



中药蛭螬多肽 Probrelin 抗白色念珠菌活性研究

胡平, 赵卓冉, 袁亚萍, 李莎莎, 景晓愿, 李钟杰*

河南科技大学基础医学院, 河南 洛阳 471003

摘要:【目的】研究蛭螬多肽 Probrelin 对白色念珠菌的抗菌活性。【方法】采用肉汤稀释法测定蛭螬多肽 Probrelin 对正常菌株及临床耐药菌株的最小抑菌浓度, 同时结合平板计数法测定最小杀真菌浓度; 通过不同浓度多肽处理后经平板计数绘制时间-杀菌动力学曲线; 通过 PI 吸收实验检测多肽对白色念珠菌细胞膜完整性的影响; 通过核酸阻滞实验检测多肽与核酸间是否具有结合作用; 通过扫描电子显微镜检测多肽对白色念珠菌形态的影响; 通过结晶紫染色法检测多肽对生物膜生成及成熟生物膜的影响; 通过显微镜观察多肽对白色念珠菌菌丝形成的影响; 通过棋盘法检测多肽与抗真菌药物间的相互效应; 通过小鼠皮下感染模型检测多肽在生理条件下的抗白色念珠菌活性。【结果】蛭螬多肽 Probrelin 对正常菌株及临床耐药菌株的最小抑菌浓度均为 100 $\mu\text{g/mL}$, 最小杀真菌浓度为 100–200 $\mu\text{g/mL}$, 且对白色念珠菌的杀菌动力学具有时间和浓度依赖性; 该多肽以浓度依赖性的方式影响白色念珠菌细胞膜的完整性, 并通过破坏白色念珠菌细胞壁的结构影响其形态, 但与核酸间不具有结合作用; 该多肽既可抑制白色念珠菌生物膜的形成, 又可清除成熟生物膜, 同时还可抑制白色念珠菌菌丝的形成; 该多肽与抗真菌药物 Clotrimazole 间具有协同效应; 在小鼠皮下感染模型中, 该多肽可以有效杀灭白色念珠菌, 进而抑制感染。【结论】蛭螬多肽 Probrelin 对白色念珠菌具有良好的抑制杀灭活性, 可以作为新的药物分子或模板分子用于抗白色念珠菌药物的研发。

关键词: 中药, 抗微生物多肽, 白色念珠菌, 生物膜, 协同效应

白色念珠菌作为人体正常菌群的成员, 主要存在于人类皮肤、胃肠道、呼吸道和泌尿生殖道中, 而在个体免疫力低下或者免疫缺陷时可引起阴道浅部感染以及口腔粘膜感染, 在适当情况下也会进入血液系统而导致深层组织感染^[1–2]。近年

来, 由于抗菌药物的大量及不规范使用, 导致白色念珠菌耐药率逐年升高, 而由耐药菌株引起的感染的治疗难度都大大增加^[1–3]。因此, 急需新型有效的抗白色念珠菌新药物分子。

抗微生物多肽为新型有效的抗白色念珠菌药

基金项目: 国家自然科学基金(81703475); 河南省大学生创新创业训练计划(202010464056)

*通信作者。E-mail: sui_feng5217@126.com

收稿日期: 2021-02-06; 修回日期: 2021-04-13; 网络出版日期: 2021-09-08

物的研发提供了新的策略。作为新型抗菌药物候选分子中的明星分子,抗微生物多肽不仅具有广谱的抗微生物活性,对耐药菌株也有很好的抑制杀灭作用^[4]。抗微生物多肽主要通过破坏细胞膜来抑制杀灭病原微生物,也可通过作用于多靶点的方式来抑制杀灭病原微生物,并能够抑制生物膜的形成或者破坏生物膜,还具有免疫调节作用,进而清除入侵病原微生物^[5-8]。目前,有众多的抗微生物多肽药物处于临床研究阶段,并展现出良好的应用前景^[9]。

我国的中药资源蕴含着巨量的药物活性分子,而其中的动物类药物是获得抗微生物多肽的良好资源。蛭蟥,金龟甲总科幼虫的统称,中医多用于治疗疼痛、丹毒、疮疡、痔漏等症,现代研究表明,蛭蟥具有抗肿瘤、抗氧化、抗病毒和抗菌作用^[10-11]。在前期的研究中,我们对蛭蟥物种白星花金龟(*Protaetia brevitarsis* Lewis)的转录组学进行了分析^[12]。进一步通过与抗微生物多肽数据库对比,我们从中获得一条潜在的抗微生物多肽 Probrelin (TRGVLQEFLKAVLR)。本研究中,针对抗微生物多肽 Probrelin 的抗白色念珠菌正常菌株及临床耐药菌株的最小抑菌浓度及最小杀真菌浓度进行测定,利用 PI 吸收实验观察其对白色念珠菌细胞膜完整性的影响,探究其对白色念珠菌生物膜形成及成熟生物膜的影响,并利用棋盘法探究其与抗真菌药物间的效应。通过本研究,旨在探究蛭蟥抗微生物多肽 Probrelin 抗白色念珠菌的有效性,以期为抗白色念珠菌药物的研发及治疗提供新的解决思路。

1 材料和方法

1.1 材料

白色念珠菌(*Candida albicans*) AY93025 购买

于中国典型培养物保藏中心,白色念珠菌临床耐药菌株 CR-1、CR-2、CR-3、CR-4 及 CR-5 为本实验保藏菌种。蛭蟥多肽 Probrelin (氨基酸序列: TRGVLQEFLKAVLR; 纯度: >95%; 修饰: C 端酰胺化)由上海吉尔生化有限公司合成。酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(Yeast Extract Peptone Dextrose Medium, YPD)购买于青岛海博生物技术有限公司,结晶紫、碘化丙啶(propidium iodide, PI)及 2.5% 电镜固定液购买于北京索莱宝科技有限公司,96 孔细胞培养板及细菌培养皿购买于耐思生物科技有限公司。抗生素 Clotrimazole、Amphotericin B、Nystatin 及 Anidulafungin 购买于上海源叶生物科技有限公司。

