异黄绵马酸PB对红色毛癣菌生物被膜黏附及甾醇代谢相关酶基因表达的影响Δ

侯　捷[1*]，唐春萍[1]，沈志滨[1]，陈艳芬[1]，丁　慎[1]，张祉思[1]，李小英[1]，江　涛[2,3,4#]（1.广东药科大学中药学院，广州 510006；2.广东药科大学实验动物中心，广州　510006；3.广州市新药筛选模型系统建设与应用重点实验室，广州　510006；4.广东省局部精确给药系统工程中心，广州　510006）

中图分类号　R285.5　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2021）05-0584-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2021.05.13

摘　要　目的：研究异黄绵马酸PB（简称“PB”）对红色毛癣菌生物被膜黏附及甾醇代谢相关酶基因表达的影响。方法：采用M38-A2法测定PB对红色毛癣菌的最小抑菌浓度（MIC）；采用MTT法筛选红色毛癣菌生物被膜的构建条件和初黏附时间；采用XTT法评价不同质量浓度PB（40、80、160 μg/mL）对红色毛癣菌黏附过程的影响（另设置不加此药物的生长对照组，下同），并计算相对黏附率；采用XTT法并结合倒置显微镜观察不同质量浓度PB（20、40、80 μg/mL）对不同初黏附时间下（3、5、9 h）红色毛癣菌生物被膜形成的影响并计算黏附抑制率；采用实时荧光定量聚合酶链式反应法检测PB（320 μg/mL）对红色毛癣菌生物被膜中甾醇代谢相关酶基因*ERG*6、*ERG*11 mRNA表达的影响。结果：PB对红色毛癣菌的MIC为20 μg/mL。红色毛癣菌生物被膜在含10%FBS的RPMI-1640培养基中且初黏附时间为6 h时的代谢活性最强。与生长对照组比较，红色毛癣菌经不同质量浓度PB作用后，相对黏附率和生物被膜中*ERG*6、*ERG*11 mRNA的相对表达量均显著降低（$P<0.01$）；菌丝减少甚至消失，黏附抑制率（初黏附5、9 h时）显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。结论：PB能抑制红色毛癣菌的黏附过程，减少菌丝形成；该作用机制可能与抑制生物被膜中甾醇代谢相关酶基因*ERG*6、*ERG*11 mRNA的表达有关。

关键词　异黄绵马酸PB；红色毛癣菌；生物被膜；黏附；甾醇代谢

Effects of Isoflavaspidic Acid PB on the Biofilm Adhesion and Gene Expression of Ergosterol Metabolism Related Enzymes in *Trichophyton rubrum*

HOU Jie[1], TANG Chunping[1], SHEN Zhibin[1], CHEN Yanfen[1], DING Shen[1], ZHANG Zhisi[1], LI Xiaoying[1], JIANG Tao[2, 3, 4]（1. College of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Laboratory Animal Center, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 3.Guangzhou Key Laboratory of Construction and Application of New Drug Screening Model Systems, Guangzhou 510006, China; 4. Guangdong Provincial Engineering Center of Topical Precise Drug Delivery System, Guangzhou 510006, Guangzhou, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE: To study the effect of isoflavaspidicacid PB (called PB for short) on the biofilm adhesion and the gene expression of ergosterol metabolism related enzymes in *Trichophyton rubrum*. METHODS: M38-A2 method was adopted to determine MIC of PB to *T. rubrum*. MTT assay was used to screen the biolfilm condition and initial adhesion period of *T. rubrum*. The effects of different concentrations of PB (40, 80, 160 μg/mL) on the adhesion duration of *T. rubrum* (growth control group without PB was set up, similarly hereinafter) were evaluated and the adhesion rate was calculated by using XTT assay; the effects of different concentrations of PB (20, 40, 80 μg/mL) on the biofilm formation of *T. rubrum* at different initial adhesion periods (3, 5, 9 h) were observed and the adhesion rate was calculated by using XTT assay combined with inverted microscope; qRT-PCR method was used to detect the effects of PB (320 μg/mL) on the mRNA expression of ergosterol metabolism related enzyme gene *ERG*6 and *ERG*11 in biofilm of *T. rubrum*. RESULTS: MIC of PB to *T. rubrum* was 20 μg/mL. The biofilm of *T. rubrum* in RPMI-1640 medium containing 10% FBS was the most metabolism activity at 6 h of initial adhesion. Compared with growth control group, after treated with different concentrations of PB, adhesion rate and mRNA expression of *ERG*6 and *ERG*11 in biofilm were decreased significantly ($P<0.01$). Hyphae decreased or even disappeared, and the adhesion inhibition rate (at 5 and 9 h of initial adhesion) increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: PB can inhibit the adhesion of *T. rubrum* and reduce the hyphae; the mechanism may be associated with the inhibition of the biofilm adhesion and mRNA expression of ergosterol metabolism related enzyme gene *ERG*6 and *ERG*11.

