

· 综 述 ·

中草药抗念珠菌生物膜形成机制研究进展

诸 斌 李 贞 陈伟琴 殷红梅 胡晓波

近年来, 由于生物医疗设备(血管内导管、心脏瓣膜、机械通气和留置尿管等)使用频率增加, 念珠菌对常见抗真菌药物氟康唑耐药率逐年递增。在中国, 热带念珠菌对氟康唑的耐药率从低于 6% 上升至 20% 以上, 光滑念珠菌对氟康唑的耐药率从 12.2% 上升至 24.0%^[1]。造成念珠菌对抗真菌药物耐药性的主要原因之一是念珠菌生物膜的形成。一项长达 5 年的回顾性研究发现, 产生中、高代谢活性生物膜的念珠菌引起感染的死亡率达 61%, 而低代谢活性生物膜的念珠菌引起感染的死亡率为 33%^[2]。抑制念珠菌生物膜形成是当今国内外研究关注热点之一。目前, 临床常采用抗生物膜药物如两性霉素 B 等治疗念珠菌感染, 但由于其耐药率和不良反应(肝、肾损伤)比例增加^[3], 给临床治疗念珠菌感染带来了挑战。中草药在抗念珠菌生物膜中具有独特的优势, 不仅可抑制念珠菌黏附、形态转化和增殖, 而且还具有天然性、不良反应少和不易产生耐药性的优点, 为治疗生物膜相关念珠菌感染提供新的思路。

1 念珠菌生物膜特点及耐药机制

1.1 念珠菌生物膜特点 念珠菌生物膜是由基层的酵母细胞和其上层具有侵袭性的菌丝共同组成。这些细胞被细胞外基质所包围, 形成一种具有动态性且高度结构化的三维致密网状系统^[4]。生物膜的三维网状结构可以方便其对外界营养物质的摄取和代谢废物的处理, 有助于维持生物膜结构的稳定和活性^[5]; 念珠菌生物膜的细胞外基质犹如一层屏障, 保护念珠菌免受环境与药物因素的破坏, 使其耐药性和黏附性增加^[6], 从而造成念珠菌感染迁延难愈; 同时在形成生物膜的过程中, 圆形的酵母状细胞会向周围环境扩散, 分散的细胞可以参与形成新的生物膜, 加速其感

染传播^[7], 造成机体全身性感染的严重后果, 成为临床诊治的一大难题。

1.2 念珠菌生物膜的耐药机制 与浮游状态的念珠菌相比, 具有生物膜的念珠菌耐药性要高其 1 000 倍以上^[8]。在生物膜发育过程中, 念珠菌对常规抗真菌药物耐药性在早期黏附阶段就发生了变化, 成熟期时达到了峰值, 研究念珠菌生物膜的耐药机制具有重要意义。

1.2.1 细胞外基质限制药物渗透 生物膜中的细胞外基质可以阻挡抗真菌药物作用于念珠菌, 犹如一道坚固的物理屏障。即使抗真菌药物可以穿透生物膜的厚度, 它最终也会被困在细胞外基质的水道中, 而永远无法作用于目标细胞^[9]。细胞外基质主要成分是碳水化合物和胞外 DNA。研究发现, 细胞外基质中碳水化合物主要成分 β -1,3 葡聚糖含量与常规抗真菌药物(氟康唑、两性霉素 B)耐药性之间存在一定的关系, β -1,3 葡聚糖通过与药物结合或阻隔的方式来抑制抗真菌药物对酵母细胞的渗透^[10]。此外, 构成细胞外基质的胞外 DNA 也与生物膜耐药性有关。Rajendran J 等^[11]发现当用 DNA 酶消除念珠菌生物膜胞外 DNA 时, 两性霉素 B 的抗真菌敏感性显著增强, 比原先增长了 2~8 倍, 但胞外 DNA 在生物膜所发挥具体耐药机制仍尚不清楚。

1.2.2 药物外排泵基因表达上调 念珠菌生物膜药物外排泵基因表达上调与抗真菌药物耐药性有关, 因为外排泵基因表达上调限制了抗真菌药物在酵母细胞积累, 从而影响了抗真菌药物的疗效^[12]。念珠菌生物膜有 3 种不同类型的外排泵: ATP 结合转运蛋白耐药基因 1 (candida drug resistance1, CDR1)、CDR2 和易化扩散载体耐药基因 (multidrug resistant transporter1, MDR1)。Shi C 等^[13]研究发现, 药物外排泵基因表达上调是白色念珠菌生物被膜早期(6~8 h)产生唑类耐药性的主要原因, 在非白念珠菌中也发现了类似的药物外排基因上调现象, 如热带念珠菌^[14]。此外, 念珠菌处于浮游状态时, 多个药物外排泵基因在抗真菌药物存在的情况下表达均开始上调。在念珠菌生物膜形成过程中, 逐渐致使外

