

- [14] 刘晓玲, 杨育儒, 蔡小辉, 等. 镰形棘豆总黄酮的含量测定方法研究[J]. 药学实践杂志, 2021, 39(5): 422-425; 459.
- [15] 陈发菊, 彭梅, 王丽, 等. 藤茶总黄酮对酒精性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 中成药, 2021, 43(1): 200-203.
- [16] 尹连红, 于浩, 彭金咏. 四氯化碳诱导肝损伤的分子机制及中药干预的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(9): 1147-1155.
- [17] 周至品, 覃乐, 农汝楠, 等. 三叶香茶菜对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路的影响[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(4): 96-101.
- [18] Zahid A, Li B F, Kombe A J K, et al. Pharmacological inhibitors of the NLRP3 inflammasome [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2538.
- [19] 黄力强, 曾悦, 庄倩, 等. 大黄游离蒽醌抑制 NLRP3/Caspase-1 通路改善大鼠重症急性胰腺炎肝损伤的研究[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(5): 54-59.
- [20] 郭悦承, 陆伦根. 肿瘤坏死因子- α 在非酒精性脂肪性肝病进展中的作用[J]. 胃肠病学, 2019, 24(10): 623-626.
- [21] 邹勇, 鲍俊杰. 暴发性肝炎小鼠血清肿瘤坏死因子- α 水平与肝损伤相关性分析[J]. 实用医技杂志, 2013, 20(5): 497.
- [22] Ishida Y, Kondo T, Tsuneyama K, et al. The pathogenic roles of tumor necrosis factor receptor p55 in acetaminophen-induced liver injury in mice[J]. *J Leukoc Biol*, 2004, 75(1): 59-67.
- [23] 刘胜新, 徐军辉, 蔡涛, 等. IL-1 β 在急性胰腺炎时肝损伤中的作用[J]. 临床外科杂志, 2019, 27(9): 777-778.
- [24] 李君蕊, 赵宝春, 商艳朝. 感染性与自身免疫性炎症中生长因子水平差异及其意义[J]. 河北医药, 2008, 30(10): 1509-1510.
- [25] 刘建辉, 张帮建, 李定海. TGF- β 1/Smad3 信号通路在帕瑞昔布钠对 CCI 模型大鼠神经病理性疼痛影响中的作用[J]. 西部医学, 2021, 33(11): 1602-1607.
- [26] 于丹丹, 阿荣. CHD 发生发展中炎症因子 TGF- β 1、IL-35 作用的研究进展[J]. 山东医药, 2021, 61(7): 92-95.

灯台叶总碱与氟康唑联用对耐药白念珠菌株 CA23 的协同抑菌作用

廖一川^{1,2}, 苏刘艳¹, 李家生^{1,2}, 王应仙^{1,2}, 李俊¹, 张祎^{1,2}, 王睿睿^{1,2*}

(1. 云南中医药大学, 云南昆明 650500; 2. 云南省民族特色养生理理论与健康产品工程实验室, 云南昆明 650500)

摘要: 目的 探讨灯台叶总碱与氟康唑联用对耐药白念珠菌 CA23 毒力因子的作用和潜在机制。方法 微量稀释法、棋盘法及时间-杀菌曲线测定灯台叶总碱与氟康唑联用效果; 荧光探针测定菌株外排泵功能, 实时荧光定量 PCR 法检测耐药相关基因表达; 倒置显微镜、扫描电镜观察菌丝诱导培养基中菌株形态转换, RT-qPCR 法检测菌丝相关基因表达, 添加外源性 cAMP 验证; 卵黄琼脂平板法检测菌株胞外磷脂酶活性。结果 灯台叶总碱与氟康唑对耐药白念珠菌具有较强的协同抑菌作用; 联用处理并不能显著抑制菌株的外排功能, 与耐药相关基因表达结果一致; 两药联用可以抑制在 SD 和 Spider 诱导培养基中菌丝生长, 且下调菌丝相关基因 *CYR1*、*ALS3*、*RAS1*、*BCR1*、*ALS2*、*TPK2* 表达, 添加外源性 cAMP 后, 能恢复部分药物联用引起的菌株形态变化; 两药联用能抑制胞外磷脂酶活性, 且对灯台叶总碱存在剂量依赖性。结论 灯台叶总碱与氟康唑联用对氟康唑耐药株表现为协同抑菌作用, 其机制与调节 Ras1-cAMP-PKA 信号通路抑制菌丝生长, 并降低胞外磷脂酶活性从而影响耐药白念珠菌毒力因子有关。

关键词: 灯台叶总碱; 白念珠菌; 协同作用; 菌丝; 磷脂酶; 毒力因子

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)12-4124-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.12.046

白念珠菌 *Candida albicans* 是一种分布广泛的条件致病菌, 好发于免疫低下及免疫缺陷人群, 易引起黏膜感染和全身感染。据研究报道, 全世界约 70% 的真菌感染由白念珠菌引起^[1], 且死亡率达 40%^[2]。目前临床治疗药物种类稀缺, 一线药物频繁使用引起的耐药性使单一药物治疗效果较差。研究表明, 一些中药复方、中药提取物及中药来

源天然化合物能有效抑制白念珠菌生长, 特别是与氟康唑联用时, 表现出良好的协同抗菌作用^[3]。课题组长期从事中药及其活性成分抗真菌活性筛选, 发现灯台叶总碱与氟康唑联用仅对白念珠菌氟康唑耐药株发挥抑菌作用, 在此基础上, 进一步探讨灯台叶总碱与氟康唑联用对耐药白念珠菌的作用机制, 以期灯台叶总碱的抗真菌感染应用

