

- [8] 曾慧婷, 沙秀秀, 朱邵晴, 等. 丹参及丹参茎叶水提物 UPLC 指纹图谱研究与丹酚酸类成分定量分析[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(4): 602-609.
- [9] 喻芳君, 钱 浩, 马志国. 鲜丹参的干燥工艺研究[J]. 海峡药学, 2016, 28(11): 38-40.
- [10] 郭 辉. 不同干燥方式对丹参多酚酸类成分的影响[J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15(17): 107; 112.
- [11] 陈立军, 黄文芳, 刘苗苗, 等. 丹参中多酚酸类成分的干燥方式研究[J]. 中药材, 2014, 37(9): 1680-1682.
- [12] 沙秀秀. 丹参茎叶资源化学研究与药材质量标准的建立[D]. 南京: 南京中医药大学, 2016.
- [13] 翟宏宇, 郝邦竹, 王海洋, 等. HPLC 测定丹参茎叶花中迷迭香酸和丹酚酸 B 的含量[J]. 中国现代中药, 2018, 20(3): 298-300.
- [14] 银慧慧, 刘 伟, 赵 武, 等. 桃金娘根总多酚的超声提取及抗氧化活性研究[J]. 中国医药导报, 2019, 16(10): 33-36.
- [15] Berker K I, Kubilay G, Tor I, et al. Total antioxidant capacity assay using optimized ferricyanide/prussian blue method[J]. *Food Anal Method*, 2010, 3(3): 154-168.
- [16] Wang C Y, Chen Y W, Hou C Y. Antioxidant and antibacterial activity of seven predominant terpenoids[J]. *Int J Food Prop*, 2019, 22(1): 230-238.
- [17] Lu C, Li H, Li C, et al. Chemical composition and radical scavenging activity of *Amygdalus pedunculata* Pall leaves' essential oil[J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 119: 368-374.
- [18] Li X, Wang Z Z. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil in leaves of *Salvia miltiorrhiza* Bunge[J]. *J Essent Oil Res*, 2009, 21(5): 476-480.
- [19] 刘铁军, 孙胜斌, 陈翔宇, 等. 不同浓缩方法对丹参提取液的影响[J]. 中国现代中药, 2018, 20(2): 208-212.
- [20] 李晓英, 薛 梅, 樊汶樵, 等. 不同干燥方式对蓝莓叶中酚类物质及其抗氧化活性的影响[J]. 中国农业科学, 2018, 51(13): 2570-2578.
- [21] Periche A, María Luisa Castelló, Heredia A, et al. Effect of different drying methods on the phenolic, flavonoid and volatile compounds of *Stevia rebaudiana* leaves[J]. *Flavour Fragr J*, 2015, 31(2): 173-177.
- [22] 邹 容, 游玉明, 陈泽雄, 等. 干燥方式对金银花多酚组分及其抗氧化活性的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(5): 78-83.
- [23] 沙秀秀, 宿树兰, 沈 飞, 等. 不同生长期丹参茎叶及花序中丹酚酸类化学成分分布与积累动态分析评价[J]. 中草药, 2015, 46(22): 3414-3419.
- [24] Anwar F, Kalsoom U, Sultana B, et al. Effect of drying method and extraction solvent on the total phenolics and antioxidant activity of cauliflower (*Brassica oleracea* L.) extracts[J]. *Int Food Res J*, 2013, 20(2): 653-659.
- [25] 李 帆, 邵佩兰, 韩娅婷, 等. 干燥方式对红枣色素活性成分含量及抗氧化活性的影响[J]. 食品科技, 2019, 44(1): 120-124.
- [26] 余 茜, 马 燕, 范丹君, 等. NaCl-CaCl₂ 处理对发芽大豆酚类物质富集及抗氧化能力的影响[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(1): 152-158.

大蒜素对白色念珠菌毒力因子作用机制的研究

熊延靖, 吴艳红, 陈 京

(皖南医学院, 医学微生物学与医学免疫学教研室, 安徽 芜湖 241002)

