41 ± 3.68
Y17c	糠秕马拉色菌	4.53 ± 3.17	9.18 ± 4.59	12.04 ± 4.25	26.08 ± 10.08	1.30 ± 0.36	1.30 ± 0.36	2.76 ± 1.18	3.41 ± 1.09
Y17d	糠秕马拉色菌	4.59 ± 0.00	36.72 ± 0.00	12.04 ± 4.25	72.24 ± 0.00	3.12 ± 0.00	5.72 ± 3.33	145.83 ± 77.95	187.50 ± 62.50
Y17e	糠秕马拉色菌	4.59 ± 0.00	36.72 ± 8.65	15.05 ± 4.25	60.20 ± 17.02	2.08 ± 0.73	2.60 ± 0.73	1.95 ± 0.00	1.95 ± 0.00
Y19a	糠秕马拉色菌	4.59 ± 0.00	22.95 ± 10.26	15.05 ± 4.25	42.14 ± 22.52	1.56 ± 0.00	2.60 ± 0.73	2.92 ± 0.97	4.22 ± 1.75
Y19b	糠秕马拉色菌	4.59 ± 0.00	36.72 ± 6.84	18.06 ± 0.00	48.16 ± 17.02	1.56 ± 0.00	2.34 ± 0.78	4.87 ± 2.18	4.87 ± 2.18

由此可知，诃子水提取物和 ZPT 对球形马拉色菌 MC14 的敏感性优于其他菌株，因此，后续实验药物均采用诃子水提取物，阳性对照药物选用 ZPT。

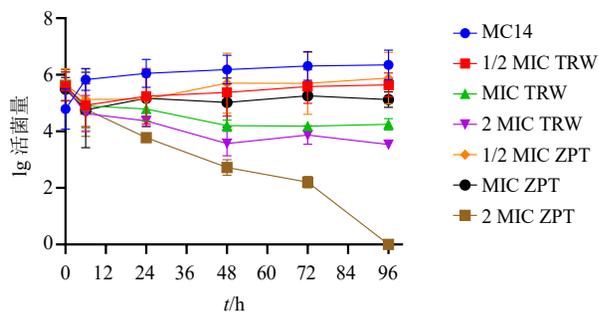
3.1.2 时间-杀菌曲线 根据体外抗菌活性的筛选结果，选球形马拉色菌 MC14 作为杀菌曲线的实验受试菌。如图 1 所示，MC14 在 24~72 h 达到对数生长期，72~96 h 达到稳定生长期。给药组中 lg 活菌量下降 1~2 CFU/mL 时判定为具有抑菌活性，lg 活菌量下降  $\geq 3$  CFU/mL 时判定为具有杀菌活性<sup>[6]</sup>。因此，1/2 MIC、MIC 的诃子水提取物作用 24、72、96 h

时显示为抑菌作用 (0.31~2.73 CFU/mL)，2 MIC 的诃子水提取物作用 72、96 h 时显示为杀菌作用 (3.28、3.41 CFU/mL)，1/2 MIC、MIC 的 ZPT 作用 24、72、96 h 时显示为抑菌作用 (0.03~2.02 CFU/mL)，2 MIC 的 ZPT 作用 72、96 h 时显示为杀菌作用 (4.42、6.87 CFU/mL)，其作用效果呈现剂量相关性。与生长对照组相比，诃子水提取物对球形马拉色菌 MC14 的对数生长期和稳定生长期均具抑制作用，且在整个作用时期，1/2 MIC 和 MIC 的诃子水提取物作用效果与 ZPT 相当。

### 3.2 诃子水提取物对球形马拉色菌不同阶段生物被膜的影响

3.2.1 XTT 法检测生物被膜代谢活性 通过 XTT 实验来测定不同时间段球形马拉色菌 MC14 生物被膜代谢活性，由此对生物被膜中活菌量进行定量，从而绘制生物被膜内细菌生长曲线，如图 2 所示，MC14 生物膜基质生长曲线主要分为 3 个阶段：黏附阶段 (0~48 h)，活菌量略有增加，表明菌开始少量聚集并黏附在表面；聚集生长阶段 (48~120 h)，活菌量斜率比初黏附阶段高，此时菌开始大量聚集并黏附；成熟阶段 (120~168 h)，生物被膜内活菌量基本保持不变。