收稿日期: 2022-02-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(81660737); 云南省科技计划中医联合重点项目(2017FF117-003)

作者简介: 廖一川(1996—), 女, 硕士生, 研究方向为真菌感染免疫。Tel: 13099439166, E-mail: 1443698127@qq.com

* 通信作者: 王睿睿(1980—), 女, 博士, 教授, 研究方向为真菌感染免疫。Tel: 15987106288, E-mail: wangruiyucm@126.com

提供科学依据。

1 材料

1.1 菌株及预处理 临床耐药株 CA23、CA381、CA4508、CA3816、CA800、CA3511、CA550、CA602、CA187、CA808、CA4574, 由昆明医科大学第一附属医院皮肤科李李玉叶教授惠赠; 白念珠菌 SC5314 购自云南登楼生物科技有限公司。菌株从-80℃冰箱中取出, 解冻后用沙氏液体培养基稀释, 取适量接种于沙氏琼脂平板, 37℃恒温恒湿培养 24~48 h, 接种环取单克隆菌落, 传代备用。

1.2 药物 氟康唑(南昌弘益药业有限公司, 批号 200117); 灯台叶总碱由中国科学院昆明植物研究所罗晓东研究员惠赠。

1.3 试剂 沙氏液体培养基、沙氏琼脂培养基(广东环凯微生物科技有限公司, 批号 1097061、1106401); 二甲亚砜(DMSO)(天津市化学试剂一厂, 批号 EZ6789B127); K_2HPO_4 (西陇科学股份有限公司, 批号 181024); 氯仿(云南杨林工业开发区汕滇药业有限公司, 批号 20191015); 营养肉汤、罗丹明 6G(R6G)、甘露醇(北京索莱宝科技有限公司, 批号 531F031、20200928、20181010); 无氨基酸酵母氮源培养基(yeast nitrogen base, YNB)(北京酷来搏科技有限公司, 批号 PM291712100); 葡萄糖(广州赛国生物科技有限公司, 批号 EZ2811F128); TRIzol 试剂(上海罗氏制药有限公司, 批号 252612); cDNA 逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒(美国 Promega 公司, 批号 0000499195、0000497768); db-cAMP(美国 MedChemExpress 公司, 批号 66069)。

1.4 仪器 恒温恒湿真菌培养箱(天津市泰斯特仪器有限公司); 恒温摇床(上海天呈实验仪器制造有限公司); 生物安全柜(新加坡 ESCO 公司); 血细胞计数板(上海求精生化试剂仪器有限公司); 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); 倒置生物显微镜(德国卡尔蔡司公司); 多功能 PCR 仪(杭州晶格科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 培养基配制 SD 液体培养基: 精密称取营养肉汤 2 g 至 200 mL 纯水混匀溶解, 115℃湿热灭菌 30 min, 冷却至 50~60℃, 加入 2 g 甘露醇、0.4 g K_2HPO_4 混匀后置于 4℃冰箱保存备用。

Spider 液体培养基: 灭菌纯水 200 mL, YNB 1.34 g, 葡萄糖 4 g 分别单独溶解, 混合在一起后置于 4℃冰箱保存备用。

卵黄琼脂培养基: 2 g 葡萄糖、4 g 蛋白胨、2 g 琼脂粉、4.64 g NaCl、0.006 9 g $CaCl_2$ 至 100 mL 纯水, 121℃湿热灭菌 15 min, 冷却至 45~55℃, 加入 15 mL 新鲜蛋黄悬液(蛋黄与生理盐水等体积混匀)轻轻混匀。

2.2 灯台叶总碱体外抗真菌活性筛选 采用 CLSI-M27-A3 微量稀释法^[4]测定灯台叶总碱对 SC5314 和临床分离株的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。菌株在沙氏琼脂培养基中传至第二代, 收集菌细胞用沙氏液

体培养基调整终浓度为 1×10^5 CFU/mL。药物质量浓度梯度设为 1 000、200、40、8、1.6、0.32 $\mu\text{g/mL}$ 。96 孔板中每孔加入 100 μL 不同质量浓度的含药培养基, 再加入 100 μL 菌细胞悬液混匀, 37℃恒温恒湿培养 24 h, 测定 625 nm 波长处光密度(OD)值, 以抑制率达到 80% 以上的药物浓度作为最小抑菌浓度。实验同时设置培养基空白对照、正常生长对照。

2.3 灯台叶总碱与氟康唑联用剂量设置 采用棋盘法测定灯台叶总碱与氟康唑联用对 CA23 的 MIC。96 孔板分别加入不同质量浓度的灯台叶总碱与氟康唑, 药物按 2 倍倍比稀释, 氟康唑质量浓度梯度 0~128 $\mu\text{g/mL}$, 灯台叶总碱质量浓度梯度 0~1 024 $\mu\text{g/mL}$ 。每孔分别加入对应的各 50 μL 不同质量浓度的含药培养基, 操作步骤同“2.2”项。

