

· 论著 ·

## 山奈酚对白假丝酵母生物被膜抑制作用的研究

陈 岚<sup>1</sup>, 沈 娟<sup>2</sup>, 严万年<sup>2</sup>, 范凌志<sup>2</sup>, 曹颖璞<sup>2</sup> (1. 空军杭州特勤疗养中心疗养三区药械科, 浙江 杭州 310002; 2. 上海市皮肤病医院, 上海 200443)

**【摘要】** 目的 研究山奈酚抗白假丝酵母生物被膜的作用及其可能机制。方法 测定山奈酚对白假丝酵母处于形成过程中的生物被膜和成熟生物被膜代谢活性的影响; 测定山奈酚对生物被膜基质产生水平的影响; 显微镜下观察山奈酚对菌丝形成的抑制作用; 水-烃两相分离法测定山奈酚对白假丝酵母细胞表面疏水性的影响; 实时定量 RT-PCR 法测定山奈酚对生物被膜形成相关基因表达的影响。结果 山奈酚抑制白假丝酵母生物被膜形成, 且呈剂量依赖性, 同时具有抗成熟生物被膜作用, 显著降低生物被膜基质含量; 与对照组相比, 山奈酚明显抑制白假丝酵母菌丝形成并降低其细胞表面疏水性; 经山奈酚处理的白假丝酵母生物被膜形成相关基因 *BCR1*、*NRG1* 和 *TUP1* 的表达升高, 同时 *HWPI*、*EFG1*、*CPHI*、*ALSI*、*ALS3* 和 *CSHI* 的表达下降。结论 山奈酚具有抗白假丝酵母生物被膜活性, 其机制与抑制菌丝形成及降低其细胞表面疏水性相关。

**【关键词】** 山奈酚; 白假丝酵母; 生物被膜; 黏附; 菌丝

**【中图分类号】** R379.4

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1006-0111(2020)05-0413-05

**【DOI】** 10.12206/j.issn.1006-0111.202004050

## Study on the antibiofilm activity of kaempferol in *Candida albicans*

CHEN Lan<sup>1</sup>, SHEN Juan<sup>2</sup>, YAN Wannian<sup>2</sup>, FAN Lingzhi<sup>2</sup>, CAO Yingying<sup>2</sup> (1. Drug and Equipment Department, Air Force Hangzhou Special Service Recuperation Center Sanatorium Area 3, Hangzhou 310002, China; 2. Shanghai Skin Disease Hospital, Shanghai 200443, China)

**【Abstract】** **Objective** To study the action of kaempferol (KAE) against *Candida albicans* biofilms and explore the potential mechanisms. **Methods** Biofilm metabolic activity assay was used to investigate the action of KAE against *C. albicans* biofilm formation as well as mature biofilm. The inhibition of KAE in hyphal formation was examined by microscope. The water-hydrocarbon two-phase separation assay was used to test the effect of KAE on the cell surface hydrophobicity of *C. albicans*. The mRNA expression of the genes involved in biofilm formation was determined by real time RT-PCR. **Results** KAE showed inhibition effect on *C. albicans* biofilm formation in a dose-dependent manner. Moreover, KAE inhibited mature biofilm. The biomass of biofilm was reduced upon KAE treatment. KAE inhibited hyphal formation and reduced the cell surface hydrophobicity of *C. albicans*. In the presence of KAE, the mRNA expression of the genes involved in biofilm formation was changed, with the up-regulation of *BCR1*, *NRG1*, *TUP1* and down-regulation of *HWPI*, *EFG1*, *CPHI*, *ALSI*, *ALS3* and *CSHI*. **Conclusion** KAE showed antifungal activity against *C. albicans* biofilm. The mechanisms may relate to the inhibition of hyphal formation and reduction of cell surface hydrophobicity.