基金项目: 上海市科学技术委员会科研计划项目 (No. 17DZ1930305); 上海中医药大学附属龙华医院国家中医临床研究基地龙医学者 (No. 育苗计划 LYTD-66)

作者单位: 上海中医药大学附属龙华医院检验科 (上海 200030)

通信作者: 胡晓波, Tel: 021-64385700, E-mail: huxiaobo@

vip.sina.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20210219.015

排泵基因结构突变,如编码 CDR1、CDR2 或 MDR1 基因启动子突变,使其抗真菌耐药性明显增加^[15]。

1.2.3 持留细胞的存在 持留细胞是酵母细胞的表型变异亚群,在念珠菌生物膜十分常见。它们通常位于生物膜的底层和中间层,是低代谢活性的未分裂细胞,具有高度耐药性^[16]。持留细胞的耐药性不依赖于细胞壁的构成和药物外排泵基因表达上调,与其所处的休眠代谢状态有关^[17]。在休眠代谢状态中,通过降低代谢的方式,以此来对抗饥饿、抗真菌药物以及宿主免疫系统的氧化应激的环境因素。当抗真菌药物浓度降低时,生物膜的持留细胞可以恢复成代谢活跃的状态,并有助于生物膜的重建,使其再次感染机体,导致感染持久化^[18]。

2 中草药抗生物膜形成研究进展

2.1 中草药抗生物膜形成研究现状 近年来,中药在念珠菌感染治疗方面积累了丰富的经验,在抑制毒力因子表达、抗生物膜形成、促进氧化应激以及抑制水解酶产生发挥独特的优势^[19]。其中,中药单体如大蒜素、穿心莲内酯和姜黄素^[20-22],中药复方如龙胆泻肝汤^[23]、黄连解毒汤^[24],中药提取物如白芍乙醇提取物^[25]、白头翁汤正丁醇提取物^[26]在抗生物膜形成都具有明显的效果。另外,有研究报道,中药单体成分与常规抗真菌药如氟康唑、两性霉素 B 联合应用,可以显著增强其对耐药和非耐药念珠菌生物膜的抑制作用,并维持较长的作用时间,防止念珠菌生物膜进一步发展^[27,28]。

2.2 中草药抗生物膜形成机制研究进展

2.2.1 中草药影响念珠菌黏附 念珠菌的酵母细胞不仅可以黏附在固体的表面,形成一层基底膜,还可以互相黏附,逐渐构成成熟稳定的生物膜,念珠菌的黏附过程是其形成生物膜并且发挥致病作用的第一步。

相关研究显示,中药大蒜素、黄根醇和白鲜皮提取物通过降低凝集素基因 2 (agglutinin-like sequence 2, ALS2) 和 ALS3、黏附因子基因和菌丝胞壁蛋白基因 (hyphal wall protein 1, HWP1) 表达,抑制 Ras/cAMP 通路,影响白色念珠菌早期黏附作用^[20, 29, 30]。Lee HS 等^[25]研究发现 49 $\mu\text{g/mL}$ 白芍乙醇不仅可以降低白色念珠菌一系列与黏附过程密切相关的 ALS3、HWP1 mRNA 表达,而且还能有效抑制白色念珠菌在聚丙烯材料黏附。众所周知,聚丙烯是医用导管、输液容器的主要材料。此外,中药单体对氟康唑耐药白色念珠菌黏附也有明显的抑制作用。有文献报道,1 000、500、250 $\mu\text{g/mL}$ 穿心莲内酯

提取物通过干预 ALS3 与聚苯乙烯黏附增强基因 1 (enhanced adherence to polystyrene, EAP1) 的基因转录或表达,显著抑制氟康唑耐药白色念珠菌的黏附,且对其 2 h 早期黏附干预作用较明显^[21]。中药单体和提取物不仅能影响白色念珠菌黏附,而且在非白色念珠菌黏附过程中也表现出明显的干预作用。有研究报道,100 mg/L 黄芩苷对近平滑念珠菌、季也蒙念珠菌、克柔念珠菌早期黏附有明显的干预效果^[31]。白头翁汤正丁醇提取物可以降低热带念珠菌表面的疏水性,影响其黏附能力,且与药物浓度呈正相关,显著抑制生物膜早期形成^[32]。

