基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001039

CHR抑制白假丝酵母菌生物被膜形成作用及机制探讨

张 舒[1],许 珊[2],张 丹[2],黄文祥[3],魏 伏[2],刘思佚[2],罗盛淑[1],何 琴[1],李佳俊[3]
（重庆医科大学附属第一医院 1. 肝胆外科;2. 重症医学科;3. 感染科;重庆 400016）

【摘 要】**目的**:CGA_{47-66}(chromofungin,CHR)是嗜铬粒蛋白 A(chromograinin A,CGA)水解形成的生物活性多肽,已有研究证实其具有免疫调节和抗菌作用,本研究旨在进一步证实 CHR 抗白假丝酵母菌生物被膜形成的作用,探讨其作用机制。**方法**:根据 CLSI-M27-A3 参考方法检测 CHR 对浮游状态下白假丝酵母菌的最低抑菌浓度,菌落计数法及 XTT 比色法验证 CHR 是否具有抑制生物被膜形成的作用,并确定 CHR 对白假丝酵母菌的 BIC_{50},通过菌落计数法和倒置显微镜证实 CHR 抗真菌粘附作用,并使用 qRT-PCR 检测粘附基因 *Hwp1* 的表达情况从而进一步验证其作用的分子机制。**结果**:CHR 对浮游状态白假丝酵母菌的 MIC 值为 10~20 μmol/L,并证实 CHR 具有抗白假丝酵母菌生物被膜形成作用,BIC_{50} 值为 80~160 μmol/L,且具有浓度依赖性;qRT-PCR 检测 CHR 下调 *C.albicans* Hwp1 基因的表达,160 μmol/L CHR 处理组相对 *Hwp1* 基因表达量通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值计算为(0.089 5±0.036 0),无处理组 *Hwp1* 基因的表达是 CHR 组的 11.17 倍,差异具有统计学意义(t=44.008,P=0.001)。**结论**:CHR 具有抑制白假丝酵母菌生物被膜形成的作用,其机制可能与 CHR 减少白假丝酵母菌细胞的粘附有关。本研究为 CHR 在抗真菌材料方面的应用提供了理论基础。

【关键词】CHR;白假丝酵母菌;生物被膜形成;真菌粘附
【中图分类号】R379.4 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-03-04

Inhibiting effect of CHR on biofilm formation of *Candida albicans* and its mechanism

Zhang Shu[1],Xu Shan[2],Zhang Dan[2],Huang Wenxiang[3],Wei Fu[2],Liu Siyi[2],Luo Shengshu[1],He Qin[1],Li Jiajun[3]
(1. Department of Hepatic Surgery;2. Department of Intensive Medicine;
3. Laboratory of Etiology on Infectious Disease,The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***:To further confirm if CGA_{47-66}(chromofungin,CHR) plays an inhibitory role on *Candida albicans* biofilm formation,and to explore its possible mechanism. ***Methods***:MIC_{50} of CHR on floating state *Candida albicans* was detected by M27-A3 reference method. BIC_{50} of CHR on biofilm formation was observed by XTT colorimetric assay;colony counting method and XTT colorimetric assay were employed to validate whether CHR had an inhibitory function on *Candida albicans* biofilm formation,then the antifungal adhesion function of CHR was tested by colony counting method combined with inverted microscope. The further molecular mechanism,and the expressions of adhesion gene *Hwp1* were measured by qRT-PCR. ***Results***:Our study firstly demonstrated that CHR could inhibit biofilm formation in a dose dependent manner;the BIC_{50} was 80 to 160 μmol/L;the MIC_{50} value of CHR on floating state *Candida albicans* was 10 to 20 μmol/L. CHR could down regulate the expression of adhesion

作者介绍:张 舒,Email:suesue0825@163.com,
研究方向:医院感染控制,消毒剂及抗生素临床应用。
通信作者:张 丹,Email:doctor_zhangdan@126.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81071531、81372102)。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20161027.1052.022.html (2016-10-27)

sound contrast microbubbles using in vitro experiments and viscous and viscoelastic interface models for encapsulation[J]. Journal of the Acoustical Society of America, 2005,118(1):539-550.
[13] 顾慧琼,向理科,王智彪. 高强度聚焦超声治疗兔胫骨移植性鳞状细胞癌中的空化现象[J]. 天津医药,2005,33(6):363-365.
[14] Clarke RL,Ter Haar GR. Temperature rise recorded during lesion formation by high-intensity focused ultrasound[J]. Ultrasound in Medicine & Biology,1997,23(2):299-306.
[15] Wang Y,Hu B,Diao X,et al. Antitumor effect of microbubbles enhanced by low frequency ultrasound cavitation on prostate carcinoma xenografts in nude mice[J]. Experimental & Therapeutic Medicine,2012,3(2):187-191.
[16] Mironova NL,Petrushanko IY,Patutina OA,et al. Ribonuclease binase inhibits primary tumor growth and metastases via apoptosis induction in tumor cells[J]. Cell Cycle,2013,12(13):2120-2131.