**【Key words】** kaempferol; *Candida albicans*; biofilm; adhesion; hyphae

近年来,随着广谱抗生素的使用、艾滋病病毒感染、肿瘤放疗/化疗以及器官移植患者的不断增加,导管插管等越来越多的生物材料应用于人体,侵袭性真菌感染的发病率显著上升,对人类健康乃至生命造成严重威胁。在临床真菌感染中,白假丝酵母(*Candida albicans*)是最常见的致病真菌之一<sup>[1]</sup>。

研究表明,白假丝酵母能通过黏附于人上皮及植入的导管或支架等表面,形成生物被膜(biofilm),从而在免疫功能低下的人群中导致系统性感染。白假丝酵母生物被膜的一个严重后果是对临床常用抗真菌药物呈高度耐药。与浮游型白假丝酵母相比,生物被膜型白假丝酵母对两性霉素 B、氟康唑的敏感性仅是浮游菌的几十分之一。生物被膜形成是导致临床上许多系统性、反复性感染的重要因素,是抗真菌感染治疗失败的主要原因之一<sup>[2-3]</sup>。因此,研究开发抗白假丝酵母生物被膜药物对于抗真菌感染的治疗具有重要意义。

**【基金项目】** 国家自然科学基金面上项目(81671991)

**【作者简介】** 陈 岚,本科,副主任药师, Tel: (0571)87341668

**【通讯作者】** 曹颖璞,博士,教授,研究方向:抗感染药物药理研究, Email: caoyingying608@163.com

山奈酚(kaempferol, KAE)又名山柰素、山柰黄酮醇,其分子结构见图1。山奈酚属于黄酮类化合物,主要来源于姜科植物山柰的根茎。同时,该化合物广泛存在于多种蔬菜及水果中。研究显示,山奈酚具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抑制血小板聚集及抗病毒等多种生物学活性<sup>[4-6]</sup>。本文旨在研究山奈酚抗白假丝酵母生物被膜活性并探索其潜在作用机制,为临床抗真菌感染提供新思路。

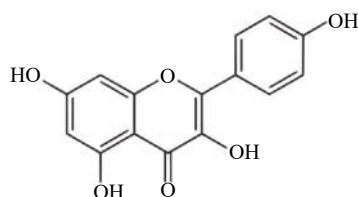


图1 山奈酚的分子结构

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株、试剂和培养基

白假丝酵母国际通用株 SC5314(*C. albicans* SC5314)由上海市皮肤病医院中心实验室保存。山奈酚(美国 Sigma 公司),二甲亚砜(DMSO,国药化学试剂有限公司)。将山奈酚溶于 DMSO 配制成母液,使用时以 RPMI1640 稀释至所需浓度。XTT(化学名:2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)和甲萘醌试剂(美国 Sigma 公司),分别用 PBS、丙酮溶解配制成母液。真菌 RNA 抽提试剂盒(北京天恩泽基因科技公司),RNA 反转录、PrimeScript RT Master Mix Perfect RealTime 及 SYBR Premix ExTaq™ 试剂(TaKaRa 生物公司)。

沙氏固体培养基(SDA):蛋白胨 10 g, D-葡萄糖 40 g,琼脂粉 20 g,以去离子水溶解并定容至 1 000 ml,高压灭菌(121 °C, 15 min),室温冷却凝固后备用。YPD 液体培养基:蛋白胨 10 g,酵母提取物 10 g, D-葡萄糖 20 g,以去离子水溶解并定容至 1 000 ml,分装后高压灭菌(121 °C, 15 min)备用。RPMI1640 液体培养基:将 RPMI1640 粉末(Gibco BRL 公司)10 g, MOPS(溇泰生物科技公司)34.5 g, NaHCO<sub>3</sub> 2.0 g,以去离子水溶解并定容至 1 000 ml,用 NaOH 调节 pH 至 7.0,定容至 1 000 ml,微孔滤膜过滤除菌,4 °C 保存。

#### 1.1.2 仪器

恒温振荡培养箱(江苏太仓市实验设备厂),高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),超净化工作

