

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00132

蒺藜中甾体皂苷 TTS-12 对白念珠菌生物被膜形成的抑制作用

陆文铨¹, 曹颖琪², 陈海生³, 姜远英^{2*}

- 1. 第二军医大学长征医院药学部, 上海 200003
- 2. 第二军医大学药学院新药研究中心, 上海 200433
- 3. 第二军医大学药学院天然药物化学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 观察蒺藜甾体皂苷类化合物 TTS-12 对白念珠菌生物被膜形成的影响, 探讨其可能的作用机制。 **方法** 采用激光共聚焦显微镜观察 TTS-12 对白念珠菌生物被膜生长形态的影响; 采用 XTT 法考察不同浓度 TTS-12 对白念珠菌生物被膜形成的影响; 应用光密度值测定及实时定量 RT-PCR(real-time RT-PCR)法考察不同浓度 TTS-12 对白念珠菌细胞表面疏水性(cell surface hydrophobicity, CSH)及相关基因表达的影响。 **结果** 与未加 TTS-12 的正常对照细胞相比, 经 TTS-12 处理的白念珠菌生物被膜结构疏松, TTS-12 可剂量依赖性地抑制白念珠菌生物被膜的形成, 其生长动力学及细胞表面疏水性值下降, CSH1 基因表达水平降低($P < 0.01$)。 **结论** TTS-12 可能通过降低白念珠菌 CSH1 基因表达来抑制白念珠菌生物被膜的形成。

[关键词] 白念珠菌; 生物被膜; 蒺藜; TTS-12; 细胞表面疏水性

[中图分类号] R 978.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)02-0132-04

Inhibitory effects of *Tribulus terrestris* L. steroid saponin TTS-12 on formation of *Candida albicans* biofilm

LU Wen-quan¹, CAO Ying-ying², CHEN Hai-sheng³, JIANG Yuan-ying^{2*}

- 1. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
- 2. Department of New Drug Research Center, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
- 3. Department of Natural Product Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the influence of TTS-12, a steroid saponin from *Tribulus terrestris* L., on the formation of *Candida albicans* biofilm, and to discuss the possible mechanism. **Methods** The inhibition of *C. albicans* biofilm formation by TTS-12 was observed by confocal scanning laser microscopy; XTT method was used to investigate the influence of different concentrations of TTS-12 on *C. albicans* biofilm formation. The water-hydrocarbon two-phase assay was used to measure the cell surface hydrophobicity of *C. albicans* treated with different concentrations of TTS-12. The expression of CSH1 mRNA was measured by real-time RT-PCR. **Results** Compared with control group, TTS-12 treatment resulted in loose *C. albicans* biofilm, and it dose-dependently inhibited *C. albicans* biofilm formation. The cell surface hydrophobicity in the TTS-12-treated groups was lower than that in the control group; consistent with this, TTS-12-treated cells also expressed significantly lower levels of CSH1 mRNA than cells in control group ($P < 0.01$). **Conclusion** TTS-12 may inhibit the formation of *C. albicans* biofilm through inhibiting CSH1 gene expression.

[Key words] *Candida albicans*; biofilm; *Tribulus terrestris*; TTS-12; cell surface hydrophobicity

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(2): 132-135]

蒺藜(*Tribulus terrestris* L.)即蒺藜科蒺藜属植物蒺藜,其果实为传统中药材,具有平肝解郁、活血祛风、明目、下气、补肾益精的功用,有降压、利尿、抗炎、抗真菌、抗肿瘤、性强壮和增强的活性。TTS-12 是从刺蒺藜中提取的甾体皂苷类化合物,结构为替告皂苷元-3-O-β-D-吡喃木糖(1→2)-[β-D-吡喃木

糖(1→3)]-[β-D-吡喃葡萄糖(1→4)]-[α-L-吡喃鼠李糖(1→2)]-β-D-吡喃半乳糖苷(图 1),具有很强的抗真菌活性^[1-3]。白念珠菌是医院内感染的主要真菌,从静脉导管中分离到白念珠菌的患者约 40%有潜在的真菌感染,导管相关的念珠菌感染患者病死率近 40%^[4-7]。白念珠菌可在体内植入的人工器官或导