1.2 最小抑菌浓度及最小杀真菌浓度检测

多肽对白色念珠菌的抑制活性参照临床和实验室标准协会(CLSI)的标准采取微量稀释法进行检测^[13]。将冻存于-80 °C 的白色念珠菌接种于 YPD 培养基,置于 35 °C 培养摇床 250 r/min 的摇速下培养至对数生长期。用培养基将菌浓度调至 10^3 – 10^4 CFU/mL,并将多肽用无菌的生理盐水等梯度稀释。在无菌的 96 孔培养板中,每孔加入 80 μ L 上述稀释的菌液和 20 μ L 上述稀释的多肽溶液,每个多肽浓度设置 3 个平行。将 96 孔培养板置于摇床中培养 24 h,将不能观察到菌生长的多肽浓度定义为最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。同时,从菌不能生长的多肽浓度孔取样涂布 YPD 平板,35 °C 培养箱培养 24 h,统计菌落数,将菌落数低于初始菌落数 0.1% 的多肽浓度定义为多肽的最小杀真菌浓度(minimum fungicidal concentration, MFC)。

1.3 杀菌动力学检测

将白色念珠菌 AY93025 培养至对数生长期,

用培养基将菌浓度调至 10^4 – 10^6 CFU/mL。将稀释好的菌液与多肽孵育, 使得多肽的终浓度分别为 1、2、4 MIC, 并以生理盐水为阴性对照。分别在时间点 0、0.25、0.50、1.00 h 取样, 梯度稀释后涂布平板。将平板置于 35 °C 培养箱培养 24 h, 统计菌落数, 绘制杀菌动力学曲线。

1.4 PI 吸收实验

将白色念珠菌 AY93025 培养至对数生长期, 用培养基将菌浓度调至 1×10^5 – 5×10^5 CFU/mL。将稀释好的菌液与多肽孵育, 使得多肽的终浓度分别为 1/2、1、2 MIC, 并以生理盐水为阴性对照, 同时加入 PI (终浓度为 5 μ g/mL), 35 °C 避光孵育 0.5 h。用 PBS 洗涤细胞并重悬, 利用荧光显微镜观察, 统计并计算荧光阳性细胞比例。

1.5 核酸阻滞实验

将不同浓度多肽分别与 300 ng 质粒 pET-28a 的环状及线状(经 *EcoR* I 及 *Xho* I 双酶切)、单链 DNA (鲑鱼精子 DNA, 索莱宝)在超纯水中混合均匀, 使得多肽与质粒的质量比分别为 40:1、20:1、10:1、5:1, 同时以单质粒为对照。混合体系在室温条件下孵育 30 min, 1.5%琼脂糖凝胶电泳, 检测核酸迁移阻滞情况。

1.6 扫描电子显微镜检测

将白色念珠菌 AY93025 培养至对数生长期, 35 °C 条件下与多肽孵育 30 min, 多肽的终浓度 4 MIC, 并以生理盐水为阴性对照。离心收集菌体并用 PBS 洗涤, 菌体用 2.5%的电镜固定液进行固定, 然后用酒精系列脱水干燥, 用扫描电镜 (JSM-6390LV)进行观察。

1.7 体外生物膜检测

将白色念珠菌 AY93025 培养至对数生长期,

用培养基将菌浓度调至 1×10^6 – 5×10^6 CFU/mL, 取 100 μ L 稀释好的菌液加入无菌的 96 孔培养板中, 35 °C 静置培养 4 h (生物膜早期形成)或者 24 h (成熟生物膜)。去除培养基并用 PBS 洗去游离的菌体, 加入含有多肽的新培养基, 同时以不含多肽为对照组, 35 °C 静置培养 24 h。去除培养基并用 PBS 洗去游离的菌体, 加入 0.1%的结晶紫溶液染色 10 min。去除染液并用无菌水洗去多余的染液, 每孔加入 150 μ L 的 33%乙酸, 室温孵育 30 min 后每孔取出 100 μ L 于新的 96 孔板中, 酶标仪测 492 nm 光吸收值, 计算生物膜形成抑制率(生物膜早期形成)或清除率(成熟生物膜)。

1.8 菌丝形成实验

将白色念珠菌 AY93025 培养至对数生长期, 用 PBS 洗涤, 再用含有 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基重悬并调菌浓度至 10^5 – 10^6 CFU/mL, 37 °C 条件下与多肽孵育 4 h, 多肽的终浓度 1/2 MIC, 并以生理盐水为阴性对照。利用显微镜进行拍摄, 观察白色念珠菌菌丝形成情况。

1.9 协同效应检测

利用棋盘法检测多肽与抗真菌药物间的抗白色念珠菌 AY93025 效应。将多肽用含有抗生素的生理盐进行梯度稀释, 检测混合体系下多肽的 MIC (cMIC), 其中抗生素的最终浓度为 1/4 MIC, 计算部分抑菌浓度指数(the fractional inhibitory concentration index, FICI)。FICI 的计算公式为: $FICI = cMIC_A / MIC_A + cMIC_B / MIC_B$ 。FICI ≤ 0.5 为协同, $0.5 < FICI < 4$ 为无作用, FICI > 4 为拮抗^[14]。

1.10 小鼠皮下感染模型

为了评估多肽在体内的抗白色念珠菌活性, 构建了小鼠皮下感染模型^[15]。雄性 Balb/c 小鼠

(SPF, 20–25 g), 每组 6 只。小鼠剔除背部毛并用 75%酒精消毒处理, 然后每只小鼠注射 50 μL 经生理盐洗涤并重悬的对数生长期的白色念珠菌 AY93025 (10^7 CFU/mL)。感染 1 h 后分别在感染部位皮下注射 50 μL 的生理盐(阴性对照组)及多肽 (0.5 mg/mL)。每 24 小时给药 1 次, 连续给药 3 d。第 4 天取感染部位皮肤组织, 经匀浆及梯度稀释后涂布平板, 计算组织菌载量。

