

牛至挥发油体内外抗白色念珠菌的活性与机制研究

黄小英, 高蓓蓓, 肖佳欢, 董 伟, 丁潇滢, 杨 明, 梁新丽*

江西中医药大学, 江西 南昌 330004

摘要: **目的** 研究牛至挥发油 (*Origanum vulgare* volatile oil, OVO) 抗外阴阴道念珠菌病 (vulvovaginal candidiasis, VVC) 的作用及机制。**方法** 体外实验评价 OVO 对白色念珠菌的抑菌效果。建立 VVC 小鼠模型, 给予 OVO 干预后, 检测小鼠阴道灌洗液中炎症因子含量, 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色、PAS 染色及扫描电镜观察阴道组织的病理变化, Western blotting 检测阴道组织 Dectin-1 信号通路相关蛋白的表达情况。**结果** 在体外抑菌实验中, OVO 对白色念珠菌的抑菌圈直径为 (24 ± 2) mm, 最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 为 1.95 mg/mL; OVO 明显抑制了白色念珠菌的生物膜形成、疏水性及黏附性 ($P < 0.05, 0.01$)。在动物实验中, 与模型组比较, OVO 组小鼠阴道冲洗液中菌落数和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-17、IL-22 含量显著减少 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 阴道组织上皮角化、炎细胞浸润及真菌负荷量明显减少, 阴道组织中树突状细胞相关性 C 型凝集素-1 (dendritic cell-associated C-type lectin 1, Dectin-1)、脾酪氨酸激酶 (spleen tyrosine kinase, Syk)、磷脂酶-C γ 2 (phospholipase-C γ 2, PLC γ -2)、胱天蛋白酶募集域蛋白 9 (caspase-associated recruitment domain-containing protein 9, CARD9)、磷酸化核因子- κ B p65 (phosphorylated nuclear factor- κ B p65, p-NF- κ B p65) 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05, 0.01$)。**结论** OVO 可能通过抑制小鼠阴道组织中的炎症反应来改善 VVC, 并有望成为治疗 VVC 感染的潜在候选药物。

关键词: 白色念珠菌; 牛至挥发油; 外阴阴道念珠菌病; 抗炎; 3-甲基-4-异丙基酚

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)12-4045-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.12.012

Activity and mechanism of *Origanum vulgare* volatile oil against *Candida albicans* in vitro and in vivo

HUANG Xiaoying, GAO Beibei, XIAO Jiahuan, DONG Wei, DING Xiaoying, YANG Ming, LIANG Xinli

Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of *Origanum vulgare* volatile oil (OVO) against vulvovaginal candidiasis (VVC). **Methods** *In vitro* experiments were conducted to evaluate the antibacterial effect of OVO against *Candida albicans*. A VVC mice model was established, after given with OVO, the contents of inflammatory factors in vaginal lavage fluid were measured. Hematoxylin-eosin (HE) staining, PAS staining and scanning electron microscopy were used to observe the pathological changes in vaginal tissues. Western blotting was performed to detect the expressions of Dectin-1 signaling pathway related proteins. **Results** In the *in vitro* antibacterial experiment, the inhibitory zone diameter of OVO against *C. albicans* was (24 ± 2) mm, and minimum inhibitory concentration (MIC) was 1.95 mg/mL. OVO significantly inhibited the biofilm formation, hydrophobicity and adhesion of *C. albicans* ($P < 0.05, 0.01$). In the animal experiment, compared with model group, the colony count and levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-17, IL-22 in vaginal lavage fluid of mice in OVO group were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), the epithelial keratinization, inflammatory cell infiltration and fungal load in vaginal tissue were significantly reduced, dendritic cell-associated C-type lectin 1 (Dectin-1), spleen tyrosine kinase (Syk), phospholipase-C γ 2 (PLC γ -2), caspase-associated recruitment domain-containing protein 9 (CARD9) and phosphorylated nuclear factor- κ B p65 (p-NF- κ B p65) protein expressions were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** OVO may improve VVC by inhibiting the inflammatory response in vaginal tissue of mice,

收稿日期: 2024-01-01

基金项目: 江西省科技厅科学技术研究项目 (GJJ2200960); 大学生校级创新创业项目 (X202310412210, X202310412252); 中西医结合江西省一流学科 (zxyylxk20220103); 校级研究生创新专项资金 (JZYC23S04)

作者简介: 黄小英, 副教授, 从事中药精油药理方向。E-mail: 13607062322@163.com

*通信作者: 梁新丽, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药药剂与药理方向。E-mail: paln7@163.com

and it has the potential to be a promising candidate for the treatment of VVC.

Key words: *Candida albicans*; *Origanum vulgare* volatile oil; vulvovaginal candidiasis; anti-inflammatory; 3-methyl-4-isopropylphenol

念珠菌性阴道炎 (vulvovaginal candidiasis, VVC) 是临床常见的妇科疾病^[1], 其临床特征主要包括外阴和阴道黏膜发红、灼热和烧痒, 常伴白色阴道分泌物, 甚至导致排尿和性交困难^[2], 严重影响女性工作和生活质量^[3]。白色念珠菌 *Candida albicans* 感染占 VVC 的 85%~95%, 目前临床用药物主要为唑类药物如氟康唑、硝酸咪康唑、酮康唑^[4], 但目前这类抗真菌药物存在选择范围小、口服胃肠道反应等不良反应问题^[5], 且这类药物在长期治疗和重复给药过程中使得白色念珠菌产生了耐药性^[6]。因此, 寻找新的抗菌谱广、抗菌效果好、不良反应小的中药制剂已经成为临床抗真菌治疗的发展方向之一。

植物挥发油是从植物中提取出来的具有芳香气味的挥发性油状液体, 具有抗菌、抗炎、抗氧化等多种生物活性^[7]。近年来, 国内外大量研究表明植物挥发油对多种病原真菌具有良好的抑菌活性, 可抑制病原真菌繁殖和真菌毒素的产生, 是天然抗菌剂的重要来源^[8-9]。这些挥发油发挥抗真菌活性与其成分、理化性质有关。其一, 其成分复杂, 可多靶点、协同发挥作用^[10]; 其二, 其为挥发性油状液体, 可快速穿透生物膜, 改变细胞膜通透性^[11]; 此外, 其还可通过调控真菌产毒素相关基因的表达, 影响真菌毒素的产生^[12]。牛至 *Origanum vulgare* L. 为多年生的唇形科牛至属芳香草本植物, 具有解表、理气、化湿的功效, 并常用于防治流感、中暑、呕吐、腹痛、皮肤瘙痒及等疾病^[13]。牛至挥发油 (*Origanum vulgare* volatile oil, OVO) 是从牛至全草中提取得到的淡黄色或琥珀色透明液体。现代药理学研究发现 OVO 具有较好的抗菌^[14]、抗氧化^[15]、抗炎等活性^[16]。近年来研究发现 OVO 也具有较好的抗真菌活性作用^[17], 其抗真菌活性与 OVO 能够破坏真菌细胞壁的完整性, 以及干扰真菌细胞膜的主要成分合成有关。然而 OVO 能够治疗 VVC 的机制尚不完全明确, 为了进一步阐明 OVO 的作用机制, 本研究通过体内外实验评估 OVO 对 VVC 模型小鼠的作用疗效与机制, 为 OVO 作为新型抗白色念珠菌药物的开发利用提供有效的理论依据。