[收稿日期] 2009-06-04 **[接受日期]** 2009-12-23

[作者简介] 陆文铨, 博士, 主管药师. E-mail: lwqp@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81871357, E-mail: jiangyy2006smmu@yahoo.com.cn

管等惰性物质或其他生物表面形成黏滑的膜,即生物被膜(biofilm),导致真菌对一些临床常用抗真菌感染药物产生高度耐药性,导致许多系统性、反复性临床感染的产生^[8-9]。因此,本研究观察 TTS-12 对白念珠菌生物被膜形成的影响并探讨其可能的作用机制,为后续研究奠定基础。

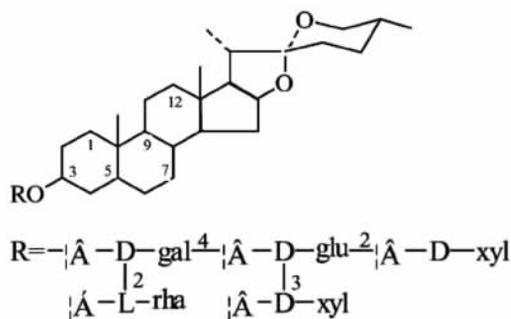


图 1 TTS-12 的化学结构

Fig 1 Chemical structure of TTS-12

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 TTS-12 由第二军医大学药学院天然药物化学教研室制备(纯度为 99.6%),用 DMSO 配成所需浓度。XTT 购自 Sigma 公司, FUN-1 和 ConA 购自 Molecular Probe 公司, 2 × SYBR Premix ExTaq 购自 TaKaRa 公司。Eppendorf 5417R 高速冷冻离心机(Eppendorf), Biofuge Stratos 高速冷冻离心机(Heraeus), MJX 型智能霉菌培养箱(宁波江南仪器厂制造), 激光共聚焦显微镜(Leica TCS sp2), LightCycler System 实时定量 RT-PCR 仪, GeneQuant II 核酸定量分析仪。

1.2 菌株及培养液 白念珠菌国际标准株 SC5314 由 William A. Fonzi(Department of Microbiology and Immunology, Georgetown University, Washington D. C.) 惠赠。RPMI 1640 培养液: RPMI 1640 (Gibco BRL 公司) 10 g, NaHCO₃ 2 g, 吗啡啉丙磺酸(morpholine propanesulfonic acid, MOPS, Sigma 公司) 34.5 g, 加蒸馏水 900 ml 溶解, 用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0, 蒸馏水加至 1 000 ml, 滤过消毒, 4℃ 保存。YPD 培养液: 酵母浸膏 10 g, 蛋白胨 20 g, 葡萄糖 20 g, 加蒸馏水 900 ml 溶解, 蒸馏水加至 1 000 ml, 高压灭菌后 4℃ 保存。

1.3 白念珠菌的培养及生物被膜的形成 按照文献^[10]方法进行白念珠菌的培养。自含有新鲜生长白念珠菌的 YPD 琼脂平板上挑取单克隆接种于

YPD 培养基, 30℃ 振荡培养过夜(约 16 h)。次日离心收集细胞, PBS 洗涤 3 次, 重悬于 RPMI 1640 培养基, 以血球计数板计数, 调整细胞密度至 1.0×10^6 /ml, 加入塑料组织培养瓶或培养板内, 37℃ 静置 1 h, 弃上清, 重新加入 RPMI 1640, 37℃ 孵育 48 h。根据重新加入 RPMI 1640 中含或不含 TTS-12 将细胞分为不同浓度 TTS-12 处理组和正常对照组。

1.4 激光共聚焦显微镜(CSLM)观察真菌表面生物被膜 为比较正常的及经 TTS-12(4 μg/ml)处理的白念珠菌生物被膜形态差异, 将白念珠菌在塑料培养板中按照生物被膜形成条件培养 48 h 后, 加入含有 10 μmol/L FUN-1(可被具代谢活性的细胞转变成橙红色, 染胞质)和 25 μg/ml ConA(可结合白念珠菌细胞壁多糖上的葡萄糖和甘露糖残基发出绿色荧光, 染胞壁)的 PBS, 37℃ 孵育 45 min, 以激光共聚焦显微镜观察生物被膜形成状况。