2.2 中草药抑制念珠菌形态转化 念珠菌在经过黏附过程之后,其分裂的酵母细胞会逐渐转换成菌丝和假菌丝形态,并在生物膜中继续繁殖和生长。菌丝细胞不仅有助于维持生物膜结构的整体稳定性,而且会加快促进念珠菌感染的传播^[33]。由此可见,念珠菌从酵母相转换成菌丝相是其具有致病性的关键,并且也是形成生物膜结构的重要组成部分。

易玉玲等^[34]研究通过 qRT-PCR 方法检测不同浓度盐酸小檗碱对菌丝形成及白色念珠菌菌丝形成特异性转录因子 (enhanced filamentous growth 1, EFG1) 和 (endothelin converting enzymes 1, ECE1) 表达水平变化,发现 128 $\mu\text{g/mL}$ 和 32 $\mu\text{g/mL}$ 盐酸小檗碱均能下调 EFG1 和 ECE1 mRNA 表达水平,以此抑制白色念珠菌从酵母相向菌丝相转换。俞丽华等^[23]对中药复方龙胆泻肝汤各提取部位活性进行抗生物膜及菌丝形成检测,发现一定浓度的乙酸乙酯和甲醇提取物能下调白色念珠菌菌丝形成基因 (sad1 unc-84 domain protein 41, SUN41) mRNA 表达水平,进而抑制其酵母相向菌丝相的转化。以上研究说明,中药单体及复方都能通过降低白色念珠菌丝形成关键基因表达水平进而影响其菌态转化。对于抑制非白色念珠菌酵母-菌丝相的菌态转化,中药依然发挥着巨大的优势。张梦翔等^[22]发现一定浓度的姜黄素能显著抑制热带念珠菌、光滑念珠菌、克柔念珠菌、近平滑念珠菌以及季也蒙念珠菌丝形成及发育,并且通过光学显微镜观察到 5 种非白色念珠菌在固体培养基上菌落周围菌丝无生成情况。另有研究发现,桉木醇对氟康唑耐药念珠菌生物膜有明显抑制作用。通过干扰菌丝形成信号通路中 cAMP-PKA 中腺苷酸环化酶基因 (adenylyl cyclase 1, CYR1) 的表达水平,进而影响其念珠菌的菌态转化,尤其是对氟康唑耐药白色念珠菌、氟康唑耐药光滑念珠菌以及氟康唑耐药热带念珠菌有明显干预作用^[35]。

2.3 中草药诱导生物膜细胞凋亡 近年来研究发现,在白色念珠菌生物膜细胞中发现了许多哺乳动物凋亡机制的同源元件^[36],即在一定药物和外界刺激下,会发现细胞凋亡现象。细胞凋亡是由其基因所确定导致其细胞自动结束生命的程序化过程,通过诱导念珠菌生物膜细胞凋亡,可以有效抑制成熟生物膜形成。

施高翔等^[26]研究发现 $\geq 128 \mu\text{g/mL}$ 白头翁汤正丁醇提取物可以使白色念珠菌生物膜凋亡率显著增加,并且使其细胞核出现固缩和碎裂,诱导其生物膜凋亡。另有研究将一定浓度的苦参-蛇床子药对提取物作用于白色念珠菌生物膜细胞,利用扫描电镜、荧光显微镜和流式细胞术技术发现 $>256 \mu\text{g/mL}$ 苦参-蛇床子药对提取物可以升高半胱天冬酶(caspase)活性,提高细胞内活性氧水平,降低线粒体膜电位,损伤细胞核,诱导其生物膜细胞凋亡^[37]。中药不仅可以诱导敏感白色念珠菌生物膜细胞凋亡,而且对诱导临床耐药白色念珠菌生物膜凋亡也有显著的效果。有研究报道,一定浓度的鱼腥草素钠可以使临床耐药白色念珠菌凋亡率,细胞内活性氧水平和 caspase 活性明显升高,并且破坏其生物膜的细胞核,影响其生物膜形态结构^[38]。然而,目前中药提取物对诱导非白色念珠菌及耐药念珠菌生物膜凋亡研究报道比较缺乏,仍需有待进一步研究证明。