KEYWORDS　Isoflavaspidic acid PB; *Trichophyton rubrum*; Biofilm; Adhesion; Ergosterol metabolism

Δ 基金项目：广东省省级科技计划项目（No.2015B020234009）

* 硕士研究生。研究方向：中药药效评价和作用机制。E-mail：1161699132@qq.com

通信作者：教授，硕士生导师。研究方向：中药药效评价和作用机制。电话：020-39352152。E-mail：1181894563@qq.com

近年来，浅部真菌病的发病率持续增加，对人们健康产生重大影响[1]。红色毛癣菌 *Trichophyton rubrum* 是临床最常见的皮肤癣菌，为浅部真菌病的主要病原菌，有69.5%的皮肤癣菌病是由红色毛癣菌感染所致[2]。目前，临床上常用的抗真菌药包括三唑类、多烯类、棘白菌素类等[3]。抗真菌药的大量使用不仅对人体的毒副作用较大，而且长期使用也会导致病原菌耐药性的产生，例如红色毛癣菌对特比奈芬耐药[4]、白色念珠菌对氟康唑耐药[5]，严重影响患者的治疗效果。有研究表明，抗真菌药物耐药性的耐药性产生与生物被膜的形成密切相关[6]。然而，关于红色毛癣菌生物被膜耐药的问题，目前研究报道甚少。

麦角甾醇是真菌生长必需的重要成分，其能与磷酸结合起到保护细胞膜稳定性的作用，对细胞膜结构的稳定性、流动性以及膜结合酶的活性具有重要作用[7]。一旦出现麦角甾醇缺失的情况，细胞膜的稳定性就会下降，从而导致细胞膜破裂和细胞内物质外流，引起真菌细胞死亡[8]。在麦角甾醇的合成过程中，有4个重要的环节，分别是甲羟戊酸的生物合成、甲羟戊酸转化为角鲨烯、角鲨烯形成羊毛甾醇、羊毛甾醇转化为麦角甾醇[9]。其中，*ERG*6是C-24位甲基转移酶上的编码基因，其mRNA的高表达不仅可以补偿其他高表达基因对麦角甾醇带来的负反馈作用，同时还可以进一步提高麦角甾醇的含量[10]。14-*α*去甲基酶是麦角甾醇合成通路中的关键酶，抑制该酶活性，可阻止羊毛甾醇的去甲基化，使其终产物麦角甾醇缺失，从而破坏细胞的完整性，进而抑制真菌生长[11]。

香鳞毛蕨 *Dryopteris fragrans*（L.）Schott是鳞毛蕨科鳞毛蕨属植物，具有抗菌、抗肿瘤、止痒、抗过敏等多种功效，在民间被广泛用于治疗多种皮肤病（如体癣、手足癣等），均有较好的效果[12]。本课题组前期研究发现，香鳞毛蕨中的单体化合物异黄绵马酸PB（简称“PB”）对红色毛癣菌及其生物被膜成熟期均有较强抑制作用[13]。基于此，本研究以红色毛癣菌为研究对象，初步分析PB对红色毛癣菌生物被膜黏附及甾醇代谢相关酶基因（*ERG*6、*ERG*11）表达等的影响，为深入研究PB抗红色毛癣菌生物被膜的作用及机制提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有：PB-10型台式数显pH计[赛多利斯科学仪器（北京）有限公司]，BA310型正置显微镜、AE2000型倒置显微镜（麦克奥迪实业集团有限公司），iMark型酶标仪（美国Bio-Rad公司），DHP-9032B型电热恒温培养箱（上海一恒科学仪器有限公司），CHA-S型恒温振荡器（江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司），Strat-agene Mx3000P型实时荧光定量聚合酶链式反应（qRT-PCR）仪（美国Agilent公司），K960型PCR扩增仪（杭州晶格科学仪器有限公司），血细胞计数板（上海市求精生化试剂仪器有限公司），Q6000UV型超微量紫外分析仪（美国Quawell Technology公司），SW-CJ-1型超净工作台（苏州安泰空气技术有限公司）。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用主要药品与试剂有：PB（本实验室自制，纯度＞98%），特比萘芬（TBF）、甲萘醌（大连美仑生物技术有限公司，批号分别为M0726A、C1517035），两性霉素B（AMB，美国AMRESCO公司，批号A0414，纯度＞98%），氟康唑（北京索莱宝科技有限公司，批号504B041，纯度＞98%），MTT试剂（广州瑞舒生物科技有限公司，批号201612），XTT钠盐（美国Sigma公司，批号CX28143704），RPMI-1640培养基（美国Gibco公司，批号1786045），胎牛血清（FBS，浙江天杭生物科技股份有限公司，批号19110506），二甲基亚砜（DMSO，天津大茂化学试剂厂，批号2019030121），丙酮（衡阳市凯信化工有限公司有限公司，批号0601142），Bestar™ qRT-PCR试剂盒、BestarTM qPCR MasterMix试剂盒（德国DBI公司，货号分别为2220、2043），TRIzol试剂（日本TaKaRa公司，货号9109），焦碳酸二乙酯（DEPC，上海麦克林生化科技有限公司，货号6079），PCR引物（由上海生工生物工程有限公司合成，引物序列及产物长度信息见表1）；其余试剂为分析纯或实验室常用规格，水为超纯水。