1.5 XTT 法测定生物被膜的生长动力学 采用 XTT 法^[10]检测白念珠菌生物被膜的生长动力学。XTT 是一种 MTT 类似的四唑氮衍生物, 该化合物是线粒体脱氢酶的作用底物, 可被活细胞线粒体脱氢酶还原成水溶性的棕色甲产物, 甲产物的光密度值与活细胞的数量成正比。取经 0.5、1、2、4、8、16 μg/ml TTS-12 处理并培养的白念珠菌生物被膜, PBS 洗去未黏附细胞, 加入 XTT-甲萘醌溶液, 于 37℃ 黑暗中放置 2 h, 用酶标仪 492 nm 处测定光密度值, 以未加 TTS-12 的正常培养细胞作为正常对照。

1.6 细胞表面疏水性(cell surface hydrophobicity, CSH)的测定 白念珠菌细胞表面疏水性采用水-烃两相测定实验^[11]。刮取经 TTS-12(0、0.5、1、2、4、8、16 μg/ml)处理的细胞, 以 YPD 制备成悬液($D_{600}=1.0$), 每组取 1.2 ml 悬液置于一洁净玻璃管内, 加入 0.3 ml 正辛烷。旋涡混匀 3 min, 静置待两相分离。两相分离后立即测定水相的 D_{600} 值。以不加正辛烷的 YPD 培养基的 D_{600} 值作为阴性对照。CSH 计算方法为: 相对疏水性 = (D_{600} 对照 - D_{600} 实验) / D_{600} 对照。

1.7 实时定量 RT-PCR 检测 CSH1 基因的表达 采用一步法抽提经 0、0.5、1、2、4、8 μg/ml TTS-12 处理的白念珠菌总 RNA^[12], 检测 D_{260} 和 D_{280} 值, 考察所抽提 RNA 的质量, 并反转录成 cDNA。实时定量 RT-PCR 循环参数为: 95℃ 10 s (变性), 60℃ 20 s (退火), 72℃ 15 s (延伸), 重复 40 个循环。溶解

曲线(melting curve program)使用 60~95℃,加热速率为 0.1℃/s。以 18S rRNA 作为内参,结果应用软件 LightCycler system software version 3.5 (Roche Diagnostics)进行分析。基因表达水平用倍数变化来表示($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法)。目的基因 CSH1 上游引物:5'-ATT CAT CTC CAT GCA AAG TC-3',下游引物:5'-ACC ACC GTT TGG AGA CCA AG-3';内参 18S rRNA 上游引物:5'-TCT TTC TTG ATT TTG TGG GTG G-3',下游引物:5'-TCG ATA GTC CCT CTA AGA AGT G-3'。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 12.0 统计软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,实验结果均来自至少 3 组平行或 3 次重复实验。

2 结果

2.1 白念珠菌生物被膜的形态观察 激光共聚焦显微镜(图 2)观察显示:正常白念珠菌生物被膜中含有大量菌丝;经 4 $\mu\text{g/ml}$ TTS-12 处理后的生物被膜明显受到抑制,结构疏松,菌丝成分明显减少,极易从附着物上脱落。

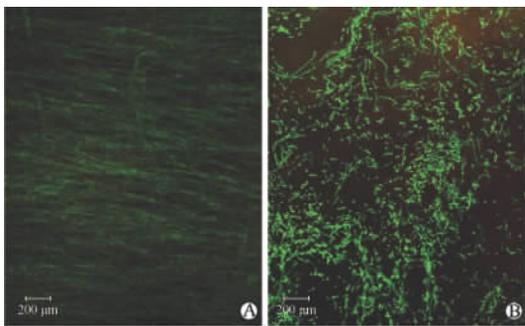


图 2 TTS-12 对白念珠菌生物被膜形态的影响

Fig 2 Effect of TTS-12 on *C. albicans* biofilm formation

A: Normal *C. albicans* biofilm; B: Cells treated with 4 $\mu\text{g/ml}$ TTS-12

2.2 白念珠菌生物被膜生长动力学检测结果 XTT 测定结果(图 3)表明:随着 TTS-12 浓度的增加,其对生物被膜形成的抑制能力增强,0.5 $\mu\text{g/ml}$ TTS-12 对生物被膜无明显抑制作用,1 $\mu\text{g/ml}$ TTS-12 对白念珠菌生物被膜的抑制率为 20%,16 $\mu\text{g/ml}$ TTS-12 对白念珠菌生物被膜的抑制率达 80%以上($P < 0.01$)。