(责任编辑:张辉洁)

gene *Hwp1*. The relative expression fold of CHR group was (0.089 5 ± 0.036 0), the expression of gene *Hwp1* in control group was 11.17 times than that in the CHR group, and the difference had statistical significance (t=44.008, P=0.001). ***Conclusion***: CHR has the inhibitory effect on *Candida albicans* biofilm formation, the mechanism may related to reducing adherent ability of *Candida albicans*. This study provides theoretical basis for the application of CHR in the field of antifungal materials.

【Key words】chromofungin; *Candida albicans*; biofilm formation; fungal adhesion

由于人口老龄化加剧、慢性疾病和肿瘤发病率增高、器官移植比例增加等原因，真菌感染问题日益严重。目前，ICU 医院获得性感染中真菌病原体位居第 3 位[1]，尤其是白假丝酵母菌（*Candida albicans*），其在皮肤黏膜真菌感染和系统性真菌感染中所占比例均超过 50%[2-4]。多年来，侵袭性真菌感染诊治策略一直是研究热点之一，但收效甚微，死亡率仍高达 30%~50%[2,4-5]。已知假丝酵母菌属可附着在医用材料或体内黏膜表面并形成生物被膜[6]，形成成熟生物被膜的真菌对氟康唑（fluconazole，FLC）、卡泊芬净（caspofungin，CAS）、两性霉素 B（amphotericin B，AMB）等抗真菌药物均呈现不同程度的耐药[7]，MIC 值甚至可增加 1 000 倍。目前研究表明，生物被膜的形成导致耐药的白假丝酵母菌菌株逐年增加[6-7]。

生物被膜一旦形成，抗真菌治疗成功率明显下降，能够抑制生物被膜形成的新型抗真菌药物亟待发现。目前越来越多的研究人员将目光投向抗菌多肽（antimicrobial peptides，AMPs）。AMPs 是广泛存在于自然界的一类具有抗菌活性的蛋白质总称[8]，人体组织器官可广泛分泌[9]。AMPs 代谢物是游离氨基酸，具有机体毒副作用小、不易诱导耐药性产生等优点，AMPs 近年来被广泛研究。已有 959 种抗真菌 AMPs 的抗菌作用被证实，具有广阔的应用前景。

CGA_{47-66}（chromofungin，CHR）是嗜铬粒蛋白 A（chromograinin protein A，CGA）水解形成的生物活性片段，具有免疫调节作用。其一级结构在鼠、牛、人等多种系中完全保守。氨基酸序列为 RILSILRHQ-NLLKELQDLAL，等电点为 8.75，分子量较小，为 2 386.87 D[10]。Metz-Boutigue 等[11]的研究已经证明 CHR 具有抗真菌作用，是 CGA 水解产物中具有抗真菌效应的最短肽段。但目前尚无研究结果证实 CHR 在抑制真菌生物被膜形成方面的作用。本研究旨在进一步明确 CHR 的抗真菌生物被膜形成作用及探讨其可能的作用机制，为其抗真菌作用的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌种和实验材料

白假丝酵母菌标准菌株 ATCC10231（购于重庆博培生物技术有限公司），临床菌株 4 株（编号分别为 1、2、17、18，来源于重庆医科大学感染疾病重点实验室）；二甲基亚砜（dimethyl-sulfoxide，DMSO）、甲萘醌、碘化丙啶（propidiam lodide，PI）、RPMI1640 培养基均购于 Sigma 公司（阿宾顿，英国）；3,3'-[1-(苯氨酰基)-3,4-四氮唑]-二(4-甲氧基-6-硝基)苯磺酸钠（XTT）购于北京索莱宝生物科技有限公司（北京，中国）；YPD（yeast extract peptone dextrose medium）液体培养基组成：酵母膏 10 g、葡萄糖 20 g，蛋白胨 20 g，蒸馏水 1 L；沙氏琼脂培养基（Sabourand's agar medium，SDA）组成：葡萄糖 40 g、酪蛋白胰酶消化物、动物组织的胃酶消化物等量混合 10 g、琼脂 15 g 加入纯化水 1 000 mL，高温灭菌后倒平板。FLC、CAS、AMB 受赠于重庆医科大学附属第一医院感染科。CHR 由上海科肽生物科技有限公司合成（上海，中国），*HWP1* 引物由上海生工合成（上海，中国），提取白假丝酵母菌的 RNA 试剂盒购于 OMEGA 公司（美国），逆转录和 qRT-PCR 试剂盒购于上海创英生物科技有限公司（上海，中国）。

