

DOI:CNKI;11-3495/R. 20110321. 1135. 012

大鼠真菌性腹腔炎症渗出液的上清液抗真菌作用研究

韦桂宁^{1,2}, 宋大彦³, 何德明¹, 李艳¹, 梁宁生^{1*}

(1. 广西医科大学附属肿瘤医院, 南宁 530021, 2. 广西中医药研究院, 南宁 530022,
3. 石家庄医学高等专科学校药理教研室, 石家庄 050081)

[摘要] 目的: 观察大鼠真菌性腹腔炎症渗出液的上清液中的抗菌物质对真菌的杀菌作用。方法: 给大鼠 ip 活的白色念珠菌 *Candida albicans* 造成真菌感染模型, 观察腹腔炎症渗出液的上清液对 *C. albicans*、光滑念珠菌 *C. glabrata*、热带念珠菌 *C. tropicalis* 的杀菌作用, 观察温度对上清液抗真菌作用的影响, 并在显微镜下观察杀灭 *C. albicans* 的过程。结果: 造模后 24 h 的腹腔炎症渗出大量渗出液, 渗出液上清液中含有大量的蛋白质, 渗出液上清液对 *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* 具有强的杀菌作用, 杀菌作用受温度的影响, 56 ℃ 处理后杀菌活性几乎丧失, 上清液可使 *C. albicans* 菌体萎缩, 然后胞体破碎死亡。结论: 大鼠真菌性腹腔炎症渗出液上清液中存在强的抗真菌物质, 具有强的抗真菌作用, 可能通过对真菌的细胞壁/细胞膜而发挥作用。其可能是未被关注或未发现的抗菌蛋白/肽。

[关键词] 白色念珠菌; 腹腔炎症渗出液上清液; 抗真菌蛋白/肽

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)10-0136-04

Fungicidal Effect of Peritoneal Exudates Supernatant in Rats Infected by *Candida albicans*

WEI Gui-ning^{1,2}, SONG Da-yan³, HE De-ming¹, LI Yan¹, LIANG Ning-sheng^{1*}

(1. Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;
2. Guangxi Institute of Chinese Medicine & Pharmaceutical Science, Nanning 530022, China;
3. Department of Pharmacology, Shijiazhuang Medical College, Shijiazhuang 050081, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the fungicidal activity of the substance in peritoneal exudates from inflammatory fluid of abdominal cavity in rats infected by *Candida albicans*. **Method:** The model of severe abdominal cavity inflammation was prepared by intraperitoneal administration of *C. albicans* to rats. The peritoneal exudates were collected and the fungicidal activity of peritoneal exudation supernatant were determined. **Result:** The peritoneal exudation supernatant collected at 24 h possessed the most potent fungicidal activity. The fungicidal activity of 80% peritoneal exudation supernatant collected at 24 h was dramatically declined after incubated in 56 ℃ for 10 min. *C. albicans* morphology changed gradually and their color turned dark, their thalline was shrunk and their cell wall was degraded after treated by peritoneal exudation supernatant for 30 min, *C. albicans* color turned dark further, the thalline was smaller further, and then was expired due to disruption lastly. **Conclusion:** The supernatant of inflammatory peritoneal exudates from abdominal cavity inflammation rat models infected by *C. albicans* possess potent fungicidal activity against fungus, the substances may be unknown fungicidal protein/

[收稿日期] 20110113(013)

[基金项目] 广西科学基金(桂科自 0832231); 广西卫生厅重点项目(重 200707)

[作者简介] 韦桂宁, 硕士, 主管药师, 主要从事中药药理研究, E-mail: weiguining2004@163.com

[通讯作者] * 梁宁生, 博士, 博士生导师, 主要从事抗菌蛋白、抗肿瘤药物研究, E-mail: Liang01@163.com

[网络出版时间] 2011-03-21 11:35

peptide.