2.4 灯台叶总碱与氟康唑联用对耐药白念珠菌时间-杀菌曲线的影响 实验设立对照组、氟康唑组、灯台叶总碱组、氟康唑+灯台叶总碱组, 每组分别加入相应药物及菌液, 菌液终浓度为 1×10^5 CFU/mL, 无菌过滤透气封口膜封口培养。各组分别在 0、2、4、8、12、24、36、48、72 h 取样 100 μL 于 96 孔板中(每组设置 3 个复孔), 在 625 nm 波长处测定 OD 值。以取样时间为横坐标(X), 所测 OD 值为纵坐标(Y)绘制时间-杀菌曲线。

2.5 灯台叶总碱与氟康唑联用对耐药白念珠菌外排系的影响 使用新鲜沙氏液体培养基调整 CA23 终浓度为 1×10^7 CFU/mL, 除对照组外, 氟康唑组、灯台叶总碱组、氟康唑+灯台叶总碱组分别加入相应药物, 与菌液共同摇床孵育 5 h, 无菌 PBS 清洗 3 次, 10 mL PBS 重悬, 摇床孵育 1 h, 充分消耗葡萄糖; 分别加入 R6G(终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$), 摇床孵育 1 h, 冰水浴 10 min 终止吸收, PBS 清洗 3 次, 将上述分组再分 2 个组系, 一组系加入含 5% 葡萄糖的 PBS, 另一组系加入无菌 PBS 继续孵育, 并于 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h 取 1 mL, 离心取上清 100 μL , 在激发波长 488 nm、发射波长 525 nm 处检测荧光强度, 各组每 1 个时间点设 3 个复孔。

2.6 灯台叶总碱与氟康唑联用对耐药白念珠菌耐药相关基因的影响

2.6.1 菌液准备 将培养 16~24 h 的菌株用新鲜沙氏液体培养基重悬调整浓度为 1×10^5 CFU/mL, 设立对照组、氟康唑组、灯台叶总碱组、氟康唑+灯台叶总碱组。每组总体积 40 mL, 分别加入菌液和对应药物混匀, 无菌过滤透气封口膜封口, 于恒温摇床 37℃, 150 r/min 培养 16 h 后, 离心弃上清并用无菌 PBS 洗 3 次备用。

2.6.2 总 RNA 提取 采用液氮研磨法提取各组总 RNA。用接种环取适量菌细胞至预冷的研钵中, 把菌细胞调整为便于研磨的立体状, 加入液氮快速研磨至白色粉末出现, 加入 TRIzol 裂解液混匀, 将其转移至无菌无酶 EP 管中, 室温放置 5 min, 加入氯仿剧烈混匀, 室温放置 3 min, 4℃、12 000 r/min 离心 15 min, 待样品分层后取上清 200 μL , 加入等体积异丙醇轻轻混匀, 室温放置 10 min,

4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min，弃上清，加入 75% 乙醇洗涤沉淀 2 次，弃上清，加入无酶水使 RNA 沉淀完全溶解。

2.6.3 cDNA 制备 按 Promega Go Script 反转录试剂盒，20 μL 总体系，冰上进行 cDNA 逆转。加样结束后，低速离心机使之沉降混匀，进行逆转录，反应条件为 42 ℃ 15 min，70 ℃ 15 min，4 ℃ 10 min。

2.6.4 引物设计及合成 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成，序列见表 1。

表 1 引物序列 (I)

基因	序列(5'→3')	产物长度/bp
ACT1-正向	ACGGTGAAGAAGTTGCTGCT	180
ACT1-反向	TGGATTGGGCTTCATCACCA	
CDR1-正向	GGTGCTGCCATGTTCTTTGC	133
CDR1-反向	AGGCATCAGCTGAAGGACGA	
CDR2-正向	AAGAGAAGCTCCATCGAGAACATTACAG	149
CDR2-反向	CTGTGCGTTTCAGCATTGGCATATAATC	
MDR1-正向	GTGCTGCTACTACTGCTTCTGGTG	139
MDR1-反向	AACACTGATGCAATGACTGATCTGAAC	
EFG11-正向	ATTGGAGACGTGATGCAGCT	80
EFG11-反向	ATCACACGTTCTCTTCTCAGT	

2.6.5 实时荧光定量 PCR 反应 按照试剂盒制备反应体系，总体系 20 μL。加样结束后，低速离心机使之沉降混匀，反应条件为预变性 95 ℃ 120 s；扩增定量程序 40 个循环，循环参数为 95 ℃ 变性 120 s，95 ℃ 退火 15 s，72 ℃ 延伸 60 s。每个样品设置 3 个复孔，重复实验 3 次。

2.7 灯台叶总碱与氟康唑联用对耐药白念珠菌形态转化的影响 菌丝诱导液体培养基 Spider/SD 调整菌株终浓度为 1×10^5 CFU/mL，实验分为对照组、氟康唑组、灯台叶总碱组、氟康唑+灯台叶总碱组。每组总体积 4 mL，分别加入菌液和相应药物混匀，每孔 1 mL，接种于 24 孔板，37 ℃ 下恒温恒湿孵育，分别在 2、4、6 h 于显微镜下观察白念珠菌形态转化情况并拍照。

2.8 扫描电镜观察耐药白念珠菌菌丝形态 菌丝诱导液体培养基 Spider/SD 调整菌株终浓度为 1×10^5 CFU/mL，实验分为对照组、氟康唑组、灯台叶总碱组、氟康唑+灯台叶总碱组。每组总体积 4 mL，分别加入菌液和相应药物混匀，每孔 1 mL，接种于 24 孔板，37 ℃ 下恒温恒湿孵育 6 h，离心收集菌细胞，用预冷无菌 PBS 洗涤并重悬，调整适量浓度。各组取 10 μL 垂直滴在细胞爬片上，37 ℃ 室温放置 30 min，加入 20 μL 5% 戊二醛，避光固定过夜。无菌 PBS 清洗固定好的细胞爬片，乙醇梯度脱水，干燥后将样品贴在带双面胶纸带的样品台上，经真空蒸镀仪喷金 20 min，于扫描电镜下观察并拍照。

