

萆薢分清饮正丁醇提取物在碱性 pH 条件下对白假丝酵母菌形态转化的影响[△]

张梦翔^{1*}, 杨晓丹¹, 徐玥玮¹, 李 璨², 蔡 明^{1#} (1. 安徽中医药大学第二附属医院药学部, 合肥 230001; 2. 安徽中医药大学中西医结合临床学院, 合肥 230013)

中图分类号 R932 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2026)04-0448-06

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2026.04.014



摘要 目的: 探讨萆薢分清饮正丁醇提取物(BXFY-NB)在碱性条件下对白假丝酵母菌的酵母-菌丝形态转化的影响。方法: 采用微量肉汤稀释法比较萆薢分清饮各有机溶剂提取部位对白假丝酵母菌的最低抑菌浓度(MIC), 确定最佳溶剂部位; 在倒置显微镜下于 pH 为 4.0~9.0 的环境中进行形态观察, 确定最强诱导形态转化的 pH; 在最优 pH 条件下, 以最优萃取部位的提取物进行后续实验, 包括 XTT 还原法测定菌丝代谢活性、显微计数法比较芽管形成率、半固体培养基评估菌丝侵袭程度; 并以实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 *HWPI*、*ALS3*、*SUN41*、*RIM101* 的转录水平。结果: 各萃取部位对白假丝酵母菌均表现出一定程度的抑菌活性, 其中正丁醇部位活性最佳(MIC 为 128~256 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 其他部位多在 256~1 024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围; pH 梯度显示, pH=8.0 时菌丝形成最旺盛, 后续实验据此开展。XTT 实验证实, 在 pH=8.0 条件下, 512、1 024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BXFY-NB 可显著降低菌丝代谢活性, 并在电镜下抑制菌丝形成。半固体培养基侵袭实验证实, 在 BXFY-NB 干预下, 白假丝酵母菌的侵袭深度随药物剂量增加而缩短, 1 024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组未见侵袭。qRT-PCR 实验证实, *HWPI*、*ALS3*、*SUN41*、*RIM101* 的表达随 BXFY-NB 剂量增加持续下调, 在 1 024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时降幅最大。结论: 在碱性 pH 条件下, BXFY-NB 可抑制白假丝酵母菌的酵母-菌丝形态转化并降低其代谢与侵袭能力, 机制可能与菌丝黏附相关基因及 pH 感应通路(*RIM101*)表达下调有关。

关键词 萆薢分清饮; 白假丝酵母菌; 形态转化; 菌丝; 实时荧光定量聚合酶链反应

Effects of Butyl Alcohol Extract of Bixie Fenqing Decoction on Morphological Transformation of *Candida Albicans* Under Alkaline pH Conditions[△]

ZHANG Mengxiang¹, YANG Xiaodan¹, XU Yuewei¹, LI Can², CAI Ming¹ (1. Dept. of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230001, China; 2. School of Integrated Traditional and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230013, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To probe into the effects of the butyl alcohol extract of Bixie Fenqing decoction (BXFY-NB) on yeast-to-hypha morphogenesis of *Candida albicans* under alkaline pH conditions. **METHODS:** The minimum inhibitory concentrations (MIC) of solvent fractions of Bixie Fenqing decoction were determined by broth microdilution to identify the most active fraction. Morphological screening was performed across pH from 4.0 to 9.0 by inverted microscopy to define the pH that most strongly induced hyphal growth. Under the optimal pH, the extract from the optimal extraction site was used for subsequent experiments, including the XTT-reduction assays for hyphal metabolic activity, microscopic quantification of germ-tube formation, and evaluation of invasive growth in semisolid medium. The transcriptional levels of *HWPI*, *ALS3*, *SUN41*, and *RIM101* were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). **RESULTS:** All fractions exhibited inhibitory activity against *C. albicans*, with the n-butanol fraction showing the greatest potency (MIC: 128 to 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$); other fractions were mostly within the range of 256 to 1 024 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The pH gradient revealed the most robust hyphal formation at pH 8.0, which was used for subsequent experiments. At pH 8.0, BXFY-NB at 512 and 1 024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ significantly reduced XTT absorbance and suppressed hyphal formation as visualized by electron microscopy. Invasion assays in semisolid medium showed dose-dependent shortening of invasion depth under the intervention of BXFY-NB, with no detectable invasion at 1 024 $\mu\text{g}/\text{mL}$. qRT-PCR demonstrated sustained down-regulation of *HWPI*, *ALS3*, *SUN41*, and *RIM101* as the dose of BXFY-NB increased, with the greatest decreases at 1 024 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **CONCLUSIONS:** Under alkaline pH conditions, BXFY-NB can inhibit the yeast-to-hyphal morphogenesis of *C. albicans* and reduce its metabolic and invasive capacities. The mechanism may be related