台(苏州安泰空气技术有限公司),96孔细胞培养板(美国 Corning 公司),Infinite M200 多功能酶标仪(Austria TECAN 公司),ABI7500 实时定量 RT-PCR 仪(Applied Biosystems 公司)。

### 1.2 菌株活化

挑取白假丝酵母 SC5314 甘油冻存菌划于 SDA 平板,置于 30 °C 恒温培养箱培养 3 d,待长出单克隆后,挑取菌株单克隆接种于新鲜 YPD 液体培养基中,再于 30 °C、200 r/min 振荡培养过夜(16 h),使其到达对数生长期后期。

### 1.3 山奈酚抗生物被膜形成实验

白假丝酵母生物被膜培养实验参照文献[7]进行。离心收集上述培养基至对数生长后期的白假丝酵母菌液, PBS 洗涤 3 次,重悬于 RPMI1640 培养基,计数并调节菌液浓度为  $1 \times 10^6$  CFU/ml。在 96 孔细胞培养板每孔加入 100  $\mu$ l 上述菌液, 37 °C 静置培养 2 h,弃上清液,于各孔中分别加入 100  $\mu$ l 含有不同浓度山奈酚的 RPMI1640 培养基, 37 °C 继续静置培养 24 h。

### 1.4 山奈酚抗成熟生物被膜实验

离心收集培养至对数生长后期的白假丝酵母菌液, PBS 洗涤 3 次,重悬于 RPMI1640 培养基,计数并调节菌液浓度为  $1 \times 10^6$  CFU/ml。在 96 孔细胞培养板每孔加入 100  $\mu$ l 上述菌液, 37 °C 静置培养 2 h,弃上清液,于各孔中加入新鲜 RPMI1640 培养基, 37 °C 继续静置培养 24 h,弃上清液, PBS 洗涤 2 次,于各孔中分别加入 100  $\mu$ l 含有不同浓度山奈酚的 RPMI1640 培养基, 37 °C 继续静置培养 24 h。

### 1.5 生物被膜代谢活性测定

取出上述培养的生物被膜,弃上清液, PBS 洗 2 次,随后加入 200  $\mu$ l XTT-甲萘醌溶液(含有 0.5 mg/ml XTT-1  $\mu$ mol/L 甲萘醌),于 37 °C 黑暗处静置孵育 2 h 后取出。采用多功能酶标检测仪于 492 nm 处测定光密度(OD)值。

### 1.6 生物被膜基质含量测定

生物被膜基质(biomass)含量测定参照文献[8]方法进行。在预先放置有硅胶片(1.5 cm $\times$ 1.5 cm,美国 Bantec 医药公司)的 12 孔培养板中,每孔加入 2 ml 白假丝酵母菌液( $1 \times 10^6$  CFU/ml 于 RPMI1640 培养基中),黏附 2 h,弃上清液,加入含有不同浓度山奈酚的新鲜 RPMI1640 培养基, 37 °C 继续静置培养 24 h,弃上清液, PBS 洗涤 2 次,于各孔中分别加入 100  $\mu$ l 含有不同浓度山奈酚的 RPMI1640 培养基, 37 °C 继续静置培养 24 h,取出上述培养的生物被膜,弃上清液, PBS 洗 2 次,晾干至恒重并称

重,所得重量减去硅胶片本身质量即为生物被膜基质量。

### 1.7 菌丝形成抑制实验

将过夜培养至对数生长后期的白假丝酵母,于次日按照 1% 接种于新鲜 YPD 液体培养基, 30 °C 继续振荡培养 4 h, PBS 洗涤 2 次,重悬于含有 16 μg/ml 的山奈酚 YPD+FBS 培养基(含有 10% 胎牛血清),调整菌浓度为 1×10<sup>6</sup> CFU/ml,于细胞培养板中 37 °C 静置培养 3.5 h,显微镜下观察白假丝酵母菌丝形成情况。