摘要: 目的 探讨大蒜素对白色念珠菌毒力因子的作用机制。方法 采用 CLSI-M27-A3 微量液基稀释法检测大蒜素对白色念珠菌的最小抑菌浓度 (MIC); 通过时间-杀菌曲线检测大蒜素的杀菌作用; Spider 液体培养基中观察大蒜素对白色念珠菌菌丝生长的影响; qRT-PCR 法检测大蒜素对白色念珠菌菌丝相关基因表达的影响; 卵黄乳液琼脂平板法检测大蒜素对白色念珠菌细胞外磷脂酶活性的影响。结果 大蒜素对白色念珠菌的 MIC 值为 12.5~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 时间-杀菌曲线显示 2 MIC、4 MIC 浓度的大蒜素对白色念珠菌生长保持有效的抑制作用; 在 Spider 液体培养基中, 1 MIC、2 MIC、4 MIC 浓度的大蒜素能明显抑制白色念珠菌菌丝的生长; qRT-PCR 结果显示, 在 1 MIC、2 MIC、4 MIC 浓度的大蒜素作用下, 白色念珠菌菌丝相关基因表达下调; 当大蒜素浓度 $\geq 1/2$ MIC 时, 白色念珠菌细胞外磷脂酶的活性降低。结论 大蒜素可通过抑制白色念珠菌菌丝生长、调节菌丝相关基因的表达, 以及抑制细胞外磷脂酶活性等, 发挥抑制白色念珠菌毒力因子的作用。

关键词: 大蒜素; 白色念珠菌; 菌丝; 作用机制

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)11-2964-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.11.026

收稿日期: 2019-11-19

基金项目: 皖南医学院自然科学研究项目 (WK201909); 安徽省教育厅自然科学重点项目 (KJ2019A0425)

作者简介: 熊延靖 (1982—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为药物分析。Tel: 13506552513, E-mail: 463658122@qq.com

Mechanism of allicin on the virulence factors of *Candida albicans*

XIONG Yan-jing, WU Yan-hong, CHEN Jing

(Department of Microbiology and Immunology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China)

KEY WORDS: allicin; *Candida albicans*; hyphae; mechanism

白色念珠菌 *Candida albicans* 是常驻于人体内的一种条件致病性真菌。目前随着抗癌药物、HIV 感染、免疫抑制剂的大量使用等引起的免疫功能下降,以及侵入性治疗如血透、插管技术等广泛应用,均可能造成全身或局部真菌感染。据相关统计,侵袭性念珠菌病在全球范围内已达 25 万人/年,死亡案例超过 5 万^[1],并且已成为重症监护室重症感染的首要病因^[2]。由于抗真菌药物本身的不良反应,同时药物的不合理应用导致的耐药问题亦日趋严重^[3],给抗感染治疗带来巨大挑战。因此,寻找新型高效、广谱、低毒的抗真菌药物具有重要意义。

大蒜素是从百合科植物大蒜 *Allium sativum* L. 的鳞茎中提取的含硫有机化合物的主要有效成分^[4]。研究显示大蒜素对多种细菌、真菌、病毒和寄生虫等均具有良好的抑制作用,被誉为天然广谱抗生素药物^[5]。本研究旨在探讨大蒜素对白色念珠菌毒力因子的作用机制,以期阐明大蒜素的抗真菌作用机制,为丰富大蒜素的临床应用奠定科学基础;同时拓宽大蒜素的应用价值,加快传统中医药的发展。

1 材料

1.1 供试菌株 白色念珠菌标准菌株:AX2-2086,购自广州市微生物研究所。临床分离念珠菌 4 株,CA1、CA2、CA3、CA4。经科玛嘉念珠菌显色培养基和酵母样真菌鉴定卡鉴定为白色念珠菌。所有菌株均连续在改良沙氏固体培养基中接种 2 次,保持菌株活力,4 ℃ 保存备用。

1.2 试剂与药物 二甲基亚砷 (DMSO,美国 Sigma 公司,批号 D2650); RPMI-1640 培养基 (批号 BL303A)、PBS 磷酸盐缓冲液 (批号 BL302A) (北京 Biosharp 公司); 葡萄糖 (批号 F20190509)、甘露醇 (批号 20190321) (国药集团化学试剂有限公司); 蛋白胨 (北京 Solarbio 公司,批号 P8450); 营养肉汤 (北京 Solarbio 公司,批号 N8300); 琼脂粉 (北京奥博星生物技术有限责

任公司,批号 01-023); 卵黄乳液 (青岛海博生物技术有限公司,批号 HB8295); 科玛嘉念珠菌显色培养基 (批号 CA220)、酵母样真菌鉴定卡 (批号 21343) (法国-生物梅里埃公司)。RNA 提取试剂盒 (美国 Omega 公司,批号 R6870-01); 逆转录试剂盒 (日本 TaKaRa 公司,批号 RR047A); qRT-PCR 试剂盒 (瑞士 Roche 公司,批号 6402712001); 引物 (上海生工生物工程有限公司合成)。大蒜素 (江苏正大清江制药有限公司,国药准字 H32025683,批号 190307)。