1.2 实验方法

菌种和培养条件：将白假丝酵母菌接种于 SDA，37.0 ℃培养 24~48 h，肉眼观察白色菌落形成后，挑选单个白色菌落接种于含有 2 mL YPD 培养基的试管，放置于摇床中 37.0 ℃、100 r/min 培养 24 h 以保证菌株的纯度与活力。离心（1 000 r/min，10 min）后去除 YPD 培养基，加入 2 mL PBS 溶液清洗残留的 YPD 培养基，重复 2 次后加入 RPMI1640 培养基，使用血细胞计数板计数后放置于 4 ℃备用。

1.2.1 测定 CHR 对游离白假丝酵母菌的最低抑菌浓度（minimum inhibitory concentration，MIC）值 游离状态下 CHR 对白假丝酵母菌的 MIC 值测定依照美国临床实验室标准化协会颁布的第三版 M27-A3 参考方法，YPD 培养基稀释最终的药物作用浓度为：CHR 浓度 2.5~160 μmol/L，FLC、AMB、CAS 浓度均为 0.031 25~16 μg/mL。使用 YPD 培养基稀释菌液浓度至 1×10^3~5×10^3/mL，菌液浓度计算采用血细胞计数板方法。方法概括如下：96 孔板中每孔加入 100 μL 菌液，两倍稀释法依次加入 100 μL 药物至各孔，100 μL YPD 培养基加入 100 μL 菌液作为阳性对照孔（菌液终浓度为 0.5×10^3~2.5×10^3 个/mL），200 μL YPD 培养基作为阴性对照孔。恒温箱中 37 ℃培养 24 h 后观察结果。

1.2.2 测定 CHR 抑制白假丝酵母菌生物被膜形成作用 使用 XTT 比色法[13]和菌落计数法(CFU)判断各种药物抑制白假丝酵母菌生物被膜形成的作用，用 RPMI1640 培养基稀释药物作用浓度，CHR 浓度为 20~320 μmol/L，FLC、AMB、CAS 浓度均为 0.031 25~16 μg/mL，方法简述如下：血细胞计数板在 RPMI1640 培养基中调节菌液浓度至 10^6 个/mL，96 孔板各孔加入 100 μL 白假丝酵母菌悬液，并采用两倍稀释法依次加入 100 μL 药物至各孔，阳性对照孔中加入 100 μL RPMI1640 培养基和 100 μL 菌液，保鲜膜包裹形成微氧环境后放置于恒温箱中 37 ℃培养 24 h 以形成生物被膜，使用移液枪小心吸去未粘附于 96 孔板底的真菌，并使用 PBS 清洗 2 次以除去与孔底粘附不紧密的真菌后采用以下方法判断抑制生物被膜形成作用。XTT 比色法：每孔加入 100 μL XTT (0.5 μg/mL)及甲萘醌混合物(1 μmol)后避光于恒 37 ℃温箱中作用 2 h 后使用多功能酶标仪测定 490 nm 处的吸光度(absorbance，A)值并计算各实验孔的代谢活性。代谢活性(%)=实验孔 $A_{490\,nm}$/阳性对照孔 $A_{490\,nm}$ × 100%，当代谢活性小于 50%时认为抑制生物被膜形成有效。此时对应的药物浓度即为抑制 50%白假丝酵母菌生物被膜形成的最低抑菌浓度(50% biofilm inhibitory concentration，BIC_{50})[14]。每次设置 3 个实验孔并在非同一天重复 3 次。菌落计数法：将 96 孔板底部形成的生物被膜充分刮除后种于 SDA 平板上，置于 37 ℃恒温箱中，生长 24~48 h 计数。

1.2.3 CHR 抗白假丝酵母菌粘附作用[15] 白假丝酵母菌菌液浓度调节方法同 1.2.2，设置药物浓度分别为 320、160、80 μmol/L。96 孔板中加入 100 μL 浓度为 10^6 个/mL 的菌液和 100 μL 药物，放入 37 ℃恒温箱中作用 4 h 后 PBS 清洗 2 次以除去与孔底粘附不紧密的真菌，使用菌落计数法和倒置显微镜下观察真菌粘附作用。