2.9 灯台叶总碱与氟康唑联用对耐药白念珠菌菌丝相关基因的影响

2.9.1 引物设计及合成 引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成，序列见表 2。

表 2 引物序列 (II)

引物	序列(5'→3')	产物长度/bp
RAS1-正向	GTGGTGGTGTITGGTAAATCCG	178
RAS1-反向	TGTTCTCTCATGGCCAGATATTC	
CYR1-正向	ACTTGGTACTGCAGACTGG	110
CYR1-反向	ACCCATACGAACCGACAACC	
ALS3-正向	TGTTCTGCCGTTATCGTC	124
ALS3-反向	GAAAGTGCACGTTGCCAAT	
BCR1-正向	GCATTGCCACCACCCTAA	170
BCR1-反向	AATGCCAATGGTTCGGGTCT	
ALS2-正向	GTACCTCGAATCCAGGGGC	113
ALS2-反向	CCACTGGCAGGGATATTTGGT	
TPK2-正向	GTCCAGCTCCAACATTACCCA	123
TPK2-反向	GAACGTTACAGCAACAACGA	
EFG1-正向	AATGTGGCCCAAATGACACG	131
EFG1-反向	GCCATGGCCAATGCTCTTTC	

2.9.2 实时荧光定量 PCR 按照试剂盒制备反应体系，总体系 20 μL。加样结束后，低速离心机使之沉降混匀，反应条件为 95 ℃ 预变性 600 s；扩增定量程序 45 个循环，循环参数为 95 ℃ 变性 15 s，55 ℃ 退火 30 s，72 ℃ 延伸 30 s。每组样品设置 3 个复孔，重复实验 3 次。

2.10 外源性 cAMP 添加实验 使用菌丝诱导液体培养基 Spider/SD 调整菌株浓度为 1×10^5 CFU/mL，实验分为对照组、氟康唑+灯台叶总碱组、添加 db-cAMP 的对照组和添加 db-cAMP 的氟康唑+灯台叶总碱组。每组总体积 4 mL，分别加入菌液、相应药物和 db-cAMP 混匀，每孔 1 mL，接种于 24 孔板，37 ℃ 恒温恒湿孵育，于显微镜下观察白念珠菌形态转化情况并拍照。

2.11 灯台叶总碱与氟康唑联用对耐药白念珠菌胞外磷脂酶活性的影响 使用新鲜沙氏液体培养基调整 CA23 浓度为 1×10^5 CFU/mL，实验分为对照组、氟康唑组、灯台叶总碱组、联用 I 组 (1/4MIC)、联用 II 组 (1/2MIC)、联用 III 组 (1MIC)、联用 IV 组 (2MIC)、联用 V 组 (4MIC)。每组体积 10 mL，加入菌液和相应药物，37 ℃ 恒温摇床 150 r/min 培养 16~24 h 后，离心弃上清并用无菌 PBS 清洗 3 次，PBS 重悬调整浓度为 1×10^7 CFU/mL，每组取 10 μL 滴加于卵黄琼脂培养基皿上，37 ℃ 恒温恒湿培养箱中培养 72 h，游标卡尺测量沉淀圈及菌落直径，计算 Pz 值，公式为 $Pz = \text{菌落直径} / \text{沉淀圈直径}$ ，以 Pz 值的大小表示磷脂酶的活性。每组平行 3 次，实验重复 3 次。

2.12 统计学分析 通过 Graphpad Prism 8.0 软件进行处理，计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间正态分布资料采用 t 检验，多组间差异比较采用单因素方差分析。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 灯台叶总碱体外抗真菌活性 如表 3 所示，除 SC5314、CA4574 外，其余菌株均为氟康唑耐药株。灯台叶总碱单用对氟康唑耐药株及敏感株均无抑菌作用；灯台叶总碱与氟康唑联用时，对敏感株有抑制作用，但无协同增效作用，但对所有氟康唑耐药株均表现为显著协同抑菌作

用,其联合指数 FICI 在 0.006~0.11 范围。

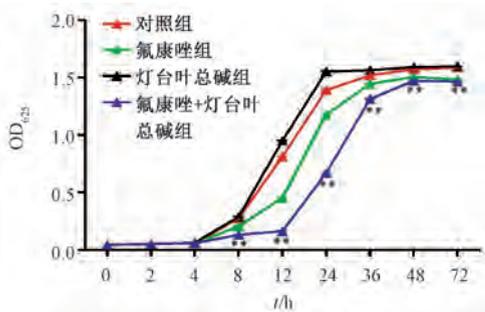
表 3 氟康唑与灯台叶总碱对白念珠菌的抑菌活性 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