1.3 仪器 BECKMAN Allegra 64R 高速冷冻离心机 (美国贝克曼公司); THERMOFISHER IMH100 隔水式电热恒温培养箱 (美国 Thermofisher 公司); 微量培养板 (96 孔、6 孔; 美国 Coring 公司); ESCO CLASS II BSC 生物安全柜 (新加坡艾斯克公司); ZQZY-VS2 恒温振荡培养箱 (上海知楚仪器有限公司); ELGA Purelabflex 2 纯水机 (英国埃尔格公司); FA2004 型电子分析天平 (上海良平仪器仪表有限公司); 双目显微镜、倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); BioDrop 核酸蛋白分析仪 (英国柏点公司); Biotek Eon 全波长酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司); Roche lighelycler 96 荧光定量 PCR 仪 (瑞士罗氏公司)。

1.4 培养基制备

1.4.1 改良沙氏培养基 葡萄糖 40 g、蛋白胨 10 g,加入双蒸水定容至 1 L,112 ℃ 高压灭菌 15 min,待培养基冷却至 50 ℃ 左右时加入青霉素 20 U/mL、链霉素 40 U/mL,即为改良沙氏液体培养基。若制备改良沙氏固体培养基,则在上述改良沙氏液体培养基中加入琼脂 20 g 再高压灭菌。4 ℃ 保存备用。

1.4.2 Spider 培养基 营养肉汤 10 g、甘露醇 10 g、K₂HPO₄ 2 g,加入双蒸水定容至 1 L,调整培养基 pH 7.2 (25 ℃),121 ℃ 高压灭菌 20 min,4 ℃ 保存备用。

1.4.3 卵黄乳液琼脂培养基 NaCl 5.73 g、蛋白

胨 1 g、葡萄糖 3 g、CaCl₂·0.055 g、琼脂粉 2 g，加入双蒸水定容至 100 mL。121 °C 高压灭菌 20 min，待高压锅温度降至 70 °C 时，立即取出并加入 10% 卵黄乳液混匀。在培养基中分别加入不同浓度大蒜素（终浓度为 1/4 MIC、1/2 MIC、1 MIC、2 MIC、4 MIC），混匀后分装至无菌培养皿，4 °C 保存备用。

2 方法

2.1 菌液制备 将白色念珠菌标准菌株和临床菌株分别接种于改良沙氏固体培养基中，37 °C 培养 48 h 后，挑取培养基中单克隆菌落，转种至 5 mL 改良沙氏液体培养基，于 37 °C、200 r/min 振荡培养 16 h，使白色念珠菌处于对数生长期。经麦氏比浊管及血细胞计数板计数，以 RPMI-1640 培养液将菌液调整至浓度为 2×10⁶ CFU /mL，4 °C 保存备用。

2.2 药液制备 将大蒜素溶解于 DMSO 中，再用 RPMI-1640 培养液作倍比稀释，使其质量浓度依次为 800、400、200、100、50、25、12.5、6.25 μg/mL。4 °C 保存备用。

2.3 大蒜素对白色念珠菌的最低抑菌浓度 (MIC) 测定 按照美国临床和实验室标准化研究所 (CLSI) 推荐的真菌敏感性检测方法 CLSI-M27-A3^[6]，采用微量液基稀释法中的操作步骤进行并略作改良。

用 RPMI-1640 培养液将白色念珠菌菌液浓度稀释至 2×10³ CFU /mL。将上述浓度的大蒜素依次加入 96 孔微量培养板中，每孔 100 μL，并设生长对照孔 (RPMI-1640 培养液 100 μL+菌液 100 μL，无大蒜素) 和空白对照孔 (RPMI-1640 培养液 200 μL，无菌液，无大蒜素)，每个浓度均设 3 复孔。将配制好的菌液加入相应孔中，每孔 100 μL，使得每一梯度药液和菌液分别被 1 : 1 稀释至终浓度。将 96 孔微量培养板置 37 °C 温箱静置培养 48 h 后观察结果。以上实验在不同时间重复 3 次。

结果判断采用视觉法，肉眼观察孔内菌株生长情况，与不含药物的空白对照孔比较，观察到生长完全抑制、培养基清亮所对应的最低药物浓度为 MIC。

2.4 白色念珠菌时间-杀菌曲线 采用不同时间点取样点板计数的方法绘制大蒜素对白色念珠菌的时间-杀菌曲线。选取白色念珠菌标准菌株 AX2-2086 和临床菌株 CA2 为试验菌株 (下同)。具体实验操作步骤为：取对数生长期的白色念珠菌，用沙氏改

