



紫草素对白色念珠菌的抑制作用机制

王杨[#], 陈菲[#], 谢明杰^{*}

辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁省生物技术与分子药物研发重点实验室, 辽宁 大连 116081

摘要:【目的】研究紫草素抑制白色念珠菌的作用机制。【方法】通过微量稀释法测定紫草素对白色念珠菌的最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MFC);紫外分光光度法测定紫草素对白色念珠菌细胞膜渗透性的影响;扫描电镜观察紫草素对菌体形态的影响;激光共聚焦显微镜测定紫草素对白色念珠菌细胞内钙离子浓度的影响;卵黄平板培养基法检测紫草素对白色念珠菌的细胞膜磷脂酶活性的影响;RT-PCR检测紫草素对白色念珠菌 *PLB1* 和 *PLB2* 基因表达量的影响。【结果】紫草素对白色念珠菌有较强的抑制作用,其对白色念珠菌的 MIC 和 MFC 分别为 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。紫草素能破坏白色念珠菌细胞膜的完整性,使细胞膜的通透性增加,导致细胞内 DNA 和 RNA 等大分子物质的泄漏和细胞内钙离子的流失。其中 MIC 的紫草素作用菌体 16 h 后,上清液中的 DNA 和 RNA 等大分子含量与对照组相比增加了 117.32% ($P<0.01$);细胞内的 $[\text{Ca}^{2+}]$ 降低了 72.02% ($P<0.01$)。扫描电镜结果也证明了紫草素对白色念珠菌细胞膜的破坏作用。紫草素也能抑制白色念珠菌分泌磷脂酶,且呈浓度剂量依赖。其中,与对照组相比, MIC 的紫草素能使白色念珠菌分泌磷脂酶的量下降 56.3% ($P<0.01$)。RT-PCR 结果显示,紫草素能抑制编码磷脂酶 B 的基因 *PLB1* 和 *PLB2* 的表达量,其中 1/2 MIC 的紫草素作用白色念珠菌 16 h 后,与对照组相比, *PLB1* 和 *PLB2* 基因的相对表达量分别降低了 56.4% 和 61.4% ($P<0.01$)。【结论】紫草素对白色念珠菌有较强的抑杀作用,其作用机制是通过破坏白色念珠菌细胞膜的完整性,增加菌体细胞膜的通透性,导致细胞内 DNA 和 RNA 等大分子的泄漏和细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的流失,最终引起菌体的死亡。而紫草素对白色念珠菌磷脂酶分泌的抑制作用,致使其不能及时维护和修复由紫草素造成的细胞膜的破坏和损伤,也是导致菌体死亡的原因。

关键词: 紫草素, 白色念珠菌, 细胞膜, 磷脂酶

基金项目: 辽宁省大学生创新创业训练计划(201710165000223); 辽宁省自然科学基金(201602462); 辽宁省教育厅科学研究一般项目(L201683675)

*通信作者。Tel: +86-411-85827068; E-mail: xmj1222@sina.com

[#]并列第一作者。

收稿日期: 2017-12-30; 修回日期: 2018-03-25; 网络出版日期: 2018-06-15

白色念珠菌(*Candida albicans*)是临床上最常见的条件致病真菌。一般存在于人体的皮肤、粘膜、阴道等部位。当机体免疫机能降低或其寄居部位微生态环境失调,白色念珠菌就会大量繁殖,引起皮肤、粘膜或内脏感染^[1-4]。目前临床上用于治疗白色念珠菌的药物以唑类和多烯类抗生素为主,但由于这些药物均存在一定的毒性,且长期使用后致使白色念珠菌耐药性不断增强,因此目前由白色念珠菌引起的疾病已成为临床上急需解决的问题^[5]。紫草是由中国药典收录的中草药,常用于治疗急、慢性肝炎和肝硬化等。紫草素(alkannin)是从紫草中提取的萘醌类化合物,已有的研究结果显示,紫草素具有多种药理作用,如抗肿瘤、抗菌和抗炎等作用^[6-8]。目前关于紫草素的抗肿瘤作用研究较多,研究结果显示紫草素类化合物所发挥的抗肿瘤作用,是通过影响肿瘤细胞的代谢、增殖、分化、信号传递和基因表达等来阻碍肿瘤细胞的生长^[9-10]。但有关紫草素对真菌的抑制作用目前尚未见相关报道。因此本文以白色念珠菌为实验材料,研究了紫草素对真菌的抑制作用及其机制,旨在为开发抗真菌感染药物提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 白色念珠菌(*Candida albicans* ATCC10231),购自中国医学菌种保藏中心。