△ 基金项目: 安徽省卫生健康科研项目 (No. AHWJ2023A30074)

* 副主任药师。研究方向: 中药抗感染。E-mail: tojosaki@126.com

通信作者: 副主任药师。研究方向: 中药复方药理。E-mail: caiming@ahcm.edu.cn

to the down-regulation of genes associated with filament adhesion and the pH sensing pathway (RIM101).

KEYWORDS Bixie Fenqing decoction; *Candida albicans*; Morphogenesis; Hyphae; qRT-PCR

白假丝酵母菌为常见的真菌,可以引起包括尿路感染在内的多种感染。白假丝酵母菌存在酵母态与菌丝态 2 种形态,当宿主抵抗力降低,白假丝酵母菌在宿主体内由酵母态向菌丝态转变,以侵入宿主免疫系统。菌丝态白假丝酵母菌能产生水解酶和念珠菌溶素等多种毒力因子,对宿主的黏附和侵袭能力更强,致病力也因此更强,且易于逃逸免疫系统的攻击^[1]。因此,控制白假丝酵母菌菌丝生长对治疗白假丝酵母菌引起的感染至关重要。

临床治疗念珠菌相关感染以 3 类药物为主:唑类药物(如氟康唑、伏立康唑、艾沙康唑等)用于浅表及多种系统性感染;棘白菌素类药物(如卡泊芬净、米卡芬净)在侵袭性念珠菌病中作为重要一线选择;多烯类药物(两性霉素 B 及其脂质体制剂)多用于重症或耐药情形^[2-3]。这些药物主要针对细胞壁或细胞膜来抑制或杀死真菌,但不能有效抑制白假丝酵母菌菌丝生长或者杀死白假丝酵母菌菌丝。并且由于抗真菌药的滥用,耐药性的不断升级,白假丝酵母菌感染相关的死亡率也随之升高。为了弥补抗真菌药的不足,研究毒性较小且相对安全的传统中药治疗这种常见的真菌感染变得极具价值。传统中药在成本、多样性和人体全身调控方面较西药具有多项优势,被广泛用于治疗包括传染病在内的多种疾病。因此,传统中药将是治疗白假丝酵母菌造成的感染性疾病的新选择^[4-5]。萆薢分清饮首载于《杨氏家藏方》,主要用于下焦虚寒所致的小便白浊、尿频等。临床上,部分尿路感染与白假丝酵母菌有关。近年来,有医师尝试用萆薢分清饮干预此类病例(如非淋菌性尿道炎,其中包括由白假丝酵母菌引起的真菌性尿道炎),效果尚可,但作用机制不清。据此,本研究探讨了萆薢分清饮提取物能否干预白假丝酵母菌的形态转化(酵母→菌丝),从而削弱其致病性,为其用于尿路感染以及其他白假丝酵母菌感染提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:白假丝酵母菌标准株 SC5314 由海军军医大学姜远英教授惠赠,9 株白假丝酵母菌临床分离株由安徽中医药大学第一附属医院皮肤性病科刘小平主任惠赠。

1.1.2 仪器:DPH-9162 型恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);血细胞计数板(上海求精生化试剂仪器有限公司);CKX41-32 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);DMI6000B 型倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司);Sirion 200 型扫描电镜(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);SpectraMax M2e 型多功能酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司];I7000 型实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)仪[美谷分子仪器(上海)有限公司]。

1.1.3 药品与制备:萆薢分清饮含萆薢、石菖蒲、乌药、益智仁,4 味等比(质量比为 1:1:1:1),药材均来自安徽中医药大学第二附属医院。经性状鉴别合格,留有凭证标本。阳性对照药氟康唑标准品购于中国食品药品检定研究院。

1.1.4 试剂与培养基:磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH = 7.4, 武汉博士德生物工程有限公司)、无水乙醇(上海苏懿化学试剂有