良液体培养基稀释菌液浓度为 2×10⁶ CFU /mL。以各试验菌株的 MIC 值为依据，设置大蒜素终浓度依次为 1/4 MIC、1/2 MIC、1 MIC、2 MIC、4 MIC。将白色念珠菌菌液 2 mL 加入无菌试管中，再依次加入不同浓度大蒜素。同时设立不加药物的空白对照组。混匀后置 37 °C，200 r/min 恒温振荡培养。分别于培养 0、2、4、8、12、24 h 时取 10 μL 菌液按 10 倍倍比稀释，取 100 μL 稀释液均匀涂布于改良沙氏固体培养基上。37 °C 培养 48 h 后计算菌落数目。以时间点为横轴，以不同时间点生长的菌落数的对数为纵轴，绘制时间-杀菌曲线。

2.5 大蒜素对白色念珠菌形态转化的影响 检测大蒜素对白色念珠菌标准菌株 AX2-2086 和临床菌株 CA2 在 Spider 液体培养基中形态转化能力的影响。用 Spider 液体培养基将白色念珠菌稀释至 2×10⁶ CFU /mL。将菌液和不同浓度大蒜素分别加入 6 孔板中，大蒜素终浓度分别为 1/4 MIC、1/2 MIC、1 MIC、2 MIC、4 MIC。同时设立不加药物的空白对照孔。37 °C 静置孵育 6 h。取出孔板，在倒置显微镜明场下观察白色念珠菌菌丝形成情况并拍照。

2.6 qRT-PCR 检测大蒜素对菌丝相关基因表达的影响

2.6.1 总 RNA 提取 将大蒜素与菌液混匀，置 37 °C 静置培养 24 h 后，收集菌体，用无菌 PBS 缓冲液清洗 3 次后提取总 RNA，按照试剂盒说明书进行。

2.6.2 引物设计与合成 所用引物序列见表 1，由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Tab. 1 Primer sequence for qRT-PCR

基因	引物序列(5'-3')
RAS1	正向 GCCCATGAGAGAACAATATA
	反向 GTCTTTCCATTCTAAATCAC
CDC35	正向 TTCATCAGGGGTTATTTTCAC
	反向 CTCTATCAACCCGCCATTTTC
EFG1	正向 TATGCCCCAGCAAACAACCTG
	反向 TTGTGTCTCTGCTGTCTGTC
PDE2	正向 ACCACCACCACTACTACTAC
	反向 AAAATGAGTTGTTCTCTGTCC
18S rRNA	正向 AATTACCCAATCCCGACAC
	反向 TGCAACAACCTTTAATATACGC

2.6.3 cDNA 制备 根据 TaKaRa PrimeScript™ RT reagent Kit 说明书操作。第一步，RNA 1 μg，5×gDNA Eraser Buffer 2 μL，gDNA Eraser 1 μL，加

RNase Free dH₂O 至 10 μL, 反应条件为 42 °C 2 min; 第二步, 取第一步反应液 10 μL, Master Mix 10 μL, 反应条件为 37 °C 15 min, 85 °C 5 sec。

2.6.4 实时荧光定量 PCR 反应 按照试剂盒说明, 制备反应体系见表 2。将所有试剂加好后, 置于荧光定量 PCR 仪中进行反应, 反应条件为预变性 95 °C 600 s; 扩增定量程序为 95 °C 10 s, 60 °C 15 s, 72 °C 20 s, 扩增程序为 45 个循环; 熔解曲线 65~95 °C。每个样品平行 3 次。

表 2 RT-PCR 反应体系

Tab. 2 Reaction system of RT-PCR

试剂	体积/μL
cDNA	1
PCR Forward Primer	1
PCR Reverse Primer	1
Master mix, 2×conc.	10
ddH ₂ O	7
总量	20

2.6.5 定量分析 qRT-PCR 分别测定的目的基因和内参基因的 CT 值, 将实验结果取平均值, 计算并统计。最后基因表达水平用 2^{-ΔΔCT} 法进行分析。

2.7 大蒜素对白色念珠菌细胞外磷脂酶活性的影响 分别取白色念珠菌标准菌株 AX2-2086 和临床菌株 CA2 的菌液 (1×10⁷ CFU/mL) 1 μL, 滴加在含有不同浓度大蒜素 (终浓度为 1/4 MIC、1/2 MIC、1 MIC、2 MIC、4 MIC) 的卵黄乳液琼脂培养基中, 同时设置不加药物的空白对照组。将培养基置 37 °C 培养 4 d 后, 白色念珠菌在平板上形成菌落, 并在菌落周围形成乳黄色不透明的沉淀圈。实验重复 3 次。用游标卡尺测定菌落直径和沉淀圈直径 (含菌落) 直径。细胞外磷脂酶活性用 P_z 表示, P_z=d₁/d₂, 其中, d₁ 为菌落直径, d₂ 为沉淀圈直