2. 结果和分析

2.1 活性检测

利用肉汤稀释法测定蛭蟾多肽 Probrelin 对白

色念珠菌正常菌株及临床耐药菌株的最小抑制浓度, 结果如表 1 所示。蛭蟾多肽 Probrelin 对白色念珠菌 AY93025 及临床耐药菌株 CR 的 MIC 均为 100 $\mu\text{g/mL}$, MFC 为 100–200 $\mu\text{g/mL}$ 。这些结果表明, 蛭蟾多肽 Probrelin 对白色念珠菌敏感菌株及其临床耐药菌株均具有抑制杀灭活性。

2.2 杀菌动力学

为了探究蛭蟾多肽 Probrelin 的杀菌模式, 选择白色念珠菌 AY93025 为模式菌株, 对其进行杀菌动力学检测。通过图 1 可以看出, 经 1 MIC 蛭蟾多肽 Probrelin 处理 1 h, 白色念珠菌的菌落数只有轻微的下降; 经 2 MIC 蛭蟾多肽 Probrelin 处理

表 1. 蛭蟾多肽 Probrelin 的抗白色念珠菌活性

Table 1. Activity of probrelin against *Candida albicans*

Strains	MIC/($\mu\text{g/mL}$)	MFC/($\mu\text{g/mL}$)
<i>Candida albicans</i> AY93025	100	200
<i>Candida albicans</i> clinical resistant strain CR-1	100	200
<i>Candida albicans</i> clinical resistant strain CR-2	100	100
<i>Candida albicans</i> clinical resistant strain CR-3	100	100
<i>Candida albicans</i> clinical resistant strain CR-4	100	100
<i>Candida albicans</i> clinical resistant strain CR-5	100	100

MIC: minimum inhibitory concentrations; MFC: minimum fungicidal concentrations.

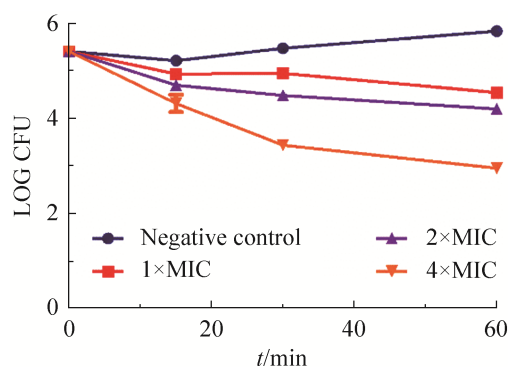


图 1. 蛭蟾多肽 Probrelin 对白色念珠菌 AY93025 的杀菌动力学

Figure 1. Time-killing kinetics of probrelin against *C. albicans* AY93025. Negative control: saline; MIC: minimum inhibitory concentrations; LOG CFU: \log_{10} (CFU/mL).

0.5 h, 白色念珠菌的菌落数下降约一个数量级; 而经 4 MIC 蛭蟾多肽 Probrelin 处理 0.5 h, 白色念珠菌的菌落数下降约两个数量级。从图 1 中同样可以看出, 蛭蟾多肽 Probrelin 对白色念珠菌的杀菌模式具有时间和浓度依赖性。

2.3 PI 吸收检测

为了探究蛭蟾多肽 Probrelin 是否会破坏细胞膜, 白色念珠菌 AY93025 经多肽处理并进行 PI 染色。通过图 2 及图 3 可以看出, 与对照组相比, 随着多肽浓度的升高, 荧光阳性细胞数逐渐增多。1/2 MIC 多肽浓度处理组荧光阳性细胞数占比仅为 0.88%, 1 MIC 多肽浓度处理组荧光阳性细胞数

占比为 10.08%, 2 MIC 多肽浓度处理组荧光阳性细胞数占比为 28.19%。这些结果说明, 随着多肽作用浓度的提升, 对白色念珠菌细胞膜的破坏度逐渐增加。从这些结果中还可看出, 蛭螬多肽 Probrelin 除了作用于白色念珠菌细胞膜外, 还有可能作用于其他靶标, 而且随着作用浓度的升高, 逐渐以作用细胞膜的方式影响白色念珠菌细胞。

2.4 核酸阻滞实验

通过核酸阻滞实验探究蛭螬多肽 Probrelin 是否会与核酸间有直接的相互作用, 进而影响白色念珠菌的生理活动。通过图 4 可以看出, 与蛭螬多肽 Probrelin 孵育后, 质粒 DNA pET-28a、质粒 DNA pET-28a 双酶切片段及鲑鱼精子 DNA 在核

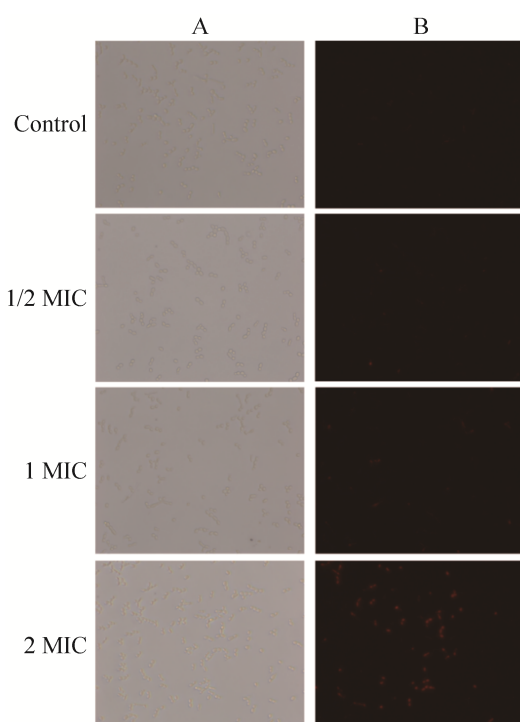


图 2. PI 吸收检测

Figure 2. PI absorption test. A: normal image; B: fluorescence image; Control: saline; MIC: minimum inhibitory concentrations.