1.1.2 培养基与试剂: 沙堡葡萄糖琼脂固体培养基(SDA)、RPM-1640 液体培养基和酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(YEPD); 蛋黄培养基; 紫草素标准品购于成都曼斯特股份有限公司。

1.1.3 主要实验仪器设备: 酶标仪(Thermo MULTISKAN ASCENT); PCR 仪(英国 TTECHNE-512

型); 实时荧光定量 PCR 仪(日本 TAKARA TP800); 电泳凝胶定量分析系统(Bio-Rad 公司, Version 3.1); 扫描电镜(KYKY-1000B); 激光共聚焦显微镜(Zeiss LSM 710, German)。

1.2 紫草素对白色念珠菌的抑制作用测定

将 200 μL 培养至对数期的白色念珠菌的菌悬液(10^6 CFU/mL)分别加入 96 孔板中,再加入 20 μL 不同浓度的紫草素药液,使其终浓度分别为 64、32、16、8、4 $\mu\text{g/mL}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后于 595 nm 处测定吸光值。以不加药物组为空白对照。实验重复 3 次,取平均值。其中,紫草素对白色念珠菌的最低抑菌浓度(MIC)值为菌体的 OD 值下降 80% 以上的最低药物浓度。从大于 MIC 的各孔中分别取 10 μL 菌悬液涂布于 SDA 固体培养基上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后观察菌体生长情况,最低杀菌浓度(MFC)为平板上没有菌体生长的最低药物浓度。

1.3 紫草素对白色念珠菌细胞膜渗透性的影响

将培养至对数期的菌悬液按 2% 接种量接种于 20 mL RPM-1640 液体培养基中,以 150 r/min、30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 16 h 后,离心弃上清液,用 PBS 洗涤菌体 2 次,制成适当浓度的白色念珠菌菌悬液,分别向其中加入浓度为 MIC 和 2MIC 的紫草素继续培养 12 h,每隔 2 h 分别取样液 4 mL,4000 r/min 离心 10 min 弃沉淀,用紫外分光光度计于 260 nm 下测定上清液中 DNA 和 RNA 等大分子物质的变化。以不加药为空白对照组,实验重复 3 次,取平均值。

1.4 紫草素对白色念珠菌形态的影响

将培养至对数期的白色念珠菌菌悬液(10^7 CFU/mL)接种于含紫草素终浓度为 MIC 的 YEPD 液体培养基中,150 r/min、30 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养。于 6 h 和 16 h 分别取 1 mL 菌悬液,3000 r/min 离

心 5 min 后弃上清。再加入 0.5 mL PBS 缓冲液和 0.5 mL 2.5% 的戊二醛, 4 °C 冰箱固定过夜。次日用 PBS 缓冲液冲洗 2 次, 50%、80%、100% 乙醇依次脱水 1 次, 每次 15 min, 100% 乙醇浸没的电镜样品置 4 °C 冰箱中降温 10 min 后, 放入真空干燥器中干燥 40 min。待干燥后的样品温度升至室温后取出, 喷金镀膜, 使用扫描电镜观察照相, 以不加药组为空白对照, 实验重复 3 次。

1.5 紫草素对白色念珠菌细胞内钙离子浓度的影响

将 2 mL RPM-1640 培养基及 300 μ L 培养至对数期的菌悬液(10^6 CFU/mL)分别加入 6 孔板中, 每孔内分别放一片无菌盖玻片, 37 °C 培养 4 h 后, 以加入 300 μ L 浓度为 MIC 的紫草素的孔为实验组, 加入 300 μ L 去离子水的孔为空白对照组, 37 °C 下继续培养 16 h。然后吸出每孔中的液体, 用 PBS 缓冲液洗涤 2 次。阴干后于避光环境下向每孔中加入 1 mL 5 μ mol/L 的钙离子荧光探针 (Fluo-3AM), 于 37 °C 培养箱中孵育 45 min 进行探针装载。吸出剩余的荧光探针染液并用 PBS 缓冲液冲洗, 置于 37 °C 培养箱中继续孵育 15 min, 以确保 Fluo-3 AM 完全转变为 Fluo-3。取出盖玻片, 用 10 μ L 抗荧光淬灭剂进行封片后, 利用激光共聚焦显微镜检测荧光强度, 并按照公式(1)计算钙离子浓度($[Ca^{2+}]$)变化百分率。实验重复 3 次。