1.2.4 qRT-PCR 方法分析 *Hwp1* 的表达 采用荧光定量核酸扩增检测系统(real-time quantitative PCR detecting system，qRT-PCR)分析粘附基因 *Hwp1* 的表达。白假丝酵母菌为标准菌株 ATCC10231，96 孔板中加入 100 μL 浓度为 10^6 个/mL 的菌液和 100 μL 的药物或 RPMI1640 培养基，CHR 处理组浓度设置为 160 μmol/L，加入 RPMI1640 设置为对照组，按前述抑制生物被膜形成实验方法处理后收集各组菌液。离心收集白假丝酵母菌细胞用于 RNA 提取(步骤按前述 RNA 提取试剂盒说明进行)，逆转录(步骤见 qRT-PCR 试剂盒)后使用 Bio-Rad Laboratories 公司生产的 SmartSpec™Plus 检测 ssDNA 浓度，加入引物及荧光剂后予以该公司生产的 CFX96 Touch 仪器检测各组 C_t 值，通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值计算基因相对表达量。每次设置3 个重复孔，一共 3 次。内参基因为 *ACT1*，引物碱基序列及内参基因如下：*Hwp1*-F：GCTCAACTTATTGCTATCGCTTA-TTACA；*Hwp1*-R：GACCGTCTACCTGTGGGACAGT。*ACT1*-F：GCTGGTAGAGACTTGACCAACCA；*ACT1*-R：GACAATTTCTC TTTCAGCACTAGTAGTGA。

1.3 统计方法

采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析，所有计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各药物的 MIC 值判读终点为肉眼与阳性对照孔比较为清澈培养基的最小药物浓度，每次设置 3 个实验孔并在非同一天重复 3 次；XTT 法白假丝酵母菌代谢活性小于 50%时 CHR 浓度即为 BIC_{50}，每次设置 3 个实验孔并在非同一天重复 3 次。CHR 抑制白假丝酵母菌生物被膜形成作用结果及菌落计数法检测 CHR 抗白假丝酵母菌粘附作用结果多组间均数比较使用单因素方差分析，其两两比较使用 LSD-t 法；qRT-PCR 检测 CHR 下调白假丝酵母菌 *Hwp1* 基因表达实验中对照组和 CHR 处理组结果采用 t 检验进行组间比较。检验水准 α=0.05。结果采用 graphpad prism5 作图。

2 结 果

2.1 CHR 具有抑制白假丝酵母菌生物被膜形成作用

2.1.1 CHR 对浮游状态白假丝酵母菌的 MIC 值 CHR 具有抗浮游状态白假丝酵母菌活性。本实验发现，CHR 对临床菌株浮游状态白假丝酵母菌的 MIC 值为 10~20 μmol/L，对标准菌株的 MIC 值为 10 μmol/L，临床菌株与标准菌株的 MIC 值相当。

2.1.2 CHR 抑制白假丝酵母菌的 BIC_{50} 值 本研究发现，CHR 除了对浮游状态白假丝酵母菌具有抗菌活性外，在体外实验中同时具有抑制生物被膜形成的作用(表 1)，经 XTT 法证实，CHR 对临床白假丝酵母菌株的 BIC_{50} 为 80~160 μmol/L，标准菌株为 80 μmol/L。

2.1.3 CHR 抑制白假丝酵母菌生物被膜形成的浓度依赖性 为了检测 CHR 抑制生物被膜形成作用是否存在浓度依赖

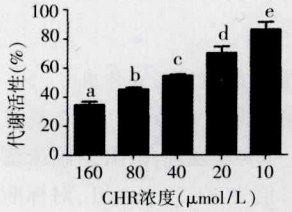
表 1 CHR 及抗菌药物对白假丝酵母菌抗菌活性

Tab.1 Anti-*C.albicans* activity of CHR and antimicrobial agents

菌株	FLC(μg/mL)		AMB(μg/mL)		CAS(μg/mL)		CHR(μmol/L)	
	MIC	BIC_{50}	MIC	BIC_{50}	MIC	BIC_{50}	MIC	BIC_{50}
1	0.25	4	0.031 25	0.5	0.031 25	0.25	10	160
2	0.25	4	0.031 25	0.5	0.031 25	0.25	20	160
17	0.50	2	0.031 25	0.5	0.031 25	0.25	20	160
18	0.50	2	0.031 25	0.5	0.031 25	0.25	20	80
ATCC10231	0.25	2	0.031 25	0.5	0.031 25	0.25	10	80

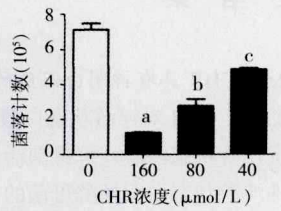
注：MIC 表示根据 M27-A3 参考方法测得的各药物对浮游状态下白假丝酵母菌的最低抑菌浓度；BIC_{50} 表示根据 XTT 法测得的抑制 50%生物被膜形成时的最低抑菌浓度