表1 引物序列及产物长度信息

Tab 1 Primer sequence and length

基因	引物序列	产物长度,bp
β-tubulin	上游:5′-GCATCTTTTGTTGGCACCGT-3′	278
	下游:5′-TACCGGGCTTCAAATGTCCC-3′	
*ERG*6	上游:5′-CTCTGGCAAGACACGAACAC-3′	126
	下游:5′-CCTTGCAGCCGGTGAAGG-3′	
*ERG*11	上游:5′-CCGGCTTCAGGCATACCAA-3′	103

1.3 菌株

本研究所用红色毛癣菌临床菌株YAMA-786、近平滑念珠菌标准菌株ATCC-22019均由中国医学科学院皮肤病研究所提供。

2 方法

2.1 红色毛癣菌菌悬液的制备

取红色毛癣菌临床菌株YAMA-786，于超净工作台中接种在马铃薯固体培养基的试管斜面上，置于28 ℃恒温箱中培养14天后，连续传代2次得到红色毛癣菌实验菌株；然后采用接种环轻刮菌落置于研磨器中，加入无菌磷酸盐缓冲液（PBS）1 mL，研磨成菌悬液，经血细胞计数板计数后，用RPMI-1640液体培养基将菌悬液浓度调至1×10^6个/mL，备用。

2.2 PB对红色毛癣菌药敏性的影响考察

采用M38-A2法进行检测。取PB以RPMI-1640培

养基稀释，使药物质量浓度为640 μg/mL，分别加入96孔板的第1列孔中（每孔200 μL），在第2～10列孔中加入RPMI-1640培养基100 μL，然后从第1列孔中吸取100 μL PB药液加入第2列孔中，充分混匀后吸取100 μL加入第3列孔中，依次进行倍比稀释[14]；第10列孔中药液混匀后吸弃100 μL；在第11列孔加入RPMI-1640培养基100 μL作为生长对照组（即不含药物），第12列孔加入RPMI-1640液体培养基200 μL作为空白对照。除第12列孔不加入红色毛癣菌菌悬液外，其余各孔均加入2×10^{4}个/mL的菌悬液（使PB药液终质量浓度为0.625、1.25、2.5、5、10、20、40、80、160、320 μg/mL），于35 ℃恒温培养箱中培养96 h，以肉眼观察96孔板中无菌生长的孔所对应的药物浓度作为PB的最小抑菌浓度（MIC）。另取阳性对照药TBF、AMB同上述方法进行倍比稀释（终质量浓度分别为0.003 9～2、0.062 5～8 μg/mL），按上述方法测定TBF、AMB的MIC。另以平滑念珠菌标准菌株ATCC22019作为质控菌，以氟康唑作为质控菌药物（终质量浓度为0.0625～8 μg/mL），同上述方法测定氟康唑对平滑念珠菌的MIC，若氟康唑的MIC为0.5～4 μg/mL，则表明该方法可靠。以上试验操作均重复3次。

2.3 红色毛癣菌生物被膜构建条件筛选

采用MTT法筛选构建红色毛癣菌生物被膜的培养基和初黏附时间。分别以含或不含10%FBS的RPMI-1640培养基将红色毛癣菌菌悬液稀释至1×10^{6}个/mL，按每孔100 μL接种至96孔板中，分别在35 ℃培养箱中培养0、3、6、12、24、96 h（即初黏附时间，每种培养基各时间点均设置10个复孔），弃去上层培养基，用无菌PBS轻轻冲洗2次，再加入相应培养基100 μL后，继续于35 ℃恒温培养箱中培养直至96 h；弃去上层培养基，用无菌PBS轻轻冲洗2次，室温干燥后，加入5 mg/mL MTT溶液20 μL，置于35 ℃恒温培养箱中避光培养4 h后，再加入DMSO 150 μL，低速振荡10 min；吸取上述菌悬液100 μL到新孔板中，采用酶标仪于510 nm波长处检测各孔的光密度（OD）值。OD值越高，表明红色毛癣菌生物被膜中孢子代谢活性越高，即该条件越优。