3.2.2 活菌计数法测定药物对不同阶段生物被膜活菌量的影响 如图 3 所示，在 MC14 生物被膜黏附



MC14-生长对照组 TRW-诃子水提取物组 ZPT-吡啶硫酮锌组，下图同

MC14-control group TRW-water extract of *T. chebular* group ZPT-zinc pyrithione group, same as below figures

图 1 诃子水提取物对球形马拉色菌 MC14 的时间-杀菌曲线  
Fig. 1 Time-kill growth curves of water extract of *T. chebular* to *M. globosa* MC14

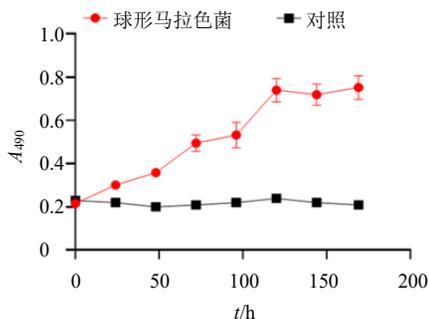


图2 生物被膜内活菌量的生长曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 2 Growth curve of viable biomass in biofilm ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

期 (24 h)、聚集期 (96 h) 和成熟期 (168 h), 与生长对照组相比, 诃子水提取物能降低 MC14 生物被膜内活菌量 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 且呈剂量相关性, 5 个质量浓度的诃子水提取物在黏附、聚集和成熟期生物被膜活菌量分别减少 21.89%~51.62%、4.37%~46.93%

和 16.74%~48.93%, 作用效果依次为黏附期 > 成熟期 > 聚集期, 且 1/2~8 MIC 剂量下的诃子水提取物对黏附期与聚集期的生物被膜活菌量减少与阳性对照 ZPT 作用效果相当, 成熟期时 1/2~2 MIC 的诃子水提取物对生物被膜活菌量减少与相应浓度的 ZPT 作用效果相当。

**3.2.3 SEM 观察药物对不同阶段生物被膜微观形态结构的影响** 诃子水提取物和阳性药 ZPT 对球形马拉色菌 MC14 生物被膜在黏附期 (24 h)、聚集期 (96 h) 和成熟期 (168 h) 的部分微观形态分别见图 4~6。

诃子水提取物的作用效果黏附期 > 成熟期 > 聚集期, 诃子水提取物对 MC14 生物被膜的作用呈剂量相关性。黏附期时, 诃子水提取物从 1/2 MIC 即发挥效用, 随着药物浓度的增加, 细胞数量依次减少, 胞外聚合物的分泌减少, 可见细胞从凹陷到破裂皱缩

