



## 小檗碱抗新生隐球菌活性和作用机制

徐佳龙<sup>1</sup>, 宋浩雷<sup>2</sup>, 陈晓琴<sup>1</sup>, 叶政苑<sup>1</sup>, 范静<sup>1</sup>, 廖国建<sup>1\*</sup>

1 西南大学药学院 黄连开发与利用教育部工程研究中心, 重庆 400715

2 河北亚诺生物科技股份有限公司, 河北 石家庄 052165

徐佳龙, 宋浩雷, 陈晓琴, 叶政苑, 范静, 廖国建. 小檗碱抗新生隐球菌活性和作用机制[J]. 微生物学报, 2023, 63(4): 1541-1550.

XU Jialong, SONG Haolei, CHEN Xiaoqin, YE Zhengyuan, FAN Jing, LIAO Guojian. Antifungal activity and mechanism of berberine against *Cryptococcus neoformans*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(4): 1541-1550.

**摘要:** 【目的】研究小檗碱对新生隐球菌的抗菌活性及其作用机制。【方法】采用微量肉汤稀释法测定小檗碱对新生隐球菌标准菌株和临床分离菌株的最小抑菌浓度, 通过棋盘法测定小檗碱与氟康唑、两性霉素 B 的协同作用, 测定小檗碱对隐球菌重要毒力因子的表达, 以及对巨噬细胞和隐球菌互作的影响, 采用隐球菌感染大蜡螟模型测定小檗碱的体内杀菌活性。【结果】小檗碱是一种杀真菌化合物, 在测试的菌株中, 最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)范围为 8–16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。亚致死剂量小檗碱能够抑制隐球菌荚膜大小、产黑色素能力和有性生殖能力, 并能增强巨噬细胞的杀菌能力。锌指转录因子 Nrg1 介导了上述重要的过程。在隐球菌感染动物模型中, 小檗碱能够延长感染大蜡螟的存活时间。【结论】小檗碱在体内外具有优异的抗隐球菌活性, 有望作为抗隐球菌药物开发的起始化合物。

**关键词:** 新生隐球菌; 小檗碱; 毒力因子; 锌指转录因子 Nrg1

资助项目: 重庆市自然科学基金(cstc2020jcyj-msxmX0439)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2020jcyj-msxmX0439).

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-23-68251225, E-mail: gjliao@swu.edu.cn

Received: 2022-08-30; Accepted: 2022-11-01; Published online: 2022-11-04

# Antifungal activity and mechanism of berberine against *Cryptococcus neoformans*

XU Jialong<sup>1</sup>, SONG Haolei<sup>2</sup>, CHEN Xiaoqin<sup>1</sup>, YE Zhengyuan<sup>1</sup>, FAN Jing<sup>1</sup>, LIAO Guojian<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Engineering Research Center of Coptis Development and Utilization, Ministry of Education, College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

<sup>2</sup> Hebei Yanuo Bioscience Co., Ltd., Shijiazhuang 052165, Hebei, China

**Abstract:** [Objective] To investigate the antifungal activity and mechanism of berberine against *Cryptococcus neoformans*. [Methods] The minimum inhibitory concentration (MIC) of berberine against the standard strain and clinical isolates of *C. neoformans* was determined by micro-broth dilution method. The synergistic effect of berberine with the marketed antifungal drugs (fluconazole and amphotericin B) was determined by checkerboard method. Further, we determined the effects of berberine on the expression of key virulence factors of *Cryptococcus* and on the macrophage-*Cryptococcus* interaction. The *in vivo* fungicidal activity of berberine was examined with the *Galleria mellonella* model of *Cryptococcus* infection. [Results] Berberine was a fungicidal compound with a MIC range of 8–16  $\mu\text{g/mL}$  against the tested strains. Berberine at the sublethal concentration inhibited capsule size, melanin-producing ability, and sexual reproduction and enhanced the fungicidal ability of macrophages. The zinc-finger transcription factor Nrg1 mediated these important processes. The experiment with the *G. mellonella* model of cryptococcal infection showed that berberine prolonged the survival time of infected *G. mellonella*. [Conclusion] Berberine exhibits excellent anti-cryptococcal activity *in vitro* and *in vivo* and is expected to be a promising starting compound for the development of anti-cryptococcal agents.