2.4 PB对红色毛癣菌黏附过程的影响考察

采用XTT法进行检测。以含10% FBS的RPMI-1640培养基将红色毛癣菌菌悬液调整为1×10^{6}个/mL，然后按每孔100 μL接种至96孔板中，随机分为PB 40、80、160 μg/mL质量浓度组（根据PB的2、4、8倍MIC进行设置），并加入相应药液100 μL；同时设置生长对照组（含菌悬液但不含药物）和空白对照组（只含培养基），每组均设5个复孔。将96孔板于35 ℃恒温培养箱中培养6 h后，用无菌PBS轻轻冲洗2次；加入新鲜的含10%FBS的RPMI 1640培养基100 μL，继续于35 ℃恒温培养箱中培养直至96 h后，弃去原培养基，用无菌PBS轻轻冲洗2次，于室温条件下干燥；每孔加入100 μL XTT-甲萘醌溶液（XTT钠盐用PBS配制成0.5 mg/mL的饱和溶液，甲萘醌用丙酮配制成10 mol/L的溶液，然后两者按1∶10体积比混匀而得），避光培养2 h后取出，将96孔板置于微量振荡器上振荡10 min，使染料分布均匀；吸取上述染色后的菌悬液100 μL于新的96孔板中，用酶标仪于490 nm波长处检测各孔OD值。另设置阳性对照药TBF 0.25、0.5、1.5 μg/mL质量浓度组（根据TBF的2、4、8倍MIC进行设置），按上述方法操作。然后根据公式计算红色毛癣菌的相对黏附率：相对黏附率（%）=（$OD_{药物组}$－$OD_{空白对照组}$）/（$OD_{生长对照组}$－$OD_{空白对照组}$）×100%。

2.5 PB对不同初黏附时间下红色毛癣菌生物被膜形成的影响

采用XTT法进行检测。以含10% FBS的RPMI-1640培养基将红色毛癣菌菌悬液调整为1×10^{6}个/mL，按每孔100 μL分别接种至3个96孔板中，置于35 ℃恒温培养箱中分别培养3、5、9 h（该过程即为红色毛癣菌的初黏附过程），然后用PBS轻轻冲洗2次，再将含菌孔板随机分为PB 20、40、80 μg/mL质量浓度组（根据PB的1、2、4倍MIC进行设置），并加入相应药液；同时设置生长对照组（含菌悬液但不含药液）和空白对照组（只含培养基），每组设5个复孔。将96孔板置于35 ℃恒温培养箱中培养直至96 h，取出，于倒置显微镜下观察PB对不同初黏附时间下红色毛癣菌生物被膜黏附作用的影响，并拍照记录。然后弃去培养基，以无菌PBS轻轻冲洗2次，于室温条件下干燥后，每孔加入XTT-甲萘醌溶液100 μL，避光培养2 h后取出，将96孔板置于微量振荡器上振荡10 min，使染料分布均匀；吸取上述染色后的菌悬液100 μL到新的96孔板中，用酶标仪于490 nm波长处检测各孔OD值，并计算不同初黏附时间下对红色毛癣菌的黏附抑制率：黏附抑制率（%）=[1－（$OD_{药物组}$－$OD_{空白对照组}$）/（$OD_{生长对照组}$－$OD_{空白对照组}$）]×100%。

2.6 PB对红色毛癣菌生物被膜中*ERG*6、*ERG*11 mRNA表达的影响

根据“2.2”项下筛选的条件，以含10%FBS的RPMI-1640培养基将红色毛癣菌菌悬液稀释成1×10^{6}个/mL，按每孔2 mL接种至6孔板中，置于35 ℃恒温培养箱中培养6 h后，吸弃上层培养基，用无菌PBS轻轻冲洗3次，然后加入2 mL含10%FBS的RPMI 1640培养基，继续于35 ℃恒温培养箱中培养至96 h；弃去上层培养基后，分别加入含PB和阳性对照药TBF、AMB的培养基（终质量浓度均分别为320、2、8 μg/mL，每种药物设置3个复孔）2 mL，置于35 ℃恒温培养箱中培养48 h后，用4 ℃的PBS清洗2次，以1 000 r/min离心10 min，弃上清，即