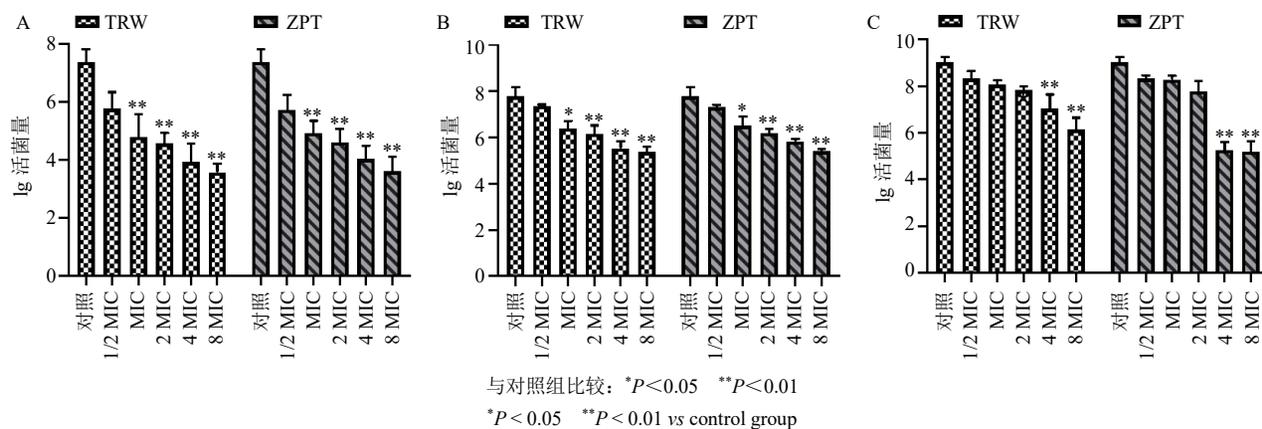


图3 诃子水提取物对黏附期 (A)、聚集期 (B) 和成熟期 (C) 生物被膜中活菌量的影响

Fig. 3 Effect of water extract of *T. chebular* on viable count in biofilm at adhesion period (A), aggregation period (B) and maturity period (C)

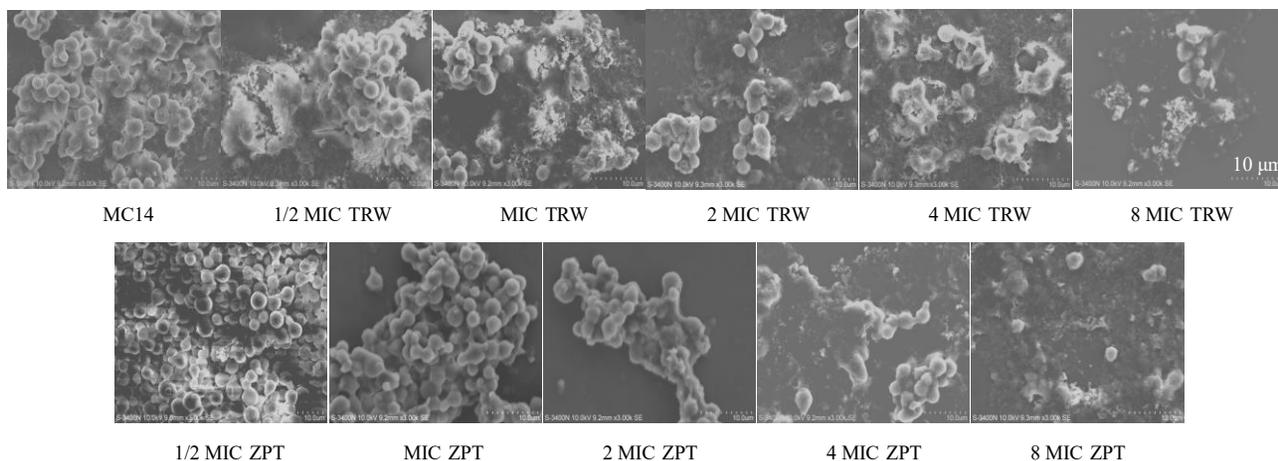


图4 诃子水提取物对球形马拉色菌生物被膜黏附期的清除作用 ( $\times 3000$ )

Fig. 4 Scavenging effect of water extract of *T. chebular* on *M. globosa* biofilm at adhesion period ( $\times 3000$ )

