

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.03.007

抗菌肽 MUC7 联合双歧杆菌体外抗真菌研究*

郭斌,谢宁,白珊珊,李君安,唐中[△]

(川北医学院附属医院检验科,四川南充 637000)

摘要:目的 探讨抗菌肽粘蛋白 7(MUC7)联合双歧杆菌体外抗真菌作用。方法 制备双歧杆菌与真菌菌悬液,采用活菌计数法和牛津小杯法检测双歧杆菌及其联合 MUC7 的抗真菌能力。结果 双歧杆菌/MUC7 组对白色假丝酵母菌、热带假丝酵母菌、克柔假丝酵母菌和近平滑假丝酵母菌均表现出有效的抗真菌效果,活菌计数法其菌落数分别为 2.00 ± 1.13 、 2.00 ± 1.42 、 5.00 ± 2.03 、 2.00 ± 1.39 ,少于生理盐水组和双歧杆菌组($P < 0.01$),MUC7 组与生理盐水组、双歧杆菌组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);牛津小杯法其抑菌圈分别为(29.00 ± 2.17)、(31.00 ± 3.25)、(29.00 ± 2.89)、(30.00 ± 3.36) mm,与生理盐水组和双歧杆菌组、MUC7 组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 抗菌肽 MUC7 联合双歧杆菌表现出良好的抗真菌效果,为进一步研究新一代抗真菌双歧制剂奠定了基础。

关键词:抗真菌药;双歧杆菌;抗菌肽 MUC7

中图分类号:R978.5

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)03-0309-03

The antifungal study of antibacterial peptide MUC7 combined with Bifidobacterium in vitro*

Guo Bin, Xie Ning, Bai Shanshan, Li Jun'an, Tang Zhong[△]

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

Abstract: Objective To investigate the cooperative antifungal effect of antibacterial peptide MUC7 combined with Bifidobacterium in vitro. Methods The antifungal effect was observed and measured by viable count and the Oxford cup method. Results Two methods exhibited more potent antifungal effect on *Candida albicans*, *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida parapsilosis* in MUC7 combined with Bifidobacterium group. The colonies' numbers in MUC7 combined with Bifidobacterium group were 2.00 ± 1.13 , 2.00 ± 1.42 , 5.00 ± 2.03 , 2.00 ± 1.39 respectively by viable counting, which was lower than those in the saline group and Bifidobacterium group ($P < 0.01$), these two groups were significant lower than those in MUC7 group ($P < 0.05$); the inhibition zone in MUC7 combined with Bifidobacterium group were (29.00 ± 2.17), (31.00 ± 3.25), (29.00 ± 2.89), (30.00 ± 3.36) mm detected by the Oxford cup method, which showed a significantly difference with the saline group, Bifidobacterium group and MUC7 group ($P < 0.05$). Conclusion Antibacterial peptide MUC7 combined with Bifidobacterium exhibits good antifungal effect which may provide a foundation for the further research on a new generation of antifungal Bifidobacterium preparation.

Key words: antifungal agents; Bifidobacterium; antibacterial peptide MUC7

当前侵袭性真菌感染的患病率和病死率均呈逐年上升趋势^[1-2],寻找一种适合临床预防性治疗的药物已成为防治该病的重要手段。研究发现,存在于人体唾液中的粘蛋白 7(MUC7)是多种微生物黏合剂,特别是其 N 末端 20-mer 和 12-mer,表现出强烈的抗多种真菌作用^[3-4],能否寻求一种安全有效的给药方式成为其临床应用的关键^[5-7]。双歧杆菌是人体肠道内的一种益生菌,它能有效抑制有害细菌及真菌的生长,由于该菌表达的外源蛋白无需纯化可以直接连同菌体一起服用,因此是联合抗菌肽开发微生态制剂的热门菌之一。本研究探讨了双歧杆菌单独及联合 MUC7 使用体外对抗各种临床常见真菌的作用,报道如下。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 实验菌株 两歧双歧杆菌 86321,由重庆医科大学惠赠;白色假丝酵母菌 ATCC 90028、热带假丝酵母菌 ATCC 750、克柔假丝酵母菌 ATCC 6258、近平滑假丝酵母菌 ATCC22019 由迈克公司提供。