径。P_z 值越小, 表明磷脂酶活性越强, 反之则活性越弱。

2.8 统计学分析 所有数据应用 SPSS 21.0 统计软件进行分析处理, 计量资料以 (x̄±s) 表示, 组间差异比较采用单因素方差分析检验, P<0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大蒜素对白色念珠菌的 MIC 值 采用 CLSI-M27-A3 推荐的微量稀释法, 经过 3 次重复体外药物敏感性试验, 大蒜素对白色念珠菌标准菌株 AX2-2086 的 MIC 为 25 μg/mL。对于临床分离菌株, 大蒜素的 MIC 为 12.5~25 μg/mL。结果见表 3, 表明, 大蒜素对白色念珠菌具有良好的抑菌作用。后续选用白色念珠菌标准菌株 AX2-2086 和临床菌株 CA2 作为试验菌株。

表 3 大蒜素对白色念珠菌的 MIC 值 (μg/mL)

Tab. 3 MIC values of allicin to *C. albicans* (μg/mL)

菌种	MIC
AX2-2086	25
CA1	25
CA2	12.5
CA3	25
CA4	12.5

3.2 大蒜素对白色念珠菌的时间-杀菌曲线 时间-杀菌曲线可以反映各时间点药物的抑菌或杀菌作用。本实验通过计数平板上白色念珠菌单克隆菌落的数量, 并根据稀释倍数计算出原始 CFU。结果表明, 2 MIC 和 4 MIC 浓度的大蒜素对白色念珠菌保持有效的抑制作用, 1 MIC 浓度组也具有一定的抑制作用。但是 1/4 MIC 浓度组未显示明显抑制作用, 这与大蒜素对白色念珠菌的 MIC 值结果基本相符, 见图 1。

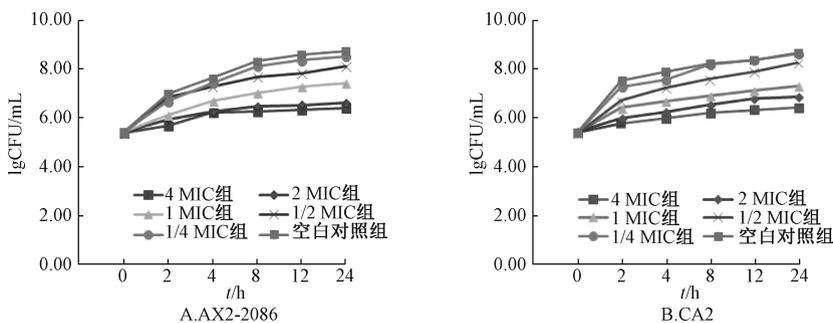


图 1 大蒜素对白色念珠菌的时间-杀菌曲线

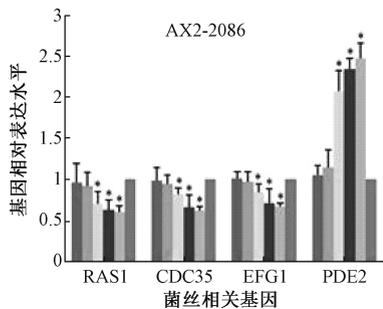
Fig. 1 Time-kill curve of allicin against *C. albicans*

3.3 大蒜素抑制白色念珠菌的形态转化 菌丝是白色念珠菌最主要的致病因子之一, 酵母相-菌丝

相形态转化也是其生物被膜形成的重要一步^[7]。通过倒置显微镜观察大蒜素对白色念珠菌菌丝形成

的影响,结果见图2。在 Spider 液体培养基中,未经药物处理的白色念珠菌能在6 h内形成较长且密的菌丝,错综复杂,相互缠绕重叠。当加入1 MIC大蒜素时,视野内可观察到菌丝长度明显变短,且与对照组比较数量明显减少。而4 MIC浓度则能够基本抑制菌丝的生长,镜下观察以酵母相细胞为主。这一现象表明,大蒜素可以抑制白色念珠菌由酵母相向菌丝相的转化,且这种抑制作用具有剂量依赖性,即随着药物浓度的升高,抑制作用更加明显。