得不同药物作用后的红色毛癣菌生物被膜样品，于液氮中保存，备测。

取上述待测红色毛癣菌生物被膜样品100 mg，加入TRIzol试剂1 mL研磨，然后加入氯仿0.2 mL，振荡后于4 ℃条件下放置3 min，再以12 000 r/min离心15 min，取上清液至EP管中，加入等体积异丙醇混匀；弃上清，加入DEPC处理过的75%乙醇溶液洗涤沉淀后，于4 ℃条件下以8 000 r/min离心5 min，弃去上清，沉淀于室温下晾干后，加入30 μL DEPC处理过的ddH_2O溶解RNA；取RNA溶液1.5 μL于超微量紫外分析仪中测定浓度后，置于－80 ℃冰箱中保存，备用。以上述总RNA 4 μg为模板，按照Bestar™ qPCR RT试剂盒说明书方法将总RNA逆转录成cDNA。采用荧光定量PCR仪进行扩增，PCR反应体系（共20 μL）为：Bestar® SybrGreen qPCR master-Mix 10 μL，cDNA模板1 μL，上下游引物各0.5 μL，ddH_2O 8 μL。PCR反应条件为：95 ℃预变性2 min；94 ℃变性20 s，58 ℃退火20 s，72 ℃延伸20 s，40个循环。进行融解曲线分析：94 ℃变性30 s，65 ℃退火30 s，94 ℃延伸30 s。上述试验均重复操作3次。以*β-tubulin*为内参基因，按照$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算目的基因的相对表达量。

2.7 统计学方法

采用SPSS 25.0软件对数据进行统计分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，组间比较采用单因素方差分析，多重比较采用LSD法。$P<0.05$表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 PB对红色毛癣菌药敏性的影响

PB、TBF和AMB对红色毛癣菌的MIC分别为20、0.125、0.5 μg/mL；氟康唑对质控菌株近平滑念珠菌ATCC-22019的MIC为2 μg/mL，符合质控要求，测试结果可信。

3.2 红色毛癣菌生物被膜构建条件的筛选结果

在相同初黏附时间（3、6、12 h）下，与不含FBS的RPMI-1640培养基比较，含10%FBS的RPMI-1640培养基中红色毛癣菌生物被膜的OD值均显著升高（$P<0.01$），表明红色毛癣菌在含10%FBS的RPMI-1640培养基中的代谢活性增强，生物被膜的形成量明显增加。在含10%FBS的RPMI-1640培养基中，与6 h的初黏附时间比较，其他初黏附时间（12、24、48 h）下红色毛癣菌生物被膜的OD值均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），表明红色毛癣菌在含10%FBS培养基中初黏附6 h时的生物被膜代谢活性最强，详见表3。

3.3 PB对红色毛癣菌黏附过程的影响

药物作用6 h后，与生长对照组比较，PB和TBF各质量浓度组红色毛癣菌的相对黏附率均显著降低（$P<0.01$），详见表3。

表2 不同培养基、不同初黏附时间下红色毛癣菌生物被膜代谢活性的比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Tab 2 Comparison of metabolic activities of *T. rubrum* biofilm in different culture mediums at different initial adhesion periods（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

初黏附时间，h	OD值	
	不含FBS的RPMI-1640培养基	10%FBS的RPMI-1640培养基
0	0.610 7±0.068	0.590 3±0.090$^{\#\#}$
3	0.693 0±0.067	1.011 1±0.093$^{**\#\#}$
6	0.651 0±0.098	1.122 3±0.038**
12	0.315 7±0.025	0.665 8±0.068$^{**\#\#}$
24	0.640 9±0.088	0.441 8±0.077$^{\#\#}$
96	0.644 8±0.046	0.553 8±0.057$^{\#\#}$

注：与不含FBS的RPMI-1640培养基比较，$^{**}P<0.01$；与6 h初黏附时间比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$

Note：vs. RPMI-1640 medium without FBS，$^{**}P<0.01$；vs. initial adhesion time of 6 h，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$

表3 PB对红色毛癣菌黏附过程的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

Tab 3 Effects of PB on the adhesion process of *T. rubrum*（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	相对黏附率，%
生长对照组	100.00
PB 40 μg/mL质量浓度组	88.95±0.070$^{\Delta\Delta}$
PB 80 μg/mL质量浓度组	36.72±0.052$^{\Delta\Delta}$
PB 160 μg/mL质量浓度组	16.91±0.016$^{\Delta\Delta}$
TBF 0.25 μg/mL质量浓度组	29.46±0.027$^{\Delta\Delta}$
TBF 0.5 μg/mL质量浓度组	31.23±0.030$^{\Delta\Delta}$
TBF 1 μg/mL质量浓度组	31.97±0.029$^{\Delta\Delta}$