$[Ca^{2+}]$ 变化百分率= $(F-F_0)/F_0 \times 100\%$ 公式(1)
 F 表示空白对照组的荧光强度, F_0 表示实验组的荧光强度。

1.6 紫草素对白色念珠菌分泌胞外磷脂酶 (phospholipase, PL) 的影响

制备 10 μ L 含紫草素终浓度为 1/2 MIC 和 MIC 的菌悬液(10^6 CFU/mL)并用移液枪接种于卵黄培养基上, 以加等量 PBS 的菌悬液为空白对照, 于

37 °C 下培养 48 h。待培养结束后, 用刻度尺分别测量平板上的菌落直径和沉淀圈直径, 每组实验重复 3 次, 取平均值。磷脂酶的活性用 PZ 值表示, PZ 值按下列公式计算。 PZ 值=菌落直径/总直径。总直径=菌落直径+菌落周围沉淀圈的直径。 $PZ=1$, 表示无磷脂酶活性; PZ 值 <1 , 表示有磷脂酶活性, 且 PZ 值越大, 磷脂酶的活性越弱。

1.7 紫草素对白色念珠菌 *PLB1* 和 *PLB2* 相对表达量的影响

1.7.1 白色念珠菌 *PLB1* 和 *PLB2* 基因的检测:

提取模板 DNA, 根据 GenBank 中已发布的白色念珠菌的基因序列, 利用 Primer 5.0 软件及参考文献设计磷脂酶相关基因 *PLB1* 和 *PLB2* 的上下游引物, 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物(表 1)。PCR 扩增条件为 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.7.2 紫草素对白色念珠菌 *PLB1* 和 *PLB2* 相对表达量的影响:

将培养至对数期的菌悬液接种到含紫草素终浓度分别为 1/8 MIC、1/4 MIC 和 1/2 MIC 的 RPM-1640 培养基中, 30 °C、150 r/min 培养 16 h 后, 采用 Trizol 法提取 RNA, 用微量核酸测量仪进行 RNA 浓度的定量。采用 2 步法反转合成模板 cDNA, 根据设计合成 RT-PCR 引物进行扩增(表 2)。以 18S rRNA 为内参基因, 以不加药物组为空白对照。待反应结束后分析 RT-PCR 的扩增曲线和融解曲线, 并计算 *PLB1* 和 *PLB2* 基因的相对表达量。

表 1. PCR 引物

Table 1. Primer sequences used for PCR amplification

Primer name	Primer sequences (5'→3')	Size/bp
<i>PLB1</i> -F	TGTGGTCAGATGTAACGAGTGC	299
<i>PLB1</i> -R	AGACAACACCGCTTCGTTGA	
<i>PLB2</i> -F	TGGAACCAGGCTTGATGATG	305
<i>PLB2</i> -R	TCTGACCGTCTTCACTCCA	

表 2. RT-PCR 引物

Table 2. Primer sequences used for RT-PCR amplification

Primer name	Primer sequences (5'→3')	Size/bp
PLB1-F	GCAATGTTGACTGGAGCAGGT	125
PLB1-R	AACCACGATCCACCTGATAACC	
PLB2-F	GCTTCCATTGATCCACCGTAA	135
PLB2-R	GCAATGCCATCTCCTTGTA	

1.8 统计学方法

采用 SPSS 17.0 及 Curve Expert 1.3 统计软件进行分析, 数值用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。予以卡方检验和 t 检验。以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果和分析

2.1 紫草素对白色念珠菌的抑制作用

实验结果显示, 紫草素对白色念珠菌有显著的抑制和杀灭作用, 且呈浓度剂量依赖。其抑杀白色念珠菌的 MIC 和 MFC 分别为 16 $\mu\text{g/mL}$ 和 32 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 紫草素对白色念珠菌细胞膜渗透性的影响

实验结果显示(图 1), 紫草素能导致细胞内 DNA 和 RNA 等大分子物质的泄漏, 其中 MIC 的紫草素作用菌体 12 h 后, 上清液中的 DNA 和 RNA

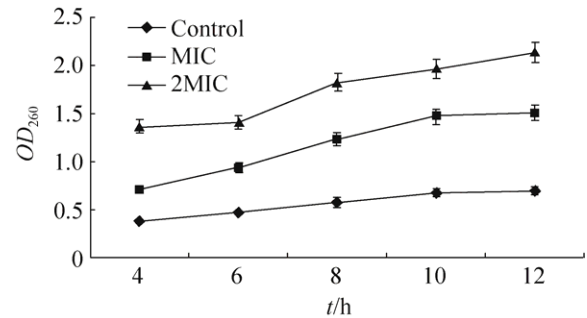


图 1. 紫草素作用白色念珠菌后大分子物质的变化

Figure 1. Effect of alkannin on macromolecules against *Candida albicans*.