1 材料

1.1 菌株和动物

白色念珠菌菌株 (ATCC 10231) 购自美国模式菌种收藏中心。SPF 级雌性 ICR 小鼠 60 只, 6~7 周龄, 体质量 18~22 g, 购自湖南斯莱克景达动物有限公司, 许可证号 SCXK (湘) 2019-0004。动物于室温 (25.0±0.5) °C、相对湿度 (55±5) %、自然光照/黑暗循环的环境下饲养。动物实验所有操作均符合江西中医药大学动物委员会的伦理准则 (批准号 zxyylxk20220103)。

1.2 药材

牛至购自江中中药饮片有限公司, 经江西中医药大学韩飞教授鉴定为唇形科牛至属植物牛至 *O. vulgare* L. 的全草 (包括叶、茎、花)。

1.3 药品与试剂

氟康唑 (批号 1210501) 购自烟台鲁银药业有限公司; 硝酸咪康唑乳膏 (批号 LBJ6138) 购自西安杨森制药有限公司; 小鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) IL-17、IL-22 ELISA 试剂盒 (批号分别为 CSB-E04741m、CSB-E0854m、CSB-E04608m、CSB-E04639m) 均购自武汉华美生物工程公司; 磷脂酶-C γ 2 (phospholipase-C γ 2, PLC γ -2) 抗体 (批号 ab302940)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 ab129068)、树突状细胞相关性 C 型凝集素-1 (dendritic cell-associated C-type lectin 1, Dectin-1) 抗体 (批号 ab8245)、二抗 (批号 ab150077) 均购自英国 Abcam 公司; 胱天蛋白酶募集域蛋白 9 (caspase-associated recruitment domain-containing protein 9, CARD9) 抗体 (批号 10669-1-AP) 购自美国 Proteintech 公司; 脾酪氨酸激酶 (spleen tyrosine kinase, Syk) 抗体 (批号 AF5008) 购自美国 Affinity 公司; 磷酸化核因子- κ B p65 (phosphorylated nuclear factor- κ B p65, p-NF- κ B p65) 抗体 (批号 3033) 购自美国 CST 公司。

1.4 仪器

Multiskan FC 型全波长多功能酶标仪、PowerEase Touch 350W 型电泳仪 (美国 Thermo 公

司); Stepone Plus 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司); Bx53 型显微镜(日本 Olympus 公司); TP1020 型组织脱水机、RM2245 型组织切片机(德国 Leica 公司); Kodak Image Station 2000 MM 型成像系统(美国 Kodak 公司)。

2 方法

2.1 OVO 的制备及成分分析

如图 1 所示,水蒸气减压蒸馏法提取 OVO,取牛至,加 14 倍量水,加热回流提取 4 h, OVO 实际得率为 0.93%。使用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)

对 OVO 成分进行分析,用正己烷稀释 OVO。

气相色谱条件: HP-5MS 毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm),载气为高纯 He,进样量 1 μL,体积流量 1 mL/min。升温程序: 初始温度 40 °C,保持 2 min; 2 °C/min 升温至 60 °C,保持 2 min; 5 °C/min 升温至 160 °C,保持 2 min; 15 °C/min 升温至 300 °C。

质谱条件: EI 离子源,离子源温度 230 °C,电子能量 70 eV,接口温度 250 °C,质量扫描范围 m/z 30~650。

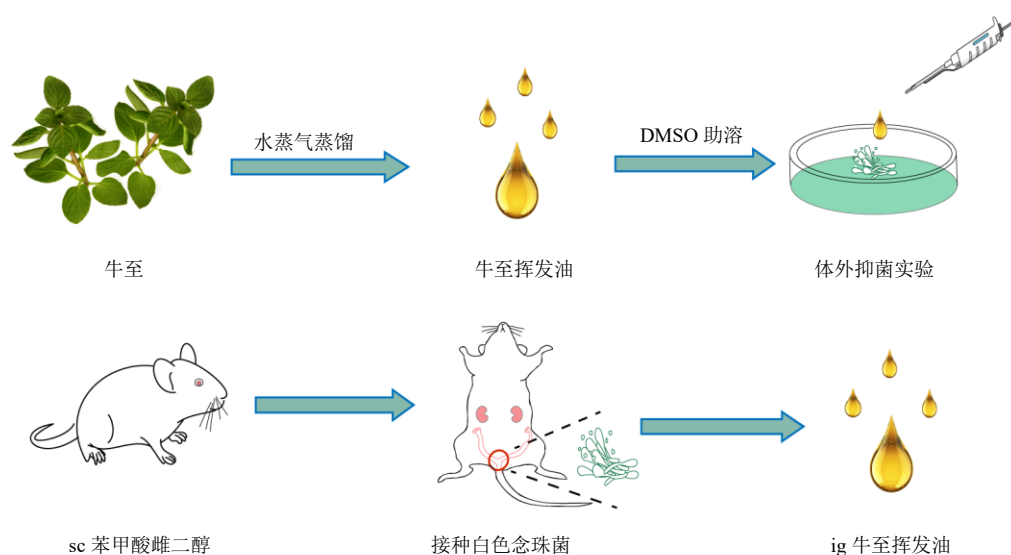


图 1 OVO 的提取及其体内外实验中给药方式的示意图

Fig. 1 Schematic diagram of extraction of OVO and administration methods in *in vivo* and *in vitro* experiments

2.2 抑菌圈直径的测量

采用打孔扩散法测量 OVO 抗白色念珠菌的能力,取 200 μL 菌悬液(1×10^7 CFU/mL)涂布于固体培养基,打孔,分别设置空白组(1% DMSO)、OVO 组(原油)、硝酸咪康唑乳膏组,于相应孔中分别加入相应药物 50 μL, 37 °C 恒温培养 24 h,观察并测量抑菌圈的大小。

2.3 最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)的测定

采用肉汤稀释法测量 OVO 对白色念珠菌的 MIC,分别设置模型组、OVO 组、1% DMSO 组、氟康唑组,于 96 孔板中加入 100 μL 菌悬液(1×10^7 CFU/mL)和 100 μL 不同质量浓度(250、125、62.5、31.2、15.6、7.81、3.90、1.95、0.97、0.48、0.24 mg/mL)的药物, 37 °C 恒温培养 12 h 并观察菌株生长情况。

2.4 OVO 对生物膜形成的影响

参照徐瑞等^[18]方法进行生物膜含量测定。在 96

孔板中加入 100 μL 的菌悬液(1×10^7 CFU/mL), 37 °C 孵育,分别在培养 0、1.5、3、6、12、24、48、72 h 时间点进行 XTT 实验,采用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度(A)值,并计算生物膜代谢活性的变化。