性，设置不同的药物浓度后，根据 XTT 法检测结果：CHR 在 160 μmol/L 浓度时白假丝酵母菌生物被膜代谢活性为（34.34 ± 4.92）%，CHR 浓度为 80、40、20、10 μmol/L 时的代谢活性分别为（42.77 ± 4.62）%、（53.47 ± 5.26）%、（68.39 ± 7.92）%、（80.85 ± 14.61）%；统计分析发现，不同浓度 CHR 对白假丝酵母菌生物被膜代谢活性抑制能力具有统计学差异（F=45.743，P=0.000），两两分析结果：160 μmol/L CHR 处理组代谢活性抑制能力高于 80 μmol/L 组（P=0.039），80 μmol/L CHR 处理组代谢活性抑制能力高于 40 μmol/L 组（P=0.010），40 μmol/L CHR 处理组代谢活性抑制能力高于 20、10 μmol/L 组（P=0.001，P=000），如图 1A 所示。菌落计数法中，不含 CHR 的阳性对照组菌落数为（702 498.00 ± 39 189.96）CFU，160、80、40 μmol/L 浓度 CHR 组分别为（119 008.00 ± 11 673.88）CFU、（276 607.00 ± 39 517.54）CFU、（490 424.00 ± 46 355.00）CFU；统计分析发现，不同浓度 CHR 处理组抑制白假丝酵母菌生物被膜形成作用具有统计学差异（F=615.760，P=0.000），两两分析结果：160 μmol/L CHR 处理组菌落数低于 80 μmol/L 处理组（P=0.000），80 μmol/L 处理组菌落数低于 40 μmol/L 处理组（P=0.000），如图 1B 所示。经 XTT 法和菌落计数证实 CHR 抑制白假丝酵母菌生物被膜形成的作用具有明显浓度依赖性。



a、b、c、d、e 表示两两比较均具有统计学差异，P 值均小于 0.05

A. XTT 法检测生物被膜形成情况



a、b、c 表示与对照组比较有统计学差异，且两两比较有统计学差异，P 值均小于 0.05

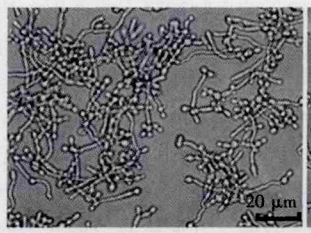
B. 菌落计数判断生物被膜形成

图 1　CHR 抑制白假丝酵母菌生物被膜形成的作用

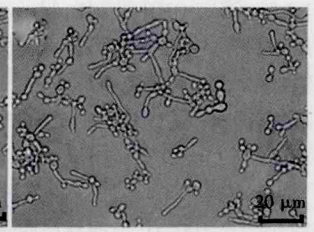
Fig.1　Inhibitory role of CHR on *C.albicans* biofilm formation

2.2　CHR 抑制白假丝酵母菌生物被膜形成作用机制

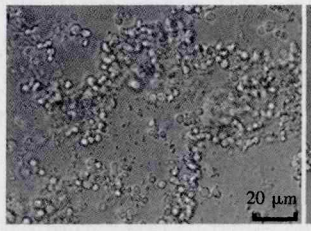
2.2.1　倒置显微镜下观察 CHR 的抗白假丝酵母菌粘附作用　菌落计数法及 XTT 法均证实了 CHR 具有较强的抑制生物被膜形成的作用。为了进一步了解其作用机制，在倒置显微镜下观察 CHR 对白假丝酵母菌粘附作用的影响。结果发现：对照组（菌液+培养基）中大量白假丝酵母菌孢子粘附于 96 孔板中，菌丝呈密集网状生长（图 2A）；加入 40 μmol/L 的 CHR 100 μL，孢子数量明显减少，菌丝未形成网状结构（图 2B）；加入 80 μmol/L 的 CHR 100 μL 时孢子数量进一步减少，且未见明显菌丝生长（图 2C）；160 μmol/L 的 CHR 处理时仅见少量孢子粘附于 96 孔板（图 2D）。表明 CHR 能有效抑制白假丝酵母菌粘附于 96 孔板，并且该作用存在浓度依赖性。



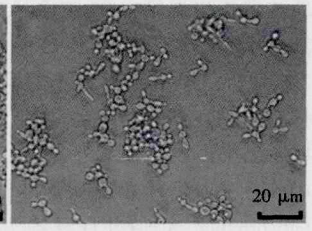
A. 菌液 100 μL+1640 培养基 100 μL，白假丝酵母菌菌丝大量存在，呈密集网状生长