等大分子含量与对照组相比增加了 117.32% ($P < 0.01$), 表明紫草素可破坏白色念珠菌细胞膜的完整性, 使细胞膜的通透性大大增加。

2.3 紫草素对白色念珠菌细胞形态的影响

扫描电镜结果显示(图 2), MIC 紫草素作用白色念珠菌后, 其细胞形态发生了明显的改变。其中对照组的白色念珠菌(图 2-A), 形态规则、外观饱满、表面光滑致密、折光性好。而加药处理 6 h 后(图 2-B), 细胞表面开始变得粗糙, 扭曲变形。当药物作用菌体 16 h 后(图 2-C), 大部分菌体严重皱缩、干瘪、扭曲变形, 菌体表面凹凸不平, 形成囊泡状或不规则的突起结构。

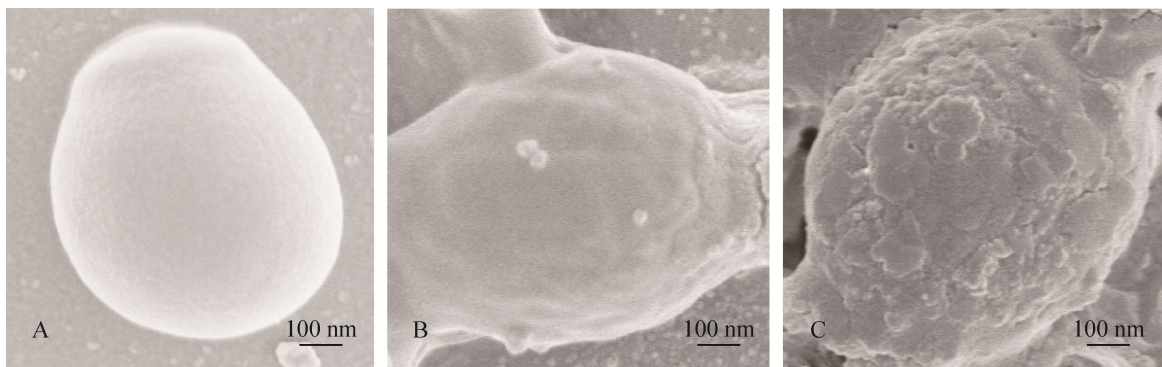


图 2. 紫草素作用后白色念珠菌形态变化的扫描电镜结果

Figure 2. Scanning electron microscopy results of morphological changes of *Candida albicans* after alkannin effected.

2.4 紫草素对白色念珠菌钙离子通透性的影响

利用钙离子荧光探针 Fluo-3 AM 检测细胞内 $[Ca^{2+}]$ 变化的原理, 是 Fluo-3 AM 进入菌体细胞后, 能在细胞内水解酶的作用下水解成 Fluo-3, Fluo-3 与细胞内钙离子的结合物能在激发光下产生特有的荧光。荧光强度可反映细胞内的 $[Ca^{2+}]$, 荧光强度越弱, 表示细胞内 $[Ca^{2+}]$ 流失的越多, 细胞膜的损伤越严重。激光共聚焦显微镜结果显示(图 3), 紫草素能显著降低白色念珠菌细胞内的 $[Ca^{2+}]$, 与对照组相比, MIC 的紫草素能使白色念珠菌细胞内的 $[Ca^{2+}]$ 降低 72.02% ($P < 0.01$)。表明紫草素能够破坏白色念珠菌细胞膜的完整性使细胞膜的通透