3.4 大蒜素对白色念珠菌菌丝相关基因表达的影响 与空白对照组比较,经1 MIC、2 MIC和4 MIC浓度的大蒜素干预后,参与正向调控白色念珠菌菌丝生长的基因 *RAS1*、*CDC35*、*EFG1* 的表达均明显下降,而负向调控菌丝生长的基因 *PDE2* 的表达量增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图3,结果显示,大蒜素对白色念珠菌菌丝生长的作用机制可能是通过调节菌丝形成相关基因的表达,从而抑制菌丝的形成。



注:与各自空白对照组比较,* $P < 0.05$ 。结果以各自对照组表达量为标准“1”进行比较。

图3 大蒜素对白色念珠菌菌丝相关基因表达的影响

Fig. 3 Effect of allicin on gene expression of *C. albicans* hyphae

3.5 大蒜素抑制白色念珠菌细胞外磷脂酶活性 卵黄乳液琼脂平板法是检测细胞外磷脂酶的经典方法^[8]。在结果观察中,菌落直径代表菌细胞数目的多少,沉淀圈直径代表磷脂酶催化的沉淀产物的量,两者直径比值(P_z)可近似反映单位细胞数量的磷脂酶活性。 P_z 越低,反映磷脂酶产生越多,活性越强。图4表明,白色念珠菌标准菌株 AX2-2086 和临床菌株 CA2 均能分泌较高活性的磷脂酶。加入浓度为1/4 MIC大蒜素未能明显改变磷脂酶活性,菌体仍能分泌活性较高的磷脂酶。当大蒜素浓度 $\geq 1/2$ MIC时,与空白对照组比较,白色念珠菌细胞外磷脂酶的活性降低, P_z 逐渐升高。结果表明,大蒜素可以抑制白色念珠菌细胞外磷脂酶的活性。

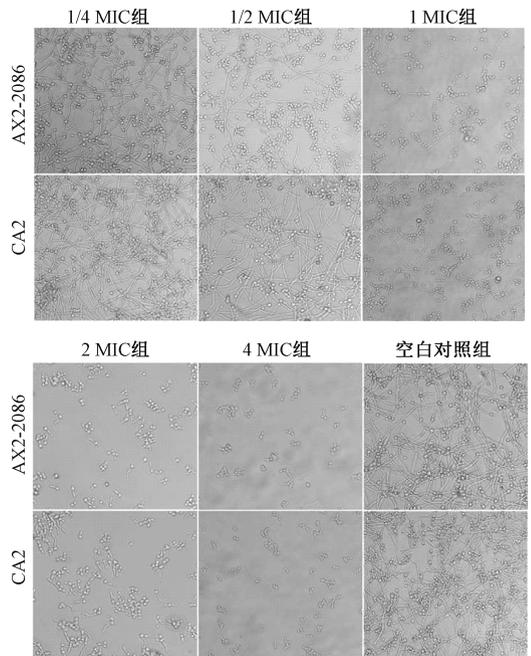
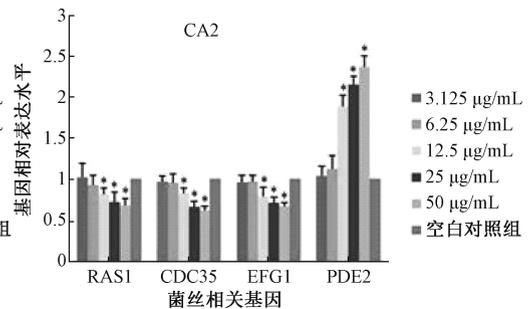


图2 大蒜素对白色念珠菌形态转化的影响 ($\times 400$)

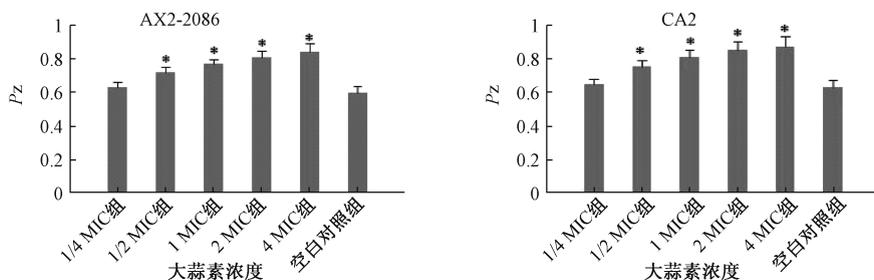
Fig. 2 Effect of allicin on morphological transition of *C. albicans* ($\times 400$)



4 讨论

目前,应用于临床的抗真菌药物数量和种类有限,但是由于临床上有限抗真菌药物的大量使用,导致真菌耐药性的情况日益严重,而且出现交叉耐药现象^[9]。其中白色念珠菌是临床最常见的条件致病性真菌。白色念珠菌在体内最主要的致病原因在于宿主免疫功能受损导致的不受控制的增殖。过度的增殖导致白色念珠菌毒力因子的释放,进而对机体造成危害^[10]。白色念珠菌的毒力因子主要包括粘附、分泌酶、形态转化、生物被膜的形成等等。