2.3 白念珠菌细胞表面疏水性及 CSH1 基因的表达结果 CSH 检测结果(图 4A)表明:在 TTS-12 浓度为 16 $\mu\text{g/ml}$ 时,白念珠菌的 CSH 值(0.09)最小,随着 TTS-12 浓度的降低,CSH 值逐渐增大,呈现出剂量依赖性,经 0.5 $\mu\text{g/ml}$ TTS-12 处理的白念珠菌 CSH 值

为 0.88。实时定量 RT-PCR 检测结果(图 4B)表明:与正常对照组(0 $\mu\text{g/ml}$)相比,0.5、1、2、4、8 $\mu\text{g/ml}$ TTS-12 处理组白念珠菌 CSH 相关基因 CSH1 mRNA 表达水平明显下降,差异具有显著统计学意义($P < 0.01$),且抑制作用具有剂量依赖性。

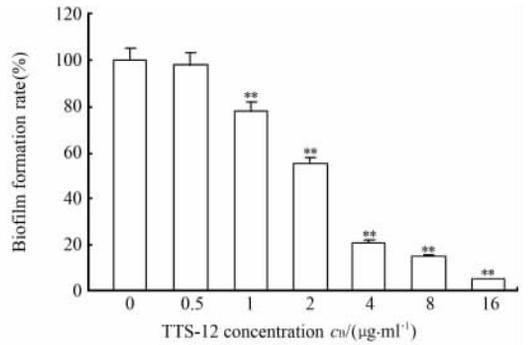


图 3 不同浓度 TTS-12 对白念珠菌生物被膜生长动力学的影响

Fig 3 Effects of different concentrations of TTS-12 on *C. albicans* biofilm formation

** $P < 0.01$ vs the compound free group (0 $\mu\text{g/ml}$); $n = 3, \bar{x} \pm s$

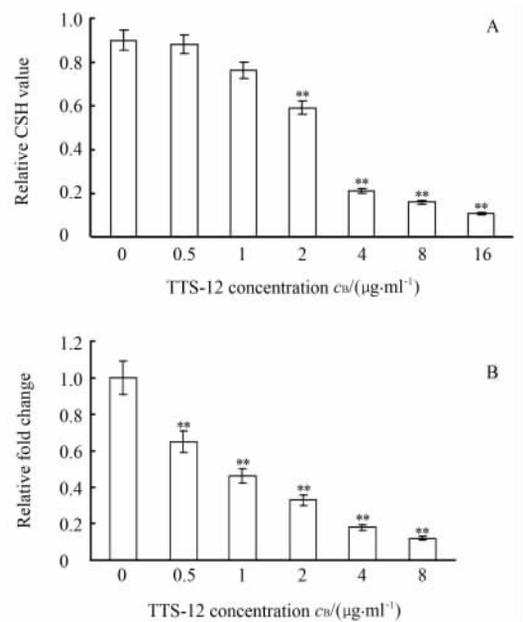


图 4 不同浓度 TTS-12 对白念珠菌细胞表面疏水性(A)及 CSH1 基因表达(B)的影响

Fig 4 Effects of different concentrations of TTS-12 on CSH of *C. albicans* biofilm(A) and expression of CSH1 gene in *C. albicans*(B)

** $P < 0.01$ vs the compound free group (0 $\mu\text{g/ml}$); $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

生物被膜是微生物以某些惰性物质或生物材料为依托产生的一种群体生长方式,这种生长方式有助于微生物抵御外界不利因素的影响,对抗药物的杀伤

作用,是微生物中普遍存在的生长方式。研究表明,以生物被膜形式生长的白念珠菌对氟康唑、酮康唑、咪康唑及两性霉素 B 等临床常用抗真菌药物敏感性大大降低,使抗真菌感染的治疗面临严峻挑战。近年来,从天然产物中寻找新的抗真菌药物已成为重要的研究方向,我们前期研究发现,TTS-12 具有抗真菌作用,可抑制浮游型白念珠菌生长^[7-9]。本研究结果也显示,TTS-12 对生物被膜型白念珠菌亦具有抑制作用,且抑制作用具有剂量依赖性。

