

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.14.010

白藜芦醇诱导白念珠菌凋亡的机制探讨

张 瑞,秦永亮,李 姣,郭玉楷,吴 欣,李永军[△]

河北医科大学第二医院检验科,河北石家庄 050000

摘要:目的 探究白藜芦醇诱导白念珠菌凋亡的机制。方法 将不同浓度的白藜芦醇(终浓度 0.256、0.128、0.064 mg/mL)和作为阳性对照的两性霉素 B(AmB,终浓度 0.5 μ g/mL)分别加入指数生长期的白念珠菌悬液,同时设置空白对照组,检测白念珠菌的凋亡率、细胞内活性氧和线粒体膜电位等指标。结果 与空白对照组比较,白藜芦醇处理后的白念珠菌凋亡率、活性氧水平明显升高,线粒体膜电位明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 白藜芦醇具有诱导白念珠菌凋亡的作用,这可能与活性氧积累和线粒体损伤相关。

关键词:白藜芦醇; 白念珠菌; 细胞凋亡**中图分类号:**R966**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2020)14-1978-03**Mechanism of resveratrol induced apoptosis of *Candida albicans***ZHANG Rui, QIN Yongliang, LI Jiao, GUO Yukai, WU Xin, LI Yongjun[△]

Department of Clinical Laboratory, the Second Hospital of Hebei

Medical University, Shijiazhuang, HeBei 050000, China

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of resveratrol induced apoptosis of *Candida albicans*. **Methods** Different concentrations of resveratrol (final concentrations were 0.256, 0.128, 0.064 mg/mL) and amphotericin B (AmB, final concentration was 0.5 μ g/mL) which was used as the positive control were added into the bacterial suspension at exponential growth stage respectively, meanwhile, the blank group was set up. Then the apoptosis rate of *Candida albicans*, intracellular reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential were measured. **Results** Compared with the blank group, the apoptotic rate of *Candida albicans* treated with resveratrol, the level of intracellular ROS increased significantly, and the mitochondrial membrane potential decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Resveratrol can induce the apoptosis of *Candida albicans*, which may be related to the accumulation of ROS and mitochondrial damage.

Key words: resveratrol; *Candida albicans*; apoptosis

近年来的流行病学研究表明,一些植物来源化学成分的水平与肿瘤、感染的发生、发展密切相关^[1]。这些成分因为具有高效、低毒的特性而备受关注。白藜芦醇是虎杖的有效成分之一,是一种天然多酚化合物,具有广泛的药理活性,生物利用度较高。红葡萄皮中有高水平的白藜芦醇。本课题组的前期研究表明,白藜芦醇具有一定的抗白念珠菌活性,但其作用机制不详^[2]。有研究表明,白藜芦醇可通过诱导真菌细胞凋亡发挥抗菌作用^[3]。本研究探讨了白藜芦醇通过诱导凋亡发挥抗白念珠菌活性的机制。

1 材料与方法

1.1 菌株 白念珠菌 ATCC 90028,由北京协和医院惠赠。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 流式细胞仪为美国 BD 公司产品;恒温培养箱为上海博迅公司产品。

1.2.2 试剂 白藜芦醇购自 Sigma 公司,两性霉素 B(AmB)购自 Solarbio 公司。PBS 缓冲液 pH 值为 7.0;RPMI-1640 培养基为 Solarbio 公司产品;蜗牛酶

为 Solarbio 公司产品;Annexin V-FITC/PI 试剂盒为凯基公司产品;活性氧检测试剂盒为 Solarbio 公司产品;线粒体膜电位(MMP)检测试剂盒为 Solarbio 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 菌株的活化及菌液配制 从 4 $^{\circ}$ C 保存的沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)上挑取白念珠菌 ATCC 90028 单菌落接种于沙氏液体培养基中,35 $^{\circ}$ C 摇床振荡(200 r/min)过夜培养,使菌株处于对数生长期,离心收集菌体,PBS 洗涤两次后,用 RPMI-1640 稀释至 2×10^6 CFU/mL 备用^[4]。

