文章编号:1000-5404(2011)04-0339-03

论著

盐酸氨溴索对体外白色假丝酵母菌成熟生物膜的抑制作用及其形态学的影响

吴玉华[1*],陆 彪[2*],余加林[3] (750004 银川,宁夏医科大学附属医院:儿童急救科[1],儿科[2];400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院新生儿科,儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室[3])

【摘要】 目的 研究盐酸氨溴索对体外白色假丝酵母菌(*Candida albicans*)成熟生物膜(biofilm, BF)的影响。**方法** 用微孔板法建立体外白色假丝酵母菌 ATCC 90028 BF 模型;采用甲基四氮盐(the abated tetrazolium salt, XTT)减低法定量评价盐酸氨溴索对白色假丝酵母菌成熟 BF 的抑制作用;银染后,倒置显微镜下观察该药对白色假丝酵母菌成熟 BF 的形态学影响。**结果** 在 96 孔微量细胞培养板上成功建立白色假丝酵母菌 BF 模型;1.25、2.5、5、7.5 mg/ml 的盐酸氨溴索作用白色假丝酵母菌成熟 BF 12 h 后,XTT 减低法 D(450)值分别为(0.63 ± 0.05)、(0.52 ± 0.08)、(0.31 ± 0.05)和(0.11 ± 0.03),分别与空白对照组(0.71 ± 0.07)比较,差异有显著性(P < 0.05);0.625 mg/ml 的盐酸氨溴索作用白色假丝酵母菌成熟 BF 后,D(450)值为(0.67 ± 0.04),与空白对照组比较,差异无显著性(P > 0.05);不同浓度的盐酸氨溴索作用白色假丝酵母菌成熟 BF,组间比较,均有显著性差异(P < 0.05)。**结论** 盐酸氨溴索对体外白色假丝酵母菌成熟 BF 有抑制作用,且在一定药物浓度范围内随着该药药物浓度的增加,对 BF 的抑制作用显著增强。

【关键词】 白色假丝酵母菌;生物膜;盐酸氨溴索
【中图法分类号】 R379.9;R965;R974.1 **【文献标志码】** A

Inhibition of ambroxol hydrochloride on *Candida albicans* biofilm *in vitro* and its effect on morphogenesis

Wu Yuhua[1*], Lu Biao[2*], Yu Jialin[3] ([1]Department of Children's Emergency, [2]Department of Pediatrics, Affiliated Hospital, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia Hui Autonomous Region, 750004; [3]Department of Neonatology, Key Laboratory of Developmental Diseases in Childhood of Ministry of Education, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of ambroxol hydrochloride on biofilm and morphology of *Candida albicans* (*C. albicans*) *in vitro*. Methods Microtiter plate culture method was used to establish *C. albicans* (ATCC 90028) biofilm. The abated tetrazolium salt (XTT) reduction assay was performed to quantitatively analyze the effect of ambroxol hydrochloride against *C. albicans* mature biofilm for 12 h. Microscopic examination with silver staining was conducted to assess the effect of ambroxol hydrochloride on morphology of *C. albicans* biofilm. Results *C. albicans* biofilm *in vitro* was formed on 96-well microtiter plates successfully. XTT reduction assay indicated that the OD_{450} values at different concentration of ambroxol hydrochloride (0.625, 1.25 and 2.50, 5.00 and 7.50 mg/ml) were 0.68 ± 0.04, 0.63 ± 0.05, 0.52 ± 0.07, 0.31 ± 0.05 and 0.11 ± 0.03, respectively. All of these values had significant difference when compared with that of control (0.71 ± 0.07, P < 0.05). But, when the concentration of ambroxol hydrochloride was 0.625 mg/ml, the OD_{450} value was 0.67 ± 0.04, which had no significant difference with that of control (P > 0.05). After the treatment of ambroxol hydrochloride (2.50, 5.00 and 7.50 mg/ml) for 48 h, biofilm structure was destroyed, extracellular matrix was decreased, more single yeast cells were observed. Conclusion Ambroxol hydrochloride inhibits mature biofilm of *C. albicans* in a dose-dependent manner.

