

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.27.012

大蒜素对白假丝酵母菌生物被膜的抑制作用*

吴玉华¹, 武伟¹, 张妍²

(1. 宁夏医科大学附属医院新生儿科, 银川 750004; 2. 宁夏银川市第一人民医院肾脏内科 750001)

摘要:目的 研究大蒜素对白假丝酵母菌生物被膜(BF)内真菌的抑制作用。方法 用 FITC-conA 标记白假丝酵母菌 BF 的多糖成分, 利用荧光显微镜从形态学上观察大蒜素对白假丝酵母菌 BF 形成过程的影响。将标本分为 5 组, 分别是对照组(大蒜素浓度为 0)、大蒜素 0.25 mg/mL 组、大蒜素 0.5 mg/mL 组、大蒜素 1.0 mg/mL 组、大蒜素 2.0 mg/mL 组。应用 XTT 减低法定量检测大蒜素对白假丝酵母菌 BF 中真菌的杀灭作用。结果 在荧光显微镜下可见大蒜素 2.0 mg/mL 组大蒜素干预白假丝酵母菌 BF 后的荧光强度较大蒜素 0.5 mg/mL 组及对照组的荧光强度减弱。大蒜素 0.5、1.0、2.0 mg/mL 作用于白假丝酵母菌 BF 5 h 后, XTT 减低法光密度(OD_{450})的值分别为 1.87 ± 0.31 、 1.64 ± 0.25 和 1.30 ± 0.29 , 分别与对照组的 2.11 ± 0.26 比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 0.25 mg/mL 的大蒜素作用白假丝酵母菌 BF 后, OD_{450} 值为 1.93 ± 0.31 , 与对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 大蒜素能杀灭白假丝酵母菌 BF 内的真菌, 对 BF 有抑制作用。在一定浓度范围内, 随着大蒜素浓度的增加, 其对 BF 的抑制作用逐渐增强。

关键词: 真菌; 白假丝酵母菌; 生物被膜; 大蒜素

中图分类号: R378.99

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)27-3582-02

Inhibition effect of allitride on *Candida albicans* biofilm*Wu Yuhua¹, Wu Wei¹, Zhang Yan²

(1. Department of Neonatology, Affiliated Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China;

2. Department of Nephrology, Yinchuan Municipal First People's Hospital, Yinchuan, Ningxia 750001, China)

Abstract: Objective To investigate the killing effect of allitride on fungus inside *Candida albicans* biofilm(BF). Methods The polysacchride components of BF was labeled by FITC-conA. The fluorescence microscopic was adopted to observe the effect of allitride on the BF forming process of *Candida albicans* in morphology. The specimens were divided into 3 groups, the control group (allicin concentration of 0), 0.25 mg/mL allicin group, 0.5 mg/mL allicin group, 1.0 mg/mL allicin group, 2.0 mg/mL allicin group. The XTT reduction assay was performed to quantitatively detect the killing effect of allitride on fungus inside *Candida albicans* BF. Results After the treatment by different concentrations of allitride, the BF structure was observed by fluorescence microscopy. The fluorescence intensity of high concentration group was weakened compared with the low concentration group and the control group. The OD_{450} values of the XTT reduction assay after acting on *Candida albicans* BF for 5 h by different concentrations of allitride (0.5, 1.0, 2.0 mg/mL) were 1.87 ± 0.31 , 1.64 ± 0.25 and 1.30 ± 0.29 , respectively, and the OD_{450} value of the control group was 2.11 ± 0.26 , there was statistically significant difference between the allitride groups and control group($P < 0.05$); after acting on *Candida albicans* BF by 0.25 mg/mL allitride, the OD_{450} value was 1.93 ± 0.31 , the difference had no statistical significance compared with the control group($P > 0.05$). Conclusion Allitride can kill the fungus inside BF of *Candida albicans* and has the inhibiting effect on biofilm. Moreover the inhibiting effect on biofilm is increased with its concentration increase within certain concentration range.