### 1.8 细胞表面疏水性测定

采用水-烃两相分离法测定细胞表面疏水性<sup>[9]</sup>。将过夜培养至对数生长后期的白假丝酵母于次日按照 1% 量接种于新鲜 YPD 液体培养基, 30 °C 继续振荡培养 4 h, 随后加入不同浓度山奈酚,于 30 °C 继续振荡培养 4 h, 离心收集菌液以 PBS 洗涤 2 次,重悬于 YPD 液体培养基,调整菌液至 OD<sub>600</sub>=1.0, 每组取 1.2 ml 菌悬液于另一离心管中,加入 0.3 ml 正辛烷,涡旋振荡混匀 3 min, 室温静置使两相分离,立即测定上层水相的 OD<sub>600</sub> 值,以未加正辛烷的 YPD 培养基为阴性对照。白假丝酵母细胞表面疏水性值的计算公式:相对细胞表面疏水性=[(OD<sub>600</sub> 对照组-OD<sub>600</sub> 实验组)/OD<sub>600</sub> 对照组]×100%。

### 1.9 引物设计

应用 Primer Premier5 软件设计用于实时定量 RT-PCR 扩增的目的基因引物序列(表 1)。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.10 实时定量 RT-PCR 实验

将培养至对数生长后期的白假丝酵母菌液, PBS 洗涤 3 次,重悬于 RPMI1640 培养基,计数并调节菌液浓度为 1×10<sup>6</sup> CFU/ml。将上述菌液在细胞培养瓶中 37 °C 静置培养 2 h,弃上清液,随后加入含有 16 μg/ml 山奈酚的新鲜 RPMI1640 培养基,37 °C 继续静置培养 24 h。离心收集菌体, PBS 洗涤 3 次,按照北京天恩泽基因科技公司真菌 RNA 抽提试剂盒的操作说明进行总 RNA 的抽提,抽提完毕后加入 100 μl 去除 RNA 酶的水(经 DEPC 处理)溶解 RNA,采用分光光度计测定 RNA 纯度及含量, A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 比值在 1.8~2.0 之间为合格。按照 TaKaRa 生物公司的反转录试剂盒操作说明,将上述 RNA 反转录为 cDNA。取上述逆转录产物进行 PCR 扩增,以 18S rRNA 作为内参基因。反应条件为预变性 95 °C, 30 s, 重复 40 个循环。循环参数为: 95 °C, 5 s; 60 °C, 20 s; 72 °C, 30 s。溶解曲线采

表 1 引物序列

引物序列(5'-3')	
HWP1-F	TGGTGCTATTACTATTCCGG
HWP1-R	CAATAATAGCAGCACCGAAG
EFG1-F	TATGCCCCAGCAAACAACCTG
EFG1-R	TTGTTGTCTCTGTCTGTCTGTC
CPH1-F	ATGCAAACTATTATACCTC
CPH1-R	ATGCAAACTATTATACCTC
ALS1-F	TTGGGTTGGTCTTAGATGG
ALS1-R	ATGATTCAAAGCGTCGTTCT
ALS3-F	CTAATGCTGCTACGTATAATT
ALS3-R	CCTGAAATTGACATGTAGCA
CSH1-F	CTGTCCGGTACTATGAGATTG
CSH1-R	GATGAATAAACCCAACAACCT
TUP1-F	GATTGACGAG TCCTCCAACG
TUP1-R	AAACCAACCTATCGCCATCA
NRG1-F	TATCAGTATG CTGCTCCTCC
NRG1-R	GGAGTTGGCCAGTAAATCAC
BCR1-F	AGTATAATGCTCCTGGTAAAGAA
BCR1-R	ACGTAAAGGAGGCACGGCATA
18S rRNA-F	AATTACCCAATCCCACAC
18S rRNA-R	TGCAACAACCTTAATATACGC

用 60~95 °C, 温度改变速率为每秒 0.1 °C。扩增产物采用 ABI 7500 SDS 软件系统进行分析。采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法表示基因表达水平。

### 1.11 统计学分析

实验数据应用 GraphPad Prism 6.0 软件进行作图及统计学检验,以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,每个实验至少重复 3 次,以 P<0.05 为差异显著, P<0.01 为差异极显著。