【Key words】 *Candida albicans*; biofilm; ambroxol hydrochloride

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30772363, 81070513), the Special Foundation for Doctorial Subjects of High Education Colleges and Universities (20070631001) and the Key Program of Chongqing Medical University (XBZD200808). Wu Yuhua and Lu Biao are first authors who contributed equally to the article. Corresponding author: Yu Jialin, E-mail: yujialin486@sohu.com

【基金项目】 国家自然科学基金(30772363,81070513);2007 年度高等学校博士学科点专项科研基金(20070631001);2008 重庆医科大学校级重点项目(XBZD200808)

*: 同等贡献者
【通信作者】 余加林,E-mail:yujialin486@sohu.com

目前随着免疫抑制剂、广谱抗生素和置入性医疗装置特别是血管内导管的广泛应用,使得以白色假丝酵母菌为主的深部真菌感染呈上升趋势。美国医院感染监测系统显示,以白色假丝酵母菌为主的真菌感染

在导管相关感染中占第3位[1]，其死亡率在院内感染中居首位[2]。越来越多的证据表明其致病性与白色假丝酵母菌(*Candida albicans*)生物膜(biofilm，BF)的形成有关。BF形成后，其膜内菌对抗生素产生多重耐药[3]，其引发的感染常常只有移走植入物才能控制。如何防止生物膜的产生和清除已形成的生物膜是临床中极为迫切和棘手的问题。本课题组在前期研究中[4-5]发现，盐酸氨溴索对黏液型铜绿假单胞菌BF的结构有破坏作用。那么，盐酸氨溴索是否对白色假丝酵母菌的BF有破坏作用呢？本实验拟研究盐酸氨溴索在体外对白色假丝酵母菌成熟BF的影响，为寻找白色假丝酵母菌BF相关感染的治疗办法提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 白色假丝酵母菌(ATCC 90028)，重庆医科大学附属儿童医院检验科细菌室提供。

1.1.2 药物 盐酸氨溴索注射液(天津药物研究院药业有限责任公司)。

1.1.3 培养基及试剂 YPD液体培养基(2%胰蛋白胨，2%葡萄糖，1%酵母浸粉)，SDA培养基(2%胰蛋白胨，2%葡萄糖，2%琼脂)，凯基XTT细胞增殖及细胞毒性测试试剂盒，0.01 mol/L pH=7.4磷酸盐缓冲溶液(Phosphate Buffer Solution，PBS)。XTT工作液的配制：XTT粉末(KGA313)溶于25 ml PBS中，按所需使用量预分装，置-20 ℃保存。用前按所需工作液量将XTT与电子耦合试剂溶液以50∶1体积比混匀为XTT工作液。

1.1.4 仪器设备 电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司)，Olympus倒置显微镜(日本Olympus公司)，96孔微量细胞培养板(美国Coming公司)，恒温摇床(上海智城分析仪器制造有限公司)，多功能酶标仪(Thermo Scientific公司)。

1.2 方法

1.2.1 白色假丝酵母菌(ATCC 90028) BF模型[6]的建立 用接种环从保存备用的SDA培养基上挑取白色假丝酵母菌单菌落，接种置5 ml YPD培养基中，于30 ℃、100 r/min振荡培养过夜。以YPD培养基稀释，血细胞计数板计数，用5中格计数法计数，调整菌液浓度至1×10^7/ml。将100 μl该浓度的菌悬液接种于96孔微量细胞培养板中，放置在电热恒温培养箱中，37 ℃培养48 h形成白色假丝酵母菌BF。

1.2.2 银染初步鉴定BF的形成 将培养48 h的成熟BF用蒸馏水漂洗洗去浮游菌，2.5%戊二醛固定1 h，蒸馏水漂洗1 min，饱和氯化钙溶液结合15 min，蒸馏水漂洗1 min，5%硝酸银溶液染色15 min，1%对苯二酚溶液显色2 min，蒸馏水漂洗1 min，5%硫代硫酸钠溶液固定2 min，蒸馏水漂洗1 min，然后将96孔微量细胞培养板置于倒置显微镜下观察。

1.2.3 XTT减低法[7]测定盐酸氨溴索对白色假丝酵母菌成熟BF的抑制作用 96孔微量细胞培养板中培养48 h形成成熟BF，用移液器吸出多余的培养基，用PBS 150 μl反复冲洗3次，将浮游菌洗去，然后依次加入用YPD液体培养基稀释不同浓度的100 μl盐酸氨溴索，浓度梯度如下：0、0.625、1.25、2.5、5、7.5 mg/ml，放置在37 ℃电热恒温培养箱中孵育12 h。用移液器吸出多余的药液，再用PBS 150 μl反复冲洗3次，洗去残余药液。然后向每个孔中加入100 μl YPD液体培养基和50 μl XTT工作液，37 ℃避光作用5 h，再用移液器将150 μl的该溶液移至另一新的96孔微量细胞培养板中，用酶标仪在450 nm处测定光密度值D(450)。每个浓度设4个孔，重复3次。另设只有YPD培养基与XTT工作液的阴性对照孔。操作过程同药物干预组。实际光密度值为试验孔的光密度值减去阴性对照孔的光密度值。