1.1.2 仪器设备与试剂 CO₂ 孵箱,生物安全柜,压力蒸汽灭菌器,厌氧袋,牛津小杯(外径 8 mm),沙保培养基,MRS 培养基,血平板,氟康唑 NaCl 注射液(浓度:2 g/L,批号:A120211),MUC7 蛋白 1 mg,购于北京乐博生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 双歧杆菌与真菌菌悬液制备 接种两歧双歧杆菌于液体 MRS 培养基中,37 °C 于孵箱内摇瓶厌氧培养 48 h,调整菌悬液浓度为 2×10^8 CFU/mL;将 4 种真菌接种于沙保培养基 37 °C 培养 48 h,用无菌生理盐水调整菌悬液备用,同时用无菌生理盐水调整氟康唑浓度为 0.02 g/L,调整 MUC7 浓度为 25 μmol/L。

1.2.2 活菌计数法检测双歧杆菌/MUC7 组对真菌的抑制性 4 种真菌调菌悬液浓度分别为白色假丝酵母菌 2×10^5 CFU/mL,热带假丝酵母菌 1×10^4 CFU/mL,克柔假丝酵母菌 1×10^4 CFU/mL,近平滑假丝酵母菌 1×10^2 CFU/mL,再将每 1 种实验真菌分为 5 组:生理盐水组(NS 组)、双歧杆菌组(BLTA 组)、氟康唑组(F 组)、MUC7 组和双歧杆菌/MUC7 组

(BLTA+MUC7 组),其处理分别为:取等体积 50 μL 生理盐水、双歧杆菌菌悬液、氟康唑、MUC7 蛋白液与真菌菌悬液 50 μL 混合,双歧杆菌/MUC7 各 50 μL 的混合液与真菌菌悬液 100 μL 混合,分别取等量涂布于血平板,每组平行试验 6 次;实验组及对照组均置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱厌氧培养 48 h 后计数平板上真菌的菌落数。

1.2.3 牛津杯法检测双歧杆菌/MUC7 对真菌的抑制性
取浓度为 1×10^7 CFU/mL 的 4 种真菌菌悬液 70 μL 作为指示菌,涂布于凝固的血平板,平衡 30 min。无菌操作将 5 只无菌的牛津杯放在平板上,杯内分别加入生理盐水 100 μL 、双歧杆菌 100 μL 、氟康唑 100 μL 、MUC7 100 μL 、双歧杆菌+MUC7 100 μL 混合液于杯中。平放 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱厌氧培养 48 h,测定它们对 4 种真菌形成的抑菌圈大小,并取杯底部、杯外边缘菌落进行革兰染色观察对比,重复试验 6 次。

2 结果

2.1 活菌计数法各处理组真菌生长菌落数比较 氟康唑组均无真菌生长;4 种真菌的 BLTA+MUC7 组真菌菌落数与 NS 组和 BLTA 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);MUC7 组与 NS 组和 BLTA 组比较差异也有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 活菌计数法各处理组真菌生长菌落数($\bar{x} \pm s$)

组别	菌落数(n)			
	白色假丝酵母菌	热带假丝酵母菌	克柔假丝酵母菌	近平滑假丝酵母菌
NS 组	15.00 \pm 2.13	11.00 \pm 1.96	29.00 \pm 3.56	11.00 \pm 1.89
BLTA 组	10.00 \pm 2.25	7.00 \pm 1.32	25.00 \pm 2.67	7.00 \pm 2.14
F 组	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
MUC7 组	5.00 \pm 1.54 ^b	4.00 \pm 1.48 ^b	7.00 \pm 2.31 ^b	5.00 \pm 1.79 ^b
BLTA+MUC7 组	2.00 \pm 1.13 ^c	2.00 \pm 1.42 ^c	5.00 \pm 2.03 ^c	2.00 \pm 1.39 ^c