限公司)、溶壁酶(美国 Sigma 公司)、25%戊二醛(国药集团化学试剂有限公司)、Total RNA 提取与 PCR 反应试剂(日本 ToyoBo 公司)、寡核苷酸引物[生工生物工程(上海)股份有限公司]、XTT 钠盐(XTT sodium)等常规分子/细胞试剂(加拿大 BBI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养:实验前,将菌株从-80℃冰箱取出,解冻后使用接种棒接种至沙氏固定培养基上,37℃恒温培养至形成白假丝酵母菌单菌落。使用时,从沙氏固体培养基中挑取形态较好的单菌落接种至 RPMI-1640 液体培养基中,37℃恒温培养箱中培养 24 h,并根据实验要求将菌液浓度调为 2×10^3 或 2×10^6 CFU/mL。

1.2.2 药品制备:使用 80%乙醇将萆薢分清饮的 4 味药材萆薢、石菖蒲、乌药、益智仁混合后置于 70℃回流 3 h 后过滤,收集滤渣,共重复回流 3 次后,混合药物的滤液分别用石油醚、乙酸乙酯、氯仿、正丁醇按照极性梯度萃取 3 次,萃取液低温真空干燥,得到萆薢分清饮各有机溶剂提取部位,即石油醚提取部位(BXFY-PE)、乙酸乙酯提取部位(BXFY-CF)、氯仿提取部位(BXFY-EA)和正丁醇提取部位(BXFY-NB)。

1.2.3 萆薢分清饮不同溶剂萃取物对白假丝酵母菌的最低抑菌浓度(MIC):采用 96 孔微量肉汤稀释法。将白假丝酵母菌(SC5314 标准株及 9 株临床分离株)制备为 2×10^3 CFU/mL 的接种液;每孔先加入 100 μL 的药液(萆薢分清饮各有机溶剂提取部位:32、64、128、256、512、1 024 μg/mL),再加入 100 μL 接种液混匀,终体积为 200 μL,并行设置生长对照(0 μg/mL)、无菌对照、阳性对照药氟康唑 8 μg/mL。37℃培养 48 h 后,与生长对照相比无可见生长/混浊的最低药物浓度判为 MIC。并分别报告各株 MIC,每株每剂量设 3 孔技术重复,实验独立重复 3 次。根据 MIC 结果,选择 MIC 最低的溶剂提取部分进入后续实验。

1.2.4 倒置显微镜观察不同白假丝酵母菌在不同 pH 下的形态转化:将 SC5314 菌悬液(2×10^6 CFU/mL)分别接种于 RPMI-1640 培养基中(pH 分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)中,37℃孵育 6 h 后取出,于倒置显微镜下观察白假丝酵母菌菌丝形成情况,选取菌丝形成最为旺盛的 pH 条件用于后续实验。

1.2.5 XTT 评估 BXFY-NB 对白假丝酵母菌菌丝代谢活性的影响:XTT 是淡黄色四唑盐,可被活跃代谢的细胞还原为橙色可溶性甲臞染料。在 96 孔板中,依次加入 BXFY-NB(256、512、1 024 μg/mL)药液 100 μL 与 SC5314 菌液(2×10^6 CFU/mL) 100 μL,并设置未给药的空白对照组;37℃孵育 6 h 后弃上清液,以无菌 PBS 冲洗去除未黏附细胞。每孔加入 XTT 工作液 60 μL,避光反应 2 h,在 492 nm 读取吸光度(A 值)。每组设 3 孔技术复孔,独立重复 3 次。

1.2.6 倒置显微镜评估 BXFY-NB 对白假丝酵母菌芽管形成率的影响:将 SC5314 菌液(2×10^6 CFU/mL) 1 mL 与 BXFY-NB(256、512、1 024 μg/mL) 1 mL 分别混匀置于 6 孔板,37℃孵育 4 h。在倒置显微镜下随机选取 1 个视野计数,分别统计产

生芽管的细胞数与总细胞数,计算芽管形成率,芽管形成率=产生芽管细胞数/总细胞数。每组实验重复3次并取平均值。

1.2.7 荧光显微镜观察 BXFY-NB 对白假丝酵母菌菌丝生长与菌体死亡的影响:使用荧光显微镜观察白假丝酵母菌菌丝生长。碘化丙啶(PI)无法穿透完整细胞膜,只能进入膜受损死细胞与 DNA 结合发红色荧光,用于区分 BXFY-NB 作用后的死细胞与活细胞。自活化 3 d 的平板边缘用无菌打孔器取直径 8 mm 菌饼,接种于含 BXFY-NB 256、512、1 024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 RPMI-1640 培养基中。以 7 000 r/min、离心半径 8 cm、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min 收集菌丝体,PBS 洗涤 3 次后重悬于 5 mL PBS。观察前,向悬液中加入 PI (终浓度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$),30 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min,最后采用荧光显微镜(激发 546 nm、发射 590 nm)观察并成像。每组独立重复 3 次,每次随机选择 3 个视野进行观察。以不加 BXFY-NB 作为空白对照组。