在 96 孔板中加入 100 μL 的菌悬液(1×10^7 CFU/mL), 37 °C 孵育,分别形成早期生物膜(1.5 h)、成熟生物膜(24 h),设置模型组、OVO(MIC、3MIC、6MIC)组、1% DMSO 组、氟康唑(MIC)组,加入含有不同质量浓度药物的培养基溶液孵育 24 h, XTT 法分别考察不同质量浓度的 OVO 对生物膜活性的影响。

2.5 OVO 对黏附性及菌丝形成的影响

在 24 孔板中加入 100 μL 的菌悬液(1×10^7 CFU/mL),设置模型组、OVO(MIC、3MIC、6MIC)组、1% DMSO 组、氟康唑(MIC)组,加入相应的药物, 37 °C 孵育 3 h, XTT 作用 2 h,采用酶标仪

测定 490 nm 处的 A 值, 并计算黏附率。

培养及给药步骤同上, 37 °C 孵育 3 h, 结晶紫染色并于显微镜下观察白色念珠菌的形态及菌丝的形成。

2.6 OVO 对表面疏水率的影响

将 4 mL 菌悬液 (1×10^7 CFU/mL) 接种于 6 孔板, 设置模型组、OVO (MIC、3MIC、6MIC) 组、1% DMSO 组、氟康唑 (MIC) 组, 加入相应的药物, 37 °C 孵育 24 h, 形成生物膜后弃上清液, 细胞刮刀刮取生物膜, 加入培养基制备成菌悬液, 参照刘冬梅等^[19-20]的方法测量细胞表面疏水率, 吸取菌悬液 1.2 mL, 与 0.3 mL 正辛烷液涡旋混匀, 静置 15 min, 于 600 nm 处测定水相 A 值, 计算相对细胞表面疏水率。

2.7 动物分组、造模及给药

参照 Chen 等^[21-22]方法造模并进行优化, 60 只 10 周龄雌性 ICR 小鼠随机分为空白组、模型组及 OVO 低、中、高剂量 (1.95、5.85、11.70 mg/kg) 组和氟康唑 (31.2 mg/kg) 组, 每组 10 只。除空白组外, 其余各组隔天颈后注射苯甲酸雌二醇 (4 mL/kg), 共接种 3 次, 末次注射第 2 天每只小鼠阴道接种白色念珠菌悬液 ($800 \mu\text{L/kg}$, 1×10^7 CFU/mL), 连续感染 2 d。

将 OVO 稀释于 0.1% DMSO 中制备不同质量浓度 (MIC、3MIC、6MIC) 的 OVO 溶液, 称取 31.2 mg 的氟康唑粉末溶于 1 mL 生理盐水制备成质量浓度为 31.2 mg/mL 的氟康唑溶液。用一次性注射器连接带有弧度灌胃针进行阴道注射给药^[23], 空白组、模型组阴道注射 20 μL 1% DMSO, OVO 组阴道注射相应质量浓度 (MIC、3MIC、6MIC) 的挥发油 20 μL , 氟康唑组阴道注射 20 μL 氟康唑溶液 (31.2 mg/mL), 1 次/d, 连续 7 d。给药期间除空白组外其余各组隔日注射苯甲酸雌二醇维持白色念珠菌生长环境^[24]。

2.8 阴道灌洗液中真菌载量测定

末次给药 24 h 后, 观察外阴红肿情况, 用 500 μL PBS 溶液分 3 次用移液枪阴道冲洗, 收集小鼠阴道灌洗液, 1 000 r/min 离心 5 min, 取 10 μL 灌洗液均匀涂布于培养基中, 37 °C 孵育 24 h 后, 观察白色念珠菌的菌落集数。

2.9 阴道灌洗液中炎症因子水平的检测

根据 ELISA 试剂盒说明书检测阴道灌洗液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-17 和 IL-22 水平。

2.10 阴道组织病理学观察

小鼠异氟烷吸入麻醉, 眼球取血, 脱颈处死, 收集阴道组织, 用 4% 多聚甲醛固定、脱水、石蜡包埋、切片, 分别进行 HE 染色和 PAS 染色, 于显微镜下观察阴道组织有无水肿及炎细胞的浸润等病理变化。

2.11 阴道组织扫描电镜观察

将新鲜阴道组织用 1% 锇酸避光固定 1~2 h, 乙醇梯度脱水, 乙酸异戊酯浸泡 15 min, 临界点干燥仪干燥样本 12 h, 离子溅射仪喷金 30 s, 扫描电子显微镜下观察阴道组织中的载菌量并拍照。

2.12 Western blotting 检测阴道组织 PLC γ -2、Dectin-1、CARD9、Syk、p-NF- κ B p65 蛋白表达

-80 °C 冰箱取出阴道组织, 加入裂解液, 制备组织匀浆, BCA 法测定蛋白浓度, 99 °C 水浴加热 15 min 使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 封闭、洗膜后, 加入一抗, 4 °C 孵育过夜; 洗膜后加入二抗孵育 2 h, 加入 ECL 发光液, 凝胶成像仪曝光显影, 以 β -actin 为内参, 采用 Image J 软件统计条带灰度值。

2.13 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8.3.0 软件进行统计分析和绘图。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行方差齐性检验、单因素方差分析、组间 LSD 检验。

3 结果

3.1 OVO 的成分分析

如图 2 和表 1 所示, OVO 中质量分数超过 1% 的化合物有 22 种, 占总化合物的 90.32%, 其中 3-甲基-4-异丙基苯酚含量最高 (21.00%), 其次是 *O*-cymene (9.51%)、 γ -松油烯 (7.04%) 等。

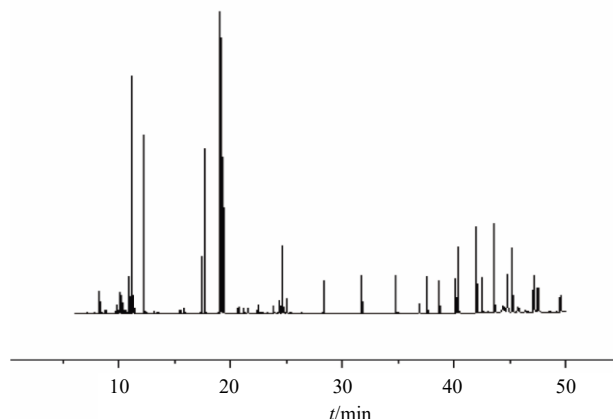


图 2 OVO 的总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatogram of OVO

表 1 OVO 的 GC-MS 分析结果
Table 1 GC-MS analysis results of OVO

序号	t_R/min	化合物	质量分数/%
1	10.95	1,3-环己二烯	1.37
2	11.20	<i>O</i> -cymene	9.51
3	12.26	γ -松油烯	7.04
4	17.46	2-methoxy-4-methyl-1-(1-methylethyl)-benzene	8.79
5	19.10	3-甲基-4-异丙基苯酚	21.00
6	19.12	百里香酚	1.51
7	21.23	香芹酚	1.13
8	24.63	β -红没药烯	2.88
9	28.34	1,3,5,7-tetraethyl-1-ethylbutoxysiloxycyclotetrasiloxane	1.33
10	31.75	cyclononasiloxane	4.75
11	38.67	二十二烷	1.49
12	40.14	octadecamethyl-cyclononasiloxane	1.67
13	40.37	2,6,10,14-tetramethyl-hexadecane	3.02
14	42.01	tetracosane	4.02
15	42.49	1,1,1,5,7,7,7-heptamethyl-3,3-bis(trimethylsiloxy)tetrasiloxane	2.02
16	43.58	pentacosane	4.35
17	44.37	1,2-benzenedicarboxylic acid, bis(1-methylethyl) ester	1.03
18	44.75	eicosamethyl-cyclodecasiloxane	2.74
19	45.19	hexacosane	3.81
20	47.12	heptacosane	2.82
21	47.49	octadecamethyl-cyclononasiloxane	2.34
22	49.52	heneicosane	1.70