注：与生长对照组比较，$^{\Delta\Delta}P<0.01$

Note：vs. growth control group，$^{\Delta\Delta}P<0.01$

3.4 PB对不同初黏附时间下红色毛癣菌生物被膜形成的影响

不同初黏附时间下，生长对照组均有大量红色毛癣菌菌丝聚集成团，生物被膜结构致密。当初黏附3 h时，与生长对照组比较，PB 20、40 μg/mL质量浓度组菌丝数量相对减少，PB 80 μg/mL质量浓度组菌丝数量明显减少、长度明显缩短；当初黏附5、9 h时，PB 20、40 μg/mL质量浓度组菌丝数量明显减少，PB 80 μg/mL质量浓度组未发现明显菌丝，详见图1。与生长对照组比较，初黏附3 h后，PB 20、40、80 μg/mL质量浓度组红色毛癣菌生物被膜的黏附抑制率均显著升高（$P<0.05$）；初黏附5、9 h后，PB 20、40、80 μg/mL质量浓度组红色毛癣菌生物被膜的黏附抑制率均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），详见表4。

3.5 PB对红色毛癣菌生物被膜中*ERG*6、*ERG*11 mRNA表达的影响

与生长对照组比较，TBF组红色毛癣菌生物被膜中*ERG*6、*ERG*11 mRNA的相对表达量均显著升高（$P<0.05$）；AMB组、PB组红色毛癣菌生物被膜中*ERG*6、*ERG*11 mRNA的相对表达量均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），详见表5。

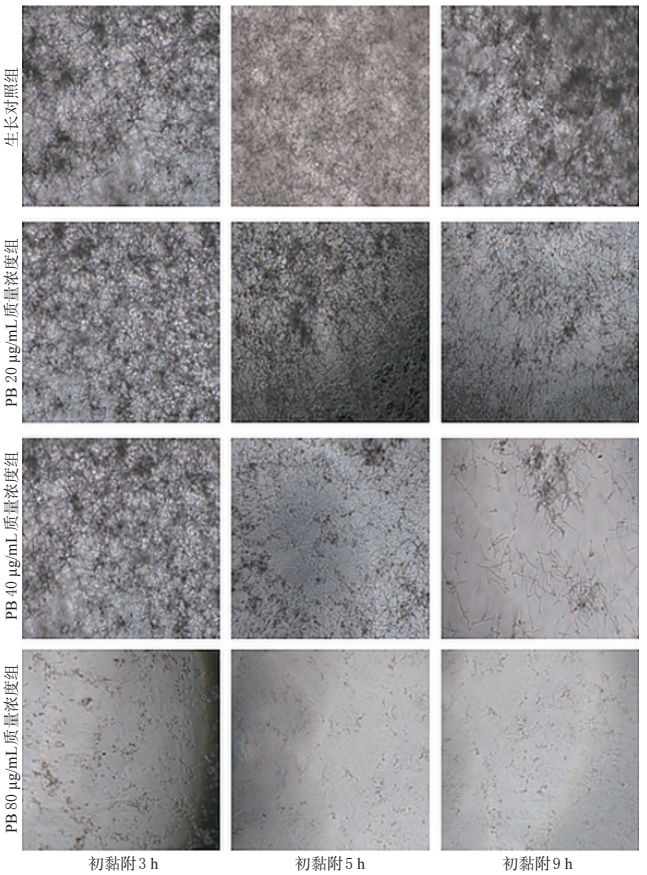


图1　PB对不同初黏附时间下红色毛癣菌生物被膜形成的影响显微图（×400）

Fig 1　Micrograph of effects of PB on the biofilm formation of *T. rubrum* at different adhesion periods（×400）

表4　PB对不同初黏附时间下红色毛癣菌生物被膜形成的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

Tab 4　Effect of PB on the biofilm formation of *T. rubrum* at different adhesion periods（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	黏附抑制率，%		
	初黏附3 h	初黏附5 h	初黏附9 h
生长对照组	0	0	0
PB 20 μg/mL质量浓度组	0	4.7±0.059$^{\Delta}$	3.4±0.023$^{\Delta\Delta}$
PB 40 μg/mL质量浓度组	0	17.8±0.089$^{\Delta}$	47.5±0.076$^{\Delta\Delta}$
PB 80 μg/mL质量浓度组	69.4±0.096$^{\Delta}$	91.1±0.077$^{\Delta}$	98.1±0.019$^{\Delta\Delta}$

注：与生长对照组比较，$^{\Delta}P<0.05$，$^{\Delta\Delta}P<0.01$

Note：vs. growth control group，$^{\Delta}P<0.05$，$^{\Delta\Delta}P<0.01$

4　讨论

目前国内外对红色毛癣菌生物被膜的研究甚少，对真菌生物被膜的研究主要集中在白色念珠菌生物被膜，尚未形成对红色毛癣菌生物被膜的系统性探究[15]。真菌生物被膜的形成过程中受到很多因素的影响，包括不同的培养基成分及黏附时间，即使在相同材质的黏附表面，在外界环境营养成分不一致的情况下生物被膜产生的程度也不尽相同[16-18]。例如Nikawa等[19]和Frade等[20]的研究表明，在培养基中添加血清，可有效增加白色念珠菌生物被膜中孢子的代谢活性。基于此，本研究也探讨了在培养基中加入与不加FBS对红色毛癣菌生物被膜形成的影响。结果表明，在含10%FBS的RPMI-1640培养基中，且初黏附时间为6 h时，红色毛癣菌生物被膜的形成量最优。