1.2.8 半固体培养基上观察 BXFY-NB 对白假丝酵母菌侵袭能力的影响:制备 pH=8.0 的溴甲酚紫葡萄糖蛋白胨水培养基半固体培养基,分别加入 BXFY-NB 至终浓度 256、512、1 024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将 SC5314 菌悬液经倍比稀释至 2×10^6 CFU/mL,取 100 μL 涂布于半固体表面(稀释涂布法)。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d 后自中线切开培养基,拍摄横切面以判定菌丝侵入深度与范围。

1.2.9 qRT-PCR 检测 BXFY-NB 对白假丝酵母菌菌丝特异性基因表达的影响:(1)总 RNA 的提取。采用 Trizol 法提取真菌总 RNA。将 SC5314 菌液 2 mL 与 BXFY-NB(256、512、1 024 $\mu\text{g}/\text{mL}$)各 2 mL 混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min、离心半径 3 cm 离心 6 h。收集菌体,以无菌 PBS 清洗 3 次处理结束后,立即冰上终止反应,4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,无菌 PBS 洗 1~2 次去残余培养基。每管加入 1 mL Trizol (约对应 $10^6 \sim 10^7$ 个细胞),充分吹打混匀裂解,室温(25 $^{\circ}\text{C}$)静置 5 min。加入氯仿 200 μL ,剧烈振荡 15 s 乳化,冰上 3 min;15 000 r/min、离心半径 8 cm、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min,小心转移上层水相至新管。加入等体积异丙醇,颠倒混匀,室温 10 min 沉淀 RNA;15 000 r/min、离心半径 8 cm、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,弃上清液。用 75%乙醇 1 mL 轻轻洗涤沉淀,10 000 r/min、离心半径 8 cm、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min,弃上清液,空气干燥 5~10 min(勿过干)。用 30 μL 无 RNase 水溶解 RNA(55 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min 有助溶解),置冰备用。

(2)引物的设计与合成。目标基因序列来源于美国国家生物技术信息中心,采用 Primer Premier 5.0 软件设计,引物由上海生工合成,序列见表 1。

表 1 各引物序列表

引物	序列(5'→3')	长度/bp
HWPI-F	AGCTAGACGGTCAAGGTC	18
HWPI-R	TGGTTGTTGTGCGGTA	18
ALS3-F	TAATGATGCTGCGAAGAA	18
ALS3-R	TAGCGAATCCCATTTGTAC	18
RIM101-F	ATTGAAGCCTTTCCATTGTGAC	22
RIM101-R	TAGTTGCATTCATCGAGTTTGC	22
SUN41-F	TGATAA ATC CGA AGA AAC	18
SUN41-R	AACCACCAG TTG AAG ATG	18
ACT1-F	TTGATTGGCTGCTAGAA	18
ACT1-R	ATGGCAGAAGATTGAGAA	18

(3)反转录为 cDNA。按 ToyoBo RT-qPCR 试剂盒说明进行反转录(全程置冰),产物用焦碳酸二乙酯处理水稀释 10 倍

备用。

(4) qRT-PCR 反应。采用 SYBR Green Realtime PCR Master Mix(ToyoBo),25 μL 反应如下,2×Mix 12.5 μL 、Forward Primer(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)1 μL 、Reverse Primer 1 μL 、cDNA 0.5 μL 、dd H₂O 10 μL 。在 ABI7000 扩增,预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 、60 s;循环 40 次,95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s;熔解曲线为 60~95 $^{\circ}\text{C}$,升温 0.1 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ 。内参基因 ACT1。每样本技术复孔 3 个,独立重复 3 次。

(5)定量分析。记录各基因 Ct 值取均值,以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示相对表达倍数变化。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件对本研究数据进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。每个处理条件设技术复孔 3 个,独立重复 3 次;统计时以每次独立重复的均值作为 1 个样本,避免将技术复孔当作独立样本。组间差异比较采用单因素方差分析检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 萹藨分清饮各萃取部位对白假丝酵母菌的 MIC