[Key words] *Candida albicans*; fungal inflammatory exudates supernatant; fungicidal protein/peptide

近年来,无论在国内还是国外,真菌感染率有上升的趋势,严重的威胁着人类的健康。其中的原因是多方面的,与广谱强效抗生素的广泛使用或滥用广谱抗生素引起菌群失调;因炎症、恶性肿瘤而长期使用免疫抑制剂、皮质类固醇激素、抗癌化疗药物;糖尿病和 HIV 感染等引起机体免疫功能下降;侵入性诊断治疗的广泛应用,以及肿瘤患者的放射治疗有密切关系^[1-3]。而且,相比起抗细菌感染药物来说,抗真菌药物存在种类少、选择性小、毒副作用大的缺点。故加紧研究和开发新型高效、低毒、广谱的抗真菌药物迫在眉睫。

多年来,人们对抗真菌药物的新药研究做了很多工作,但疗效好、副作用小、不易耐药的抗真菌新药能在临床上应用的还是不多。大多是通过已知抗菌药物改变剂型、对已知抗真菌药物进行结构改造,也取得了一定的成果,如制霉菌素的脂质体形式、伏立康唑等^[4-5],但是还远远不能满足临床的需要。脊椎动物天然拥有一整套高度特异性的、以细胞为核心的免疫系统外,还拥有一套由不同的抗菌蛋白/多肽组成的高效、广谱的防御系统。菌蛋白/多肽与传统的抗生素相比具有杀菌快速(传统抗生素杀菌时间以天来计算,抗菌肽以分钟或小时来计算)、广谱(包括对传统抗生素抗药性很强的病菌的抗菌性)、致病菌很难对其产生抗药性等优点^[6-7]。对这些抗菌蛋白/多肽的研究,可以从中得到这些抗真菌物质对真菌杀菌作用的相关信息,对新型抗真菌药物的研究将得到重要启示。

我们以常见的真菌如白色念珠菌 *Candida Albicans*,光滑念珠菌 *C. glabrata*,热带念珠菌 *C. tropicalis* 为研究目标,给大鼠 ip *C. albicans* 诱导产生真菌感染的炎症模型,然后收集腹腔炎症渗出液,经过离心得到上清液。研究腹腔炎症渗出液的上清液中杀菌物质杀灭真菌的能力,并观察上清液对 *C. albicans* 的杀菌过程,为天然新型抗真菌药物的研究提供信息。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠,体重(300 ± 50)g,雄性,由广西医科大学实验动物中心提供,动物许可证证号:SCXK(桂)2003-0003。

1.2 菌株 *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*,均来自广西医科大学微生物教研室。

1.3 试剂 RPMI 1640 液基,美国 Gibcobl 公司; LB 培养基粉,上海生工生物工程有限公司;沙保罗氏琼脂,杭州天和微生物制剂有限公司;牛血清白蛋白(BSA),武汉生命技术有限公司分装。

2 方法

2.1 大鼠真菌感染模型的建立 对数生长期 *C. albicans* 的制备,挑取少量菌种接种于新鲜 LB 培养液中,37 °C,190 r·min⁻¹ 振摇过夜。将过夜培养液按 1:100 接入新鲜 LB 培养液中,37 °C,190 r·min⁻¹ 振摇,5 h 后,将培养液取出,4 000 r·min⁻¹ 离心 50 s,弃上清液,用生理盐水稀释后吸光度法测定 *C. albicans* 菌液浓度,生理盐水稀释成所需的浓度,待用。

取 Wistar 大鼠 20 只,雄性,体重(300 ± 50)g,随机分为 2 组,即真菌腹腔感染组和正常对照组,每组 10 只。用生理盐水稀释 LB 培养液培养的 *C. albicans* 液,制成 1 × 10⁸ CFU·mL⁻¹ 菌量的混悬液,按 18 mL·kg⁻¹ 体重对大鼠 ip^[8],造成大鼠真菌感染,于 24 h 处死大鼠,打开腹腔,收取腹腔液,即真菌性腹腔炎症渗出液(渗出液)。将收集的腹腔液 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,收集上清液,即真菌性腹腔炎症渗出液上清液(上清液)。同时另设 ip 等体积生理盐水的空白对照组。