1.3.2 菌株的凋亡诱导 将 2 mL 指数生长期($A_{600} = 0.5$)的白念珠菌悬液(密度为 2×10^6 CFU/mL)接种于 24 孔培养板中,同时将白藜芦醇分别加入孔板中,使终浓度分别为 0.256、0.128、0.064 mg/mL,另设不加药的空白对照组和加 AmB(终浓度为 0.5 μ g/mL)的阳性对照组。37 $^{\circ}$ C 静置孵育 2 h,离心后无菌 PBS 洗 3 次,然后用 Annexin V-FITC 和 PI 的标记液混匀(密度为 10^6 CFU/mL)。室温避光 37

℃ 孵育 10 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

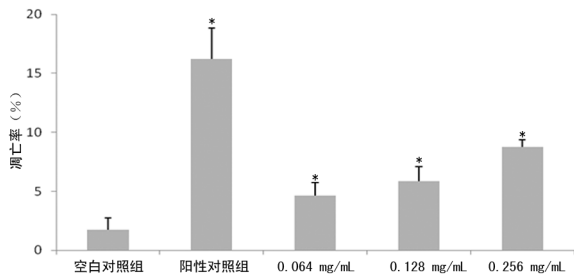
1.3.3 白藜芦醇对白念珠菌活性氧(ROS)的影响 对指数生长期的白念珠菌悬液进行不同的加药处理后(同 1.3.2), 37 ℃ 孵育 12 h, 离心收集白念珠菌细胞, PBS 缓冲液洗涤 3 次后调整密度为 5×10^6 CFU/mL。利用探针 2, 7-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)进行 ROS 检测, DCFH-DA 可自由通过细胞膜进入细胞内被酯酶水解, 而 DCFH 则不能透过细胞膜, 从而使探针易被装载到细胞内。细胞内的活性氧可氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF。检测 DCF 荧光即可得知细胞内活性氧水平。按照试剂盒说明加入 DCFH-DA 试剂, 37 ℃ 孵育 20 min, 流式细胞仪检测白念珠菌 ROS 水平^[5]。

1.3.4 白藜芦醇对白念珠菌 MMP 的影响 对指数生长期的白念珠菌悬液进行不同的加药处理后(同 1.3.2), 孵育、离心收集白念珠菌细胞、PBS 缓冲液洗涤、调整浓度同 1.3.3。JC-1 为检测 MMP 的荧光探针。当 MMP 较高时, JC-1 聚集在线粒体基质中, 形成聚合物产生红色荧光; 而 MMP 较低时, JC-1 不能聚集在线粒体的基质中, 产生绿色荧光。通过 JC-1 从红色荧光到绿色荧光的转变(红色和绿色荧光强度的比值)可反映细胞膜电位的变化。参照 MMP 检测试剂盒说明书加入 JC-1 染色工作液, 于细胞培养箱 30 ℃ 避光孵育 15 min 后, PBS 洗涤 3 次, 用流式细胞仪检测荧光强度^[6], 然后计算。

1.4 统计学处理 采用 SPSS21.0 软件进行数据处理, 组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

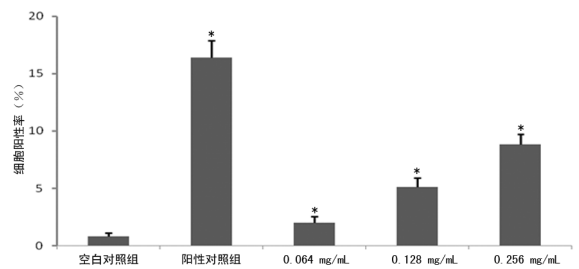
2.1 白藜芦醇对白念珠菌细胞凋亡的影响 在 0.064~0.256 mg/mL 范围内, 随着白藜芦醇浓度的升高, 白念珠菌细胞凋亡率逐渐升高, 见图 1。



注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 1 不同加药处理组白念珠菌的细胞凋亡率

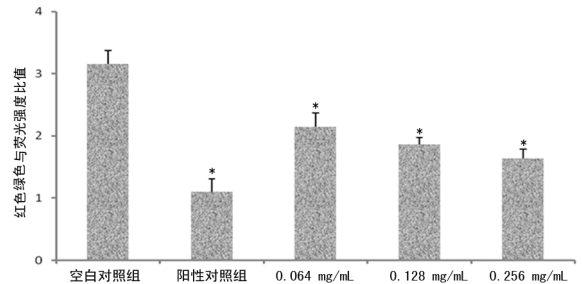
2.2 白藜芦醇对白念珠菌 ROS 阳性率的影响 空白对照组的荧光强度弱, ROS 阳性率为 0.8%, 不同浓度白藜芦醇(0.064、0.128、0.256 mg/mL)处理后, 荧光强度呈剂量依赖性增强, ROS 阳性率分别提升至 1.9%、5.1%、8.7% 和 16.4%, 与空白对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 2。