^a: $P < 0.01$,与 NS 组、BLTA 组、MUC7 组和 BLTA+MUC7 组比较;^b: $P < 0.05$,与 NS 组和 BLTA 组比较;^c: $P < 0.01$,与 NS 组和 BLTA 组比较。

2.2 牛津小杯法各处理组抑菌圈大小比较 氟康唑组抑菌圈大小与其他组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$);4 种真菌的 BLTA+MUC7 组抑菌圈大小与 NS 组和 BLTA 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);且 MUC7 组与 NS 组和 BLTA 组比较差异也有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 牛津杯法各处理组抑菌圈大小($\bar{x} \pm s$)

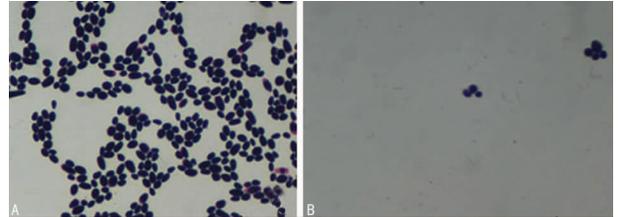
组别	抑菌圈(mm)			
	白色假丝酵母菌	热带假丝酵母菌	克柔假丝酵母菌	近平滑假丝酵母菌
NS 组	8.00 \pm 2.63	8.00 \pm 1.95	8.00 \pm 2.03	8.00 \pm 1.67
BLTA 组	9.00 \pm 1.56	12.00 \pm 2.67	10.00 \pm 1.83	12.00 \pm 3.73
F 组	44.00 \pm 2.36 ^a	42.00 \pm 2.13 ^a	40.00 \pm 3.01 ^a	43.00 \pm 4.12 ^a
MUC7 组	25.00 \pm 2.12 ^b	28.00 \pm 2.67 ^b	28.00 \pm 3.13 ^b	25.00 \pm 3.78 ^b
BLTA+MUC7 组	29.00 \pm 2.17 ^c	31.00 \pm 3.25 ^c	29.00 \pm 2.89 ^c	30.00 \pm 3.36 ^c

^a: $P < 0.01$,与 NS 组、BLTA 组、MUC7 组和 BLTA+MUC7 组比较;^b: $P < 0.05$,与 NS 组和 BLTA 组比较;^c: $P < 0.01$,与 NS 组和 BLTA 组比较。

2.3 各实验组菌落革兰染色 牛津杯外边缘革兰染色结果为

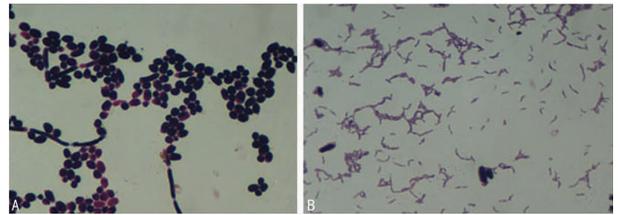
每个血平板上 NS 组均大量真菌生长;BLTA 组则为中等量真菌和双歧杆菌混合生长;F 组为极少量真菌生长甚至无真菌生长;MUC7 组为少量真菌生长;而 MUC7+BLTA 组则为极少量真菌和双歧杆菌混合生长,见图 1。

取牛津杯底部革兰染色结果为每个血平板上 NS 组仍是大量真菌生长;BLTA 组为少量真菌和大量双歧杆菌混合生长;F 组均无真菌生长;MUC7 组为少量真菌生长;而 MUC7+BLTA 组几乎只有双歧杆菌生长。此外,BLTA 组杯底部革兰染色发现对于热带假丝酵母菌,双歧杆菌大多包裹其混合生长,见图 2。



A: NS 组杯外边缘;B: MUC7+BLTA 组杯外边缘。

图 1 牛津杯外边缘革兰染色结果($\times 1000$)



A: NS 组杯底部;B: MUC7+BLTA 组杯底部。

图 2 牛津杯底部革兰染色结果($\times 1000$)