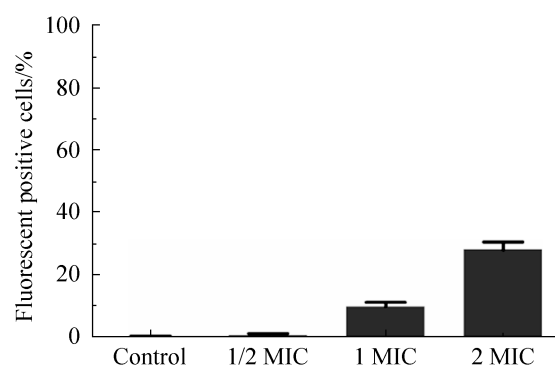


图 3. PI 吸收实验荧光阳性细胞数占比

Figure 3. Percentage of fluorescent positive cells in PI absorption test. MIC: minimum inhibitory concentrations.

酸凝胶电泳中的迁移情况都没有受到阻滞影响, 说明蛭螬多肽 Probrelin 与 DNA 没有直接的相互作用。

2.5 扫描电子显微镜检测

扫描电子显微镜用来检测蛭螬多肽 Probrelin 对白色念珠菌形态结构的影响。如图 5 所示, 未经蛭螬多肽 Probrelin 处理(negative control)的白色念珠菌具有光滑的形态, 而经蛭螬多肽 Probrelin 处理(4 MIC) 30 min 的白色念珠菌其形态结构发生显著变化, 其表面上具有不规则的卷曲结构, 说明该多肽可能影响了其细胞壁。

2.6 体外生物膜检测

生物膜在白色念珠菌的感染过程中发挥着重要作用, 同时也影响白色念珠菌感染的治疗效果。通过图 6-A 可以看出, 蛭螬多肽 Probrelin 可以有效抑制白色念珠菌生物膜的形成, 且具有浓度依赖性, 在 MIC 浓度下的抑制率为 59.49%, 在 2 MIC 浓度下的抑制率为 89.91%。通过图 6-B 可以看出, 蛭螬多肽 Probrelin 可以有效清除白色念珠菌生物膜, 且同样具有浓度依赖性, 在 MIC 浓度下的清除率为 60%, 在 2 MIC 浓度下的清除率为 82.34%。

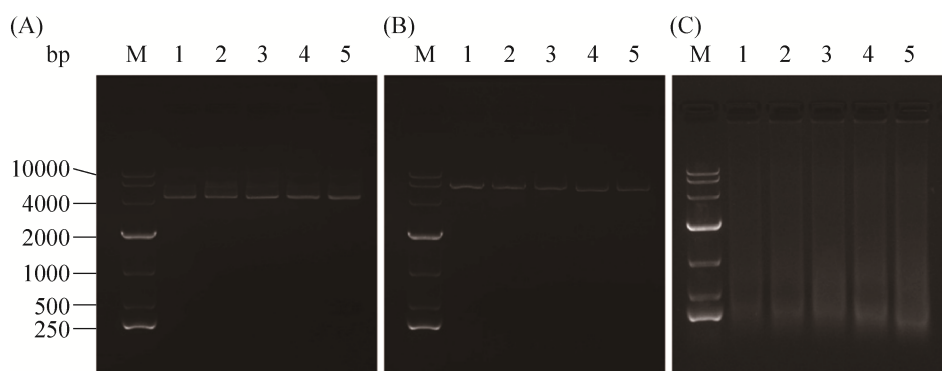


图 4. 蛭蟾多肽 **Probrelin** 对核酸的影响

Figure 4. Effects of the peptide Probrelin on nucleic acid. A: plasmid pET-28a; B: plasmid pET-28a digested by *EcoRI* and *XhoI*; C: sperm DNA from salmon. M: marker. Rate of peptide/nucleic acid: line 1 for 0:1, line 2 for 5:1, line 3 for 10:1, line 4 for 20:1, line 5 for 40:1.

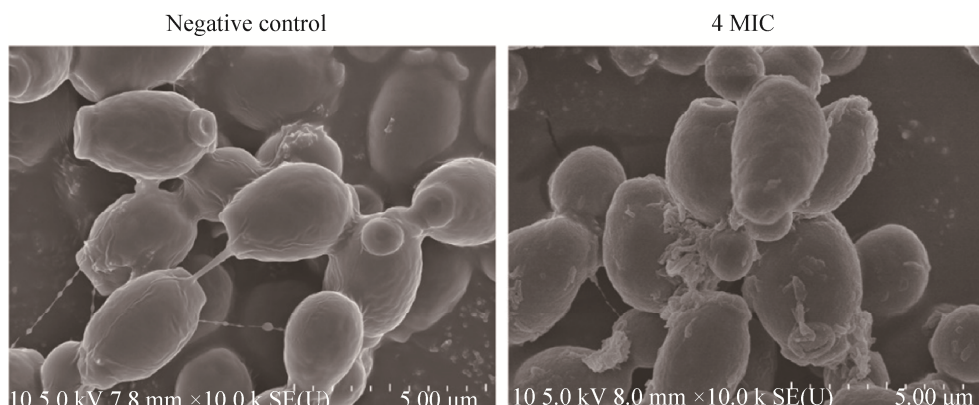


图 5. 扫描电子显微镜检测蛭蟾多肽 **Probrelin** 对白色念珠菌形态的影响

Figure 5. Scanning electron microscopy micrographs of the untreated (negative control) and 30 min probrelin (4 MIC) treated *C. albicans* cells.