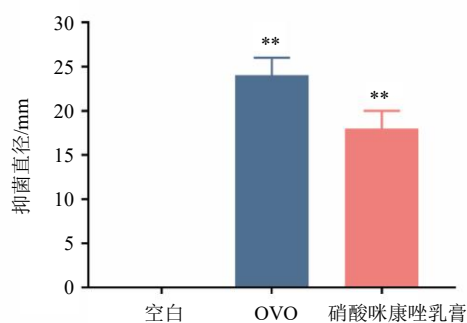
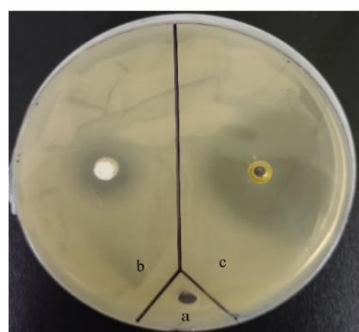
3.2 OVO 对白色念珠菌抑菌圈直径的影响及 MIC 的测定

如图 3 所示, 硝酸咪康唑乳膏的抑菌圈直径为 (18 ± 2) mm, OVO 的抑菌圈直径为 (24 ± 2) mm, 与空白组相比均具有较好的抑菌效果 ($P < 0.01$)。OVO 对白色念珠菌 MIC 为 1.95 mg/mL, 氟康唑对白色念珠菌的 MIC 为 31.2 mg/mL。

3.3 OVO 对生物膜形成的影响

生物膜与白色念珠菌的致病机制以及耐药性有

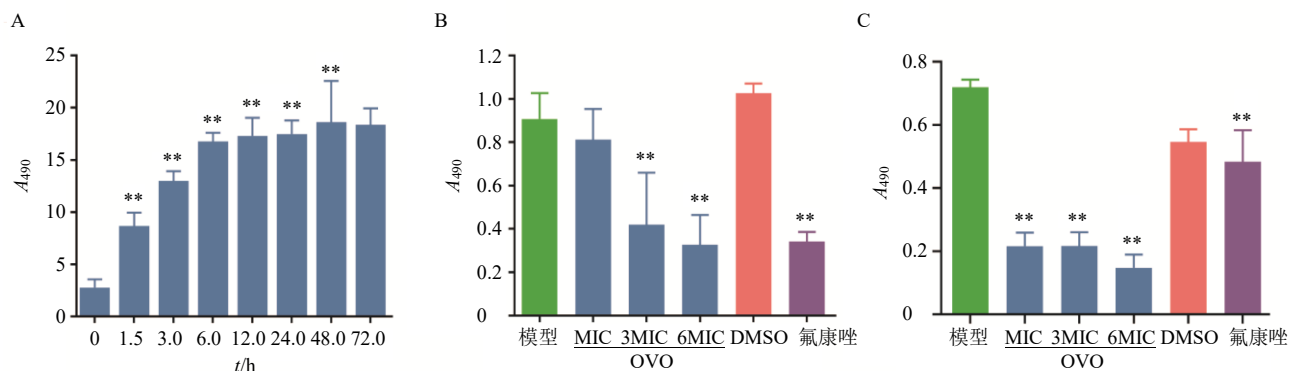
着密切的关系。通过对不同时间段白色念珠菌的成膜量进行测定来确定生物膜形成, 如图 4-A 所示, 白色念珠菌生物膜于 1.5 h 开始形成, 12 h 内生物膜生长显著上升, 24 h 生物膜趋于成熟; 如图 4-B 所示, 与模型组比较, OVO 组中早期生物膜形成受到抑制, 其中 6MIC OVO 效果最好 ($P < 0.01$); 如图 4-C 所示, 与模型组比较, OVO 组中成熟生物膜形成明显受到抑制 ($P < 0.01$), 以上实验结果表明 OVO 对生物膜的形成有着较好的抑制作用。



a-空白组; b-硝酸咪康唑乳膏组; c-OVO 组; 与空白组比较: ** $P < 0.01$ 。
a-blank group; b-miconazole nitrate cream group; c-OVO group; ** $P < 0.01$ vs blank group.

图 3 OVO 对白色念珠菌抑菌圈直径的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of OVO on diameter of antibacterial zone of *C. albicans* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下图同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图 4 OVO 对白色念珠菌生物膜形成 (A)、早期生物膜 (B)、成熟生物膜 (C) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of OVO on formation of biofilms (A), early biofilms (B), mature biofilms (C) of *C. albicans* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 OVO 对生物膜黏附性及疏水性的影响

白色念珠菌是临床常见的致病菌，其强大的生物膜表面疏水性和黏附性是感染期间成功定植和持久的先前条件。如图 5-A 所示，与模型组比较，OVO 各剂量组黏附性明显降低 ($P < 0.01$)；如图 5-B 所示，与模型组比较，OVO 组生物膜表面疏水性逐渐升高 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.5 OVO 对菌丝形成的影响

当机体免疫功能下降时，白色念珠菌从酵母形

态转化为具有入侵性的菌丝形态，形成生物膜进而侵入机体产生疾病^[25]。如图 6 所示，模型组细胞密集且菌丝结构完整；随着 OVO 给药浓度的增加，聚集细胞变少，菌丝生长受到抑制。

3.6 OVO 对 VVC 模型小鼠外阴及阴道灌洗液菌落数的影响

VVC 模型小鼠造模及给药示意图见图 7-A。如图 7-B 所示，与空白组比较，模型组小鼠外阴出现大面积的脱毛、红肿；与模型组比较，OVO 各剂量

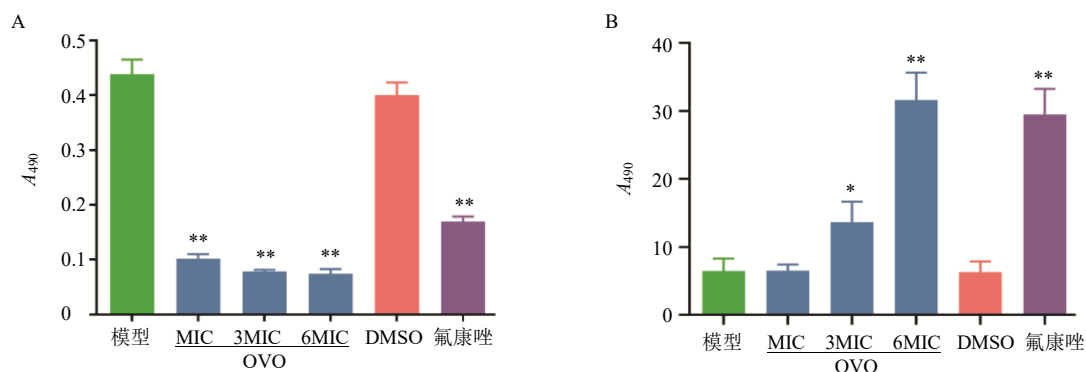


图 5 OVO 对白色念珠菌黏附性 (A)、疏水性 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of OVO on adhesion (A) and hydrophobicity (B) of *C. albicans* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