3 讨论

研究发现,存在于人体唾液中的 MUC7 是多种微生物的黏合剂,因此被认为是机体非免疫宿主防御系统的重要组成部分,其主要作用包括调节菌群比例和杀灭致病菌。MUC7 对正常菌群可发挥选择性黏附并促进繁殖,同时通过掩蔽细胞表面的致病菌结合配体,并以自身多肽链 N 末端的微生物结合区黏合并杀灭致病菌,从而阻止致病菌定植于细胞表面^[8-10]。Bobek 等^[3]研究发现 MUC7 20-mer(N-LAHQKPFIR KSYK-CLHKRCR-C;residues 32 to 51 of MUC7)具有高效的抗白色假丝酵母菌、新型隐球菌、光滑假丝酵母菌、克柔假丝酵母菌的作用,且对部分吡咯耐药的白色假丝酵母菌、氟康唑耐药的光滑假丝酵母菌和两性霉素 B 耐药的新型隐球菌也有良好作用;Situ 等^[11]进一步研究发现在 MUC7 20-mer 中的 MUC7 12-mer 同样具有高效的抗真菌活性,且具有分子量更小及 ED50 药物用量仅在微摩尔浓度等优点;而且 MUC7 与人体基因同源,因此与其他抗菌肽相比,对人体正常细胞没有毒性作用,具有明显临床应用优势。

但是,抗菌肽的使用须要有有效的载体,存在于人体肠道内的益生菌双歧杆菌是有效的肠道保护性菌种,具有维持和调整肠道菌群平衡、抑制肠道侵袭性真菌感染、增强免疫功能等诸多生理作用,已作为载体广泛应用于临床疫苗开发^[12-14]。本研究对抗菌肽 MUC7 及其联合双歧杆菌在体外的抑菌效果进行了实验,用以评价其杀灭条件致病性真菌的活性。

活菌计数实验结果显示药物的抑菌效果仍然是最好的,接种平板几乎无真菌菌落生长;MUC7 组对临床常见的真菌均有较好的抑制生长作用,与 NS 组和 BLTA 组相比,其差异有

统计学意义($P < 0.05$)。虽然单一的双歧杆菌对真菌的抑制作用有限,但与 MUC7 合用同样可以达到好的抑制真菌生长效果,证明两者合用的可行性。牛津杯法检测抑菌作用的结果显示 MUC7 组及 MUC7+BLTA 组均有较好的抑菌效果,作用仅次于药物组,从杯底和外缘的涂片来看,真菌的数量也较少,且有出现双歧杆菌包裹真菌生长的现象,同样证明 MUC7 与双歧杆菌联合使用的可行性。虽然这样的作用还不及药物显著,但抗真菌药物存在耐药性或不良反应大,有引起心脏、神经系统不良反应的可能,特别是对肝脏、肾脏有造成较大损伤可能,必须在用药期间严密监测,从这个角度分析,MUC7 与人体基因同源,因此对人体正常细胞没有毒性作用,联合的双歧杆菌又是人体正常的益生菌,因此其预防和治疗真菌具有优势。

综上所述,本研究的结果为进一步研究口服携 MUC7 基因的双歧杆菌制剂在预防和治疗肠道真菌感染中的临床应用提供了实验依据,也为临床抗真菌治疗和新型抗真菌药物的开发提供了新思路,有望在临床中发挥重要作用。

参考文献:

- [1] Carole AS, Kim MS, Jeffrey AC. Advances in Antifungal therapy[J]. *Annu Rev Med*, 2008, 59: 361-379.
- [2] Disanto R. Natural products as antifungal agents against clinically relevant pathogens[J]. *Nat Prod Rep*, 2010, 27(7): 1084-1098.
- [3] Bobek LA, Situ H. MUC7 20-mer; MUC7 20-Mer; investigation of antimicrobial activity, secondary structure, and possible mechanism of antifungal action[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(2): 643-652.
- [4] Wei GX, Bobek LA. Human salivary mucin MUC7 12-mer-L and 12-mer-D peptides; antifungal activity in saliva, enhancement of activity with protease inhibitor cocktail or EDTA, and cytotoxicity to human cells [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(6): 2336-2342.
- [5] Jenssen H, Hamill P, Hancock RE. Peptide Antimicrobial

Agents[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2006, 19(3): 491-511.