Key words: fungi; *Candida albicans*; biofilm; allitride

白假丝酵母菌是人体重要的条件致病菌, 能导致从浅表黏膜到危及生命的全身性疾病^[1]。它是院内真菌感染的主要病原菌, 其引起的病死率高达 40%^[2]。白假丝酵母菌可以在目前使用的几乎所有的植入性材料包括支架、假体、生物瓣膜以及各种类型的导管等表面形成生物被膜(biofilm, BF)^[3]。据报道体内外 BF 模型内真菌的耐药性比浮游菌增加了近 1 000 倍^[4], 它引起的感染呈间歇性、持续性, 往往难以清除。Davis^[5]综述了大蒜素(allitride)在体外对念珠菌属、隐球菌属等真菌孢子的萌发和菌丝的生长有抑制作用。然而大蒜素对白

假丝酵母菌 BF 有无作用, 目前国内尚未见报道。本研究拟在考察大蒜素在体外对白假丝酵母菌体内真菌的杀灭作用, 以及大蒜素对白假丝酵母菌 BF 形态学的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 白假丝酵母菌(ATCC 10231), 重庆医科大学附属儿童医院检验科细菌室提供。

1.1.2 试剂 大蒜素(徐州莱恩药业有限公司), Gibco 分装 RPMI 1640 液体培养液、YPD 培养基(1%酵母提取物、2%蛋

* 基金项目: 宁夏医科大学面上项目(XM2012001、XM2012036)。研究。

作者简介: 吴玉华(1976—), 硕士, 副主任医师, 主要从事新生儿方向的研究。

白脉、2%葡萄糖)、XTT 细胞增殖及细胞毒性测试试剂盒、荧光多糖染料 FITC-conA(Sigma 公司)。

1.1.3 仪器设备 荧光显微镜(Olympus BX51)、96 孔微量细胞培养板(美国 Corning 公司)、24 孔细胞培养板(美国 Corning 公司)、HF212uv 培养箱、HZQ-C 空气浴振荡器、多功能酶标仪(Model 680)。

1.2 方法

1.2.1 置片法构建体外模型 用接种环挑取白假丝酵母菌单菌落,接种于 YPD 培养基中,30 ℃ 振荡培养过夜。用 RPMI 1640 液体培养液稀释,血细胞计数板计数,调整菌液浓度至 1×10^7 个/mL。将 2 mL 该浓度的菌悬液接种于预先放置无菌盖玻片($1 \text{ cm}^2 \times 1 \text{ cm}^2$,作为 BF 载体)24 孔细胞培养板中,放置在恒温培养箱中,37 ℃ 培养 48 h 形成白色假丝酵母菌 BF。

1.2.2 FITC-conA 标记 BF 的多糖成分 将标本分为 5 组,分别是对照组(大蒜素浓度为 0)、大蒜素 0.25 mg/mL 组、大蒜素 0.5 mg/mL 组、大蒜素 1.0 mg/mL 组、大蒜素 2.0 mg/mL 组。将培养好的白假丝酵母菌 BF 标本用 PBS 轻轻漂洗掉浮游菌,在暗室中用配好的 FITC-conA 荧光染液 20 μL 滴在

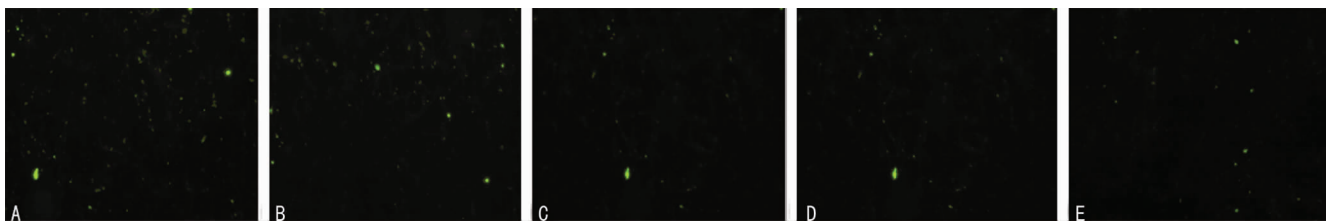
标本上,避光作用 15 min 再用 PBS 冲洗 3 次。用 50%甘油封片,放置在荧光显微镜下观察。

1.2.3 XTT 减低法 定量测定大蒜素对白假丝酵母菌 BF 内真菌的杀灭作用。微孔板法培养 48 h 白假丝酵母菌 BF。每组设置 5 个孔,各重复 3 次。每次用 PBS 冲洗 3 次,洗去浮游菌。每孔加入 100 μL 用 RPMI 预配置好的不同浓度的大蒜素,放置在恒温培养箱中作用 5 h。再用 PBS 冲洗 3 次,洗去多余的药液。然后向每个标本中加入 100 μL RPMI 1640 液体培养液和 50 μL XTT 工作液,37 ℃ 避光作用 5 h,将多余的试剂弃去。用多功能酶标仪测定 450 nm 处的光密度(OD)值。