性大大增加。

2.5 紫草素对白色念珠菌分泌的胞外磷脂酶的影响

采用卵黄培养基平板法检测磷脂酶的原理, 是菌体分泌到细胞外的磷脂酶能将培养基中所含的磷脂分解成脂肪酸, 脂肪酸与培养基中的钙反应能形成脂肪酸钙沉淀圈。因此根据形成的沉淀圈的大小, 即可判断菌体分泌磷脂酶的活性。本实验结果显示(表 3), 不同浓度的紫草素均可抑制白色念珠菌分泌磷脂酶, 且呈浓度剂量依赖。其中, 与对照组相比, MIC 的紫草素能使白色念珠菌分泌磷脂酶的量下降 56.3% ($P < 0.01$)。

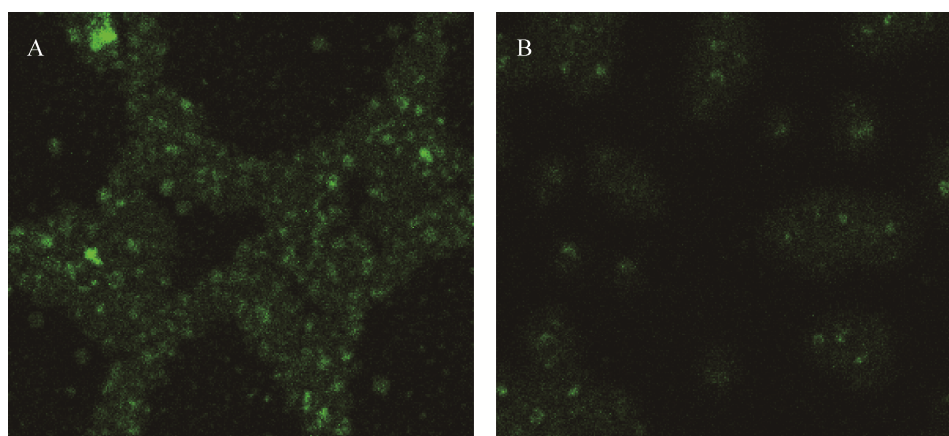


图 3. 紫草素作用白色念珠菌后的荧光强度变化

Figure 3. Fluorescence intensity of *Candida albicans* after alkannin effected. A: blank control group; B: test group.

表 3. 紫草素对白色念珠菌细胞分泌磷脂酶的影响

Table 3. The result of alkannin effected cell membrane phospholipase of *Candida albicans*

c(Alkannin)/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Colony diameter/ mm	Total diameter/mm	PZ
Control	12.0	38.0	0.32
1/2MIC	12.0	32.0	0.38*
MIC	12.0	24.0	0.50*

* $P < 0.01$, compared with the control group.

2.6 紫草素对白色念珠菌 *PLB1* 和 *PLB2* 基因相对表达量的影响

PCR 结果显示, 白色念珠菌中存在编码磷脂酶 B 的相关基因 *PLB1* 和 *PLB2* 基因(图 4)。RT-PCR 结果显示(图 5), 紫草素可降低 *PLB1* 和 *PLB2* 基因的相对表达量, 且呈浓度剂量依赖。其中 1/2

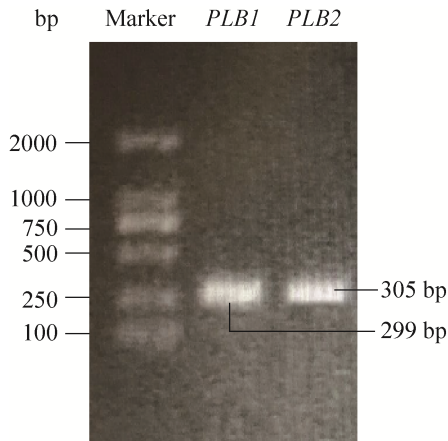


图 4. 白色念珠菌的 *PLB1* 和 *PLB2* PCR 扩增结果
Figure 4. *Candida albicans* *PLB1* and *PLB2* PCR amplification results.

MIC 的紫草素作用白色念珠菌 16 h 后, 与对照组相比, *PLB1* 和 *PLB2* 基因的相对表达量分别降低了 56.4% 和 61.4% ($P < 0.01$)。