表5　PB对红色毛癣菌生物被膜中*ERG*6、*ERG*11 mRNA相对表达量的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Tab 5　Effects of PB on mRNA expression of *ERG*6 and *ERG*11 in the biofilm of *T. rubrum*（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	质量浓度，μg/mL	*ERG*6 mRNA	*ERG*11 mRNA
生长对照组		0.81±0.05	0.88±0.02
TBF组	2	1.00±0.05$^{\Delta}$	1.00±0.06$^{\Delta}$
AMB组	8	0.64±0.17$^{\Delta}$	0.83±0.04
PB组	320	0.65±0.04$^{\Delta}$	0.65±0.04$^{\Delta\Delta}$

注：与生长对照组比较，$^{\Delta}P<0.05$，$^{\Delta\Delta}P<0.01$

Note：vs. growth control group，$^{\Delta}P<0.05$，$^{\Delta\Delta}P<0.01$

真菌生物被膜的形成分为黏附期、形成期、成熟期[21]。Lin等[22]的研究表明，PB对红色毛癣菌生物被膜形成期和成熟期有明显抑制作用。由于真菌的黏附是形成生物被膜的第一步，若真菌不能牢固定植于宿主器官或组织表面，则容易被血液及其他体液冲刷而不能引起感染，就会影响生物被膜的形成[23]。本研究采用XTT法研究PB对红色毛癣菌黏附过程的影响，结果表明，PB能显著降低红色毛癣菌的相对黏附率，抑制其黏附过程，从而降低其生物膜的生成量。

红色毛癣菌初黏附时间的长短对其生物被膜形成的能力有至关重要的影响[24]。本研究通过XTT法检测黏附不同时间后PB对红色毛癣菌生物被膜形成的影响。结果显示，在同样药物浓度下，黏附时间越长，药物对其黏附抑制率较高，表明PB对红色毛癣菌生物被膜形成的抑制作用与其初黏附的时间长短有关。Henry等[25]的研究表明，AMB可能通过与真菌细胞膜甾醇成分直接结合，使结合后的麦角甾醇合成通路的下游结合型甾醇含量增加，可直接诱导*ERG* mRNA表达水平的降低。本研究结果表明，与生长对照组比较，PB（320 μg/mL）可显著降低红色毛癣菌生物被膜中*ERG*6、*ERG*11 mRNA的相对表达量。这提示PB可能是通过与真菌细胞膜甾醇成分直接结合成复合物，降低甾醇成分分解，抑制麦角甾醇合成通路中相关靶酶基因的表达，进而降低麦角甾醇的合成，破坏红色毛癣菌生物被膜的平衡性，使胞内物质外流，从而起到抑菌及杀菌的作用。与生长对照组比较，在2 μg/mL TBF的作用下，红色毛癣菌生物被膜中*ERG*6、*ERG*11 mRNA的相对表达量均显著升高，提示其对麦角甾醇合成通路中*ERG*6、*ERG*11基因表达的影响与PB和AMB不同，这可能与Cardoza等[26]发现的*ERG*基因的表达与菌株耐药有关。

综上所述，PB能抑制红色毛癣菌的黏附过程，减少菌丝的形成；该作用机制可能与抑制生物被膜中甾醇代谢相关基因*ERG*6、*ERG*11 mRNA的表达有关。但PB抑制红色毛癣菌生物被膜的明确作用机制还有待于进一步探讨。

参考文献

[1] 李斌，郭鑫，裴贵珍.黄连萃取物体外抗红色毛癣菌活性初步研究[J].新疆中医药，2019，37(2)：39-41.

[2] 上官信一，丁晓艳，范俣琳，等.一种蒺藜甾体皂苷对人工诱导耐药的红色毛癣菌体外抗菌活性研究[J].药学研究，2018，37(3)：142-145.

[3] PIANALTO KM，ALSPAUGHl JA. New horizons in antifungal therapy[J]. J Fungi (Basel)，2016，2(4)：26.

[4] SINGH A，MASIH A，KHURANA A，et al. High terbinafine resistance in trichophyton interdigitale isolates in Delhi，India harbouring mutations in the squalene epoxidase gene[J]. Mycoses，2018，61(7)：477-484.

[5] DE FREITAS ALD，KAPLIM V，ROSSI DCP，et al. Proanthocyanidin polymeric tannins from stryphnodendron adstringens are effective against Candida spp. isolates and for vaginal candidiasis treatment[J]. J Ethnopharmacol，2018，24(216)：184-190.