在萹藨分清饮的各萃取部位中,BXFY-NB 对白假丝酵母菌标准株与 9 株临床分离株表现出的抑菌活性最佳,其对标准株 SC5314 的 MIC 为 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对 9 株临床分离株(CA01—CA09)的 MIC 为 128~256 $\mu\text{g}/\text{mL}$;其他部位包括 BXFY-PE、BXYF-CF、BXYF-EA 多在 256~1 024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围,具体 MIC 值见表 2。故本实验主要研究 BXFY-NB 对白假丝酵母菌菌丝形态转化的影响。

表 2 萹藨分清饮各溶剂萃取部位对白假丝酵母菌的 MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

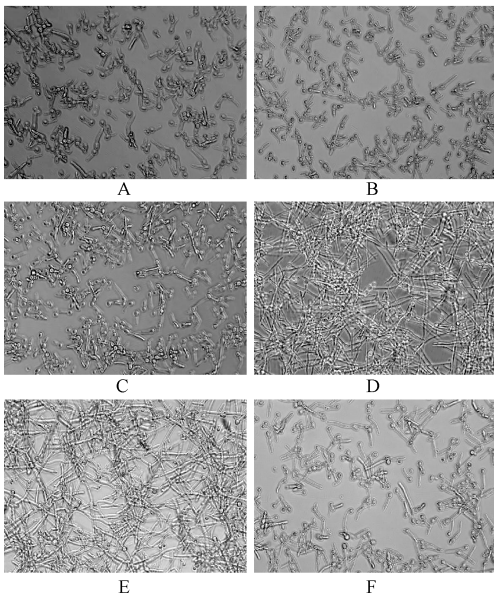
菌种	提取物					
	总提物(水提取物)	BXFY-PE	BXYF-CF	BXYF-EA	BXFY-NB	氟康唑
SC5314	512	512	512	256	128	1
CA01	512	1 024	512	256	128	0.5
CA02	512	1 024	1 024	256	256	1
CA03	1 024	512	1 024	512	128	16
CA04	512	1 024	1 024	256	128	32
CA05	512	1 024	1 024	256	128	32
CA06	512	1 024	512	256	128	64
CA07	512	1 024	512	256	128	1
CA08	1 024	1 024	1 024	512	128	0.5
CA09	512	1 024	1 024	128	256	0.5

2.2 不同 pH 下形态转化

倒置显微镜(放大 400 倍)观察显示,在 pH=4.0 和 pH=5.0 培养基上,视野中几乎全部为圆形或卵圆形酵母细胞,未见明显菌丝或假菌丝伸出;在 pH=6.0 时,开始出现部分芽管和短的假菌丝;而在 pH=8.0 条件下,视野中大量细胞拉长形成了长长的菌丝和假菌丝结构,酵母细胞明显减少;pH=8.0 时,能看到丰富的菌丝且视野中基本没有酵母态的白假丝酵母菌,见图 1。据此,后续实验在 pH=8.0 条件下评价 BXFY-NB 对白假丝酵母菌的干预效应及机制研究。

2.3 XTT 还原法评价 BXFY-NB 对白假丝酵母菌菌丝代谢活力的影响

在 pH=8.0 条件下,BXFY-NB 作用 6 h 后进行 XTT 测定,BXFY-NB 显示剂量依赖性的代谢抑制。由图 2 可知,与空白对照组比较,512、1 024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组的 OD492 明显降低,差异有



A. pH=4.0; B. pH=5.0; C. pH=6.0; D. pH=7.0; E. pH=8.0; F. pH=9.0。

图1 不同 pH 对白假丝酵母菌形态转化的影响 (×400 倍)