3 展望 综上所述,念珠菌生物膜的形成与其强耐药性密切相关,尤其对临床常规抗真菌药物氟康唑等唑类药物带来了巨大的挑战。中药单体、提取物及中药复合物在抗念珠菌生物膜有独特的优势,不仅能抑制念珠菌生物膜的形成,而且还具有毒性低、不易耐药的优点^[39]。此外,关于中药抗念珠菌生物膜形成的机制等研究也不断增多,在抑制生物膜黏附、抑制念珠菌菌态转化和诱导生物膜细胞凋亡等方面取得了一定的进展。然而,上述抗念珠菌生物膜相关研究仍然有不足之处,需进一步深入研究与探索,大部分中药抗念珠菌生物膜实验都聚焦于体外实验,体内试验相关研究明显不足,难以证实中药抗念珠菌生物膜的疗效;关于中药抗非白色念珠菌生物膜形成分子机制研究较为少见,相关中药抗生物膜机制研究有待进一步深入;目前大部分研究聚焦于中药单体、提取物及中药复方抑制念珠菌生物膜形成,未来是否可以将中药与常规抗真菌唑类药物联合应用,挑选最佳剂量,为念珠菌生物膜强耐药性提供新的指导与思路。

参 考 文 献

[1] Xiao M, Sun ZY, Kang M, et al. Five-year national

surveillance of invasive candidiasis: Species distribution and Azole susceptibility from the China Hospital Invasive Fungal Surveillance Net (CHIF-NET) Study[J]. J Clin Microbiol, 2018, 56 (7): e00577-18.

- [2] Vitális E, Nagy F, Tóth Z, et al. *Candida* biofilm production is associated with higher mortality in patients with Candidaemia[J]. Mycoses, 2020, 63 (4): 352-360.
- [3] Miyazaki T, Kohno S. Current recommendations and importance of antifungal stewardship for the management of invasive candidiasis[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2015, 13 (9): 1171-1183.
- [4] Hirota K, Yumoto H, Sapaar B, et al. Pathogenic factors in *Candida* biofilm-related infectious diseases[J]. J Appl Microbiol, 2017, 122 (2): 321-330.
- [5] 戚韩英, 汪文斌, 郑昱, 等. 生物膜形成机理及影响因素探究[J]. 微生物学通报, 2013, 40 (4): 677-685.
- [6] 孟玲宁, 刘锦燕, 李文静, 等. 白念珠菌与生物膜相关的耐药机制[J]. 中国真菌学杂志, 2017, 12 (2): 124-127.
- [7] Tsui C, Kong EF, Jabra-rizk MA. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm[J]. Pathog Dis, 2016, 74 (4): 18.
- [8] de Barros PP, Rossoni RD, de Souza CM, et al. *Candida* biofilms: An update on developmental mechanisms and therapeutic challenges[J]. Mycopathologia, 2020, 185 (3): 415-424.
- [9] Nett JE, Andes DR. Contributions of the biofilm matrix to *Candida* pathogenesis[J]. J Fungi (Basel), 2020, 6 (1): 21.
- [10] Dominguez E, Zarnowski R, Sanchez H, et al. Conservation and divergence in the *Candida* species biofilm matrix mannan-glucan complex structure, function, and genetic control[J]. mBio, 2018, 9 (2): e00451-18.
- [11] Rajendran R, Sherry L, Lappin DF, et al. Extracellular DNA release confers heterogeneity in *Candida albicans* biofilm formation[J]. BMC Microbiol, 2014, 14: 303.
- [12] Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management[J]. Lancet Infect Dis, 2017, 17 (12): e383-e392.
- [13] Shi C, Liu J, Li W, et al. Expression of fluconazole resistance-associated genes in biofilm from 23