**Keywords:** *Cryptococcus neoformans*; berberine; virulence factors; zinc finger transcription factor Nrg1

新生隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*) 是一类重要的人类条件致病真菌，每年造成超过 100 万例的感染和超过 23 万人死亡<sup>[1]</sup>。然而迄今为止治疗新生隐球菌感染药物的种类和数量却都非常有限，仅有氟康唑 (fluconazole, FCZ)、两性霉素 B 和氟胞嘧啶 3 种药物<sup>[2]</sup>。氟康唑和两性霉素 B 影响真菌细胞膜的关键成分麦角固醇，氟胞嘧啶靶向真菌的核酸代谢。随着这些抗真菌药物的长期使用，氟康唑和氟胞嘧啶耐药菌株的比例越来越高，严重限制它们的使用<sup>[1]</sup>。虽然两性霉素 B 耐药菌株非常罕见，

然而该药物有严重的毒副作用，如溶血活性和肾脏毒性。因此，迫切需要开发新结构新作用机制的抗真菌药物。

小檗碱 (berberine, BBR) 亦称黄连素，属于异喹啉生物碱，是一种具有悠久药用历史的传统中药。小檗碱可从许多植物中提取得到，如黄连 (黄连、金菊头)、金印草 (北美黄连) 和刺楸 (小檗) 等<sup>[3]</sup>。小檗碱具有广泛的药理和生物活性，在抗微生物、抗肿瘤、抗炎和抗糖尿病等方面表现出显著的活性<sup>[4]</sup>。近年来，研究发现小檗碱对念珠菌和隐球菌等致病真菌具有抑制

作用<sup>[5-6]</sup>。在白色念珠菌中,小檗碱与氟康唑、两性霉素 B 等联用能起到协同抑菌效果,并能逆转药物外排泵 Mdr1 介导的氟康唑耐药<sup>[5-7]</sup>。小檗碱通过调控真菌细胞膜麦角固醇含量,影响细胞内活性氧的产生等机制来发挥抗菌作用,然而分子机制有待深入研究。

在本研究中,以重要人类病原真菌新生隐球菌为研究对象,测试小檗碱的体内外抗菌活性,以及小檗碱对隐球菌重要毒力因子表达的影响,并初步探索了抗菌和调控毒力因子表达的作用机制,这些结果为进一步开发小檗碱为新型抗真菌药物奠定坚实的基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

新生隐球菌 H99、KN99a 以及 7 株临床分离株和巨噬细胞 J774A.1 由实验室保藏。临床分离株分离自艾滋病患者,由重庆市公共卫生医疗救治中心李同心提供,PKA1 和 HOG1 敲除菌株由美国罗格斯大学薛朝阳提供。NRG1 敲除菌株和回补菌株由实验室构建和保藏<sup>[8]</sup>。大蜡螟购于天津惠裕德生物科技有限公司。实验常规试剂主要购买于大连美仑生物技术有限公司等公司。LPS、 $\gamma$ -干扰素、小鼠补体购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司,YPD 培养基购赛默飞世尔科技(中国)有限公司,限制性内切酶及连接酶购于纽英伦生物技术(北京)有限公司和赛默飞世尔科技(中国)有限公司公司。质粒提取、片段纯化和胶回收试剂盒购于 OMEGA Bio-Tek。常规 DNA 聚合酶为北京全式金生物技术股份有限公司的 EasyTaq 酶,高保真扩增酶为南京诺唯赞生物科技股份有限公司(Vazyme)的 Phanta Max Super-Fidelity DNA 聚合酶, RNA 提取试剂盒购于江苏康为世纪生物科技股份有限公司,反转试剂盒与实时荧光定