在白色念珠菌的毒力因子中,形态转化是最主要也是最吸引注意力的一种。白色念珠菌是一种二相性真菌,从形态上分为酵母相和菌丝相。在相关



注：与各自空白对照组比较，* $P < 0.05$ 。

图4 大蒜素对白色念珠菌细胞外磷脂酶活性的抑制作用

Fig. 4 Inhibitory effect of allicin on the activity of phospholipase of *C. albicans*

诱导因素的刺激下，白色念珠菌能经历酵母相和菌丝相的相互转化。在被感染宿主体内的病灶部位，2种形态的白色念珠菌都能被发现。相关研究发现，在小鼠系统性感染中，多种菌丝形成缺陷的白色念珠菌突变体，其毒力是减弱的^[11]。因此，如果能抑制白色念珠菌形态的转化，或许能抑制其毒力和感染力。

Spider培养基常被用来评估白色念珠菌维持菌丝生长的能力^[12]。在本实验中，将白色念珠菌标准菌株 AX2-2086 和临床菌株 CA2 接种到 Spider 液体培养基中，镜下观察发现白色念珠菌形成细长的错综复杂的菌丝。加入大蒜素后可抑制菌丝的形成，甚至基本抑制白色念珠菌的形态转化，使其停留在酵母相。

Ras-cAMP-Efg1 途径是调节白色念珠菌由酵母相到菌丝相转化的重要信号通路之一，其中第二信使 cAMP 是重要的调控分子。cAMP 由 Cdc35 酶合成，Pde2 酶降解^[13]。基因 *EFG1* 编码的菌丝生长蛋白是目前研究最深入的多功能调节因子之一，它可以正向调节菌丝的形成过程，并在生物膜形成过程中起着中心作用^[14]。为验证大蒜素对白色念珠菌菌丝形成的作用机制，实验进一步通过 qRT-PCR 检测了菌丝相关基因的表达。结果显示，与空白对照组相比，大蒜素能够下调与菌丝形成正相关基因 (*RAS1*、*CDC35*、*EFG1*)，并上调菌丝形成负相关基因 (*PDE2*) 的表达。

细胞外磷脂酶是白色念珠菌重要的毒力因子之一，磷脂酶的高表达与小鼠播散性念珠菌病具有显著相关性，而磷脂酶缺陷的白色念珠菌突变体在小鼠系统性感染模型中的毒力是减弱的^[15-16]。本实验通过卵黄乳液琼脂培养基测定大蒜素对白色念珠菌细胞外磷脂酶活性的作用，发现加入大蒜素后，白色念珠菌分泌磷脂酶活性降低，表明大蒜素能够有效地抑制白色念珠菌细胞外磷脂酶活性，从而发

挥抗真菌作用。

综上所述，大蒜素可通过抑制白色念珠菌菌丝生长、调节菌丝相关基因的表达，以及抑制细胞外磷脂酶活性等，从而发挥抑制白色念珠菌毒力因子的作用。这将为拓宽大蒜素潜在的临床用途奠定了基础。但大蒜素对体内白色念珠菌毒力因子的干预效应尚有待于进一步揭示。

参考文献：

- [1] Cleveland A A, Harrison L H, Farley M M, et al. Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008-2013: results from population-based surveillance [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0120452.
- [2] McCarty T P, Pappas P G. Invasive candidiasis [J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2016, 30(1): 103-124.
- [3] 张俊华, 张伯礼. 感染性疾病的挑战与中医药替代研究 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(8): 1415-1417.
- [4] 彭敏. 大蒜素药理学作用机制及研究进展 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2018, 27(14): 1593-1596.
- [5] 孙艳, 李娜, 陆颖, 等. 大蒜素与盐酸小檗碱联用体外抗菌试验 [J]. *中成药*, 2015, 37(12): 2589-2595.
- [6] CLSI, M27-A3. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast, 4th edition [M]. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.
- [7] Nobile C J, Johnson A D. *Candida albicans* Biofilm and Human Disease [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2015, 69: 71-92.
- [8] 孙康德, 张家胜, 陈旭, 等. 口腔白色念珠菌3种致病相关分泌型水解酶检测方法的建立及应用 [J]. *检验医学*, 2016, 31(5): 355-358.
- [9] Berkow E L, Lockhart S R. Fliconazole resistance in *Candida* species: a current perspective [J]. *Infect Drug Resist*, 2017, 10: 237-245.
- [10] Erwig L P, Gow N A. Interactions of fungal pathogens with phagocytes [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14(3): 163-176.
- [11] Lo H J, Kohler J R, Didomenico B, et al. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent [J]. *Cell*, 1997, 90(5): 939-949.