1.2.4 盐酸氨溴索对白色假丝酵母菌BF作用的形态学观察 96孔微量细胞培养板中培养48 h形成成熟BF，分别加入不同浓度的盐酸氨溴索2.5、5、7.5 mg/ml，37 ℃培养12 h。同时设没有药物干预的空白对照。银染后，放置在倒置显微镜下观察BF形态的变化。

1.3 统计学分析

实验结果采用SPSS 11.5统计软件进行分析，进行正态性和方差齐性检验，符合正态性分布和方差齐同后，进行组间差异两两比较(SNK法)，数据用$\bar{x}\pm s$表示。

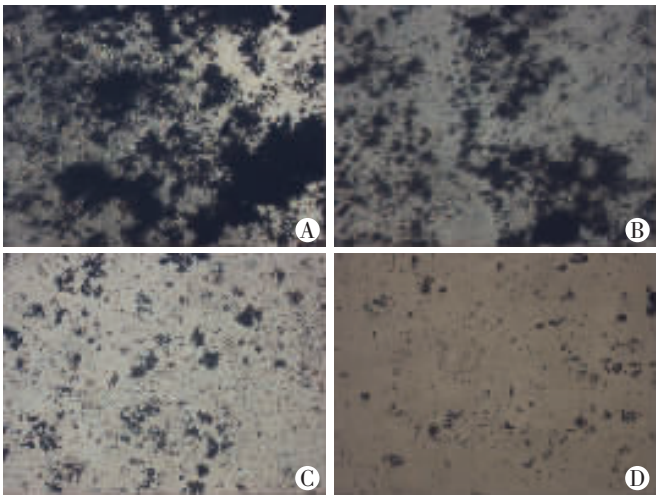
2 结果

2.1 XTT减低法结果

对照组、0.625、1.25、2.5、5、7.5 mg/ml的盐酸氨溴索干预48 h白色假丝酵母菌成熟BF后的D(450)值依次为(0.71±0.07)、(0.68±0.04)、(0.63±0.05)、(0.52±0.08)、(0.31±0.05)、(0.11±0.03)，逐渐减少。其中1.25、2.5、5、7.5 mg/ml的盐酸氨溴索与对照组比较，差异有统计学意义($P<0.05$)，0.625 mg/ml的盐酸氨溴索与对照组比较，差异无统计学意义($P>0.05$)。不同浓度的盐酸氨溴索对白色假丝酵母菌BF的抑制作用，组间比较均有显著性差异($P<0.05$)。

2.2 盐酸氨溴索对白色假丝酵母菌成熟BF形态学的影响

如图1所示，96孔微量细胞培养板中培养48 h后，BF呈黑色密集团块状分布，说明白色假丝酵母菌成熟BF形成。不同浓度的盐酸氨溴索作用后，黑色团块状物质逐渐变得稀疏，说明BF结构遭到破坏，细胞外基质减少，单个酵母细胞增多。



A：空白对照；B：2.5 mg/ml；C：5 mg/ml；D：7.5 mg/ml

图1 倒置显微镜下观察银染后不同浓度的盐酸氨溴索对白色假丝酵母菌BF的影响 (×400)

3 讨论

近年来研究[8]证实微生物在自然状态下的生存方式是以 BF 的形式为主。BF 是一种微生物聚集群体,是微生物不可逆地与无活力物体或活组织表面黏附、包被于自体产生的黏液性不均一聚合基质中,由细菌和自身分泌的胞外基质组成(extracellular matrix, ECM),具有高度耐药性的特异表型[9]。BF 内的菌体对抗菌药物的耐受性比浮游菌增加了数百至上千倍,而且 BF 还具有播散性,使感染常常表现为迁延反复和不易彻底抑制,是临床上引起难治性慢性感染的主要原因。

盐酸氨溴索是一种黏液溶解剂,临床应用安全性高,可雾化及静脉给药,为临床上常用的化痰药之一。目前,体外实验[10]证实盐酸氨溴索能够抑制黏液型铜绿假单胞菌 BF 的早期黏附,并且发现高浓度的氨溴索(2 mg/ml)可破坏铜绿假单胞菌成熟 BF 的结构和完整性,促进环丙沙星渗透入 BF,而且氨溴索可以阻止铜绿假单胞菌的早期黏附,减少胞外多糖复合物(extracellular polymeric substances, EPS)的产生[11]。然而,盐酸氨溴索对白色假丝酵母菌 BF 的作用国内外研究甚少。