统计学意义 ($P < 0.001$)。初步数据表明, BXYFY-NB 对碱性条件下菌丝形态的代谢活力有明显抑制作用, 与显微观察菌丝减少的结果一致。

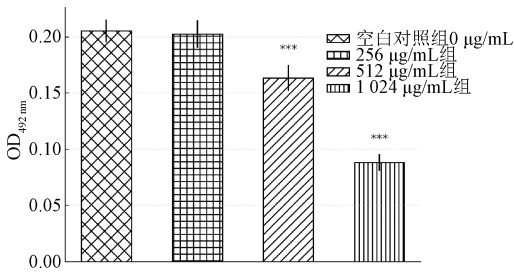


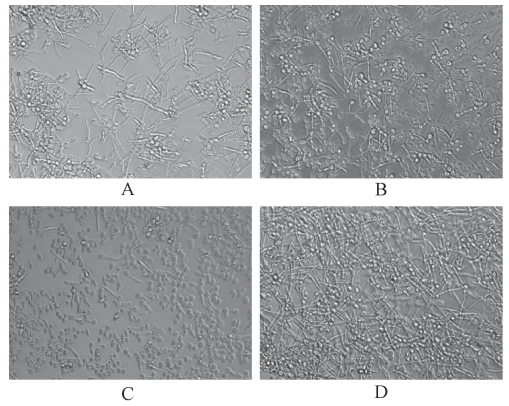
图2 BXYFY-NB 作用 6 h 后对白假丝酵母菌菌丝代谢活力的影响

2.4 BXYFY-NB 作用 4 h 对白假丝酵母菌的芽管形成率的影响

根据倒置显微镜观察, 空白对照组 90% 以上的细胞出芽形成菌丝; 256 µg/mL 组约 80% 的出芽率; 1024 µg/mL < 20% 的细胞形成芽管, 其余仍以酵母形式存在, 即 BXYFY-NB 以浓度依赖性方式抑制了芽管的产生; 菌丝长度上也有差异, 空白对照组菌丝普遍很长, 纵横交织, 而与空白对照组相比 BXYFY-NB 处理组的菌丝较短, 稀疏, 尤其 1024 µg/mL 组长度较长的菌丝数量较少, 见图 3。经过观察和计算, 各浓度组芽管形成率如下, BXYFY-NB 256 µg/mL 组为 (81.35 ± 0.04)%, 512 µg/mL 组为 (70.28 ± 0.05)%, 1024 µg/mL 组为 (16.27 ± 0.04)%, 空白对照组为 (96.13 ± 0.02)%。

2.5 BXYFY-NB 对白假丝酵母菌菌丝生长的影响

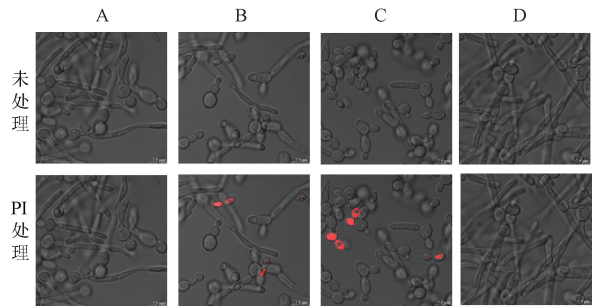
在 RPMI-1640 液体培养基中, 在不同浓度 BXYFY-NB 作用下, 菌丝的生长随着药物浓度增高而逐渐减少, 菌丝的长度逐渐减短, 菌丝的密度也受到明显影响。加入不同浓度的 BXYFY-NB 后使用 PI 染色剂染色。PI 可对死细胞进行染色, 发出红色荧光。荧光显微镜下显示, BXYFY-NB 的浓度越高, 形成菌丝越少, 活细胞数量越少, 白假丝酵母菌菌丝的长度越短。



A. BXYFY-NB 256 µg/mL 组; B. BXYFY-NB 512 µg/mL 组; C. BXYFY-NB 1024 µg/mL 组; D. 空白对照组。

图3 BXYFY-NB 作用 4 h 对白假丝酵母菌的芽管形成率的影响 (×400 倍)