2.2 上清液的杀菌实验 根据文献[9],采用的是琼脂铺板计数法①取过夜培养的 *C. Albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* 菌液,按 1:50 加入新鲜 LB 培养液中,在 37 °C 摇床中振摇孵育 5 ~ 8 h(对数生长期)。②离心收集,分别将上清液与 *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*(均为 1 × 10⁶ CFU·mL⁻¹) 加入 RPMI1640 反应液中,总体积为 100 μL,混匀后置 37 °C 水浴。③2 h 后取出孵溶液 50 μL,加生理盐水 450 μL,连续 10 倍稀释,共 4 次。每 1 稀释倍数都取出 100 μL 的稀释液至无菌培养皿(直径 55 mm)中,再加入经高温消毒后 50 °C 保温的沙保罗氏琼脂培养基 5 mL,待琼脂冷却后,将培养皿放入约 37 °C 温箱培养。72 h 后取出并计算菌落形成数目(CFU),与未加入上清液的空白对照相比,计算不同

浓度上清液的杀菌率。

2.3 温度对上清液杀菌活性的影响 取上清液作成含 80% 上清液的反应体系,分别在 36 °C, 56 °C 水浴 10 min, 然后按方法 2.2 对 *C. albicans*, *C. tropicalis* 和 *C. glabrata* 分别做杀菌实验。

2.4 上清液对 *C. albicans* 的杀菌过程 根据文献 [24] 方法,取上清液做成含 80% 上清液的反应体系,在 37 °C, 40 倍显微镜下,观察 *C. albicans* 菌体形态的变化,照相记录菌体形态的变化。

2.5 统计学分析 应用 SPSS 11.0 系统软件进行方差分析统计处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 真菌性大鼠腹腔炎症渗出液的变化 给对照组大鼠 ip 生理盐水后,在 12 h 以后被腹腔完全吸收,因此 12 h 以后对照组大鼠收集不到腹腔渗出液,为对照观察感染组渗出液的情况,我们用 300 μL 生理盐水冲洗腹腔,然后收集冲洗液,作为对照组对感染组渗出液的细胞和蛋白渗出的观察。但在杀菌实验中不设对照组。感染组大鼠,24 h 有大量渗出液渗出 (5 100 μL),有大量白细胞渗出,感染组渗出液白细胞为 $(3.8 \pm 0.8) \times 10^7$ 个/mL,对照组为 $(1.2 \pm 0.2) \times 10^6$ 个/mL,以中性粒细胞为主;有大量蛋白渗出,感染组渗出液上清液的蛋白质量浓度为 $(42.3 \pm 11.6) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,对照组为 $(19.1 \pm 4.3) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。提示感染组大鼠渗出液中有大量蛋白渗出。

3.2 上清液对真菌的杀菌活性 感染组大鼠的上清液对 *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* 均有强大的杀菌作用,反应体系含 80% 的上清液时,上清液的杀菌率都在 93% 以上;当上清液被稀释 25 倍 (4%) 后,上清液的杀菌率仍在 56% 以上。上清液对 *C. albicans*, *C. tropicalis* 的杀菌活性稍强,但无显著差异。结果见表 1。

表 1 不同浓度的上清液对真菌的杀菌情况 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

菌 珠	杀 菌 率 / %		
	80% 上清液	20% 上清液	4% 上清液
<i>C. albicans</i>	98.37 \pm 1.68	88.74 \pm 9.31	64.21 \pm 24.30
<i>C. glabrata</i>	93.15 \pm 3.57	78.80 \pm 11.78	56.83 \pm 13.51
<i>C. tropicalis</i>	97.45 \pm 2.44	80.61 \pm 10.24	62.51 \pm 19.46

3.3 温度对上清液杀菌作用的影响 含 80% 上清液的反应体系经过 56 °C 水浴 10 min 后对 *C.*

albicans, *C. tropicalis* 和 *C. glabrata* 的杀菌作用几乎丧失。结果见表 2。

表 2 温度对上清液抗真菌作用的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

菌 珠	杀 菌 率 / %	
	37 °C	56 °C
<i>C. albicans</i>	98.37 \pm 1.68	8.71 \pm 3.42 ²⁾
<i>C. glabrata</i>	93.15 \pm 3.57	5.45 \pm 2.31 ²⁾
<i>C. tropicalis</i>	97.45 \pm 2.44	7.44 \pm 4.30 ²⁾

注:各组 and 相应的 37 °C 杀菌率比较²⁾ $P < 0.01$

3.4 上清液对 *C. albicans* 的杀菌作用 40 倍镜下观察,上清液对白色念珠菌杀菌过程中,上清液作用 30 min 后, *C. albicans* 菌体轮廓边淡,菌体明显变小,120 min 后,菌体破碎而死亡。