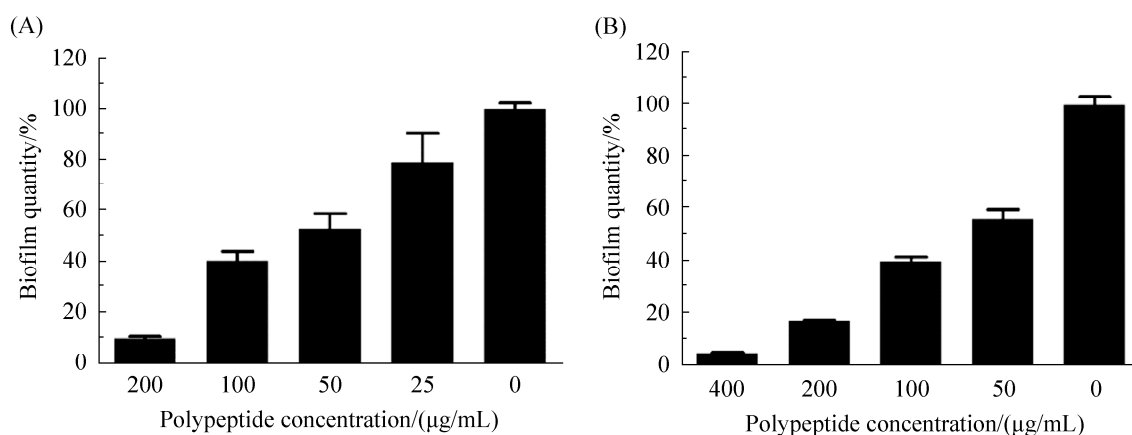


图 6. 蛭蟾多肽 **Probrelin** 对白色念珠菌生物膜的影响

Figure 6. Effects of the peptide probrelin on biofilm of *C. albicans*. A: formation of biofilm; B: mature biofilm.

2.7 菌丝形成实验

为了研究蛭螬多肽 Probrelin 对白色念珠菌形态转变的影响,用含有 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基对白色念珠菌进行培养。如图 7 所示,经过蛭螬多肽 Probrelin (1/2 MIC)处理 4 h 后,与非处理组(negative control)相比,白色念珠菌的菌丝形成情况受到显著影响,说明蛭螬多肽 Probrelin 抑制了白色念珠菌形态的改变。

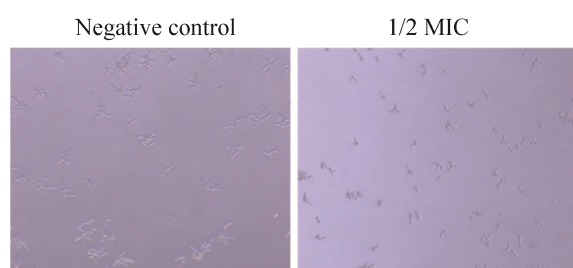


图 7. 蛭螬多肽 Probrelin 对白色念珠菌菌丝形成的影响

Figure 7. Effects of the peptide probrelin on yeast-to-hypha transition of *C. albicans* treated without (negative control) or with probrelin (1/2 MIC) for 4 h.

2.8 协同效应检测

联合用药是提高治疗效果以及应对耐药菌感染的有效策略,为探究蛭螬多肽 Probrelin 与抗真菌药物间在抗白色念珠菌上是否具有联合用药的前景,通过棋盘法检测蛭螬多肽 Probrelin 与 Clotrimazole、Amphotericin B、Nystatin 及 Anidulafungin 间的效应。通过表 2 可以看出,蛭螬多肽 Probrelin 与 Clotrimazole 间的 FICI 值为 0.5,具有协同效应;蛭螬多肽 Probrelin 与 Amphotericin B、Nystatin 及 Anidulafungin 间的 FICI 值分别为 0.75、1.25 及 1.25,说明既不具有协同效用,也不具有拮抗效应。

2.9 小鼠体内活性研究

为了研究蛭螬多肽 Probrelin 的治疗效果,构建了小鼠背部皮肤的皮下白色念珠菌感染模型。如图 8 所示,与对照组小鼠相比,经蛭螬多肽 Probrelin 治疗的小鼠其病变脓包的形成受到明显抑制(图 8-A,图 8-B)。同时,与对照组相比,蛭

表 2. 蛭螬多肽 Probrelin 联合抗真菌药物抗白色念珠菌 AY93025 的效果

Table 2. Effect of the peptide probrelin combined with antifungal drugs against *C. albicans* AY93025

Parameters	Clotrimazole	Amphotericin B	Nystatin	Anidulafugin
MIC/($\mu\text{g/mL}$)	10	5	5	0.01
FICI	0.50	0.75	1.25	1.25

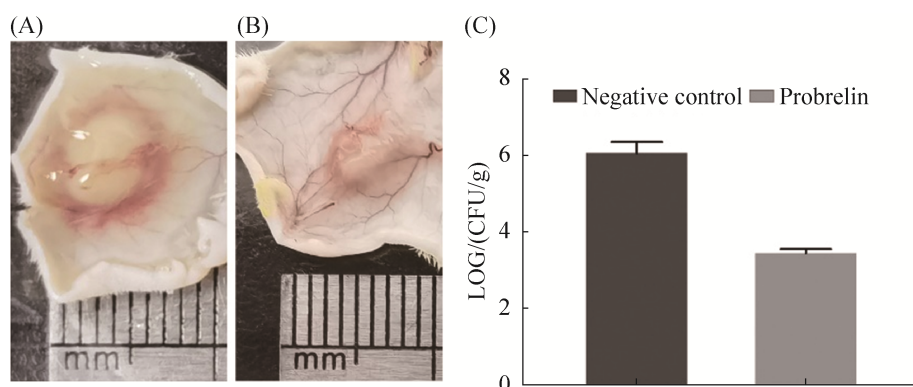


图 8. 蛭螬多肽 Probrelin 的体内抗白色念珠菌活性

Figure 8. *In vivo* activity of probrelin against *C. albicans* in a mouse subcutaneous infection model. A: pustule from negative control group; B: pustule from probrelin treatment group; C: fungal burden ($P < 0.01$).