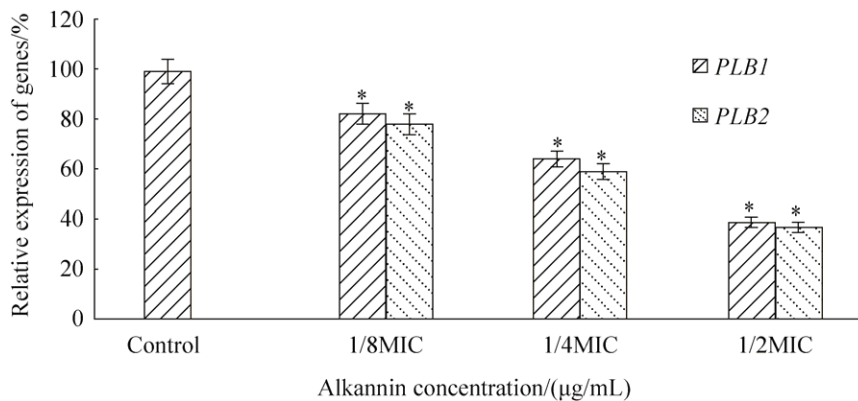


图 5. 紫草素对白色念珠菌细胞膜相关基因表达的影响

Figure 5. Effect of alkannin on *Candida albicans* cell membrane related gene expression. * $P < 0.01$, compared with the blank control group.

细胞膜是保证细胞完成各种生理功能的重要屏障结构, 可为细胞的生长代谢提供相对稳定的内环境。如果真菌细胞膜受到破坏和损伤, 则会影响菌体正常的生长繁殖, 当损伤严重时则会导致菌体死亡。本研究结果显示, 紫草素对白色念珠菌

3 讨论

近年来, 由念珠菌导致的真菌感染的发生率逐年上升, 占有真菌感染的 73.4%, 已成为临床上十分棘手的问题^[11-13]。由于目前用于抗真菌感染的药物, 普遍存在抗菌谱窄、不良反应强、生物利用度差和易产生耐药性等缺点, 因此寻找高效、安全无毒和不易产生耐药性的抗真菌药物成为解决难以治疗的真菌感染的有效途径之一^[14-15]。本研究结果显示, 紫草素对白色念珠菌有显著的抑制和杀灭作用, 其抑杀白色念珠菌的 MIC 和 MFC 分别为 16 μg/mL 和 32 μg/mL。

目前临床上应用的抗真菌药物的作用机制不同, 有的是抑制真菌细胞壁的合成, 如卡泊芬净等; 有的是阻止细胞膜的合成, 如两性霉素 B 等; 有的是干扰真菌核酸的合成, 如灰黄霉素等^[16-17]。

的抑制作用机制是通过破坏菌体细胞膜的完整性, 使细胞膜的通透性大大增加, 导致细胞内 DNA 和 RNA 等大分子的泄漏和细胞内 $[Ca^{2+}]$ 的流失, 最终引起菌体死亡。扫描电镜结果也证明了紫草素对白色念珠菌细胞膜的破坏作用。

磷脂酶是生物体内负责磷脂代谢和生物合成的一类酶,广泛存在于生物体内,其作用是维护和修复细胞膜的结构,参与细胞内的代谢和信号传导的调节等。目前已经证实磷脂酶在念珠菌对宿主细胞的穿入、损伤和溶解中发挥作用,是白色念珠菌致病的重要毒力因子之一。根据磷脂酶水解磷脂的特异性脂键的不同,可将其分为 A、B、C 和 D 等类型。研究发现,白色念珠菌的磷脂酶主要是磷脂酶 B,其具有水解酶和溶血磷脂酶-转酰基酶的活性。可通过分解宿主细胞膜中的磷脂,破坏宿主细胞膜的完整性或通透性,来增强白色念珠菌的侵袭力^[18-19]。目前在白色念珠菌上已分离到编码磷脂酶 B 的基因 *PLB1* 和 *PLB2*^[20-22]。本研究结果显示,紫草素可以明显抑制白色念珠菌分泌磷脂酶的活性,与对照组相比, MIC 的紫草素能使白色念珠菌分泌磷脂酶的量下降 56.3% ($P < 0.01$)。RT-PCR 结果显示,紫草素能够抑制 *PLB1* 和 *PLB2* 基因的相对表达量,其中 1/2 MIC 的紫草素作用白色念珠菌 16 h 后,与对照组相比, *PLB1* 和 *PLB2* 基因的相对表达量分别降低了 56.4% 和 61.4% ($P < 0.01$)。该结果除了表明紫草素能够通过抑制磷脂酶的分泌、降低白色念珠菌的感染毒力和致病性外,由于磷脂酶与维护 and 修复细胞膜的结构有关,还可以推测,紫草素对白色念珠菌的抑杀作用,与磷脂酶分泌量的减少、致使白色念珠菌不能及时维护和修复由紫草素造成的细胞膜的破坏和损伤有关。