## 2 实验结果

### 2.1 山奈酚抑制白假丝酵母生物被膜的形成

以不同浓度的山奈酚作用于白假丝酵母生物被膜形成早期(黏附 2 h),于 37 °C 继续培养 24 h 后测定生物被膜代谢活性。XTT 测定结果显示:山奈酚可抑制白假丝酵母生物被膜形成,且呈剂量依赖性。当山奈酚浓度为 8 μg/ml 时,生物被膜形成被明显抑制。当 32 μg/ml 的山奈酚作用于生物被膜时,其代谢活性约为对照组的 35%,经 128 μg/ml 的山奈酚处理的白假丝酵母几乎不能形成生物被膜(图 2A)。

由于生物被膜基质含量是显示白假丝酵母生物被膜形成能力的一个重要特征,我们进一步考察了山奈酚对生物被膜基质含量的影响。结果表明:

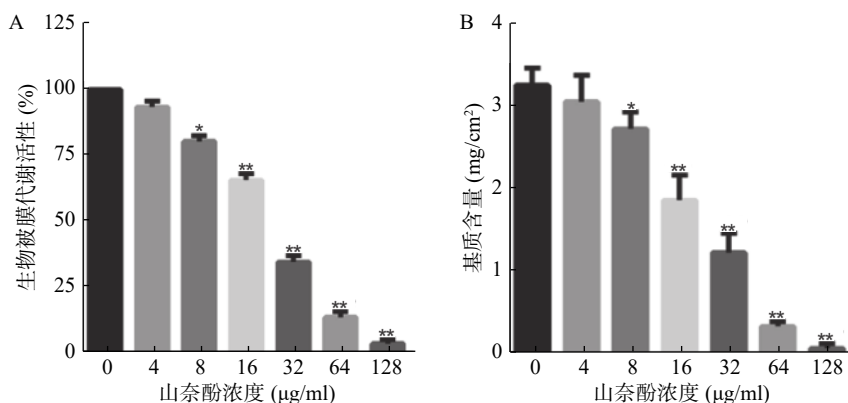


图2 山奈酚对白假丝酵母生物被膜形成的影响

A.山奈酚抑制白假丝酵母生物被膜形成; B.山奈酚抑制白假丝酵母生物被膜基质的产生

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与未加药组比较。

与对照组相比,经山奈酚处理的生物被膜基质含量显著下降,呈现剂量依赖性。当32 µg/ml的山奈酚作用于白假丝酵母生物被膜时,其基质产生量不足对照组的50%(图2B)。

### 2.2 山奈酚抗成熟白假丝酵母生物被膜活性

将不同浓度的山奈酚作用于成熟白假丝酵母生物被膜(培养24 h),于37 °C继续培养24 h后测定生物被膜代谢活性。结果显示:16 µg/ml的山奈酚具有明显的抗成熟生物被膜活性。当32 µg/ml的山奈酚作用于成熟生物被膜时,其代谢活性约为对照组的60%,经128 µg/ml的山奈酚处理的白假丝酵母生物被膜活性约为对照组的28%(图3)。

### 2.3 山奈酚对白假丝酵母菌丝形成的影响

由于白假丝酵母菌丝形成能力与生物被膜密切相关,因此,本实验进一步考察山奈酚对菌丝形成的影响。未加药的对照组白假丝酵母在含有10%胎牛血清的YPD培养基中可以形成正常菌丝,而当16 µg/ml的山奈酚作用于白假丝酵母时,菌丝生长受到明显抑制,主要以酵母型菌生长(图4)。