证实白假丝酵母菌菌丝细胞膜受 BXYFY-NB 的损伤程度可能存在浓度依赖性, 见图 4。



A. BXYFY-NB 256 µg/mL 组; B. BXYFY-NB 512 µg/mL 组; C. BXYFY-NB 1024 µg/mL 组; D. 空白对照组。

图4 BXYFY-NB 作用 6 h 后对白假丝酵母菌形态的影响

2.6 BXYFY-NB 对白假丝酵母菌在半固体培养基中的菌丝侵袭能力的影响

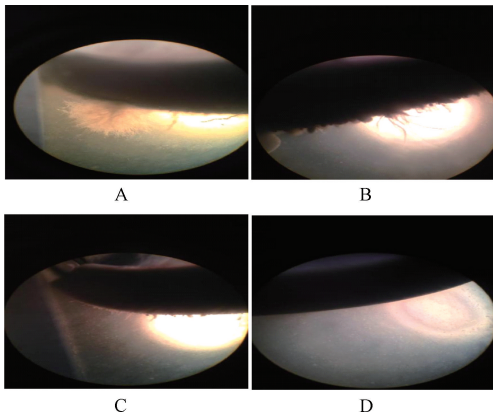
使用无菌手术刀垂直切开培养基后, 观察菌丝侵入深度。由图 5 可见, 空白对照组菌丝深入半固体琼脂形成“扎根”状, 而药物高浓度组菌丝只铺展表层未下扎。空白对照组切面上可看到沿刺入点向下有细丝状菌丝贯穿, 大约深入琼脂 3~4 mm。BXYFY-NB 256 µg/mL 组菌丝侵入长度约 2 mm 且数量稀少; 512 µg/mL 组切面几乎看不到明显菌丝穿透; 1024 µg/mL 组镜下观察未见明显的侵袭入培养基的白假丝酵母菌菌丝, 仅能在表面生长。表明 BXYFY-NB 可抑制菌丝的侵袭生长。

2.7 BXYFY-NB 对白假丝酵母菌相关基因表达的影响

在碱性条件下, BXYFY-NB (256~1024 µg/mL) 可明显影响菌丝相关基因转录。pH=8.0 条件下, 白假丝酵母菌菌丝形成相关基因在不同浓度的 BXYFY-NB 干预下相对于空白对照相应基因的表达变化见表 3。qRT-PCR 结果证实, 4 个基因均为下调, 其中 *ALS3* 与 *Rim101* 随剂量升高降幅明显增大, 1024 µg/mL 时降幅最大; *HWPI* 降幅较为平稳; *SUN41* 为中等幅度下降, 与前述形态学与侵袭性降低的结果一致。

3 讨论

白假丝酵母菌可以根据环境条件作为单细胞出芽生长,



A. 空白对照组; B. BXFY-NB 256 µg/mL 组; C. BXFY-NB 512 µg/mL 组; D. BXFY-NB 1 024 µg/mL 组。

图 5 BXFY-NB 对白假丝酵母菌在半固体培养基中的菌丝侵袭能力的影响

表 3 BXFY-NB 对白假丝酵母菌相关基因表达的影响

基因	BXFY-NB 倍数变化		
	256 µg/mL	512 µg/mL	1 024 µg/mL
<i>HWPI</i>	-1.13	-1.1	-1.31
<i>ALS3</i>	-1.39	-2.115	-5.13
<i>RIM101</i>	-1.08	-2.59	-6.49
<i>SUN4I</i>	-1.22	-1.44	-2.93

注:数值前的“-”表示下调,数值表示下调倍数。

表现为酵母态;也可以假菌丝或菌丝的形式生长,即菌丝态。酵母态的白假丝酵母菌通过黏附而定植于宿主的黏膜或皮肤表面,并且可以通过转位进入血液引起血源性传播。菌丝态的白假丝酵母菌的黏附力进一步增强,并可以侵入上皮组织同时产生天冬氨酸蛋白酶、磷脂酶、脂肪酶等水解酶,以及近年来发现的重要毒力因子溶细胞毒素(Candidalysin)^[6];还可以参与形成生物膜,并作为生物膜的主要构成引起慢性念珠菌感染以及产生耐药性^[7]。另外,菌丝通过诱导内吞和主动穿透 2 种不同的形式侵袭宿主上皮细胞,引起上皮细胞对其产生免疫应答,并在应答过程中造成对上皮细胞的损伤。菌丝态也有助于白假丝酵母菌实现免疫逃逸^[8]。因此,积极干预白假丝酵母菌菌丝形成对于防止其对宿主的损伤至关重要。本课题组前期研究表明,草薢分清饮提取物能够对白假丝酵母菌产生抑制作用,但具体机制未明。因而,本研究聚焦于草薢分清饮提取物对白假丝酵母菌形态转换(酵母相向菌丝相)的影响与抑制能力。首先,本研究比较了不同有机溶剂提取部位的活性,在 MIC 筛选中,BXFY-NB 的抑菌活性最强,因此选择 BXFY-NB 作为后续机制研究对象。其次,白假丝酵母菌的形态转化受温度、pH 和营养等共同调控,本研究通过建立 pH 梯度,发现 pH 为 6.0~10.0 时均