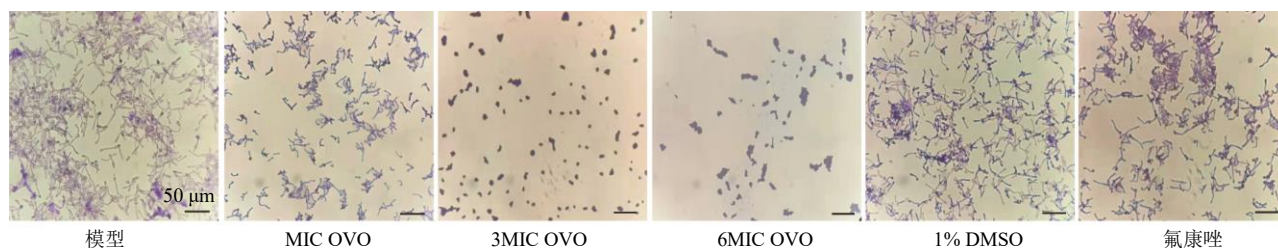


图 6 OVO 对白色念珠菌菌丝形成的影响 ($\times 200$)

Fig. 6 Effect of OVO on filamentation of *C. albicans* ($\times 200$)

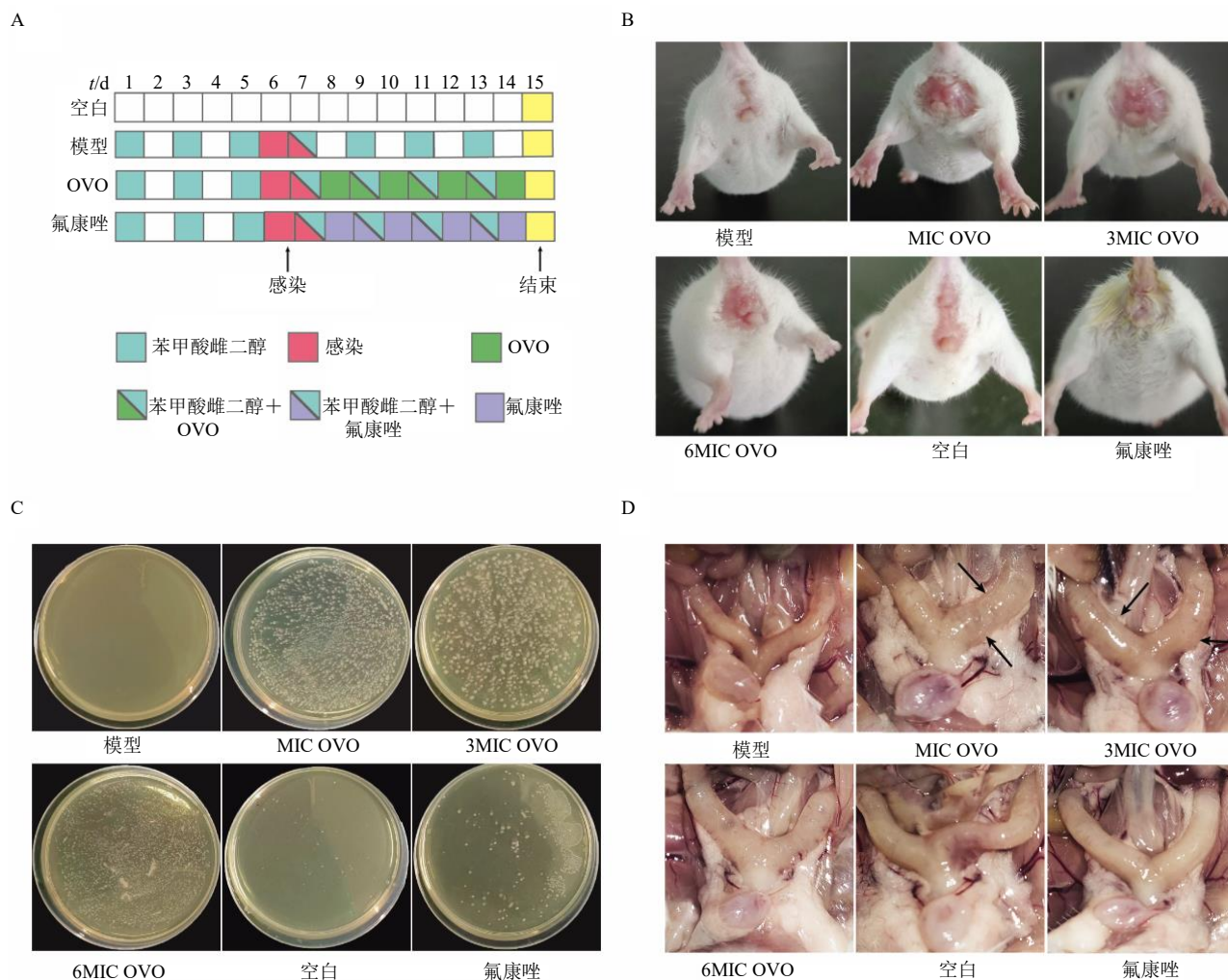


图 7 VVC 模型小鼠造模及给药示意图 (A) 及 OVO 对 VVC 模型小鼠外阴变化 (B)、阴道灌洗液中菌落数 (C)、外阴及子宫水肿情况 (D) 的影响

Fig. 7 Schematic diagram of VVC mice model establishment and drug administration (A) and effect of OVO on changes in external genitalia (B), fungal colony counts in vaginal lavage fluid (C), external genitalia and uterine edema (D)