量试剂盒购于 Vazyme 公司。

### 1.2 小檗碱体外抗真菌活性评价

小檗碱、两性霉素 B 和氟康唑对新生隐球菌抑制活性参照临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)的标准,采取微量稀释法进行检测。将隐球菌初始浓度定为  $1 \times 10^3$  CFU/mL,分别向其中加入不同浓度的药物(起始浓度为 256  $\mu$ g/mL,96 孔板 2 倍梯度稀释),于 37  $^{\circ}$ C 培养箱中静置培养,48 h 后检测微生物的生长情况。对于小檗碱和两性霉素 B,最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)定义为不能够观察到菌生长的最低药物浓度;对于氟康唑, MIC 定义为与不加药物对照相比,新生隐球菌生长抑制 50% 时的药物浓度。2 种药物之间的体外相互作用采用棋盘法由分数抑制浓度指数(fractional inhibitory concentration index, FICI)定义。FICI 模型表示如下:  $FICI = FIC_A + FIC_B = (\text{联合使用 A 的 MIC} / \text{单独使用 A 的 MIC}) + (\text{联合使用 B 的 MIC} / \text{单独使用 B 的 MIC})$ 。对 FICI 的解释是:协同作用  $FICI \leq 0.5$ ,相加作用  $0.5 < FICI \leq 1.0$ ,拮抗作用  $FICI > 4.0$ ,无交互作用  $1 < FICI \leq 4.0$ 。

将新生隐球菌 H99 培养至对数生长期,调节菌浓度为  $5 \times 10^3$  CFU/mL 用于杀菌曲线测试。将稀释好的菌液和小檗碱或氟康唑孵育,药物终浓度分别为 1 $\times$ 、5 $\times$ 和 10 $\times$ MIC。培养不同时间后取样,梯度稀释后涂布平板,置于 37  $^{\circ}$ C 培养箱培养 48 h,统计菌落数。

### 1.3 新生隐球菌荚膜检测

从平板中沾取少许菌体接种至 3 mL YPD 液体培养基中,220 r/min、30  $^{\circ}$ C 培养 12 h。从培养后的菌液中取 1 mL,4 500 r/min 离心 4 min,弃上清,向沉淀中加入 1 mL 蒸馏水重悬菌体,4 500 r/min 离心 4 min,弃上清,此步骤重复 2 次。再向沉淀菌体中加 1 mL 蒸馏水重悬,取

其中 100  $\mu\text{L}$  滴至含有不同浓度药物的 DEME 平板, 于 30  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养, 3 d 后观察结果。

#### 1.4 新生隐球菌有性生殖检测

从平板中沾取少许 H99 MAT $\alpha$  和 KN99 MAT $\alpha$  菌体分别接种至 3 mL YPD 液体培养基中, 220 r/min, 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 14 h; 从培养后的菌液中取 1 mL, 4 500 r/min 离心 4 min 后弃上清; 向沉淀菌体中加入 1 mL 蒸馏水重悬, 4 500 r/min 离心 4 min 后弃上清, 此步骤重复 2 次; 然后再向沉淀菌体中加 100  $\mu\text{L}$  蒸馏水重悬, 将 H99 MAT $\alpha$  与 KN99 MAT $\alpha$  混合, 取混合后的 50  $\mu\text{L}$  菌液滴至含有不同浓度药物的 MS 培养基; 待菌液晾干后放在 25  $^{\circ}\text{C}$  避光培养。

#### 1.5 隐球菌与巨噬细胞互作

参照 Han 等<sup>[9]</sup>的方法, 在 48 孔培养板中进行了隐球菌与巨噬细胞的相互作用试验。在 48 孔培养板的每个孔中加入总共  $5 \times 10^4$  个 J774 A.1 细胞的 0.5 mL 新鲜 DMEM, 并在 37  $^{\circ}\text{C}$  和 5% 的二氧化碳中培养过夜。为了激活巨噬细胞, 在每个孔中加入 50 单位/毫升  $\gamma$  干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 和 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)。1 $\times$ PBS 缓冲液洗涤隐球菌 2 次后, 加入 20% 的小鼠补体。然后在每个孔中加入  $2 \times 10^5$  个隐球菌细胞, 使真菌与 J774 细胞的比例为 4:1。共孵育 2 h 后, 用新鲜的 DMEM 清洗非黏附的细胞外酵母细胞, 加入不同浓度的小檗碱, 并将培养物再培养 24 h, 以评估药物新生隐球菌的细胞内增殖的影响。培养结束后用蒸馏水在室温下裂解巨噬细胞 30 min。将裂解液涂布在 YPD 平板上, 培养 2 d 后计算平板中的隐球菌数。