- clinical isolates of *Candida albicans* [J]. Braz J Microbiol, 2019, 50 (1): 157–163.
- [14] 唐娜, 郭大文. 热带假丝酵母唑类耐药相关基因的研究进展 [J]. 微生物与感染, 2017, 12 (6): 381–384.
- [15] Prasad R, Rawal MK, Shah AH. *Candida* Efflux ATPases and antiporters in clinical drug resistance [J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 892: 351–376.
- [16] Lewis K. Persister cells [J]. Annu Rev Microbiol, 2010, 64: 357–372.
- [17] Wuyts J, Van Dijck P, Holtappels M. Fungal persister cells: The basis for recalcitrant infections? [J]. PLoS Pathog, 2018, 14 (10): e1007301.
- [18] De Brucker K, De Cremer K, Cammue BP, et al. Protocol for determination of the persister subpopulation in *Candida albicans* biofilms [J]. Methods Mol Biol, 2016, 1333: 67–72.
- [19] 李贞, 陈伟琴, 胡骏, 等. 中药对念珠菌的抑菌现状及机制研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2019, 53 (12): 83–88.
- [20] 熊延靖, 吴艳红. 大蒜素对白色念珠菌生物被膜形成的作用 [J]. 菌物学报, 2020, 39 (2): 343–351.
- [21] 严园园, 施高翔, 邵菁, 等. 穿心莲内酯对白假丝酵母菌氟康唑耐药株黏附作用的影响 [J]. 中国微生物生态学杂志, 2014, 26 (1): 9–13.
- [22] 张梦翔, 施高翔, 严园园, 等. 姜黄素对 5 种非白念珠菌菌丝及生物膜形成的抑制作用 [J]. 中草药, 2015, 46 (4): 549–553.
- [23] 俞丽华, 陆克乔, 施高翔, 等. 龙胆泻肝汤不同提取部位对白念珠菌生物膜的抑制作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39 (7): 1280–1284.
- [24] 张新研. 黄连解毒汤组方在体外对白念珠菌生物膜的影响 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2015, 13 (19): 150–151.
- [25] Lee HS, Klm Y. Development of *Candida albicans* biofilms is diminished by *paeonia lactiflora* via obstruction of cell adhesion and cell lysis [J]. J Microbiol Biotechnol, 2018, 28 (3): 482–490.
- [26] 施高翔, 汪云霞, 冯鑫, 等. 白头翁汤正丁醇提取物诱导白念珠菌生物被膜细胞凋亡 [J]. 中国真菌学杂志, 2017, 12 (1): 13–18.
- [27] Jafri H, Ahmad I. *Thymus vulgaris* essential oil and thymol inhibit biofilms and interact synergistically with antifungal drugs against drug resistant strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* [J]. J Mycol Med, 2020, 30 (1): 100911.
- [28] Touil H, Boucherit K, Boucherit-Otmanl Z, et al. Optimum inhibition of amphotericin-B-resistant *Candida albicans* strain in single- and mixed-species biofilms by *Candida* and non-*Candida* terpenoids [J]. Biomolecules, 2020, 10 (2): 342.
- [29] 谈潘莉, 徐雯, 曹毅. 黄根醇提取物体外抗白色念珠菌生物膜作用的实验研究 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2015, 25 (3): 224–227.
- [30] 谈潘莉, 曹毅, 夏永良. 白鲜皮提取物体外抗白念珠菌生物膜作用及相关基因的研究 [J]. 中华中医药学刊, 2015, 33 (5): 1089–1092.
- [31] 汪长中, 程惠娟, 张雄飞, 等. 黄芩苷对非白念珠菌生物膜抑制作用的研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35 (5): 639–641.
- [32] 颜贵明, 张梦翔, 夏丹, 等. 白头翁汤正丁醇提取物对热带念珠菌毒力因子的影响 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40 (12): 2396–2402.
- [33] Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms [J]. Microbes Infect, 2016, 18 (5): 310–321.
- [34] 易玉玲, 宋琪, 雍江堰, 等. 盐酸小檗碱对白色念珠菌菌态转换的影响研究 [J]. 微生物学杂志, 2019, 39 (3): 51–57.
- [35] Kim DJ, Lee MW, Choi JS, et al. Inhibitory activity of hinokitiol against biofilm formation in fluconazole-resistant *Candida* species [J]. PLoS One, 2017, 12 (2): e171244.
- [36] Leiter É, Csernoch L, Pócsi I. Programmed cell death in human pathogenic fungi—a possible therapeutic target [J]. Expert Opin Ther Targets, 2018, 22 (12): 1039–1048.
- [37] 施高翔, 孙娟, 姜晶晶, 等. 苦参—蛇床子药对提取物诱导白念珠菌 VVC 临床株生物膜细胞凋亡作用研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30 (8): 921–926.
- [38] 崔艳艳, 施高翔, 汪云霞, 等. 鱼腥草素钠诱导临床耐药白假丝酵母菌生物膜细胞凋亡 [J]. 安徽中医药大学学报, 2017, 36 (3): 64–68.

(收稿: 2020–08–12 在线: 2021–05–10)

责任编辑: 赵芳芳