综上所述,紫草素对白色念珠菌有较强的抑杀作用,其作用机制是通过破坏白色念珠菌细胞膜的完整性,增加菌体细胞膜的通透性,导致细胞内 DNA 和 RNA 等大分子的泄漏和细胞内 $[Ca^{2+}]$ 的流失,最终引起菌体的死亡。而紫草素对白色

念珠菌磷脂酶分泌的抑制作用,致使其不能及时维护和修复由紫草素造成的细胞膜的破坏和损伤,也可能是导致菌体死亡的原因。

参 考 文 献

- [1] Peleg AY, Hogan DA, Mylonakis E. Medically important bacterial-fungal interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(5): 340-349.
- [2] Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Critical Reviews in Microbiology*, 2010, 36(1): 1-53
- [3] Turner SA, Butler G. The *Candida* pathogenic species complex. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2014, 4(9): a019778.
- [4] Papon N, Courdavault V, Clastre M, Bennett RJ. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(9): e1003550.
- [5] Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2011, 75(2): 213-267.
- [6] Zhai TY, Hei ZY, Ma Q, Liang HB, Xu Y, Zhang YC, Jin LY, Han C, Wang JD. Shikonin induces apoptosis and G0/G1 phase arrest of gallbladder cancer cells via the JNK signaling pathway. *Oncology Reports*, 2017, 38(6): 3473-3480.
- [7] Liu XC, Sun GY. Shikonin enhances Adriamycin antitumor effects by inhibiting efflux pumps in A549 cells. *Oncology Letters*, 2017, 14(4): 4270-4276.
- [8] Chen X, Oppenheim J, Howard OMZ. Shikonin, a component of antiinflammatory Chinese herbal medicine, selectively blocks chemokine binding to CC chemokine receptor-1. *International Immunopharmacology*, 2001, 1(2): 229-236.
- [9] Li MY, Mi CL, Wang KS, Wang Z, Zuo HX, Piao LX, Xu GH, Li XZ, Ma J, Jin XJ. Shikonin suppresses proliferation and induces cell cycle arrest through the inhibition of hypoxia-inducible factor-1 α signaling. *Chemico-Biological Interactions*, 2017, 274: 58-67.
- [10] Li Y, Lu HL, Gu YC, Ning ZQ, Cao TH, Chen C, Hu CR, Tao

- M. Enhancement of NK cells proliferation and function by Shikonin. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2017, 39(3): 124–130.
- [11] Tan PL, Wang ZJ, Zhao JF. Resistance of *Candida albicans* isolates against fluconazole and the resistance correlation with CAP1 gene. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2015, 31(4): 325–329. (in Chinese)
谈潘莉, 汪浙炯, 赵金方. 白假丝酵母菌临床菌株对氟康唑耐药性及其与 CAP1 基因相关性研究. *中国人兽共患病学报*, 2015, 31(4): 325–329.
- [12] Chin VK, Lee TY, Rusliza B, Chong PP. Dissecting *Candida albicans* infection from the perspective of *C. albicans* virulence and omics approaches on host-pathogen interaction: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(10): 1643.
- [13] Calderone R, Sun N, Gay-Andrieu F, Groutas W, Weerawarna P, Prasad S, Alex D, Li DM. Antifungal drug discovery: the process and outcomes. *Future Microbiology*, 2014, 9(6): 791–805.
- [14] Xie JL, Polvi EJ, Shekhar-Guturja T, Cowen LE. Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. *Future Microbiol.* 2014, 9(4): 523–42.
- [15] Sorgo AG, Heilmann CJ, Dekker HL, Bekker M, Brul S, de Koster CG, de Koning LJ, Klis FM. Effects of fluconazole on the secretome, the wall proteome, and wall integrity of the clinical fungus *Candida albicans*. *Eukaryote Cell*, 2011, 10(8): 1071–1081.
- [16] Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN. *In vitro* activities of caspofungin compared with those of fluconazole and itraconazole against 3, 959 clinical isolates of *Candida* spp., including 157 fluconazole-resistant isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47(3): 1068–1071.
- [17] Dutcher JD. The discovery and development of amphotericin B. *Diseases of the Chest*, 1968, 54(S1): 296–298.
- [18] Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG, Banno Y, Cole GT, Kitajima Y, Edwards JE Jr, Nozawa Y, Ghannoum MA. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 1995, 63(5): 1993–1998.
- [19] Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 2000, 13(1): 122–143.
- [20] Theiss S, Ganchimeg Ishdorj, Audrey Brenot, Marianne Kretschmar, Lan CY, Thomas Nichterlein, Jörg Hacker, Santosh Nigam, Nina Agabian, Gerwald A. Köhler. Inactivation of the phospholipase B gene *PLB5* in wild-type *Candida albicans* reduces cell-associated phospholipase A2 activity and attenuates virulence. *International Journal of Medical Microbiology*, 2006, 296(6): 405–420.
- [21] Leidich SD, Ibrahim AS, Fu Y, Koul A, Jessup C, Vitullo J, Fonzi W, Mirbod F, Nakashima S, Nozawa Y, Ghannoum MA. Cloning and disruption of *caPLB1*, a phospholipase B Gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(40): 26708–26086.
- [22] Naglik J, Albrecht A, Bader O, Hube B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cellular Microbiology*, 2004, 6(10): 915–926.