菌株	MIC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			联合指数 (FICI)
	氟康唑	灯台叶总碱	氟康唑+灯台叶总碱	
SC5314	1.59±0.07	>1 000	1.16±0.02	0.71
CA23	>1 000	>1 000	31.23±1.18	0.03
CA3816	>1 000	>1 000	17.17±2.18	0.02
CA187	>1 000	>1 000	65.97±0.67	0.07
CA800	>1 000	>1 000	62.05±3.15	0.06
CA3511	>1 000	>1 000	14.31±2.10	0.01
CA4508	>1 000	>1 000	42.35±2.02	0.04
CA381	>1 000	>1 000	27.31±1.46	0.03
CA808	>1 000	>1 000	108.73±2.87	0.11
CA602	>1 000	>1 000	6.54±0.20	0.006
CA550	>1 000	>1 000	25.38±1.79	0.03
CA4574	0.36±0.02	>1 000	0.33±0.01	0.94

3.2 灯台叶总碱与氟康唑最佳联用浓度测定 棋盘法测定灯台叶总碱与氟康唑对临床白念珠菌 CA23 联用时的药物

表 4 灯台叶总碱与氟康唑不同联用剂量的抑菌情况 ($n=3$)

氟康唑/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	灯台叶总碱/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)										
	0	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1 024
0	0	-0.12	2.13	3.22	2.72	-0.28	-1.83	-1.35	-0.28	-0.17	79.58
2	15.39	19.34	16.19	24.74	38.40	76.92	96.70	96.51	95.77	89.53	76.86
4	19.10	23.17	19.71	21.13	33.97	70.04	94.78	96.15	95.85	89.99	76.59
8	18.48	24.16	18.00	26.59	44.37	72.00	90.64	95.68	95.66	90.12	79.16
16	20.43	29.73	22.13	31.42	51.25	87.44	92.66	96.17	95.60	88.58	77.68
32	16.88	21.70	15.68	23.86	52.31	81.45	92.45	95.71	95.82	90.75	75.95
64	14.88	15.56	16.83	28.80	56.10	90.57	95.56	96.64	96.05	89.46	77.02
128	13.70	20.84	19.28	23.07	65.70	93.94	96.91	97.66	96.83	90.74	79.42



注:与对照组比较,** $P<0.01$ 。

图 1 灯台叶总碱与氟康唑对 CA23 时间-杀菌曲线的影响 ($n=3$)

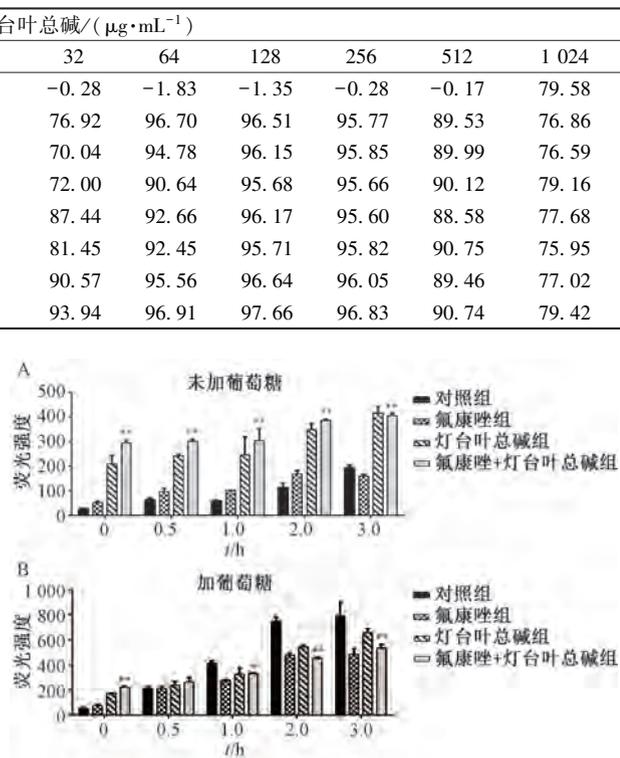
3.5 灯台叶总碱与氟康唑对耐药白念珠菌耐药相关基因表达的影响 如图 3 所示,与对照组比较,氟康唑+灯台叶总碱组仅下调 *MDR1* mRNA 表达 ($P<0.01$),但与氟康唑组比较并无明显变化。

3.6 灯台叶总碱与氟康唑对耐药白念珠菌形态转化的影响 如图 4 所示,CA23 在 SD 和 Spider 液体培养基培养 6 h 均能形成错综复杂、细长盘绕的菌丝。给药处理后,灯台叶总碱组对菌丝并无抑制作用,氟康唑组在 2、4 h 均有抑制作用,6 h 略有轻微抑制作用;而灯台叶总碱和氟康唑联

质量浓度,以两药联用能达到的最小抑菌浓度为标准,主要对应抑制率达 80% 以上的药物质量浓度,具体对应灯台叶总碱质量浓度 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$,氟康唑质量浓度 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$,结果见表 4。

3.3 灯台叶总碱与氟康唑对耐药白念珠菌时间-杀菌曲线的影响 如图 1 所示,单用氟康唑 (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对 CA23 有轻微抑制作用,单用灯台叶总碱 (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 则无明显抑制作用;灯台叶总碱联合氟康唑作用 4 h 后,表现出抑制作用,尤其是药物处理 12 h 时 ($P<0.01$)。

3.4 灯台叶总碱与氟康唑对耐药白念珠菌外排水平的影响 与对照组比较,未加葡萄糖组,在灯台叶总碱和氟康唑+灯台叶总碱分别处理 3 h 内,均对菌株的外排无抑制,见图 2A。与对照组比较,加葡萄糖组,氟康唑和氟康唑+灯台叶总碱分别处理 3 h 内,均于第 0.5 小时后开始抑制菌株的外排,并持续至第 3 小时 ($P<0.05$, $P<0.01$);但与氟康唑组比较,氟康唑+灯台叶总碱组并无明显变化,见图 2B。