白色假丝酵母菌 BF 的形成主要包括三个阶段,早期为 0 ~ 11 h 左右,分散的酵母细胞聚集增值成小菌落,中期为 12 ~ 30 h 左右,菌体分泌大量细胞外基质并逐渐包裹菌体,晚期为 30 ~ 72 h 左右,成熟的 BF 基本形成[12]。本实验依据 Pierce 等[6]方法,用 96 孔微量细胞培养板成功地构建了体外白色假丝酵母菌成熟 BF,用 XTT 减低法定量分析了盐酸氨溴索对白色假丝酵母菌成熟 BF 的影响。XTT 是一种类似于 MTT 的化合物,在电子耦合试剂存在的情况下,活细胞线粒体中存在与辅酶Ⅱ相关的脱氢酶,可将黄色的 XTT 还原成水溶性的橘黄色的四氮盐-甲替(XTT-formazan)产物,该代谢产物能溶解在组织培养基中,在 450 nm 处的吸光值与细胞的活力成正比。该法在不破坏 BF 的条件下能检测出 BF 中菌细胞的活力。现在已经广泛应用于测定真菌 BF 内细胞活性的研究。该实验结果显示在一定的浓度范围内,D(450)的值较空白对照组明显减少,间接反映了 BF 内菌体活力下降,活细胞数减少,表明盐酸氨溴索可渗透到 BF 内,并对 BF 内的细菌有杀灭作用,从而对白色假丝酵母菌成熟 BF 起到抑制作用。随着药物浓度的增加,盐酸氨溴索对 BF 的抑制作用明显增强 ,说明盐酸氨溴索对白色假丝酵母菌成熟 BF 的抑制作用呈浓度依赖性,浓度越大其对成熟 BF 内活菌的杀伤效果越好。此外,本实验还运用银染的方法从形态学上进一步验证了盐酸氨溴索对白色假丝酵母菌成熟 BF 的抑制作用。BF 的主要成分是多糖蛋白复合物,银染正是通过对 BF 菌体自身分泌的胞外多糖进行染色,从而在普通显微镜下观察细菌的 BF。本实验中,在没有药物干预情况下,BF 经过银染后呈黑色密集云雾团块状,单个酵母细胞少见。随着药物浓度的增加,BF 变得疏松,黑色团块状 BF 变小变稀薄,单个酵母细胞增多,表明细胞外基质逐渐减少。本实验结果示盐酸氨溴索对成熟白色假丝酵母菌 BF 有抑制作用,这与盐酸氨溴索能直接杀死白色假丝酵母菌和可能减少胞外多糖的产生有关。

本实验仅考察了盐酸氨溴索对成熟 BF 的抑制作用,旨在为临床上治疗由白色假丝酵母菌 BF 引起的难治性、复发性真菌感染提供实验依据。盐酸氨溴索对白色假丝酵母菌 BF 抑制作用的机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent S M, *et al*. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study [J]. Clin Infect Dis, 2004, 39(3): 309 - 317.

[2] Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi E M, *et al*. Biofilm production by Candida species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(6): 1843 - 1850.

[3] d'Enfert C. Biofilms and their role in the resistance of pathogenic Candida to antifungal agents [J]. Curr Drug Targets, 2006, 7(4): 465 - 470.

[4] 李芳, 余加林, 杨华, 等. 盐酸氨溴索联合环丙沙星抗铜绿假单胞菌成熟生物膜作用研究[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32(8): 503 - 505.

[5] 李芳, 余加林, 刘官信, 等. 氨溴索对铜绿假单胞菌生物膜结构的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(1): 60 - 63.

[6] Pierce C G, Uppuluri P, Tristan A R, *et al*. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing [J]. Nat Protoc, 2008, 3(9): 1494 - 1500.

[7] Chandra J, Mukherjee P K, Ghannoum M A. *In vitro* growth and analysis of Candida biofilms [J]. Nat Protoc, 2008, 3(12): 1909 - 1924.

[8] Costerton J W, Stewart P S, Greenberg E P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections [J]. Science, 1999, 284(5418): 1318 - 1322.

[9] Kumamoto C A, Vinces M D. Alternative Candida albicans lifestyles: growth on surfaces [J]. Annu Rev Microbiol, 2005, 59: 113 - 133.

[10] 杨华, 余加林, 刘官信, 等. 氨溴索对环丙沙星透过铜绿假单胞菌生物膜的影响[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32(4): 221 - 224.

[11] Li F, Yu J, Yang H, *et al*. Effects of ambroxol on alginate of mature Pseudomonas aeruginosa biofilms[J]. Curr Microbiol, 2008, 57(1): 1 - 7.

[12] Chandra J, Kuhn D M, Mukherjee P K, *et al*. Biofilm formation by the fungal pathogen Candida albicans: development, architecture, and drug resistance [J]. J Bacteriol, 2001, 183(18): 5385 - 5394.

(收稿 2010-10-12 修回 2010-12-01)

(编辑 邓强庭)