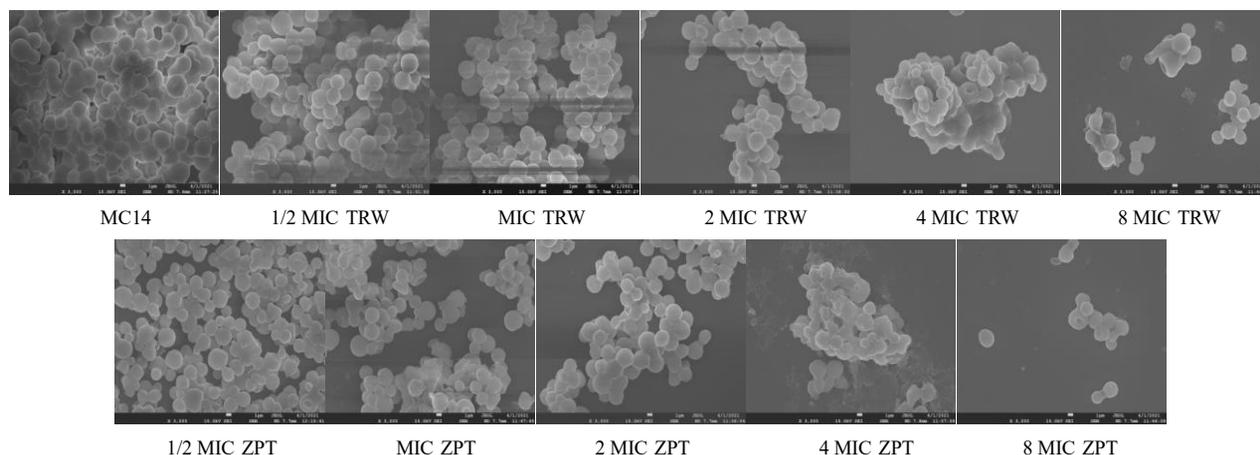


图 5 诃子水提取物对球形马拉色菌生物被膜聚集期的清除作用 (×3000)

Fig. 5 Scavenging effect of water extract of *T. chebular* on *M. globosa* biofilm at aggregation period (× 3000)

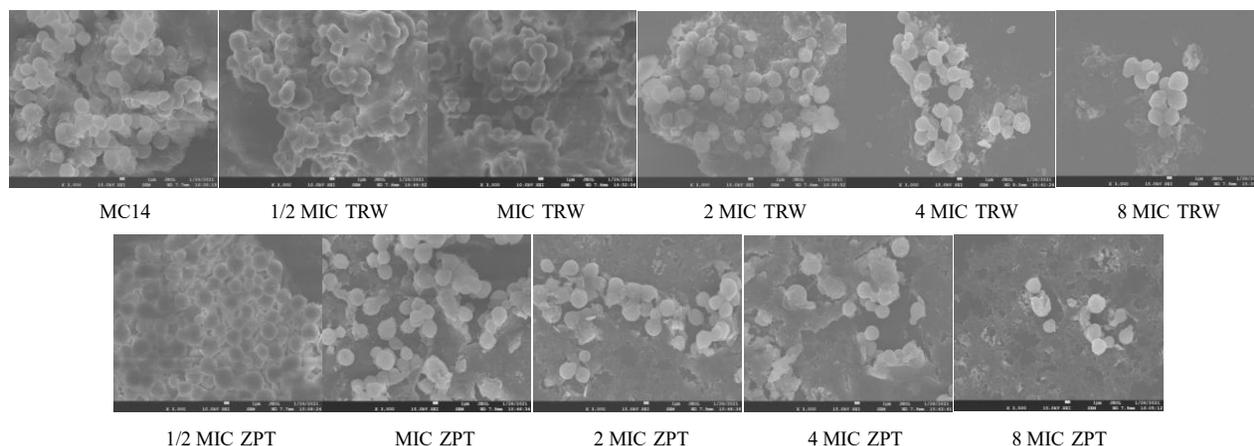


图 6 诃子水提取物对球形马拉色菌生物被膜成熟期的清除作用 (×3000)

Fig. 6 Scavenging effect of water extract of *T. chebular* on *M. globosa* biofilm at maturation period (× 3000)

变形, 生物被膜被严重破坏。聚集期时, 4 MIC 的诃子水提取物作用后, 生物被膜结构分布相对松散, 出现明显的细胞破裂内容物泄漏。8 MIC 的诃子水提取物作用后, 细胞数量显著下降, 细胞形态被破坏, 生物被膜结构分布松散。成熟期时, 随 2~8 MIC 的诃子水提取物浓度增加, 细胞数量逐渐减少, 胞外聚合物大部分消失且细胞变形, 生物被膜明显被破坏。阳性对照 ZPT, 随药物浓度增加菌体散在分布越发明显, 胞外聚合物减少生物被膜被破坏。SEM 结果表明诃子水提取物和 ZPT 对生物被膜黏附期、聚集期和成熟期的清除作用无明显差异。