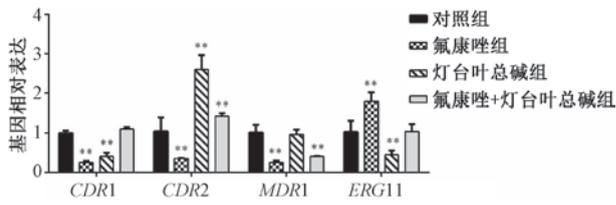


注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 2 灯台叶总碱与氟康唑对 CA23 外排水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

合组在 2、4、6 h 均能抑制菌丝的生长,且与氟康唑组比较,抑制作用持续,菌丝长度较短,菌丝数量也减少。

3.7 扫描电镜下观察灯台叶总碱与氟康唑对耐药白念珠菌菌丝形态的影响 如图 5 所示,扫描电镜下,氟康唑与灯台叶总碱联用能够抑制 CA23 菌株在 2 种菌丝诱导培养基中的菌丝生长,而氟康唑与灯台叶总碱分别单独处理下依然存在菌丝交错。



注：与对照组比较，** $P < 0.01$ 。

图3 灯台叶总碱与氟康唑对CA23耐药相关基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.8 灯台叶总碱与氟康唑对耐药白念珠菌菌丝相关基因表达的影响 与对照组比较，灯台叶总碱组和氟康唑+灯台叶总碱组菌丝相关基因 *RAS1*、*CYR1*、*BCR1*、*EFG1*、*ALS2*、*ALS3*、*TPK2* mRNA 表达降低 ($P < 0.01$)，氟康唑组 *RAS1*、*BCR1*、*EFG1*、*ALS2*、*ALS3*、*TPK2* mRNA 表达降低 ($P < 0.01$)；与氟康唑组比较，氟康唑+灯台叶总碱组 *RAS1*、*CYR1*、*BCR1*、*ALS2*、*ALS3*、*TPK2* mRNA 表达降低 ($P < 0.01$)，而 *EFG1* mRNA 表达无明显变化 ($P < 0.01$)，见图6。

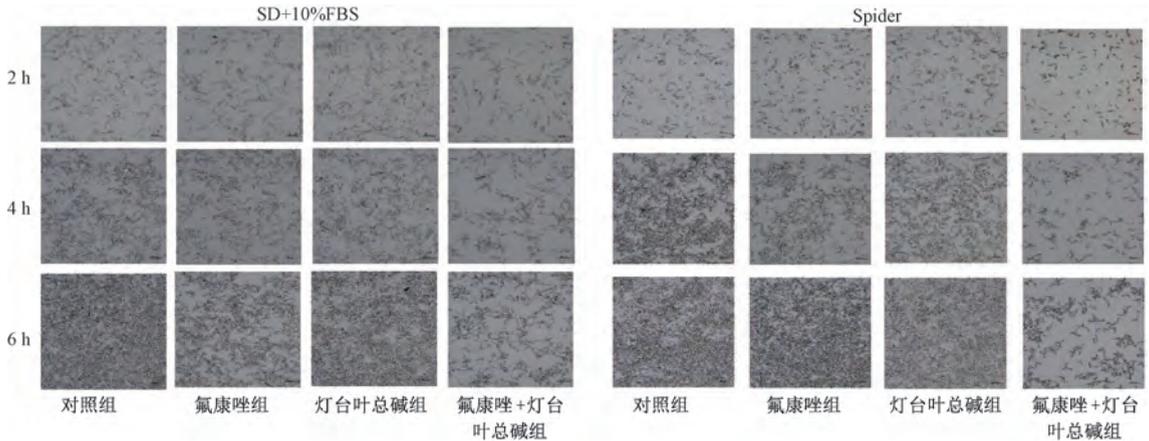


图4 灯台叶总碱与氟康唑对CA23形态转化的影响 ($\times 20$)

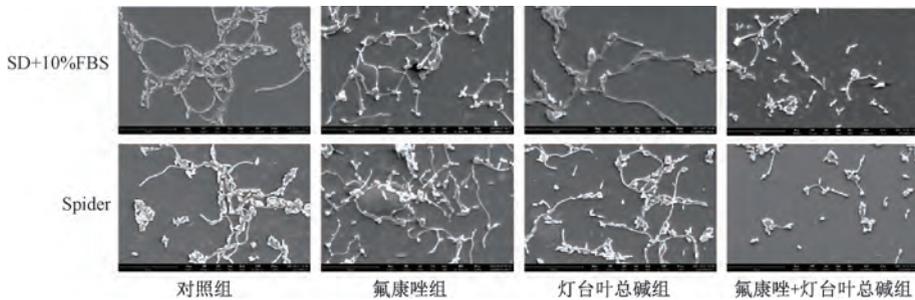
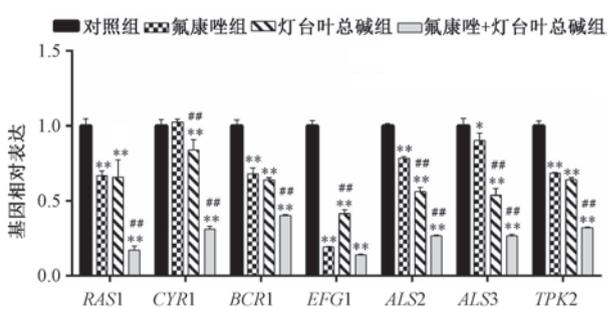