### 2.4 山奈酚对白假丝酵母细胞表面疏水性的影响

黏附是白假丝酵母生物被膜形成的早期关键步骤,而细胞表面疏水性对黏附具有重要影响,因

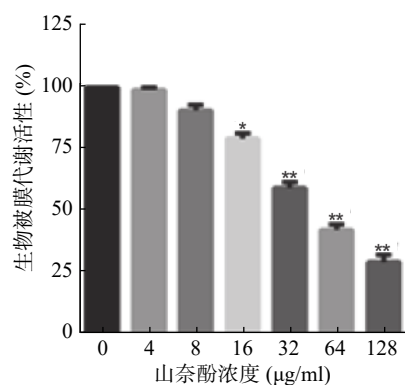


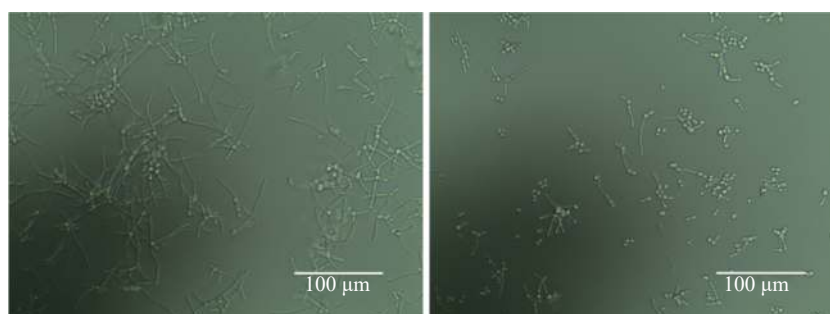
图3 山奈酚抗成熟白假丝酵母生物被膜活性

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与未加药组比较。

此,本实验考察山奈酚对白假丝酵母细胞表面疏水性的影响。与对照组相比,4 µg/ml的山奈酚对白假丝酵母细胞表面疏水性无明显影响,而当山奈酚的作用浓度为8 µg/ml时,其细胞表面疏水性明显下降,且呈现剂量依赖性(图5)。

### 2.5 山奈酚对白假丝酵母生物被膜形成相关基因表达的影响

由于山奈酚可以影响白假丝酵母菌丝形成及细胞表面疏水性,因此,本实验采用实时定量RT-PCR法测定山奈酚对白假丝酵母菌丝形成及细胞



对照(未加药)

16 (µg/ml) 山奈酚

图4 山奈酚抑制白假丝酵母菌丝形成的影响

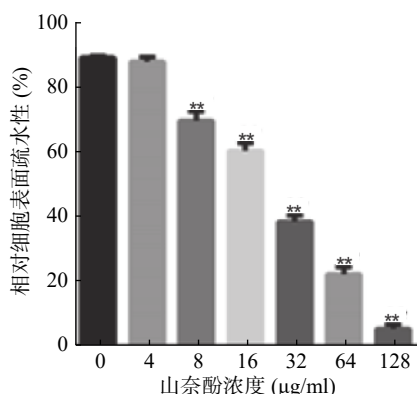


图5 山奈酚对白假丝酵母细胞表面疏水性的影响  
\*\* $P < 0.01$ , 与未加药组比较。

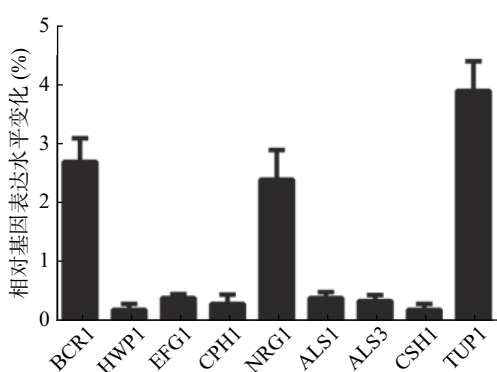


图6 山奈酚对白假丝酵母生物被膜形成相关基因 mRNA 表达的影响

表面疏水性相关基因表达的影响。如图6所示,经 16  $\mu\text{g/ml}$  山奈酚处理的白假丝酵母生物被膜中菌丝形成相关基因 *BCRI*、*NRG1* 和 *TUP1* 的基因表达分别升高了 2.7、2.4 和 3.9 倍, *HWPI*、*EFG1* 和 *CPHI* 基因表达显著下降,同时,细胞表面疏水性相关基因 *ALS1*、*ALS3* 和 *CSHI* 的表达明显下降。