### 3.3 诃子水提取物抗马拉色菌机制的研究

**3.3.1 诃子水提取物对球形马拉色菌 MC14 细胞壁通透性的影响** 含有山梨醇的生长对照组培养孔菌落生长状态良好, 说明山梨糖醇对球形马拉色菌的正常生长没有影响。如表 2 所示, 山梨糖醇的加入, 能显著提高诃子水提取物和 ZPT 对球形马拉色菌的

表 2 山梨糖醇对抗真菌剂作用于球形马拉色菌 MIC 值的影响

Table 2 Effect of sorbitol on MIC of antifungal agents against *M. globosa*

药物	MIC	
	含山梨糖醇	无山梨糖醇
诃子水提取物	2.002 5 mg·mL <sup>-1</sup>	1.000 0 mg·mL <sup>-1</sup>
ZPT	2.340 0 μg·mL <sup>-1</sup>	1.365 0 μg·mL <sup>-1</sup>

MIC 值。说明通过细胞壁通透性的影响是诃子水提取物可能的抗真菌机制之一。

**3.3.2 诃子水提取物对球形马拉色菌 MC14 细胞膜完整性的影响** 荧光染料 PI 能穿过破损的细胞膜而对核染色, 因此可通过荧光显微镜观察 DNA 染色量的多少来判断药物对细胞膜完整性的影响。如图 7 所示, 诃子水提取物和 ZPT 分别与 MC14 作用 24 h 后, 生长对照组在 PI 荧光染色下只有微弱的红色, 说明细胞膜的完整性较好, 99% 的细胞仍具活性。通过荧光显微镜观察可知, 随诃子水提取物和 ZPT 浓

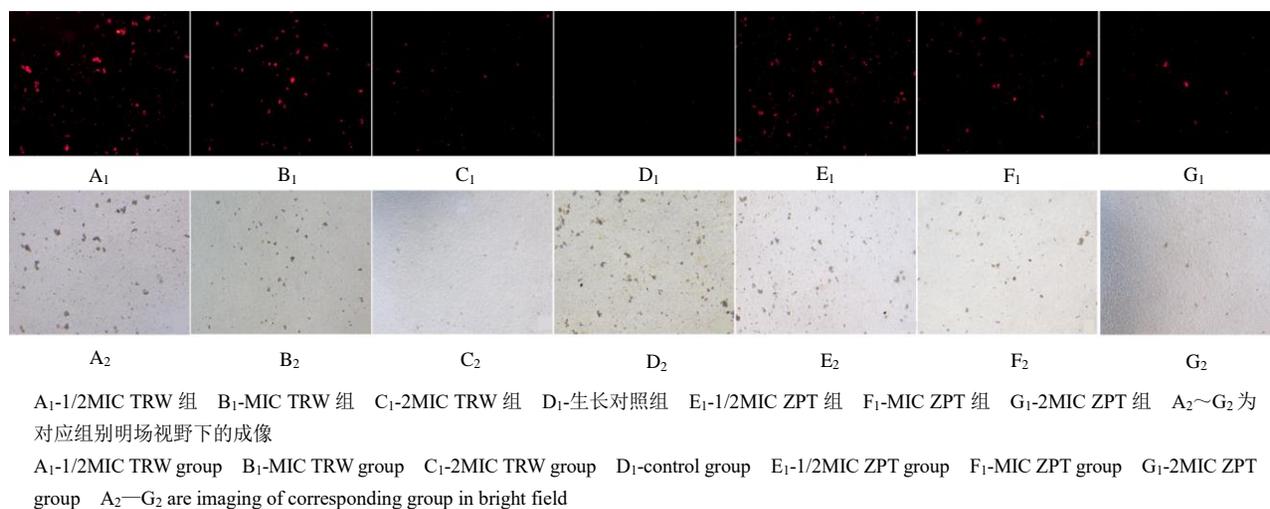


图 7 诃子水提取物对球形马拉色菌细胞膜通透性的影响 ( $\times 100$ )

Fig. 7 Effect of water extract of *T. chebular* on cell membrane integrity of *M. globosa* ( $\times 100$ )

度的增加红色荧光的强度逐渐减弱, 1/2 MIC 药物组 MC14 产生红色荧光最多且最强。由此推测诃子水提取物和 ZPT 可以通过破坏细胞膜的完整性来抑制或杀灭细胞。