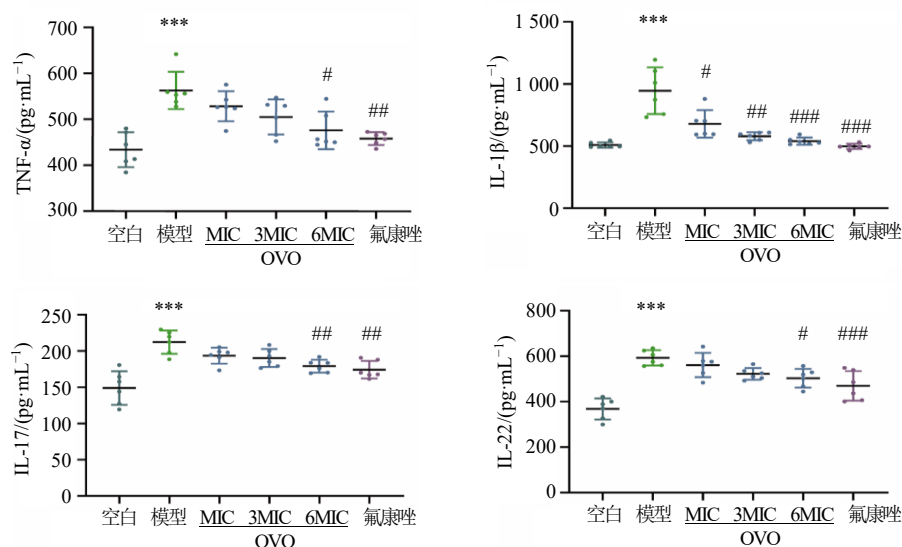
组脱毛及红肿现象明显减轻。如图 7-C 所示，与空白组比较，模型组阴道灌洗液菌落数明显增加；与模型组比较，OVO 组阴道灌洗液菌落数逐渐减少。如图 7-D 所示，与空白组比较，模型组因念珠菌的感染小鼠子宫组织水肿程度明显增加；与模型组比较，OVO 组小鼠子宫水肿程度逐渐减轻。

3.7 OVO 对 VVC 模型小鼠阴道灌洗液中炎症因子水平的影响

如图 8 所示，与空白组比较，模型组小鼠阴道灌洗液中 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-17 和 IL-22 水平明显升高 ($P < 0.001$)；与模型组比较，OVO 各剂量组 $\text{IL-1}\beta$ 水平明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，OVO 高剂量组 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-17 和 IL-22 水平均明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，且呈剂量相关性。

3.8 OVO 对 VVC 模型小鼠阴道组织病理变化的影响

通过 HE 染色、PAS 染色及扫描电镜考察了 OVO 对 VVC 模型小鼠阴道组织完整性的影响。HE 染色结果 (图 9-A) 显示，与空白组相比，模型组小鼠阴道组织整体结构异常，组织黏膜水肿伴炎细胞浸润；与模型组相比，OVO 组阴道组织整体结构得到改善，复层扁平上皮角化减少。PAS 染色染色结果 (图 9-B) 显示，模型组阴道组织紫色阳性反应区域多且密集表明白色念珠菌感染较多，OVO 处理后紫色阳性反应区域明显减少，其中氟康唑组效果最好。扫描电镜结果 (图 9-C) 与 PAS 染色结果一致，随着 OVO 的给药剂量逐渐增加，小鼠阴道组织中的载菌量也随之减少。

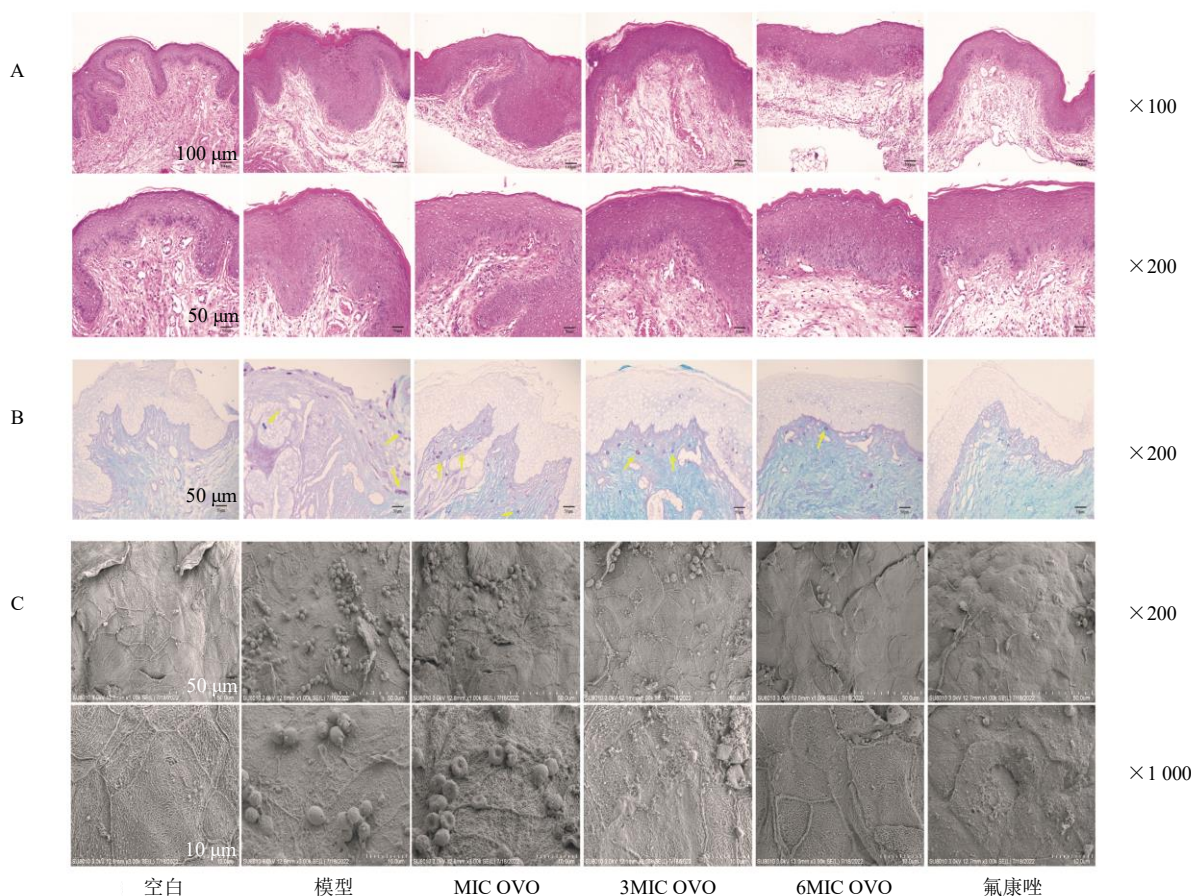


与空白组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$, 下图同。

*** $P < 0.001$ vs blank group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 8 OVO 对 VCC 模型小鼠阴道灌洗液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-17 和 IL-22 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 8 Effect of OVO on levels of TNF- α , IL-1 β , IL-17 and IL-22 in vaginal lavage fluid of VCC model mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)



A-HE 染色; B-PAS 染色; C-扫描电镜结果。

A-HE staining; B-PAS staining; C-result of scanning electron microscopy.