图5 扫描电镜下灯台叶总碱与氟康唑对CA23形态转化的影响 ($\times 3000$)



注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与氟康唑组比较，### $P < 0.01$ 。

图6 灯台叶总碱与氟康唑对CA23菌丝相关基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.9 添加外源性cAMP对灯台叶总碱与氟康唑作用于CA23的影响 如图7所示，cAMP类似物的加入可以减轻部分氟康唑与灯台叶总碱联用引起的菌株形态变化，尤其

是在SD液体培养基中，可以看出添加外源性cAMP后，氟康唑与灯台叶总碱联用组菌丝更密集。

3.10 灯台叶总碱与氟康唑对耐药白念珠菌胞外磷脂酶活性的影响 磷脂酶活性分为阴性 ($P_z = 1$)、极低 ($P_z = 0.90 \sim 0.99$)、低 ($P_z = 0.80 \sim 0.89$)、高 ($P_z = 0.70 \sim 0.79$)、极高 ($P_z = 0.60 \sim 0.69$)。如表5所示，CA23有极高的磷脂酶活性，灯台叶总碱处理后并无明显变化 ($P > 0.05$)，氟康唑处理对磷脂酶活性有略微抑制作用，但磷脂酶活性依然高 ($P < 0.05$)，氟康唑与灯台叶总碱联用能降低磷脂酶活性 ($P < 0.01$)，且对灯台叶总碱呈现剂量依赖性。

4 讨论

灯台叶是夹竹桃科鸡骨常山属糖胶树的干燥叶^[5]，具有镇痛止咳、抗氧化、抗肿瘤等广泛的药理活性^[6]。研究显示，灯台叶提取物对部分细菌和真菌均具有良好的抑菌活性^[7-8]，还具有一定的抗病毒作用^[9]，但对白念珠菌相

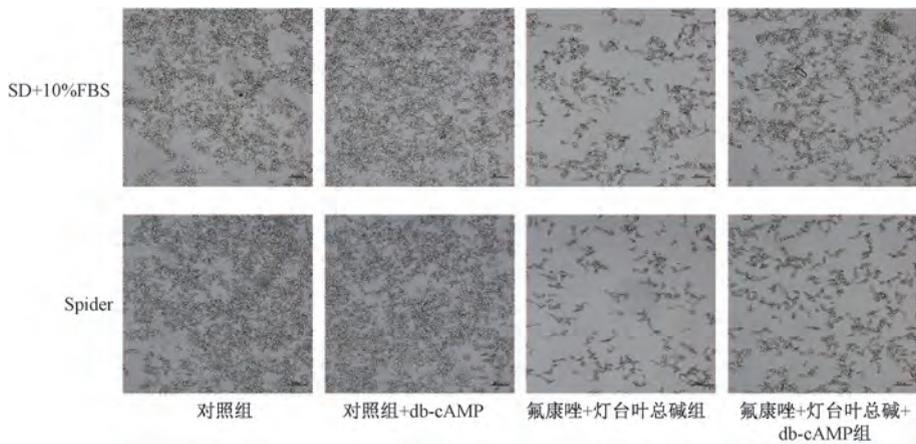


图7 外源性cAMP对灯台叶总碱与氟康唑作用于CA23的影响(×20)

关研究报道甚少。本实验发现,灯台叶总碱与氟康唑联用仅对白念珠菌氟康唑耐药株表现出协同作用,其FICI在0.006~0.11。

表5 灯台叶总碱与氟康唑对CA23胞外磷脂酶活性的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	Pz 值	磷脂酶活性
对照组	0.66±0.02	极高
氟康唑组	0.73±0.01*	高
灯台叶总碱组	0.68±0.01	极高
联用I组	0.84±0.01**	低
联用II组	0.87±0.01**	低
联用III组	0.88±0.01**	低
联用IV组	0.91±0.04**	极低
联用V组	0.97±0.04**	极低

注:联用I组为1/4MIC,联用II组为1/2MIC,联用III组为1MIC,联用IV组为2MIC,联用V组为4MIC。与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

白念珠菌对唑类耐药的原因是多方面的^[10],一方面是外排泵活力增强,主要表现膜转运蛋白增加,如CDR1p、CDR2p、MDR1p^[11];另一方面是ERG11基因的过表达或突变^[12]。本课题组就此进行研究,发现灯台叶总碱的增敏作用与耐药基因表达无关,而与毒力因子相关。

白念珠菌从共生菌转变为病原体的过程中伴随毒力因子的释放,如粘附素的表达、生物膜的形成、水解酶的分泌、形态的改变以及其代谢适应性等^[13]。白念珠菌形态转变是其毒力因子之一。白念珠菌能够在宿主体内以酵母、假菌丝和菌丝生长形式间进行可逆转换^[14]。通过菌丝的形成、伸长、拉伸能最终杀死巨噬细胞^[15],抵抗免疫系统,增加致病风险。在2种诱导菌丝生长的液体培养基中均观察到临床耐药株CA23形成密集、盘绕的菌丝,加入氟康唑和灯台叶总碱后,菌丝长度较短且数量减少,从而抑制菌丝生长。

白念珠菌依赖Ras1/cAMP/PKA信号通路,参与调节形态转换和毒力特性。缺失RAS1基因会导致菌丝生长缺陷,同时降低系统性感染模型小鼠的毒力^[16]。而TPK2基因的缺失,使PKA活性降低为野生型的10%,伴随菌丝生长受