蛞蝓多肽 Probrelin 可以有效清除感染部位的菌载量(图 8-C, $P < 0.01$)。因此,在生理条件下,蛞蝓多肽 Probrelin 依然具有良好的抗白色念珠菌活性。

3 讨论

作为第四大最常见的血液感染类型,由白色念珠菌引起的系统性感染造成约 40% 的死亡率,且其感染率和死亡率都在升高^[1-2]。抗真菌药物的临床应用,虽然有效地控制了白色念珠菌的感染,但由于长期用药以及不规范用药等原因,导致耐药菌株的出现^[16-17]。抗微生物多肽作为一类具有良好开发应用前景的抗菌药物候选分子,不仅能有效抑制或杀灭正常菌株,还能有效抑制或杀灭耐药菌株,如多肽 ZY13^[18]。在本研究中,我们探究了蛞蝓多肽 Probrelin 的抗白色念珠菌活性。研究表明,蛞蝓多肽 Probrelin 对正常菌株及临床耐药菌株均具有良好的抑制杀灭作用(表 1)。杀菌动力学实验进一步验证了蛞蝓多肽 Probrelin 对白色念珠菌具有良好的抑制或杀灭作用,且其抑制或杀灭活性具有浓度和时间依赖性(图 1)。

对于抗微生物多肽来说,大多通过作用于细胞膜来行使作用^[5,19]。如抗白色念珠菌多肽 AMP-17^[20]、Ctn^[14-33]和 P7^[22]。PI 吸收实验表明,蛞蝓多肽 Probrelin 在低浓度下对白色念珠菌细胞膜的完整性影响较小,但在高浓度下对细胞膜的破坏能力增加(图 2,图 3),说明蛞蝓多肽 Probrelin 在低浓度和高浓度下对白色念珠菌的作用方式不同,这种作用方式非常类似于抗微生物多肽 Buforin II^[23]及 Hp1404^[24]。由此我们推断,蛞蝓多肽 Probrelin 在低浓度下除了作用于细胞膜,还可能与白色念珠菌胞外的相关靶点相互作用,进而抑制其生长增殖,而在高浓度下既可通过破坏细

胞膜来杀灭白色念珠菌,又可能进入胞内与相关靶点相互作用来抑制或杀灭白色念珠菌。对于抗微生物多肽来说,大多具有正电荷特性,当其通过破坏细胞膜的完整性进入细胞内部后,可以通过静电作用非特异性地与核酸结合,进而干扰核酸相关的生理过程,如抗微生物多肽 APP^[25]和 P7^[22]。本研究中,通过核酸阻滞实验表明,蛞蝓多肽 Probrelin 与核酸之间不存在基于静电作用的非特异性相互作用(图 4),说明其细胞膜之外的靶标不是核酸,具体作用于胞内何种靶标,需要后期进行更加深入的研究。为了进一步探究蛞蝓多肽 Probrelin,本研究通过扫描电子显微镜对经多肽处理与非处理白色念珠菌的形态结构进行观察,结果表明,蛞蝓多肽 Probrelin 还可以通过破坏细胞壁影响白色念珠菌的形态结构(图 5)。

对于白色念珠菌来说,其引起的大多数疾病与其在宿主或非生物表面上形成的生物膜有关。生物膜可以为白色念珠菌提供稳定的环境,并使白色念珠菌可以耐受极高浓度的抗菌剂^[26-27]。除此之外,从生物膜释放的白色念珠菌细胞可以迁移到血液中并导致高死亡率的系统性感染^[28]。因此,抑制生物膜的生成或者破坏生物膜可提高抗白色念珠菌感染的有效性。多种抗微生物多肽被证明可作用于白色念珠菌的生物膜,如 polybia-MPI^[29]、Ctn^[14-33]和 dermaseptin-S1^[29]。本研究的结果表明,蛞蝓多肽 Probrelin 既可以抑制白色念珠菌生物膜的生成,又可以破坏已生成的生物膜(图 6)。形态转变即菌丝形成在白色念珠菌生物膜形成过程中发挥着重要作用,并与白色念珠菌的侵入性感染密切相关^[31]。研究表明,蛞蝓多肽 Probrelin 可以有效抑制白色念珠菌菌丝的形成(图 7),说明其可通过抑制白色念珠菌形态的转变来抑制生物

膜的形成,并能阻断其侵入性感染。因此,在生物膜及侵入性层面上,蛭螬多肽 Probrelín 可以用于白色念珠菌相关感染的治疗。

此外,由于耐受性或耐药性,导致抗生素治疗对白色念珠菌引起的感染难以起效,而联合用药是一个有效的抗白色念珠菌策略^[32]。本研究中所选取的抗真菌药物 Clotrimazole (抑制细胞膜合成)及 Anidulafungin (抑制细胞壁合成)属于抑菌药物,Amphotericin B 及 Nystatin 属于杀菌药物(破坏细胞膜完整性)^[33]。对于抗菌药物来说,相同靶点的药物间会存在拮抗作用,而不同靶点的药物间会存在协同效应。我们的研究结果显示,蛭螬多肽 Probrelín 体现出以破坏细胞膜为主兼具非破坏细胞膜的作用方式(图 2,图 3)。因此推断,蛭螬多肽 Probrelín 与 Clotrimazole 及 Anidulafungin 可能会存在协同效应,而与 Amphotericin B 及 Nystatin 不一定会存在拮抗作用。我们的研究结果证实了这种推断,即蛭螬多肽 Probrelín 与抗真菌药物 Clotrimazole 间展现出协同作用,但与 Anidulafungin 间既不具有协同也不具有拮抗效应,与 Amphotericin B 及 Nystatin 间不存在拮抗及协同效应(表 2)。至于蛭螬多肽 Probrelín 与 Clotrimazole 及 Anidulafungin 间所展现的两种不同效应,则可能与蛭螬多肽 Probrelín 影响白色念珠菌细胞壁结构有关(图 5)。因此,蛭螬多肽 Probrelín 与抗真菌药物 Clotrimazole 的联合用药,可作为解决白色念珠菌相关感染的有效策略之一。