#### 4 讨论

生物被膜的形成会使得抗菌治疗或宿主免疫反应的清除变得异常顽固。近些年从天然产物中发现了许多生物被膜抑制剂如粉防己碱、厚朴酚等<sup>[17]</sup>。诃子作为天然藏药, 除了具有抗菌作用外, 通过本研究还发现其对球形马拉色菌的生物被膜有显著的清除作用, 真菌生物被膜抑制剂的发现和开发正为治疗与生物被膜相关的耐药性感染提供了机会。

生物被膜的形成过程与真菌耐药程度密切相关, 形成时间越长对药物的耐受性越强。真菌的生物被膜形成过程主要有黏附期、聚集期和成熟期<sup>[18]</sup>。本研究通过 XTT 法验证成功建立了球形马拉色菌黏附、聚集和成熟期的体外生物被膜模型, 进而采用活菌计数法和 SEM 观察发现诃子水提取物可以减少 MC14 黏附期、聚集期和成熟期的生物被膜的活菌量、胞外基质, 破坏生物被膜的形态结构; 以此共同验证了诃子水提取物对球形马拉色菌不同生长阶段的生物被膜均具有良好的清除作用, 同时与阳性对照 ZPT 相比, 作用效果相当。此外, 诃子水提取物对形成时间较长的成熟生物被膜仍表现出显著的清除作用, 提示其可以有效降低真菌对药物的耐受性。

完整的细胞结构对菌体生长代谢具有重要的意义, 细胞膜与细胞壁已成为抗真菌剂筛选的理想靶

标。一旦细胞膜被破坏, 细胞内容物包括大分子物质 DNA、RNA 和大分子蛋白等发生外泄, 通过 DNA 的泄露情况可反映细胞膜的完整性状况<sup>[19]</sup>。本研究结果表明, 经诃子水提取物处理后, 受试菌株 DNA 的泄露量明显增加, 说明其细胞膜完整性被破坏。其中, 随药物浓度增加, 受试菌株 DNA 泄露量反而降低的现象, 推测由于细胞受到外界胁迫时, 会上调相关基因表达以抵抗不利环境; 药物浓度越高, 环境越不利, 细胞的抵抗机制越被激发, 进而细胞泄露物反而越少<sup>[20-21]</sup>, 有关此现象, 拟后续进一步探讨。

完整的真菌细胞壁通过控制细胞内的膨胀压力以维持菌体的完整性, 若细胞壁通透性被破坏, 没有渗透压保护将直接导致真菌死亡。山梨糖醇作为真菌细胞壁的渗透保护剂, 其保护作用可以使真菌在细胞壁抑制剂存在的情况下生长, 若缺乏则真菌生长会受到抑制, 常被用来测试药物是否作用于真菌的细胞壁<sup>[22]</sup>。加入真菌细胞壁保护剂的 MC14 经诃子水提取物给药后 MIC 值增大, 说明诃子水提取物会改变 MC14 细胞壁通透性。提示诃子水提取物发挥抗真菌作用的机制与其破坏真菌细胞膜完整性和改变细胞壁通透性有关。