4 讨论

大鼠腹腔受到真菌感染刺激以后,产生免疫应答,引起感染的部位血管通透性增高,血流动力学改变,炎症细胞渗出,血浆渗入腹腔,产生大量腹腔渗出液,上清液中含有大量蛋白质。上清液对常见的致病真菌如 *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* 均有极强的杀菌作用,且杀菌作用受到温度的影响,56 °C 可以影响到其对真菌的杀菌活性。上清液对 *C. albicans* 的作用后,菌体缩小,最后菌体破碎而死亡。这提示,上清液中存在强的抗真菌物质,其对真菌有着强的杀菌作用可能是通过影响微生物细胞膜直接作用,改变其通透性,造成膜的物理性损伤,导致细胞内容物外渗而死亡。

目前知道,渗出液中具有杀菌活性(包括细菌和真菌)的主要成分有两类,一类是细胞,一类是蛋白/多肽^[10-12]。细胞外的液体(上清液)存在多种抗菌蛋白/多肽,它们主要是通过与带负电的微生物细胞膜直接作用,改变其通透性,造成膜的物理性损伤,导致细胞内容物外渗而死亡。它们以独特的作用机制发挥作用^[13-14],有可能避免现在临床上使用的抗真菌药物容易产生耐药的问题,有着比常用抗真菌药物没有的优点。我们的研究表明,上清液的杀菌活性受到温度的影响,56 °C 可以显著影响到其杀菌活性,这和体内已知的抗菌蛋白/肽的性质不符^[14]。提示,上清液中的抗真菌物质可能是未被关注或未发现的抗菌蛋白/肽。

上清液中抗菌蛋白/肽,其来源及性质,肽链的结构和性质,能否人工改造或合成,很值得进一步研究,这也为抗真菌药物的开发提供信息。

[参考文献]

- [1] Popa L G, Popa M I, Mihai I R. Case-control study to evaluate the link between immunosuppression and *Candida spp* infection [J]. Roum Arch Microbiol Immunol, 2005, 64(1/4):72.
- [2] Pasticci M B, Barchiesi F, Fallani S, et al. Clinical efficacy and tolerability of caspofungin in a renal transplant patient with *Aspergillus flavus* lung infection: case report [J]. J Chemother, 2006, 18(5):549.
- [3] Limper A H, Knox K S, Sarosi G A, et al. An official american thoracic society statement: treatment of fungal infections in adult pulmonary and critical care patients [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 183(1):96.
- [4] Johnson E M, Qjwang J O, Szekely A, et al. Comparison of *vitro* antifungal activities of free and liposome-encapsulated nystatin with those of four amphotericin B formulation [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42(6):1412.
- [5] Ullmann A J. Review of the safety, tolerability and drug interaction of the new antifungal agents caspofungin and voriconazole [J]. Curr Med Res Opin, 2003, 19(4):263.
- [6] Yamasaki K, Gallo R L. Antimicrobial peptides in human skin disease [J]. Eur J Dermatol, 2008, 18(1):11.
- [7] Gill D, Nicholas B, Aaron W, et al. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense [J]. Curr Pharm Des, 2009, 15(21):2377.
- [8] Mack P. Clinician's guide to experimental surgery [M]. Singapore: Image Medicus, 1994:26.
- [9] Weinrauch Y A, Bad C, Liang N S, et al. Mobilization of potent plasma bactericidal activity during systemic bacterial challenge. Role of group II_A phospholipase A2 [J]. J Clin Invest, 1998, 102(3):633.
- [10] Bobek L A, Situ H. MUC7 202Mer: investigation of antimicrobial activity, secondary structure, and possible mechanism of antifungal action [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(2):643.
- [11] Sneh L, Sharma B K, Raghava G P. Analysis and prediction of antibacterial peptides [J]. BMC Bioinformatics, 2007, 23(8):263.
- [12] Yang D, Chertov O, Oppenheim J J. The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity [J]. Cell Mol Life Sci, 2001, 58(7):978.
- [13] Park Y, Lee D G, Jang S H, et al. A Leu-Lys-rich antimicrobial peptide: activity and mechanism [J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1645(2):172.
- [14] Edwards S W. Biochemistry and physiology of neutrophil [M]. Cambridge University, 1994:68.

[责任编辑 聂淑琴]