白色念珠菌是常见的引起皮肤和黏膜感染的病原真菌^[34],本研究中,我们通过构建小鼠的皮下感染模型来评估蛭螬多肽 Probrelín 能否用于治疗白色念珠菌引起的皮肤感染。结果表明,蛭螬多肽 Probrelín 可以有效地清除入侵的白色念珠

菌,进而阻断白色念珠菌的感染(图 8)。因此,蛭螬多肽 Probrelín 可被开发用于防治白色念珠菌引起的相关皮肤感染。

综上结果表明,蛭螬多肽 Probrelín 对白色念珠菌正常菌株及临床耐药菌株均具有良好的抑制作用,对白色念珠菌的抑制或杀灭作用具有浓度和时间依赖性,且在低作用浓度下对白色念珠菌细胞膜的破坏能力非常弱,而在高作用浓度下则可以破坏白色念珠菌细胞膜的完整性。蛭螬多肽 Probrelín 还可以抑制白色念珠菌生物膜的形成以及破坏生物膜,并与抗真菌药物 Clotrimazole 间具有协同作用。因此,蛭螬多肽 Probrelín 可作为新的药物分子或模板分子用于抗白色念珠菌药物的研发。

参 考 文 献

- [1] Dadar M, Tiwari R, Karthik K, Chakraborty S, Shahali Y, Dhama K. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control - An update. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 117: 128–138.
- [2] Costa-De-oliveira S, Rodrigues AG. *Candida albicans* antifungal resistance and tolerance in bloodstream infections: the triad yeast-host-antifungal. *Microorganisms*, 2020, 8(2): 154.
- [3] Wan JF, Tang CP, Shen ZB, Jiang T. Research status of natural compounds combine with antifungal agents against drug-resistant *Candida albicans*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2014, 39(1): 28–33. (in Chinese)
万江帆,唐春萍,沈志滨,江涛. 中药单体联用抗真菌药物抗耐药白色念珠菌的研究现状. *中国中药杂志*, 2014, 39(1): 28–33.
- [4] Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 2006, 19(3): 491–511.
- [5] Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 2011, 29(9): 464–472.

- [6] Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, Björn C. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2016, 6: 194.
- [7] Hancock RE. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet Infectious Diseases*, 2001, 1(3): 156–164.
- [8] Chung PY, Khanum R. Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2017, 50(4): 405–410.
- [9] Fox JL. Antimicrobial peptides stage a comeback. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(5): 379–382.
- [10] Zhao Y, Li ZG, Wang LH, Sun YT, Zhao L, Zan K. Quality standard and research progress of traditional Chinese medicine *Holotrichia diomphalia* larvae. *Chinese Journal of Drug Evaluation*, 2020, 37(4): 257–261, 281. (in Chinese)
赵艳, 李正刚, 王路宏, 孙艳涛, 赵磊, 笱珂. 中药蛴螬的质量标准及研究进展. *中国药物评价*, 2020, 37(4): 257–261, 281.
- [11] Wang C, Yu YG, Zhang Q, Yu XX, Liang ZM. Preparation and stability studies of grub antimicrobial peptides. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2018, 45(2): 116–122. (in Chinese)
王成, 余以刚, 张青, 余祥雄, 梁泽明. 蛴螬抗菌肽的制备及其稳定性研究. *广东农业科学*, 2018, 45(2): 116–122.
- [12] Li ZJ, Meng MM, Li SS, Deng B. The transcriptome analysis of *Protaetia brevitarsis* Lewis larvae. *PLoS ONE*, 2019, 14(3): e0214001.
- [13] Guilhelmelli F, Vilela N, Smidt KS, de Oliveira MA, da Cunha Moraes Álvares A, Rigonato MC, da Silva Costa PH, Tavares AH, de Freitas SM, Nicola AM, Franco OL, Derengowski LD, Schwartz EF, Mortari MR, Bocca AL, Albuquerque P, Silva-Pereira I. Activity of scorpion venom-derived antifungal peptides against planktonic cells of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1844.
- [14] Cassone M, Otvos Jr L. Synergy among antibacterial peptides and between peptides and small-molecule antibiotics. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2010, 8(6): 703–716.
- [15] Youn C, Archer NK, Miller LS. Research techniques made simple: mouse bacterial skin infection models for immunity research. *Journal of Investigative Dermatology*, 2020, 140(8): 1488–1497.e1.
- [16] Brion LP, Uko SE, Goldman DL. Risk of resistance associated with fluconazole prophylaxis: Systematic review. *Journal of Infection*, 2007, 54(6): 521–529.
- [17] Liu SY, Hou YL, Chen X, Gao Y, Li H, Sun SJ. Combination of fluconazole with non-antifungal agents: a promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2014, 43(5): 395–402.
- [18] Jin L, Bai X, Luan N, Yao H, Zhang Z, Liu W, et al. A designed tryptophan- and lysine/arginine-rich antimicrobial peptide with therapeutic potential for clinical antibiotic-resistant *Candida albicans* vaginitis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, 59(5): 1791–1799.
- [19] Fjell CD, Hiss JA, Hancock REW, Schneider G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2012, 11(1): 37–51.
- [20] Ma HL, Zhao XY, Yang LB, Su PP, Fu P, Peng J, Yang N, Guo G. Antimicrobial peptide AMP-17 affects *Candida albicans* by disrupting its cell wall and cell membrane integrity. *Infection and Drug Resistance*, 2020, 13: 2509–2520.
- [21] de Aguiar FLL, Santos NC, de Paula Cavalcante CS, Andreu D, Baptista GR, Gonçalves S. Antibiofilm activity on *Candida albicans* and mechanism of action on biomembrane models of the antimicrobial peptide ctn[15–34]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(21): 8339.
- [22] Li LR, Song FX, Sun J, Tian X, Xia SF, Le GW. Membrane damage as first and DNA as the secondary target for anti-candidal activity of antimicrobial peptide P7 derived from cell-penetrating peptide ppTG20 against *Candida albicans*. *Journal of Peptide Science*, 2016, 22(6): 427–433.
- [23] Park CB, Kim HS, Kim SC. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, 244(1): 253–257.
- [24] Li ZJ, Xu XB, Meng LX, Zhang Q, Cao LY, Li WX, Wu YL, Cao ZJ. Hp1404, a new antimicrobial peptide from the