注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 2 不同加药处理组白念珠菌细胞的 ROS 阳性率

2.3 白藜芦醇对白念珠菌 MMP 的影响 与空白对照组比较, 不同浓度(0.064、0.128、0.256 mg/mL)白藜芦醇可显著降低白念珠菌 MMP, 红色和绿色荧光强度比值分别为 2.14、1.86、1.64($P < 0.05$), 见图 3。



注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 3 不同加药处理组白念珠菌 MMP 的检测

3 讨 论

3.1 白藜芦醇诱导白念珠菌凋亡的机制 细胞凋亡是生物体普遍存在的现象——细胞自主有序的死亡过程, 诱导细胞凋亡对真菌研究有重要意义。在所有诱导细胞凋亡的因素中, 凋亡的早期表现之一为 MMP 的下降^[7-8]。线粒体是真核细胞内能量产生的中心场所, 对维持细胞能量代谢和正常功能起重要作用, 诱发凋亡的因素会导致细胞色素 C 的释放激活 caspase, 破坏电子传递, 降低 MMP 参与调节等^[9]。若 MMP 耗尽, 细胞将进入不可逆的凋亡转归途径^[10]。在凋亡信号的刺激下, 细胞凋亡导致一系列损伤相关的异质性分子的释放, 如线粒体 DNA、ROS、n-甲酰化肽及心磷脂, 导致细胞通透性会增加^[11-12]。作为酵母菌属细胞凋亡中的第二信使——不同水平的 ROS 决定了细胞的转归途径, 包括凋亡、坏死、凋亡转变坏死等^[13-14]。

坏死及凋亡细胞均释放具有炎症特性的线粒体, 以往的研究表明白藜芦醇可通过阻滞细胞 S 期从而影响白念珠菌的活性^[15]。本实验采用 DCFH-DA 和 JC-1 荧光试剂, 检测白念珠菌 ROS 和 MMP 水平。白藜芦醇的作用机制可能与降低白念珠菌的 MMP 水平、提高 ROS 水平、扰乱线粒体功能等凋亡进展中与线粒体损伤有关的进程有关。

3.2 白藜芦醇诱导白念珠菌凋亡的意义 白念珠菌常存在于人类上呼吸道、口腔、肠道及阴道等黏膜腔中, 是临床上重要的条件致病菌^[16-18]。临床上的治疗主要采用 AmB 及唑类抗真菌药物, 其长期应用引起

不良反应的报道日益增多^[19],因此寻找和发现新的药物以抑制白念珠菌的活性成为亟待解决的问题之一。白藜芦醇作为近年中药研究中的热点,其广泛的生物学活性受到关注。本研究中通过测定不同加药处理组白念珠菌的 ROS、MMP 水平,证实了白藜芦醇具有诱导白念珠菌凋亡的作用,中药成分诱导念珠菌属凋亡是当今抗真菌治疗的新策略,为临床治疗白念珠菌感染提供了重要的实验基础,具有潜在的应用价值。

3.3 相关研究的比较 WEBER 等^[20]研究证明,白藜芦醇对于常见的念珠菌属并未有明显的抑制作用,而有报道指出白藜芦醇衍生物可能影响念珠菌属^[21]。LEE 等^[3]的研究证实白藜芦醇可诱导白念珠菌的凋亡。

3.4 本研究的局限性 本实验中选取白念珠菌 ATCC90028 的标准株作为研究对象,结果尚有代表性,但还需大样本的临床分离株及动物体内试验做进一步的证实;其次,在研究方法方面除了用流式细胞仪进行检测外,还应该结合其他分子水平的实验来对凋亡机制进行深入分析。