- [6] 侯晓妹, 胡宗利, 陈国平, 等. 抗菌肽的抗菌机制及其临床应用[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(1): 97-105.
- [7] 艾丽思, 张宇, 林莉. 抗菌肽及其在口腔领域应用前景[J]. *中国实用口腔科杂志*, 2014, 31(4): 204-208.
- [8] Lis M, Bhatt S, Schoenly NE, et al. Chemical genomic screening of a *saccharomyces cerevisiae* genomewide mutant collection reveals genes required for defense against four antimicrobial peptides derived from proteins found in human saliva[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(2): 840-847.
- [9] Lis M, Liu TT, Barker KS, et al. Antimicrobial peptide MUC7 12-mer activates the calcium/calcineurin pathway in *Candida albicans*[J]. *FEMS Yeast Res*, 2010, 10(5): 579-586.
- [10] Lis M, Bobek LA. Proteomic and metabolic characterization of a *Candida albicans* mutant resistant to the antimicrobial peptide MUC7 12-mer[J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2008, 54(1): 80-91.
- [11] Situ H, Wei G, Smith CJ, et al. Human salivary MUC7 mucin peptides: effect of size, charge and cysteine residues on antifungal activity[J]. *Biochem J*, 2003, 375(Pt 1): 175-182.
- [12] Bermúdez-Humarán LG. *Lactococcus lactis* as a live vector for mucosal delivery of therapeutic proteins[J]. *Hum Vaccin*, 2009, 5(4): 264-267.
- [13] Pontes DS, de Azevedo MS, Chatel JM, et al. *Lactococcus lactis* as a live vector: heterologous protein production and DNA delivery systems[J]. *Protein Expr Purif*, 2011, 79(2): 165-175.
- [14] 白凤翎, 励建荣. 抗真菌性乳酸菌生物保护剂的研究进展[J]. *现代食品科技*, 2014, 29(5): 311-319.

(收稿日期: 2014-09-17 修回日期: 2014-11-22)

(上接第 308 页)

- [8] [J]. *Annu Rev Physiol*, 2006, 68: 307-343.
- [9] Huizinga JD, Fausone Pellegrini MS. About the presence of interstitial cells of Cajal outside the musculature of the gastrointestinal tract[J]. *J Cell Mol Med*, 2005, 9(2): 468-473.
- [10] 李湘楚, 肖勇, 余保平, 等. 胆道梗阻对胆囊动力及 Cajal 间质细胞形态的影响[J]. *中华消化杂志*, 2011, 31(6): 396-400.
- [11] Heinrich MC, Rubin BP, Longley BJ, et al. Biology and genetic aspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT activation and cytogenetic alterations[J]. *Hum Pathol*, 2002, 33(5): 484-495.
- [12] Jung HA, Chung HY, Yokozawa T, et al. Alaternin and emodin with hydroxyl radical inhibitory and/or scavenging activities and hepatoprotective activity on tacrine-induced cytotoxicity in HepG2 cells[J]. *Arch Pharm Res*, 2004, 27(9): 947-953.

- [13] Ho TY, WU SL, Chert JC, et al. Emodin blocks the SARS coronavirus spike protein and angiotensin-converting enzyme 2 interaction[J]. *Antiviral Res*, 2007, 74(2): 92-101.
- [14] Peng C, Wang L, Wang YH. The toxicity of aconitine, emodin on ICC cell and the antagonist effect of the compatibility [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2009, 34(3/4): 213-220.
- [15] Rich A, Miller SM, Gibbons SJ, et al. Local presentation of steel factor increases expression of c-kit immunoreactive interstitial cells of Cajal in culture[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003, 284(2): G313-320.
- [16] Nakahara M, Isozaki K, Vanderwinden JM, et al. Dose-dependent and time-limited proliferation of cultured murine interstitial cells of Cajal in response to stem cell factor [J]. *Life Sci*, 2002, 70(20): 2367-2376.

(收稿日期: 2014-09-20 修回日期: 2014-11-25)