- scorpion *Heterometrus petersii*. *PLoS ONE*, 2014, 9(5): e97539.
- [25] Li LR, Sun J, Xia SF, Tian X, Cheserek MJ, Le GW. Mechanism of antifungal activity of antimicrobial peptide APP, a cell-penetrating peptide derivative, against *Candida albicans*: intracellular DNA binding and cell cycle arrest. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(7): 3245–3253.
- [26] Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathogens and Disease*, 2016, 74(4): ftw018.
- [27] Mathé L, Van Dijck P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Current Genetics*, 2013, 59(4): 251–264.
- [28] Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(2): 109–118.
- [29] Wang KR, Yan JX, Dang W, Xie JQ, Yan B, Yan WJ, Sun MY, Zhang BZ, Ma MX, Zhao YY, Jia FJ, Zhu RR, Chen W, Wang R. Dual antifungal properties of cationic antimicrobial peptides polybia-MPI: Membrane integrity disruption and inhibition of biofilm formation. *Peptides*, 2014, 56: 22–29.
- [30] Belmadani A, Semlali A, Rouabhia M. Dermaseptin-S1 decreases *Candida albicans* growth, biofilm formation and the expression of hyphal wall protein 1 and aspartic protease genes. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 125(1): 72–83.
- [31] Pereira R, dos Santos Fontenelle RO, de Brito EHS, de Moraes SM. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 2021, 131(1): 11–22.
- [32] Spitzer M, Robbins N, Wright GD. Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections. *Virulence*, 2017, 8(2): 169–185.
- [33] Wang AP, Wang RJ, Li RY. New progress of antifungal agents. *Dermatology Bulletin*, 2017, 34(5): 540–550, 4. (in Chinese)
王爱平, 王若珺, 李若瑜. 抗真菌药物新进展. 皮肤科学通报, 2017, 34(5): 540–550, 4.
- [34] Fang JY, Tang KW, Yang SH, Alalaiwe A, Yang YC, Tseng CH, Yang SC. Synthetic naphthofuranquinone derivatives are effective in eliminating drug-resistant *Candida albicans* in hyphal, biofilm, and intracellular forms: an application for skin-infection treatment. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 2053.

Activity of the antimicrobial peptide probrelin from traditional Chinese medicine grub against *Candida albicans*

Ping Hu, Zhuoran Zhao, Yaping Yuan, Shasha Li, Xiaoyuan Jing, Zhongjie Li*

School of Basic Medical Sciences, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan Province, China

Abstract: [Objective] To investigate the activity of the peptide probrelin from traditional Chinese medicine grub against *Candida albicans*. [Methods] The broth microdilution method was used to determine the MIC of probrelin against normal and clinical resistant strains of *C. albicans*, and the MFC were determined by plate count method. Time-kill curves were drawn by plate counting after treatment with different concentrations of probrelin. The influences of probrelin on the integrity of the cell membrane and morphology of *C. albicans* were evaluated by PI absorption experiment and scanning electron microscope, respectively. The binding effect between probrelin and nucleic acid was evaluated by DNA gel retardation assay. Crystal violet staining method was used to evaluate the influences of probrelin on the formation of biofilm and mature biofilm of *C. albicans*. And the influences of probrelin on the hyphae formation of *C. albicans* were also tested. Checkerboard method was used to determine the interaction between probrelin and antifungal drugs. And a mouse subcutaneous infection model was used to tested the activity of probrelin against *C. albicans* under physiological conditions. [Results] The MICs of probrelin against normal and clinical resistant strains of *C. albicans* were 100 µg/mL, and the MFCs were 100–200 µg/mL. Probrelin showed time- and concentration-dependent antifungal activity against *C. albicans*, as well as on the integrity of the cell membrane, and could destroy the cell wall, but did not bind with nucleic acids. Probrelin not only inhibited the formation of the biofilm of *C. albicans*, but also disrupted the mature biofilm, and could also inhibit the hyphae formation. Furthermore, probrelin showed synergistic effect with the antifungal drug Clotrimazole, and could effectively clear *C. albicans* cells in the mouse subcutaneous infection model. [Conclusion] Probrelin showed good activity against *C. albicans*, and had the potential for the development of anti-*C. albicans* drugs.

Keywords: traditional Chinese medicine, antimicrobial peptides, *Candida albicans*, biofilm, synergistic effect

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81703475) and by the Undergraduate Training Program for Innovation and Entrepreneurship of Henan Province (202010464056)

*Corresponding author. E-mail: sui_feng5217@126.com

Received: 6 February 2021; Revised: 13 April 2021; Published online: 8 September 2021