综上所述,白藜芦醇可以通过诱导细胞凋亡发挥对白念珠菌的抑制作用,为白藜芦醇用于临床治疗白念珠菌感染提供了有效的实验室依据,进一步丰富了中药抗真菌的理论,但其更深入的作用机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 孔祥子,张妙,孙韶龙,等.白藜芦醇治疗胰腺癌机制的研究进展[J].医学综述,2019,25(1):65-69.
- [2] 李永军,张瑞,王鑫,等.白藜芦醇体外抗白假丝酵母菌生物膜作用的初步研究[J].现代检验医学杂志,2011,26(1):39-44.
- [3] LEE J,LEE D G. Novel antifungal mechanism of resveratrol:apoptosis inducer in *Candida albicans*[J]. Curr Microbiol,2015,70(4):383-389.
- [4] RAMAGE G,WALLE K V,WICKES BL,et al. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms[J]. Antimicrob Agents Chemother,2001,45(9):2475-2479.
- [5] DING Y,LI Z,LI Y,et al. HSAF-induced antifungal effect in *Candida albicans* through ROS-mediated apoptosis[J]. RSC Adv,2016,6(37):30895.
- [6] PARK C,LEE D G. Melittin induces apoptotic feature in *Candida albicans*[J]. Biochem Biophys Res Commun,2010,394(1):170-173.
- [7] LEO V,JULIA A,KAREN L,et al. Potential involvement of F0F1-ATP(synth)ase and reactive oxygen species in apoptosis induction by the antineoplastic agent erucylphosphohomocholine in glioblastoma cell lines[J]. Apoptosis,2010,15(7):753-768.
- [8] BROOKS M M,NEELAM S,FUDALA R,et al. Lenticu-

- lar mitoprotection; monitoring mitochondrial depolarization with JC-1 and artifactual fluorescence by the glycogen synthase kinase-3 β inhibitor[J]. Mol Vis,2013,19(10):14194-14210.
- [9] GREEN D R,REED J C. Mitochondria and apoptosis[J]. Science,1998,281:1309-1312.
- [10] SONG H W,WOHLTMAN M,TAN M,et al. Group VIA phospholipase A2 mitigates palmitate-induced β -cell mitochondrial injury and apoptosis[J]. J Biol Chem,2014,289(20):14194-14210.
- [11] JEONG S Y,SEOL D W. The role of mitochondria in apoptosis[J]. BMB Rep,2008,41(1):11-16.
- [12] MAEDA A,FADEEL B. Mitochondria released by cells undergoing TNF- α -induced necroptosis act as danger signals[J]. Cell Death Dis,5(7):e1312.
- [13] DONGMEI L,HUI C,ABIGAIL F,et al. Enzymatic dysfunction of mitochondrial complex I of the *Candida albicans* goa 1 mutant is associated with increased reactive oxidants and cell death[J]. Am Soc Microbiol,2011,10(5):672-682.
- [14] RINNERTHALER M,BUTTNER S,LAUN P,et al. Yno1p/Aim14p, a NADPH-oxidase ortholog, controls extramitochondrial reactive oxygen species generation, apoptosis, and actin cable formation in yeast[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2012,109(22):8658-8663.
- [15] JUNG H J,SEU Y B,LEE D G,et al. Candidicidal action of resveratrol isolated from grapes on pathogenic yeast *C. albicans*[J]. J Microbiol Biotechnol,2007,17(8):1324-1329.
- [16] NOBILE C J,JOHNSON A D. *Candida albicans* biofilms and human disease[J]. Annu Rev Microbiol,2015,69:71-92.
- [17] KIM K,ZILBERMINTZ L,MARTCHENKO M,et al. Repurposing FDA approved drugs against the human fungal pathogen, *Candida albicans*[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob,2015,14:32.
- [18] HULL C M,PARKER J E,BADER O,et al. Facultative sterol uptake in an ergosterol-deficient clinical isolate of *Candida glabrata* harboring a missense mutation in ERG11 and exhibiting cross-resistance to azoles and amphotericin B[J]. Antimicrob Agents Chemother,2012,56(8):4223-4232.
- [19] BROMLEY M,JOHNS A,DAVIES E,et al. Mitochondrial complex I is a global regulator of secondary metabolism, virulence and Azole sensitivity in *Fungi*[J]. PLoS One,2016,11(7):e0158724.
- [20] WEBER K,SCHULZ B,RUHNKE M. Resveratrol and its antifungal activity against *Candida* species[J]. Mycoses,2011,54(1):30-33.
- [21] HOUILLE B,PAPON N,BOUDESOCQUE L,et al. Antifungal activity of resveratrol derivatives against *Candida albicans*[J]. J Nat Prod,2014,77(7):1658-1662.