本研究发现, 诃子水提取物对球形马拉色菌、限制性马拉色菌、糠秕马拉色菌均有良好的体外抗菌活性, 对球形马拉色菌不同生长阶段的生物被膜均具有显著的清除作用。此外, 诃子水提取物对供试菌的作用效果与阳性药 ZPT 相当, 说明天然的诃子水提取物具有替代 ZPT 的潜力。本研究为将诃子水提取物开发成一种新型真菌生物被膜抑制剂提供了理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 王丽, 周起, 朱雅新, 等. 头皮微生物多样性与去屑活性成分研究进展 [J]. 微生物学通报, 2019, 46(10): 2772-2780.
- [2] 瞿玉沙, 汤小芹, 陈明华. 头皮屑的发生机制及去屑方法的研究进展 [J]. 广东化工, 2020, 47(17): 97-99.
- [3] Honnavar P, Chakrabarti A, Dhaliwal M, et al. Sociodemographic characteristics and spectrum of *Malassezia* species in individuals with and without seborrheic dermatitis/dandruff: A comparison of residents of the urban and rural populations [J]. *Med Mycol*, 2021, 59(3): 259-265.
- [4] Rudolf E, Cervinka M. Stress responses of human dermal fibroblasts exposed to zinc pyrithione [J]. *Toxicol Lett*, 2011, 204(2/3): 164-173.
- [5] Schwartz J R. Zinc pyrithione: A topical antimicrobial with complex pharmaceuticals [J]. *J Drugs Dermatol*, 2016, 15(2): 140-144.
- [6] Angiolella L, Rojas F, Mussin J, et al. Biofilm formation, adherence, and hydrophobicity of *M. sympodialis*, *M. globosa*, and *M. slooffiae* from clinical isolates and normal skin virulence factors of *M. sympodialis*, *M. globosa* and *M. slooffiae* [J]. *Med Mycol*, 2020, 58(8): 1162-1168.
- [7] Figueredo L A, Cafarchia C, Otranto D. Antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* biofilm [J]. *Med Mycol*, 2013, 51(8): 863-867.
- [8] 潘敬灵, 梁玉婷, 刘小赞, 等. 具有抗限制性马拉色菌活性中药的筛选及其活性成分初步研究 [J]. 中国皮肤性病杂志, 2020, 34(7): 759-764.
- [9] 吴小诗, 潘敬灵, 邓榕榕, 等. 诃子水提物体内外抗菌作用及止痒效果研究 [J]. 日用化学工业, 2021, 51(2): 127-131.
- [10] 张媛媛, 曾慧婷, 袁源见, 等. 藏药诃子的化学成分与药理活性研究进展 [J]. 中国药房, 2018, 29(14): 2002-2006.
- [11] 赵鹿, 廖翠萍, 杨秀娟, 等. 诃子的研究进展及质量标志物的预测 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2732-2744.
- [12] 向丽, 周铁军, 叶迎春, 等. 诃子鞣质对白色念珠菌及其生物被膜的影响 [J]. 重庆医学, 2013, 42(2): 134-137.
- [13] CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 4th ed. CLSI standard M27 [S]. 2017: 14.
- [14] 陈学情, 蒋家璇, 任志鸿, 等. 纳米银的抗菌特性及对多重耐药菌株的抗菌作用 [J]. 微生物学报, 2017, 57(4): 539-549.
- [15] 蔡芝玲, 莫梓童, 郑诗倩, 等. 黄绵马酸 BB 联合红霉素抑制表皮葡萄球菌及其生物被膜的形成研究 [J]. 中草药, 2022, 53(8): 2417-2427.
- [16] Skariyachan S, Muddebhalkar A G, Badrinath V, et al. Natural epiestriol-16 act as potential lead molecule against prospective molecular targets of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*-Insight from *in silico* modelling and *in vitro* investigations [J]. *Infect Genet Evol*, 2020, 82: 104314.
- [17] Wu S C, Wang Y, Liu N, et al. Tackling fungal resistance by biofilm inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2017, 60(6): 2193-2211.
- [18] Gulati M, Nobile C J. *Candida albicans* biofilms: Development, regulation, and molecular mechanisms [J]. *Microbes Infect*, 2016, 18(5): 310-321.
- [19] 王硕, 陶大勇, 美合日古丽·阿卜杜热西提, 等. 盐穗木正丁醇萃取物对金黄色葡萄球菌抑菌作用的机制 [J]. 动物医学进展, 2019, 40(9): 44-47.
- [20] 关鹏, 冻梓杰, 贺舒佳, 等. 低温对不同抗性金黄色葡萄球菌细胞膜完整性及相关基因表达的影响 [J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(19): 16-22.
- [21] Mak S, Xu Y, Nodwell J R. The expression of antibiotic resistance genes in antibiotic-producing bacteria [J]. *Mol Microbiol*, 2014, 93(3): 391-402.
- [22] Frost D J, Brandt K D, Cugier D, et al. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly [J]. *J Antibiot*, 1995, 48(4): 306-310.

[责任编辑 李亚楠]