阻^[17]。转录调控因子EFG1及BCR1,在调节菌丝方面发挥重要作用^[18]。凝集素样序列基因家族(agglutinin-like sequence, ALS)是白念珠菌粘附的主要成员,ALS3高表达白念珠菌更易导致对唑类药物的耐药性增加^[19]。本实验结果显示,氟康唑和灯台叶总碱联用降低了RAS1、CYR1、TPK2、BCR1、ALS2和ALS3 mRNA表达,但对EFG1 mRNA表达的影响与氟康唑单用并无明显变化,说明两药联用对Ras1/cAMP/PKA通路可能是通过中央调控因子BCR1来调节的。加入db-cAMP,再次验证两药联用对菌丝的抑制是通过Ras1/cAMP/PKA途径实现的。

磷脂酶作为白念珠菌中另一重要的毒力因子,主要通过分解宿主细胞膜,增加膜通透性,提高入侵宿主的能力^[20]。本研究发现,氟康唑和灯台叶总碱联用对白念珠菌的抑制作用可能与抑制胞外磷脂酶活性有关,且抑制效果与灯台叶总碱剂量呈正相关。

综上所述,灯台叶总碱与氟康唑联用对白念珠菌临床耐药株表现出良好的协同作用,其可能是通过抑制菌丝和磷脂酶活性,调节Ras1/cAMP/PKA途径影响白念珠菌毒力因子而引起的。这表明灯台叶总碱有成为氟康唑增敏剂的潜力,但灯台叶总碱对临床耐药株深入的作用机制及其在体内抗真菌的作用机制还有待研究。

参考文献:

- [1] Morad H O J, Wild A M, Wiehr S, et al. Pre-clinical imaging of invasive Candidiasis using immunoPET/MR [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1996.
- [2] Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, et al. *Candida albicans*—The virulence factors and clinical manifestations of infection [J]. *J Fungi (Basel)*, 2021, 7(2): 79.
- [3] 李贞,陈伟琴,胡骏,等.中药对念珠菌的抑菌现状及机制研究进展[J]. *上海中医药杂志*, 2019, 53(12): 83-88; 92.
- [4] 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.
- [5] 杨妮娜,徐安顺,赵应红,等.傣药“摆埋丁别”生药学鉴

- 别研究[J]. 中国民族医药杂志, 2018, 24(1): 24-28.
- [6] Khyade M S, Kasote D M, Vaikos N P. *Alstonia scholaris* (L.) R. Br. and *Alstonia macrophylla* Wall. ex G. Don: A comparative review on traditional uses, phytochemistry and pharmacology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153(1): 1-18.
- [7] Yu H F, Huang W Y, Ding C F, et al. Cage-like monoterpene indole alkaloids with antimicrobial activity from *Alstonia scholaris* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2018, 59(31): 2975-2978.
- [8] Altaf I U K, Hussain M M, Rahim A. Phytochemical and antimicrobial study of *Alstonia scholaris* leaf extracts against multidrug resistant bacterial and fungal strains[J]. *Pak J Pharm Sci*, 2019, 32(4): 1655-1662.
- [9] Zhou H X, Li R F, Wang Y F, et al. Total alkaloids from *Alstonia scholaris* inhibit influenza A virus replication and lung immunopathology by regulating the innate immune response[J]. *Phytomedicine*, 2020, 77: 153272.
- [10] Luna-Tapia A, Kerns M E, Eberle K E, et al. Trafficking through the late endosome significantly impacts *Candida albicans* tolerance of the azole antifungals [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(4): 2410-2420.
- [11] 吴永琴, 应春妹. 白念珠菌唑类药物相关耐药基因及其调控机制的研究进展[J]. 检验医学, 2016, 31(9): 739-743.
- [12] Xu J L, Liu R H, Sun F J, et al. Eucalyptal D enhances the antifungal effect of fluconazole on fluconazole-resistant *Candida albicans* by competitively inhibiting efflux pump[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9: 211.
- [13] Ciurea C N, Kosovski I B, Mare A D, et al. *Candida* and Candidiasis—Opportunism versus pathogenicity: A review of the virulence traits[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(6): 857.
- [14] Lu Y, Su C, Liu H P. *Candida albicans* hyphal initiation and elongation[J]. *Trends Microbiol*, 2014, 22(12): 707-714.
- [15] McKenzie C G, Koser U, Lewis L E, et al. Contribution of *Candida albicans* cell wall components to recognition by and escape from murine macrophages [J]. *Infect Immun*, 2010, 78(4): 1650-1658.
- [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] 鲁仁义, 马钱瑶, 张晓龙, 等. 白念珠菌 Ras/cAMP/PKA 通路的研究进展[J]. 中国真菌学杂志, 2017, 12(1): 52-57.
- [18] Liu X N, Li T, Wang D C, et al. Synergistic antifungal effect of fluconazole combined with licofelone against resistant *Candida albicans*[J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2101.
- [19] Deng K K, Jiang W, Jiang Y Y, et al. ALS3 Expression as an indicator for *Candida albicans* biofilm formation and drug resistance[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 655242.
- [20] 邱熙然, 陈思敏, 侯炜彤, 等. 白念珠菌侵袭宿主毒力因子研究进展[J]. 中国真菌学杂志, 2020, 15(3): 183-188.