可见菌丝,pH=8.0 最旺盛。因此,后续一律在 pH=8.0 的“最易出丝”条件下评估 BXFY-NB 的作用,以便直观看到对形态转化的抑制。

BXFY-NB 对白假丝酵母菌临床分离株的 MIC 为 128~256 µg/mL,提示有一定的抑菌活性。显微镜与平板实验证明,从 256 µg/mL 起就能减少菌丝;512、1 024 µg/mL 时抑制更明显,半固体侵袭终止。XTT 显示,512、1 024 µg/mL 时代谢活性显著下降($P<0.001$)。这说明 BXFY-NB 既抑制形态转化,也降低代谢水平和侵袭能力,且呈清晰的剂量依赖。

为阐明在碱性诱导条件下 BXFY-NB 抑制形态转化的分子基础,本研究对典型的菌丝、黏附与 pH 感应相关基因进行 qRT-PCR 检测。与空白对照组相比,BXFY-NB 处理组 *HWPI*、*ALS3*、*SUN4I* 呈剂量依赖性下调。*HWPI* 与 *ALS3* 为菌丝期高表达的黏附与侵袭因子,其降低提示对白假丝酵母菌与上皮的黏附、介导内吞及生物膜组装的能力被削弱,从而限制后续侵袭^[9-10]。*SUN4I* 参与细胞壁重塑与细胞分离,是生物膜形成的重要组成,其表达下降意味着细胞壁稳定性与表面黏附结构受损,不利于芽管与菌丝的持续延伸^[11]。与此同时,*RIM101*(碱性 pH 应答通路的关键转录因子)的表达在高剂量下明显下调,提示碱性反应信号被压低,即便处于 pH=8.0 的诱导环境也难以顺利启动菌丝程式^[12]。上述转录学变化与本研究在显微观察、半固体侵袭及 XTT 代谢实验中获得的抑制效果相吻合,支持 BXFY-NB 通过降低菌丝黏附相关基因表达与抑制碱性应答通路协同阻断白假丝酵母菌的酵母相-菌丝相转换,从而减弱侵袭性。

临床上,白假丝酵母菌相关感染多见于局部 pH 偏碱性的环境。本研究在 pH=8.0 条件下建立诱导模型,即便在这种更容易形成菌丝的情形下,BXFY-NB 仍表现出明确作用,即减少菌丝形成,降低黏附与侵袭能力,降低代谢活性。这些体外表型与转录水平的变化相一致,提示该提取物在碱性微环境中具有进一步研究的潜在价值。本研究亦存在不足:(1)实验主要为体外短期试验,尚缺动物模型与临床前安全性评估;(2)仅在 pH=8.0 下系统观察,血清、CO₂、N-乙酰葡萄糖胺等其他诱导条件尚未比较;(3)基因检测范围较窄,目前仅覆盖 *HWPI*、*ALS3*、*SUN4I* 及 *RIM101* 等关键位点,有必要扩展至 Ras1-cAMP-PKA、MAPK 等通路的核心节点^[13],并同步检测胞内 cAMP 水平与相关蛋白表达/活性。完成上述工作,将为草薢分清饮用于白假丝酵母菌感染相关疾病提供更充分的实验依据。

(下转第 457 页)

(上接第 447 页)

[26] 申婼,赵明一,曾志辉,等. *CREBBP* 基因突变所致 Rubinstein-Taybi 综合征 1 例[J]. 中南大学学报(医学版),2020,45(2):198-203.

[27] 冯宇阳. microRNA-4474/4717 及 *CREBBP* 在具核梭杆菌感染相关结肠癌组织中的表达及其作用研究[D]. 重庆:西南大学,2020.

[28] 陈彦竹,何倩,马宏志,等. PI3K-Akt/mTOR/AMPK 通路基因突变与鼻咽癌疗效及预后的关系[J]. 中南大学学报(医学

版),2022,47(2):165-173.

[29] 刘露,刘占奎,吴雪,等. 狼毒大戟调节 AGE-RAGE 信号通路对肝硬化大鼠炎症反应和纤维化的影响[J]. 中国老年学杂志,2023,43(15):3800-3804.

[30] 董克臣,张萌,梁毅,等. 西黄胶囊对大鼠放射性口腔黏膜炎的防护作用[J]. 现代肿瘤医学,2020,28(3):383-386.

(收稿日期:2025-02-14 修回日期:2025-06-03)