[6] RAMAGE G，RAJENDRAN R，SHERRY L，et al. Fungal biofilm resistance[J/OL]. Int J Microbiol，2012：528521 [2020-08-07].https：//pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22518145/.DOI：10.1155/2012/528521.

[7] 韩叙，廖国建.白色念珠菌麦角甾醇的储存、调节和功能[J].国外医药(抗生素分册)，2018，39(5)：424-429.

[8] 严园园，汪天明，施高翔，等.黄连解毒汤联合氟康唑对耐药白念珠菌麦角甾醇的影响[J].中国中药杂志，2015，40(4)：727-732.

[9] 曹龙辉，李晓珺，赵文红，等.麦角甾醇的研究进展[J].中国酿造，2014，33(4)：9-12.

[10] BITENCOURT TA，MACEDO C，FRANCO M E，et al. Transcription profile of Trichophyton rubrum conidia grown on keratin reveals the induction of an adhesin-like protein gene with a tandem repeat pattern[J/OL]. BMC Genomics，2016，17：249[2020-08-07].https：//pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26993619.DOI：10.1186/s12864-016-2567-8.

[11] 胡绿荫，宰淑蓓，金鑫，等.白念珠菌唑类耐药和生物膜相关基因的表达[J].检验医学，2014，29(6)：597-602.

[12] 朱冲冲，彭冰，曾祖平，等.香鳞毛蕨的化学成分及药理作用研究进展[J].中国药房，2017，28(10)：1418-1423.

[13] 刘雪萍，林浩琪，沈志滨，等.异黄绵马酸PB对红色毛癣菌生物被膜的抑制作用观察[J].山东医药，2018，58(40)：32-37.

[14] SHEHATA AS，MUKHERJEE PK，GHANNOUM MA. Comparison between the standardized clinical and laboratory standards institute M38-A2 method and a 2，3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-[(sulphenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide-based method for testing antifungal susceptibility of dermatophytes[J]. J Clin Microbiol，2008，46(11)：3668-3671.

[15] HAWSER SP，DOUGLAS LJ. Biofilm formation by Candida species on the surface of catheter materials in vitro[J]. Infect Immun，1994，62(3)：915-921.

[16] ANDES D，NETT J，OSCHEL P，et al. Development and characterization of an in vivo central venous catheter Candida albicans biofilm model[J]. Infect Immun，2004，72(10)：6023-6031.

[17] KIM S，ALI AL，JYOTSNA C，et al. Parenteral lipid emulsion induces germination of Candida albicans and increases biofilm formation on medical catheter surfaces[J]. J Infect Dis，2009，200(3)：473-480.

[18] BONDARYK M，OCHAL Z，STANISZEWSKA M. Sulfone derivatives reduce growth，adhesion and aspartic protease SAP2 gene expression[J]. World J Microbiol Biotechnol，2014，30(9)：2511-2521.

[19] NIKAWA H，NISHIMURA H，HAMADA T，et al. Effect of serum concentration on Candida biofilm formation on acrylic surfaces[J]. Mycoses，2010，43(3/4)：139-143.

[20] FRADE J，ATILDE，PEDRO O. Effect of serum and surface characteristics on Candida albicans biofilm formation[J]. Mycoses，2011，54(4)：154-162.

[21] CHANDRA J，MUKHERJEE PK. Candida biofilms：development，architecture，and resistance[J]. Microbiol Spectr，2015，3(4)：1-14.

[22] LIN H，LIU X，SHEN Z，et al. The effect of isoflavaspidic acid PB extracted from Dryopteris fragrans (L.) Schott on planktonic and biofilm growth of dermatophytes and the possible mechanism of antibiofilm[J/OL]. J Ethnopharmacol，2019，241：111956[2020-08-07].https：//pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31129309/.DOI：10.1016/JCO.2019.111956.

[23] 汪天明，张梦翔，施高翔，等.黄连解毒汤乙酸乙酯提取物对光滑念珠菌黏附作用的影响[J].中国中药杂志，2015，40(3)：516-521.

[24] 姜路路.重楼皂苷Ⅶ抑制白色念珠菌生物被膜形成的作用机制[D].大连：辽宁师范大学，2018.

[25] HENRY KW，NICKELS JT，EDLIND TD. Upregulation of ERG Genes in Candida species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors[J]. J Antimicrob Chemother，2000，44(10)：2693-2700.

[26] CARDOZA RE，VIZCAINO JA，HERMOSA MR，et al. Cloning and characterization of the erg1 gene of Trichoderma harzianum：effect of the erg1 silencing on ergosterol biosynthesis and resistance to terbinafine[J]. Fungal Genet Biol，2006，43(3)：164-178.

（收稿日期：2020-09-08　修回日期：2020-12-31）

（编辑：唐晓莲）