Inhibitory mechanism of alkannin on *Candida albicans*

Yang Wang[#], Fei Chen[#], Mingjie Xie^{*}

Key Laboratory of Biotechnology and Molecular Drug Development in Liaoning Province, College of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian 116081, Liaoning Province, China

Abstract: [Objective] This study aims to explore the inhibitory effect of alkannin on *Candida albicans* and the mechanism. [Methods] The minimal inhibitory concentration and minimal fungicidal concentration of alkannin on *C. albicans* were measured by microdilution method. The effect of alkannin on the membrane permeability of *C. albicans* was determined by ultraviolet spectrophotometry. The effect of alkannin on the morphology of *C. albicans* was observed by scanning electron microscope and the effect of alkannin on intracellular calcium ion concentration of *C. albicans* was determined by laser scanning confocal microscope. The effect of alkannin on membrane phospholipid enzyme activity of *C. albicans* was determined by egg-yolk agar plate medium method. The effect of alkannin on amount of gene expression of *PLB1* and *PLB2* was determined by RT-PCR. [Results] Alkannin had potent inhibitory effect on *C. albicans*, the minimal inhibitory concentration and minimal fungicidal concentration of alkannin on *C. albicans* were 16 µg/mL and 32 µg/mL respectively. Alkannin could damage the cytomembrane integrity of *C. albicans* and increased the permeability of cytomembrane, leading to the leakage of macromolecular substances such as DNA and RNA in cells and the loss of intracellular calcium ions. The concentration of macromolecular substances such as DNA and RNA in the supernatant increased by 117.32% ($P<0.01$) after alkannin acted on *C. albicans* for 16 h and the intracellular $[Ca^{2+}]$ decreased by 72.02% ($P<0.01$). The scanning result of electron microscopy also proved the destructive effect of alkannin on *C. albicans* cytomembrane. Alkannin could inhibit secretion of phospholipase by *C. albicans* and showed the dose-dependence. Alkannin in minimal inhibitory concentration decreased phospholipase secretion of *C. albicans* by 56.3% ($P<0.01$) compared with the control group. RT-PCR results demonstrated that alkannin could inhibit the expression of *PLB1* and *PLB2*, which were a pair of gene encoding phospholipase B. After alkannin in 1/2 minimal inhibitory concentration acted on *C. albicans* for 16 h, the expression of *PLB1* and *PLB2* decreased by 56.4% and 61.4% respectively ($P<0.01$) compared with the control group. [Conclusion] Alkannin had a strong inhibitory effect on *C. albicans* by damaging cytomembrane integrity of *C. albicans* and increasing the permeability, leading to leak of intracellular macromolecule such as DNA and RNA and loss of $[Ca^{2+}]$, eventually causing cell death. The inhibition of alkannin on phospholipase secretion of *C. albicans* prevented cells from maintaining and repairing the damage of cytomembrane caused by alkannin, was also one of reasons of cell death.

Keywords: alkannin, *Candida albicans*, cytomembrane, phospholipase

(本文责编: 李磊)

Supported by the Liaoning College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program (201710165000223), by the Liaoning Natural Science Foundation Project (201602462) and by the Liaoning Provincial Department of Education General Scientific Research Project (L201683675)

*Corresponding author. Tel: +86-411-85827068; E-mail: xmj1222@sina.com

[#]These authors contributed equally to this work.

Received: 30 December 2017; Revised: 25 March 2018; Published online: 15 June 2018