1.3 统计学处理 应用 SPSS21.0 统计软件进行分析,符合正态性分布和方差齐性后,组间比较采用方差分析,组内两两比较采用 LSD-*q* 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光显微镜观察大蒜素对白假丝酵母菌 BF 的形态学的影响 用 FITC-conA 染料标记后,荧光显微镜下可见随着大蒜素浓度的增加,绿色荧光的密集度及亮度逐渐减弱,BF 密集的针织网状交错结构变得疏松,单个酵母细胞较之前增多。见图 1。



A:对照组;B:0.25 mg/mL;C:0.5 mg/mL组;D:1.0 mg/mL;E:2.0 mg/mL组。

图 1 荧光显微镜下 FITC-conA 染色后大蒜素对白假丝酵母菌 BF 的影响($\times 100$)

2.2 XTT 减低法结果 0.25、0.5、1.0、2.0 mg/mL 的大蒜素干预白假丝酵母菌 BF 后的 OD_{450} 值依次为 1.93 ± 0.31 、 1.87 ± 0.31 、 1.64 ± 0.25 、 1.30 ± 0.29 ,与对照组 OD_{450} 值 2.11 ± 0.26 相比,逐渐减少。不同浓度大蒜素干预 BF 后,BF 内真菌活力不同($P < 0.05$)。其中 0.5、1.0、2.0 mg/mL 的大蒜素与对照组相比,对白假丝酵母菌 BF 均有明显抑制作用($P < 0.05$),0.25 mg/mL 的大蒜素与对照组相比,对 BF 没有显著抑制作用($P > 0.05$)。不同浓度的大蒜素对白假丝酵母菌 BF 的抑制作用,组间比较除对照组与 0.25 mg/mL 组、0.25 mg/mL 组与 0.5 mg/mL 组之间差异无统计学意义以外($P > 0.05$),其余各组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

BF 是微生物在自然界存在的主要方式。据估计,自然界中有 95% 的微生物都附着在 BF 中^[6]。它是一种具有复杂结构的微生物聚集体,被多糖组成的细胞外基质包裹,彼此互相黏附在表面或界面上^[7]。

白假丝酵母菌 BF 的耐药性是多因素共同作用所致,包括细胞外基质阻碍药物渗透,BF 内微生物代谢率的改变,BF 耐药基因的表达以及原始耐药株的存在等^[8]。在 BF 形成过程中应用荧光显微镜结合细胞外基质 FITC-conA 染料不仅能在不损坏 BF 结构的前提下从大体上观察 BF 形态,而且还能观察到细胞外基质^[9]。本研究应用荧光显微镜观察了成熟白色

假丝酵母 BF 的形态以及不同浓度的大蒜素对白假丝酵母菌 BF 的形态学影响。随着大蒜素浓度的增高,荧光的强度有逐渐变弱的趋势。为进一步验证这种改变是通过大蒜素渗透到 BF 内杀灭白假丝酵母菌,从而进一步减少细胞外基质的分泌,本研究运用 XTT 减低法定量分析大蒜素对白假丝酵母菌 BF 内真菌的抑制作用。XTT 是线粒体脱氢酶的作用底物,被活细胞还原成水溶性的橙黄色四氮盐-甲替^[10]。当 XTT 与电子耦合剂联合应用时,其所产生的水溶性的四氮盐-甲替的光密度与活细胞的数量成正比。目前该法已广泛应用于测定细胞以及细菌和真菌 BF 内微生物的活力。本研究结果显示,随着大蒜素浓度的增加, OD_{450} 值与对照组相比有逐渐下降的趋势,间接说明白假丝酵母菌 BF 内菌体的活力逐渐下降,大蒜素通过增加渗透到 BF 内的浓度进而杀灭 BF 内的菌体,阻止 BF 的进一步发展。该研究结果提示在一定浓度范围内,大蒜素对白假丝酵母菌 BF 内真菌的杀灭作用呈浓度依赖性,大蒜素浓度增高,其对 BF 内真菌的杀灭作用越强。

大蒜素作为抗菌剂及抗真菌制剂已经在临床广泛应用,但针对白假丝酵母菌 BF 的治疗目前尚未开展。本研究仅考察了大蒜素对白假丝酵母菌 BF 的抑制作用及形态学的影响,旨在为临床治疗由白假丝酵母菌 BF 引起的间歇性、反复性及顽固性真菌感染提供一些实验依据和研究方向。

PSAmRNA 基因的表达,一定水平 Cyclopamine 可能对转移性前列腺癌的治疗有效。

参考文献:

- [1] 张利,王东文.外周血 PSAmRNA 检测在前列腺癌微转移中的意义[J].国外医学:泌尿系统分册,2004,9(5):605-607.
- [2] Straub B, Muller M, Krause H, et al. Detection of prostate-specific antigen RNA before and after radical retropubic prostatectomy and transurethral resection of the prostate using "light-cycler"TM-based quantitative real-time polymerase chain reaction[J]. Urology, 2001, 58(5):815-820.
- [3] Cardillo MR, Di Silverio F, Gentile V. Reliability of PSA circulating cells as markers of metastatic prostate cancer [J]. Scand J Clin Lab Invest, 2004, 64(7):687-689.
- [4] Shaw G, Price AM, Ktori E, et al. Hedgehog signalling in androgen Independent prostate cancer [J]. Eur Urol, 2008, 54(6):1333-1343.
- [5] Chen JK, Taipale J, Cooper MK, et al. Inhibition of hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to smoothed[J]. Genes Dev, 2002, 16(21):2743-2748.
- [6] Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, et al. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis [J]. Nature, 2004, 431(79):707-712.
- [7] Sheng T, Li C, Zhang X, et al. Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer [J]. Mol Cancer, 2004, 3:29.
- [8] Mimeault M, Johansson SL, Vankatraman G, et al. Com-

bined targeting of epidermal growth factor receptor and hedgehog signaling by gefitinib and cyclopamine cooperatively improves the cytotoxic effects of docetaxel on metastatic prostate cancer cells[J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(3):967-978.

- [9] Shaw G, Prowse DM. Inhibition of androgen-independent prostate cancer cell growth is enhanced by combination therapy targeting Hedgehog and ErbB signalling [J]. Cancer Cell Int, 2008, 8:3.
- [10] 胡望平,冯福英,叶桂云,等.血清 c-PSA 及 C/T 在提高前列腺癌诊断特异性中的探讨[J].第三军医大学学报, 2007, 29(18):1815-1817.
- [11] Rubenstein M, Hollowell CM, Guinan P. Increased prostate-specific membrane antigen expression in LNCaP cells following treatment with bispecific antisense oligonucleotides directed against bcl-2 and EGFR [J]. Med Oncol, 2010, 27(4):1212-1218.
- [12] Zhang LG, Wang CY, Yang R, et al. Real-time quantitative RT-PCR assay of prostate-specific antigen and prostate-specific membrane antigen in peripheral blood for detection of prostate cancer micrometastasis [J]. Urol Oncol, 2008, 26(6):634-640.
- [13] Michel V, Licon-Munoz Y, Trujillo K, et al. Inhibitors of vacuolar ATPase proton pumps inhibit human prostate cancer cell invasion and prostate-specific antigen expression and secretion [J]. Int J Cancer, 2013, 132(2):E1-10.

(收稿日期:2014-03-27 修回日期:2014-05-13)

(上接第 3583 页)

参考文献:

- [1] Seneviratne CJ, Wang Y, Jin L, et al. Candida albicans biofilm formation is associated with increased anti-oxidative capacities [J]. Proteomics, 2008, 8(14):2936-2947.
- [2] Zaoutis TE, Argon J, Chu J, et al. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: A propensity analysis [J]. Clin Inf Dis, 2005, 41(9):1232-1239.
- [3] Ramage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL. Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem [J]. FEMS Yeast Res, 2006, 6(7):979-986.
- [4] Di BG, Pompilio A, Picciani C, et al. D'antonio D, piccolomini R. biofilm formation by the emerging fungal pathogen trichosporon asahii: development, architecture, and antifungal resistance [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(10):3269-3276.
- [5] Davis SR. An overview of the antifungal properties of alliin and its breakdown products--the possibility of a safe and effective antifungal prophylactic [J]. Mycoses, 2005,

48(2):95-100.

- [6] Sardi Jde C, Pitanguí Nde S, Rodríguez-Arellanes G, et al. Highlights in pathogenic fungal biofilms [J]. Rev Iberoam Micol, 2014, 31(1):22-29.
- [7] Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, et al. Microbial biofilms [J]. Annu Rev Microbiol, 1995, 49:711-745.
- [8] Tobudic S, Kratzer C, Lassnigg A, et al. Antifungal susceptibility of Candida albicans in biofilms [J]. Mycoses, 2012, 55(3):199-204.
- [9] Fayyaz M, Mirza IA, Ikram A, et al. Pathogens causing blood stream infections and their drug susceptibility profile in immunocompromised patients [J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2013, 23(12):848-851.
- [10] Haghghi F, Mohammadi SR, Mohammadi P, et al. The evaluation of Candida albicans biofilms formation on silicone catheter, PVC and glass coated with Titanium dioxide nanoparticles by XTT method and ATPase assay [J]. Bratisl Lek Listy, 2012, 113(12):707-711.

(收稿日期:2014-03-25 修回日期:2014-05-17)