B. 菌液 100 μL+40 μmol/L CHR 100 μL，菌丝和孢子生长减少，未形成大片网状结构



C. 菌液 100 μL+80 μmol/L CHR 100 μL，未见明显菌丝生长

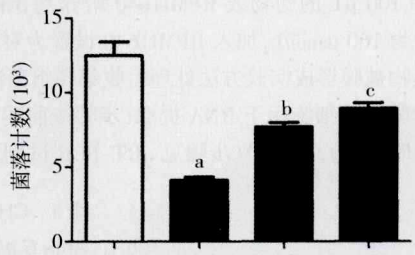


D. 菌液 100 μL+160 μmol/L CHR 100 μL，未见明显菌丝生长，孢子数量明显减少

图 2　CHR 抗白假丝酵母菌粘附作用

Fig.2　Inhibitory effect of CHR on *C.albicans* adhesion

2.2.2　菌落计数法检测 CHR 抗白假丝酵母菌粘附作用　为了明确 CHR 具有抗白假丝酵母菌粘附作用，本研究采用菌落计数法计数不同浓度 CHR 处理时粘附于 96 孔板中的真菌数，发现对照组（菌液+培养基）中的白假丝酵母菌生长 4 h 时粘附于 96 孔板上的真菌数为（12 497.000 ± 2 732.936）CFU，160、80、40 μmol/L CHR 处理后的真菌数分别为（4 105.600 ± 657.486）CFU、（7 671.700 ± 839.532）CFU、（8 895.900 ± 1 118.511）CFU，统计分析发现，各组抗粘附作用有统计学差异（F=43.778，P=0.000），两两比较结果：对照组粘附菌落数高于 160、80、40 μmol/L 的 CHR 处理组（P=0.000、P=0.000、P=0.000），160 μmol/L CHR 处理组抗粘附能力强于 80、40 μmol/L 组（P=0.000、P=0.000）。



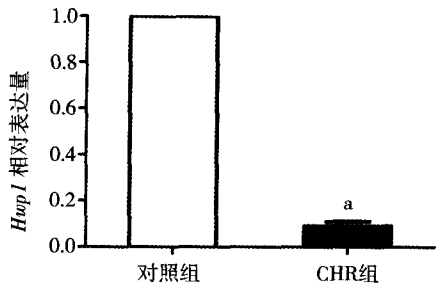
a、b、c：与对照组相比，P < 0.05，且两两比较，也有统计学差异，P < 0.05

图 3　菌落计数法检测 CHR 抗白假丝酵母菌粘附作用

Fig.3　Inhibitory effect of CHR on *C.albicans* adhesion detected by colony counting

2.2.3　qRT-PCR 检测 CHR 下调白假丝酵母菌 *Hwp1* 基因的表达　研究发现 CHR 具有抗白假丝酵母菌粘附作用，抑制

生物被膜的形成，为进一步探索其分子机制，通过 qRT-PCR 方法检测黏附基因 *Hwp1* 的表达情况，结果显示 CHR 下调 *C.albicans* 粘附基因 *Hwp1* 表达，经计算 CHR 处理组的相对表达值为(0.089 5 ± 0.036 0)，对照组中 *Hwp1* 的表达是 CHR 处理组的 11.17 倍；CHR 处理组与对照组相比，差异具有统计学意义(t=44.008，P=0.001)。结果提示 CHR 能通过下调粘附基因 *Hwp1* 的表达发挥抗真菌粘附作用，抑制 *C.albicans* 生物被膜的形成。



a：CHR 处理组与对照组相比，P<0.05

图 4　CHR 下调 *C.albicans* 黏附基因 *Hwp1* 表达的作用

Fig.4　Down-regulatory role of CHR on expression of adhesion gene *Hwp1* of *C.albicans*

3　讨　论

生物被膜的形成被认为是真菌产生耐药的重要原因[16]。生物被膜是由病原体粘附于生物体腔内或植入材料表面后由自身分泌的细胞外基质(葡聚糖、蛋白质、eDNA 等)包裹形成的三维立体结构，在形态结构、生理生化特性、致病性等多方面均与游离状态的真菌细胞存在较大差异，可抵御机体的免疫应答，临床表现为耐药性的增加[17]，可引起感染迁延和治疗失败，增加患者的死亡率[18]。AMPs 作为机体天然免疫系统的重要组成部分，是预防微生物感染的第一道防线，可在与病原体接触的组织器官中分泌，如皮肤黏膜、气道、泌尿道上皮细胞等，且局部可达较高浓度[9]。其代谢物是游离氨基酸，无毒副作用，不易诱导病原体产生耐药性，近年来成为可能的新型抗真菌物质而被广泛研究。