图 9 OVO 对 VCC 模型小鼠阴道组织病理学的影响

Fig. 9 Effect of OVO on pathological changes of vaginal tissue in VCC model mice

3.9 OVO 通过调控 Dectin-1 信号通路相关蛋白表达抑制 VVC 模型小鼠炎症反应

如图 10 所示,与空白组比较,模型组小鼠阴道组织中 Dectin-1、Syk、PLC γ -2、CARD9 和 p-NF- κ B p65 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.001$);与模型组比较,OVO 高剂量组 Dectin-1、Syk、PLC γ -2、

CARD9 和 p-NF- κ B p65 蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01),OVO 中剂量组 Dectin-1、Syk 和 p-NF- κ B p65 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$),OVO 低剂量组 Dectin-1 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$)。表明 OVO 可能通过抑制 Dectin-1 信号通路的激活来减轻 VVC 模型小鼠阴道组织中的炎症反应。

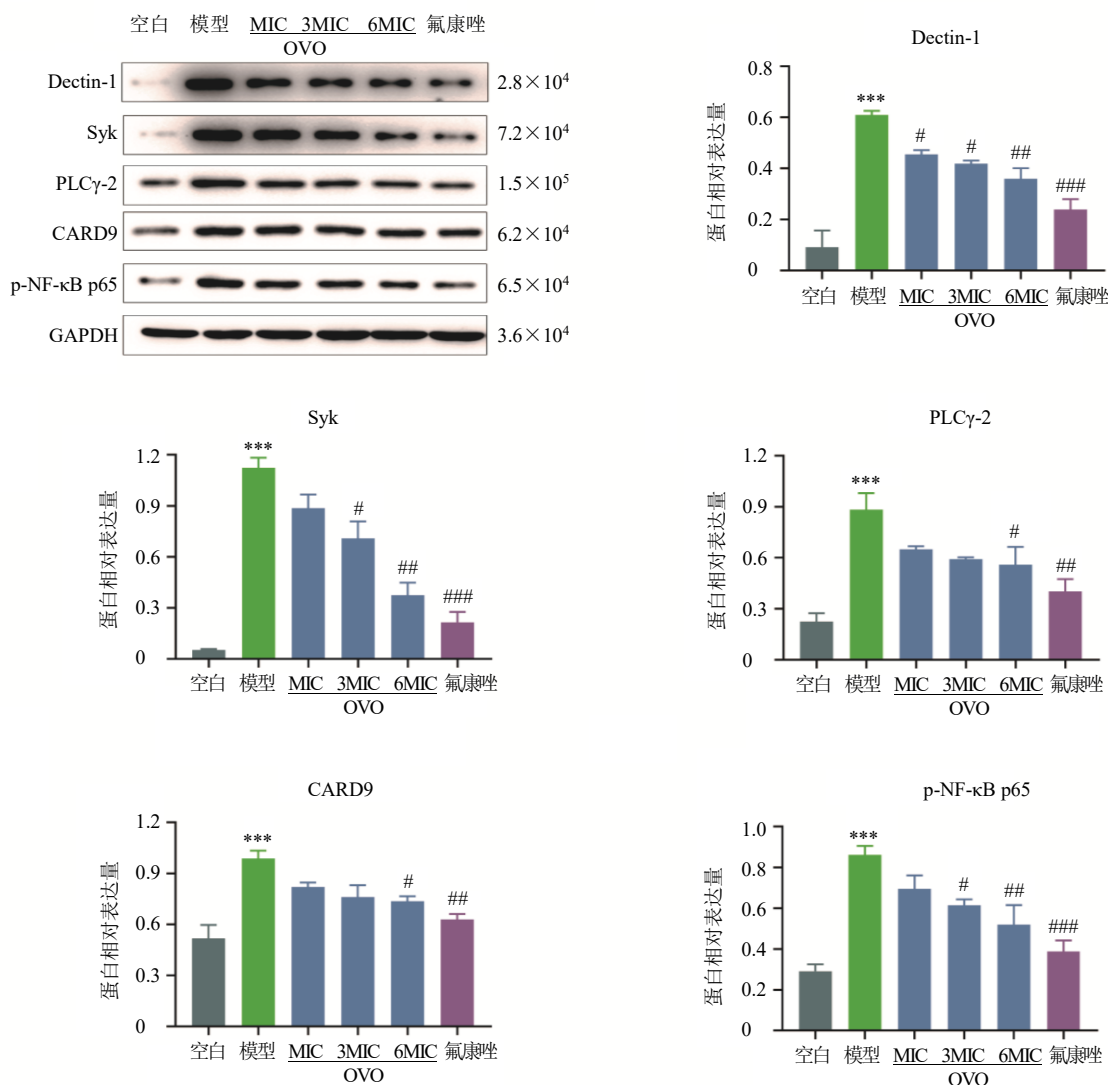


图 10 OVO 对 VCC 模型小鼠阴道组织中 Dectin-1、Syk、PLC γ -2、CARD9、p-NF- κ B p65 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effect of OVO on expressions of Dectin-1, Syk, PLC γ -2, CARD9 and p-NF- κ B p65 proteins in vaginal tissues of VCC model mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

VVC 主要由白色念珠菌感染引起,是妇科的常见病和多发病,其发病率仅次于细菌性阴道炎^[26]。VVC 的临床特征有白色阴道分泌物、外阴道灼热和瘙痒,其严重影响了女性患者的生活和工作质量。当前临床上 VVC 的主要治疗药物主要为唑类,但

其治疗过程中会产生严重的耐药性及不良反应^[3],因此开发新型抗真菌药物显得极为迫切。近期研究发现 OVO 具有较好的抗白色念珠菌的作用,且在 MIC 水平可显著抑制生物膜的形成^[27]。然而,这一现象仅在体外研究中被发现,缺乏 OVO 抗白色念珠菌体内活性验证。

本研究首先对 OVO 的活性成分进行分析, 鉴定出质量分数超过 1% 的成分有 22 种, 主要成分为 3-甲基-4-异丙基苯酚。同时体外验证了 OVO 对白色念珠菌生物膜形成的影响, 结果发现 OVO 对白色念珠菌的抑菌圈直径为 (24 ± 2) mm, MIC 为 1.95 mg/mL。白色念珠菌的毒力与多种因素相关, 如细胞表面的黏附性、疏水性及菌丝的形成等^[28]。本研究结果发现 OVO 能有效抑制白色念珠菌的生物膜形成、黏附性、疏水性及菌丝的形成。

细胞因子的过度分泌是引起妇科炎症的主要因素之一。研究显示, IL-17 和 IL-22 与白色念珠菌的菌丝形成及启动宿主先天免疫反应有关^[29-30]。TNF- α 、IL-1 β 为机体内重要的促炎因子, 可加重机体内的炎症反应。本研究结果显示, OVO 处理后小鼠阴道灌洗液中 IL-17、IL-22、TNF- α 及 IL-1 β 水平明显减少。HE 染色、PAS 染色及扫描电镜结果显示 OVO 可以减少 VCC 模型小鼠阴道组织中炎症细胞的浸润及白色念珠菌的载量。