### 3 讨论

近年来,随着免疫低下人群的不断增多以及越来越多的医疗器材应用于人体,真菌感染率大幅增加,其中,以生物被膜型白假丝酵母感染较为常见,常导致反复性感染及耐药,是临床抗感染治疗的一个重要难题。因此,寻找开发具有抗生物被膜活性的化合物对于防治真菌感染具有重要意义。

天然化合物作为药物的一个重要组成部分,被广泛应用于各种疾病的治疗。山奈酚是最常见的膳食类黄酮化合物之一,广泛存在于花菜、茶叶及柚子等多种植物中,具有抗炎、抗氧化及抗肿瘤等多种生物学活性。Shao 等报道山奈酚具有抗浮游型真菌活性并抑制耐药相关外排泵基因的表达<sup>[10]</sup>。本实验结果显示,山奈酚具有抗白假丝酵母生物被

膜活性,不仅可以抑制生物被膜形成,对于成熟生物被膜也有抑制作用。研究表明,白假丝酵母生物被膜基质中富含碳水化合物及 DNA,可以通过形成物理屏障阻碍抗真菌药物进入胞内,因此,其含量与耐药程度密切相关。有报道称,生物被膜基质可以隔离放射性标记的氟康唑,将两性霉素 B 作用于去除基质的念珠菌生物被膜,其抗菌活性与为去除基质的对照组相比明显增强<sup>[11-13]</sup>。在本实验中,经山奈酚处理的白假丝酵母生物被膜基质水平明显下降,这可能是该化合物发挥抗生物被膜活性的机制之一。

白假丝酵母生物被膜主要由 3 部分构成,即基底芽生孢子层、菌丝成分以及细胞外多聚基质,其中,菌丝成分是构成完整生物被膜的重要元件,酵母态到菌丝态的转换是其形成生物被膜的关键。本实验结果显示,山奈酚可以明显抑制白假丝酵母菌丝形成。进一步的实时定量 RT-PCR 测定结果表明,山奈酚对菌丝形成相关基因的表达具有调控作用。*HWPI* 是菌丝特异性表达基因,该基因缺失型生物被膜极易从附着物上脱落<sup>[14]</sup>。山奈酚对生物被膜的抑制作用可能与其下调 *HWPI* 基因表达有关。同时,经山奈酚处理的白假丝酵母中 2 个调控菌丝形成信号通路的重要转录因子 *EFG1* 和 *CPHI* 的表达也明显下降。*TUP1* 编码的转录因子对菌丝形成具有抑制作用,可抑制菌丝形成相关基因的表达。有研究报道,*TUP1* 敲除型白假丝酵母即使在适于酵母菌生长条件下也表现为菌丝过度生长<sup>[15]</sup>。在白假丝酵母菌丝及生物被膜形成抑制剂 farnesol 处理的白色念珠菌中,*TUP1* 基因呈过度表达<sup>[7]</sup>。*NRG1* 是另一菌丝生长抑制型转录因子,在菌丝诱导条件下其 mRNA 和蛋白表达水平均下降,该过程依赖 cAMP/PKA 信号通路。*NRG1* 对菌丝形成具有极强的抑制作用,可与 *TUP1* 共同抑制菌丝形成<sup>[16-18]</sup>。本实验中,*TUP1* 和 *NRG1* 在山奈酚处理组中呈现高表达与菌丝形成抑制的生物学表型相一致。

白假丝酵母生物被膜的形成分为起始黏附、微克隆形成以及生物被膜成熟 3 个阶段,其中,细胞表面疏水性与起始黏附密切相关,对于正常生物被膜的形成至关重要<sup>[19]</sup>。本实验结果显示,与对照组相比,经山奈酚处理的白假丝酵母细胞表面疏水性明显下降。与此相一致的是,细胞表面疏水性相关基因 *CSHI* 的表达在山奈酚处理组中明显下降。

(下转第 430 页)