作为具有抗真菌作用的一种 AMPs，CHR 是CGA 氨基端的重要功能基团，其结构高度保守，分子量小，化学性质稳定。Metz-Boutigue 等[11]的研究结果提示 CHR 对白假丝酵母菌的 MIC 值为 2~15 μmol/L，而本研究发现 CHR 对浮游状态白假丝酵母菌的 MIC 值为 10~20 μmol/L，略高于 Metz-Boutigue 等的研究结果，这可能与本研究选取的临床菌株均为有形成生物被膜能力的白假丝酵母菌有关，这些菌株对抗菌药物的耐受力等可能高于白假丝酵母菌的平均水平。

本研究首次发现 CHR 具有抑制白假丝酵母菌生物被膜形成的作用，其 BIC_{50} 为 80~160 μmol/L，且具有浓度依赖性。与文献报道其他具有该特性的抗菌多肽相比，Tyrocidines 家族的 BIC_{50} 为 12.5~25 μmol/L；14-β-螺旋多肽家族的 BIC_{50} 为 4~512 μg/mL，不同抗菌多肽的 BIC_{50} 差异较大[19-20]，这种差异可能来自抗菌多肽本身的氨基酸序列、两亲活性及等电点的不同[21]。

生物被膜形成的过程分为 3 个阶段：①粘附(0~4 h)为真菌细胞粘附于生物体腔或者非生物体材料表面；②中期(4~12 h)为细胞逐渐分泌多聚糖(细胞外基质主要组成成分)，并在菌落表面的覆盖增多，内有菌丝样细胞生长；③成熟(12~24 h)为细胞外基质包裹菌丝及真菌孢子形成成熟生物被膜[22]。因此，真菌细胞的粘附是生物被膜形成的关键步骤。

本研究通过菌落计数证实了 CHR 能有效减少白假丝酵母菌粘附，倒置显微镜结果显示 CHR 处理组孢子数量和菌丝附着均减少，以菌丝附着减少较为明显。有研究发现，菌丝相毒力强，具有较强的粘附力与侵袭力，易附着于生物体及非生物体表面，导致生物被膜的形成[23]。本研究结果提示 CHR 抑制生物被膜形成的作用机制与减少白假丝酵母菌的粘附有关。该过程由多种粘附因子介导，其中最重要的粘附因子是菌丝壁蛋白 1(HWP1)。HWP1 是由 *Hwp1* 编码的一个具有显著抗原和菌丝特异性的菌丝壁蛋白，是一种重要的发育调节粘附素，介导白假丝酵母菌粘附、嵌入生物体或非生物体的表面，从而形成生物被膜[24]。Nobile 等研究发现，缺乏 HWP1 的生物被膜更倾向于从非生物基质表面分离[24]。本研究结果首次表明 CHR 能下调白假丝酵母菌粘附基因 Hwp1 的表达。

但是本研究仍存在一定的局限性，例如只检测了 CHR 对白假丝酵母菌的抗菌作用，而对于非白假丝酵母菌以及其他真菌生物被膜形成的作用还未进行研究。CHR 的抗真菌生物被膜机制仍然需在进一步研究中深入探讨。

综上所述，本研究结果表明 CHR 通过减少白假丝酵母菌的粘附来抑制生物被膜的形成，首次阐

明了 CHR 抑制白假丝酵母菌生物被膜形成的作用，并发现了 CHR 减少真菌细胞粘附作用的可能机制。这一结果再次阐明了 CGA 作为重要应激激素在机体抗感染天然免疫中发挥着重要作用。同时也在一定程度上为 CGA 衍生抗菌多肽 CHR 的应用提供了新的理论基础。例如，基于抗真菌粘附特性的抑制生物被膜形成的植入材料，为“后抗生素时代”[25]中抗感染治疗策略的改进提供新的思路。

参 考 文 献

[1] Pfaller MA,Diekema DJ,Procop GW,et al. Multicenter comparison of the VITEK 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B,flucytosine,and voriconazole against Candida spp[J]. J Clin Microbiol,2007,45(11):3522-3528.

[2] Lai CC,Tan CK,Huang YT,et al. Current challenges in the management of invasive fungal infections[J]. J Infect Chemother,2008,14(2):77-85.

[3] Pfaller M,Neofytos D,Diekema D,et al.Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients:data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry,2004-2008[J]. Diagn Microbiol Infect Dis,2012,74(4):323-331.