白念珠菌生物被膜形成主要包括:黏附、生物被膜生长及成熟,其中细胞的起始黏附对生物被膜的形成非常重要。CSH 是白念珠菌重要的毒力因子之一,在白念珠菌生物被膜形成中起重要作用,CSH 值越大,生物被膜形成能力越强^[13-14]。CSH1 基因编码一种细胞表面疏水性相关蛋白,是第一个被发现的可影响白念珠菌 CSH 表型的候选基因,敲除该基因后白念珠菌的细胞表面疏水性下降^[15]。本研究测定了经不同浓度 TTS-12 处理的白念珠菌生物被膜的 CSH,结果表明,所用的 TTS-12 浓度越大,CSH 值越小,CSH1 基因表达水平越低,提示 CSH1 表达水平下降而导致的细胞表面疏水性降低可能是 TTS-12 抑制白念珠菌生物被膜形成的分子机制之一。

[参考文献]

[1] Zhang J D, Cao Y B, Xu Z, Sun H H, An M M, Yan L, et al. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the eight steroid saponins from *Tribulus terrestris* L. with potent activity against fluconazole-resistant fungal pathogens[J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28: 2211-2215.

[2] Zhang J D, Xu Z, Cao Y B, Chen H S, Yan L, An M M, et al. Antifungal activities and action mechanisms of compounds from *Tribulus terrestris* L[J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 103: 76-84.

[3] 张军东, 陈海生, 曹永兵, 徐 铮, 高平辉, 阎 澜, 等. 天然产物

T12 抗真菌作用及其机制研究[J]. *中国新药杂志*, 2004, 13: 1110-1114.

[4] Nicastrì E, Petrosillo N, Viale P, Ippolito G. Catheter-related bloodstream infections in HIV-infected patients[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 946: 274-290.

[5] O'Toole G, Kaplan H B, Kolter R. Biofilm formation as microbial development[J]. *Annu Rev Microbiol*, 2000, 54: 49-79.

[6] Anaissie E J, Rex J H, Uzun O, Vartivarian S. Predictors of adverse outcome in cancer patients with candidemia [J]. *Am J Med*, 1998, 104: 238-245.

[7] Kuhn D M, George T, Chandra J, Mukherjee P K, Ghannoum M A. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms; unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46: 1773-1780.

[8] Chandra J, Mukherjee P K, Leidich S D, Faddoul F F, Hoyer L L, Douglas L J, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro* [J]. *J Dent Res*, 2001, 80: 903-908.

[9] Ramage G, Vandewalle K, Wickes B L, López-Ribot J L. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans* [J]. *Rev Iberoam Microcol*, 2001, 18: 163-170.

[10] Chandra J, Kuhn D M, Mukherjee P K, Hoyer L L, McCormick T, Ghannoum M A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*, development, architecture, and drug resistance [J]. *J Bacteriol*, 2001, 183: 5385-5394.

[11] Klotz S A, Drutz D J, Zajic J E. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces [J]. *Infect Immun*, 1985, 50: 97-101.

[12] Wang Y, Cao Y Y, Jia X M, Cao Y B, Gao P H, Fu X P, et al. Cap1p is involved in multiple pathways of oxidative stress response in *Candida albicans* [J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, 40: 1201-1209.

[13] Reynolds T B, Fink G R. Baker's yeast, a model for fungal biofilm formation [J]. *Science*, 2001, 291: 878-881.

[14] Li X, Yan Z, Xu J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans* [J]. *Microbiology*, 2003, 149 (Pt 2): 353-362.

[15] Singleton D R, Masuoka J, Hazen K C. Cloning and analysis of a *Candida albicans* gene that affects cell surface hydrophobicity [J]. *J Bacteriol*, 2001, 183: 3582-3588.

[本文编辑] 贾泽军