Dectin-1 是免疫细胞表面受体, 能够识别和结合真菌细胞壁上的 β -葡聚糖^[31]。当 Dectin-1 与 β -葡聚糖结合时, 下游信号分子 Syk、PLC γ -2 及 CARD9 被激活, 进而激活炎症相关的 NF- κ B 信号通路, 加重阴道的炎症反应^[32]。研究发现, 在白色念珠菌的感染下小鼠阴道组织中 Dectin-1、Syk、PLC γ -2、CARD9、p-NF- κ B p65 蛋白表达明显增加, 随着 OVO 的处理这一趋势明显扭转。因此推测 OVO 可能是通过 Dectin-1 信号通路调节小鼠阴道组织的炎症。

本研究结果表明, OVO 可以有效抑制白色念珠菌生物膜的形成及相关毒力因子, 减轻 VVC 模型小鼠阴道组织中的炎症, 其作用机制可能与抑制 Dectin-1 信号通路有关。因此, OVO 可以作为新型抗 VVC 进行更深入的研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张春霞, 陈庆华. 阴道炎治疗药物及其外用制剂研究进展 [J]. 世界临床药物, 2010, 31(6): 381-386.
- [2] Mtibaa L, Fakhfakh N, Kallel A, et al. Vulvovaginal candidiasis: Etiology, symptomatology and risk factors [J]. *J Mycol Med*, 2017, 27(2): 153-158.
- [3] Denning D W, Kneale M, Sobel J D, et al. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: A systematic review [J]. *Lancet Infect Dis*, 2018, 18(11): e339-e347.
- [4] Benitez L L, Carver P L. Adverse effects associated with long-term administration of azole antifungal agents [J]. *Drugs*, 2019, 79(8): 833-853.
- [5] Lirio J, Giraldo P C, Amaral R L, et al. Antifungal (oral and vaginal) therapy for recurrent vulvovaginal candidiasis: A systematic review protocol [J]. *BMJ Open*, 2019, 9(5): e027489.
- [6] Lu H, Shrivastava M, Whiteway M, et al. *Candida albicans* targets that potentially synergize with fluconazole [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2021, 47(3): 323-337.
- [7] Heghes S C, Vostinaru O, Rus L M, et al. Antispasmodic effect of essential oils and their constituents: A review [J]. *Molecules*, 2019, 24(9): 1675.
- [8] Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils [J]. *Curr Med Chem*, 2003, 10(10): 813-829.
- [9] Rodriguez-Garcia I, Silva-Espinoza B A, Ortega-Ramirez L A, et al. Oregano essential oil as an antimicrobial and antioxidant additive in food products [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2016, 56(10): 1717-1727.
- [10] 李毛加, 沙玉茹, 罗晓敏, 等. 基于谱效关联分析筛选竹叶挥发油抗菌质量标志物 [J]. 中草药, 2021, 52(20): 6268-6273.
- [11] Zhang J, Ye K P, Zhang X, et al. Antibacterial activity and mechanism of action of black pepper essential oil on meat-borne *Escherichia coli* [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 2094.
- [12] Kim Y G, Lee J H, Gwon G, et al. Essential oils and eugenols inhibit biofilm formation and the virulence of *Escherichia coli* O157: H7 [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36377.
- [13] 王东东, 沙拉买提·艾力, 徐海燕, 等. 维吾尔族药牛至药材质量标准 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(16): 32-35.
- [14] Khan M, Khan S T, Khan M, et al. Chemical diversity in leaf and stem essential oils of *Origanum vulgare* L. and their effects on microbicidal activities [J]. *AMB Express*, 2019, 9(1): 176.
- [15] Sarfaraz D, Rahimmalek M, Sabzalian M R, et al. Essential oil composition and antioxidant activity of oregano and marjoram as affected by different light-emitting diodes [J]. *Molecules*, 2023, 28(9): 3714.
- [16] Silva F V, Guimarães A G, Silva E R S, et al. Anti-inflammatory and anti-ulcer activities of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano [J]. *J Med Food*, 2012, 15(11): 984-991.
- [17] Pradebon Brondani L, Alves da Silva Neto T, Antonio Freitag R, et al. Evaluation of anti-enzyme properties of *Origanum vulgare* essential oil against oral *Candida albicans* [J]. *J Mycol Med*, 2018, 28(1): 94-100.

- [18] 徐瑞, 顾静怡, 刘思琪, 等. 法尼醇对白念珠菌和粪肠球菌混合生物膜体外抑制作用的研究 [J]. 口腔医学, 2021, 41(4): 289-294.
- [19] 刘冬梅, 罗劲, 孔晋亮, 等. 二氢槲皮素联合两性霉素 B 对白色念珠菌生物被膜的干预作用 [J]. 中成药, 2022, 44(12): 4040-4044.
- [20] 许江燕, 王原, 邵一为, 等. 载银二氧化钛抗白色念珠菌生物被膜作用及机制研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2020, 30(14): 1668-1670.
- [21] Chen Z W, Luo T S, Huang F K, *et al.* Kangbainian lotion ameliorates vulvovaginal candidiasis in mice by inhibiting the growth of fluconazole-resistant *Candida albicans* and the dectin-1 signaling pathway activation [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 816290.
- [22] Chen L, Wang F, Qu S, *et al.* Therapeutic potential of perillaldehyde in ameliorating vulvovaginal candidiasis by reducing vaginal oxidative stress and apoptosis [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(2): 178.
- [23] 罗秀针, 林燕燕, 林泽燕, 等. 白凤菜总黄酮治疗小鼠细菌性阴道炎效果 [J]. 社区医学杂志, 2021, 19(15): 906-911.
- [24] Richardson J P, Willems H M E, Moyes D L, *et al.* Candidalysin drives epithelial signaling, neutrophil recruitment, and immunopathology at the vaginal mucosa [J]. *Infect Immun*, 2018, 86(2): e00645-e00617.
- [25] Rodrigues L B, Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins A, Cesário F R, *et al.* Anti-inflammatory and antiedematogenic activity of the *Ocimum basilicum* essential oil and its main compound estragole: *In vivo* mouse models [J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 257: 14-25.
- [26] Sobel J D. Vulvovaginal candidosis [J]. *Lancet*, 2007, 369(9577): 1961-1971.
- [27] Hacıoglu M, Oyardi O, Kirinti A. Oregano essential oil inhibits *Candida* spp. biofilms [J]. *Z Naturforsch C J Biosci*, 2021, 76(11/12): 443-450.
- [28] Takano T, Kudo H, Eguchi S, *et al.* Inhibitory effects of vaginal *Lactobacilli* on *Candida albicans* growth, hyphal formation, biofilm development, and epithelial cell adhesion [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1113401.
- [29] Yu X Y, Fu F, Kong W N, *et al.* *Streptococcus agalactiae* inhibits *Candida albicans* hyphal development and diminishes host vaginal mucosal TH17 response [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 198.
- [30] Qu S, Chen L, Tian H, *et al.* Effect of perillaldehyde on prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in a murine model [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 1466.
- [31] Hardison S E, Brown G D. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity [J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(9): 817-822.
- [32] Strasser D, Neumann K, Bergmann H, *et al.* Syk kinase-coupled C-type lectin receptors engage protein kinase C-delta to elicit Card9 adaptor-mediated innate immunity [J]. *Immunity*, 2012, 36(1): 32-42.

[责任编辑 李亚楠]