[4] Eric J Bow,Gerald E,Jeff F,et al. Canadian clinical practice guidelines for invasive candidiasis in adults[J]. Can J Infect Dis Med Microbiol,2010,21(4):e122-e150.

[5] Viudes A,Pemán J,Cantón E,et al.Candidemia at a tertiary-care hospital:epidemiology,treatment,clinical outcome and risk factors for death[J].Eur J Clin Microbiol Infect Dis,2002,21(11):767-774.

[6] Hu B,Du Z,Kang Y,et al. Catheter-related Candida bloodstream infection in intensive care unit patients:a subgroup analysis of the China-SCAN study[J]. BMC infectious diseases,2014,14(1):594.

[7] García-Sánchez S,Aubert S,Iraqui I,et al. Candida albicans biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns[J]. Eukaryotic cell,2004,3(2):536-545.

[8] Bahar A,Ren D. Antimicrobial peptides[J]. Pharmaceuticals,2013,6(12):1543-1575.

[9] Schauber J,Gallo RL. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology,2008,122(2):261-266.

[10] Zhang D,Shooshtarizadeh P,Laventie BJ,et al. Two chromogranin a-derived peptides induce calcium entry in human neutrophils by calmodulin-regulated calcium independent phospholipase A2[J]. PLoS One,2009,4(2):e4501.

[11] Metz-Boutigue MH,Lugardon K,Goumon Y,et al. Antibacterial and antifungal peptides derived from chromogranins and proenkephalin-A. From structural to biological aspects[J]. Adv Exp Med Biol,2000,482:299-315.

[12] Rex JH. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts,approved standard CLSI document M27-A3[J]. Clinical and Laboratory Standards Institute,Wayne,PA,USA,2008.

[13] Cocuaud C,Rodier MH,Daniault G,et al. Anti-metabolic activity of caspofungin against Candida albicans and Candida parapsilosis biofilms[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy,2005,56(3):507-512.

[14] Chavez-Dozal A,Jahng M,Rane HS,et al. In vitro analysis of flufenamic acid activity against Candida albicans biofilms[J]. International Journal of Antimicrobial Agents,2014,43(1):86-91.

[15] Ramage G,Walle KV,Wickes BL,et al. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of Candida albicans biofilms[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy,2001,45(9):2475-2479.

[16] Obłak E,Piecuch A,Dworniczek E,et al. The influence of bio-degradable gemini surfactants,N,N'-bis(1-decyloxy-1-oxopronan-2-yl)-N,N,N',N'-Tetramethylpropane-1,3-diammonium dibromide and N,N'-bis(1-dodecyloxy-1-oxopronan-2-yl)-N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diammonium dibromide,on fungal biofilm and adhesion[J]. Journal of Oleo Science,2015,64(5):527-537.

[17] Chandra J,Mukherjee PK,Leidich SD,et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro[J]. J Dent Res,2001,80(3):903-908.

[18] Balcázar JL,Subirats J,Borrego CM. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance[J]. doi:10.3389/fmicb.2015.01216.

[19] Troskie AM,Rautenbach M,Delattin N,et al. Synergistic activity of the tyrocidines,antimicrobial cyclodecapeptides from Bacillus aneurinolyticus,with amphotericin B and caspofungin against Candida albicans biofilms[J]. Antimicrobial agents and chemotherapy,2014,58(7):3697-3707.

[20] Raman N,Lee MR,Lynn DM,et al. Antifungal activity of 14-helical β-peptides against planktonic cells and biofilms of Candida species[J]. Pharmaceuticals,2015,8(3):483-503.

[21] Powers JP,Hancock RE. The relationship between peptide structure and antibacterial activity[J]. Peptides,2003,24(11):1681-1691.

[22] Chandra J,Kuhn DM,Mukherjee PK,et al. Biofilm formation by the fungal pathogen Candida albicans:development,architecture,and drug resistance[J]. J Bacteriol,2001,183(18):5385-5394.

[23] Nobile CJ,Nett JE,Andes DR,et al. Function of Candida albicans adhesin Hwp1 in biofilm formation[J]. Eukaryotic Cell,2006,5(10):1604-1610.

[24] Sun L,Liao K,Wang D. Effects of magnolol and honokiol on adhesion,yeast-hyphal transition,and formation of biofilm by Candida albicans[J]. PLoS One,2015,10(2):1-20.

[25] Di Luca M,Maccari G,Nifosì R. Treatment of microbial biofilms in the post-antibiotic era:prophylactic and therapeutic use of antimicrobial peptides and their design by bioinformatics tools[J]. Pathogens and Disease,2014,70(3):257-270.

（责任编辑：方济）