- [12] Sudbery P E. Growth of *Candida albicans* hyphae[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(10): 737-748.
- [13] Hogan D A, Sundstrom P. The Ras/Camp/PKA signaling pathway and virulence in *Candida albicans*[J]. *Future Microbiol*, 2009, 4(10): 1263-1270.
- [14] Mancera E, Porman A M, Cuomo C A, et al. Finding a missing gene: EFG1 regulates morphogenesis in candida tropicalis[J]. *G3 (Bethesda)*, 2015, 5(5): 849-856.
- [15] Padmavathi A R, Bakkiyaraj D, Thajuddin N, et al. Effect of 2, 4-di-tert-butylphenol on growth and biofilm formation by an opportunistic fungus *Candida albicans*[J]. *Biofouling*, 2015, 31(7): 565-574.
- [16] Mayer F L, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms[J]. *Virulence*, 2013, 4(2): 119-128.

HPLC 法评估补肾强身胶囊中酒女贞子的质量

张鹏程, 张崇生*, 倪 赞

(温州市食品药品检验科学研究院, 浙江 温州 325008)

摘要: 目的 HPLC 法评估补肾强身胶囊中酒女贞子的质量。方法 建立 HPLC 法测定补肾强身胶囊中红景天苷和特女贞苷的含有量, 通过测定不同炮制时间两者的含有量, 探讨女贞子在炮制过程中的变化规律, 通过配对样本 *t* 检验分析补肾强身胶囊和酒女贞子中特女贞苷含有量和红景天苷含有量的比值(比值)。**结果** 红景天苷和特女贞苷分别在 2.956~118.2、12.46~498.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好 ($r \geq 0.9998$), 平均回收率分别为 103.78%、103.81%, RSD 分别为 1.2%、0.7%。21 h 内随着炮制时间的延长, 酒女贞子中红景天苷含有量逐渐升高, 特女贞苷含有量逐渐降低, 比值逐渐变小。*t* 检验表明补肾强身胶囊和酒女贞子的比值无显著差异。29 批样品红景天苷、特女贞苷含有量和比值范围分别为 0.09~0.60 mg/粒、0.60~3.62 mg/粒和 1.5~31.7。**结论** 该方法准确有效, 重现性好, 可为提高补肾强身胶囊质量标准提供依据。

关键词: 补肾强身胶囊; 酒女贞子; 红景天苷; 特女贞苷; HPLC

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)11-2970-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.11.027

Quality assessment of wine-steamed *Ligustri Lucidi Fructus* in Bushen Qiangshen Capsules by HPLC

ZHANG Peng-cheng, ZHANG Chong-sheng*, NI Zan

(Wenzhou Institute for Food and Drug Control, Wenzhou 325008, China)

KEY WORDS: Bushen Qiangshen capsules; wine-steamed *Ligustri Lucidi Fructus*; salidroside; specnuezhenide; HPLC

补肾强身胶囊由淫羊藿、金樱子、菟丝子、酒女贞子和烫狗脊 5 味药材组方而成, 主治腰酸足软、头晕耳鸣、眼花心悸、阳痿遗精等症状^[1]。酒女贞子为方中臣药, 其制法为取净女贞子, 照酒炖法或酒蒸法(通则 0213)炖至酒吸尽或蒸透^[2]。女贞子酒制后凉滑之性缓和, 滋补肝肾作用增强^[3-4]。较多文献研究表明女贞子炮制后环烯醚萜

苷类成分如特女贞苷含有量降低, 红景天苷含有量升高^[5-8]。

补肾强身胶囊现行标准有卫生部药品标准中药成方制剂第四册标准和多个企业注册标准, 这些标准过于简单, 无法有效控制内在质量。2015 年版《中国药典》标准除性状外无法有效区分生品女贞子和炮制品, 制成中成药后更无法评估药材质量。

收稿日期: 2019-12-10

基金项目: 2020 年温州市基础性科研项目(Y2020193)

作者简介: 张鹏程(1987—), 男, 硕士, 主管药师, 从事药物分析研究。Tel: 13600671565, E-mail: zpc@zju.edu.cn

* 通信作者: 张崇生(1974—), 男, 硕士, 副主任药师, 从事药物分析研究。Tel: (0577) 88536561, E-mail: 1018763742@qq.com