#### 1.6 新生隐球菌黑色素生成能力的检测

将活化后的新生隐球菌转移至 YPD 液体培养基中, 220 r/min 培养 2 h 后收集菌体, 稀释至  $OD_{600}=1.0$ , 10 倍稀释滴至含有不同浓度药物的 Niger Seed 培养基上, 于 30  $^{\circ}\text{C}$  培养箱

中培养 3 d 后观察结果。

#### 1.7 新生隐球菌 RNA 提取和 RT-qPCR 分析

RNA 提取和 RT-qPCR 分析参照已发表论文的方法<sup>[10]</sup>。按照说明书进行反转录和 qPCR。基因表达差异倍数通过与 *TEF1* 的表达水平进行均一化进行计算, 并通过取  $\text{Log}_2$  确定基因表达的表达式。

#### 1.8 小檗碱体内抗真菌活性评价

将大蜡螟分为 7 组, 每组 10 只, 前 6 组注射 10  $\mu\text{L}$  浓度为  $1 \times 10^7$  CFU/mL H99 菌液, 第 7 组注射等体积生理盐水。孵育 3 h 后, 注射药液 10  $\mu\text{L}$ , 第 1 组为氟康唑 (14 mg/kg), 第 2 组为 BBR (10 mg/kg), 第 3 组为 BBR (20 mg/kg), 第 4 组为 BBR (40 mg/kg), 第 5 组为联合用药组 (BBR 20 mg/kg+FCZ 14 mg/kg), 第 6、7 组注射生理盐水, 注射后 37  $^{\circ}\text{C}$  培养, 每隔 24 h 观察大蜡螟死亡数目, 至实验组所有大蜡螟死亡。

## 2 结果与分析

#### 2.1 小檗碱对新生隐球菌具有抑制活性

为了测试小檗碱对新生隐球菌的抑制活性, 采用肉汤稀释法测定了小檗碱 (BBR) 对标准菌株 H99 和 7 株临床分离菌株的最小抑菌浓度, 以一线抗真菌药物氟康唑作为对照。结果显示小檗碱对所有测试菌株均有抑制活性, 其 MIC 范围为 8–16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (表 1)。为了进一步确定小檗碱对新生隐球菌是抑菌还是杀菌作用, 以抑菌药物氟康唑作为对照, 测定不同药物处理下标准菌株 H99 的存活率。结果显示, 小檗碱 (5 $\times$ MIC 和 10 $\times$ MIC) 处理 12 h 后隐球菌全部被杀灭, 而在相同的 MIC 倍数甚至更高倍数时氟康唑仍然是抑菌效果, 并且小檗碱的最低杀菌浓度是最低抑菌浓度的 2 倍, 这表明小檗碱对隐球菌具有杀菌作用 (图 1)。药物联用是治疗

表 1 小檗碱抗新生隐球菌活性

Table 1 Antifungal activity of berberine against *Cryptococcus neoformans* strains

Strains	Origin	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) BBR	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) FLC
<i>C. neoformans</i> H99	Standard strain	16.00	2.00
<i>C. neoformans</i> 1	Clinical	8.00	4.00
<i>C. neoformans</i> 2	Clinical	16.00	0.25
<i>C. neoformans</i> 3	Clinical	8.00	4.00
<i>C. neoformans</i> 4	Clinical	8.00	2.00
<i>C. neoformans</i> 5	Clinical	16.00	4.00
<i>C. neoformans</i> 6	Clinical	8.00	2.00
<i>C. neoformans</i> 7	Clinical	8.00	4.00

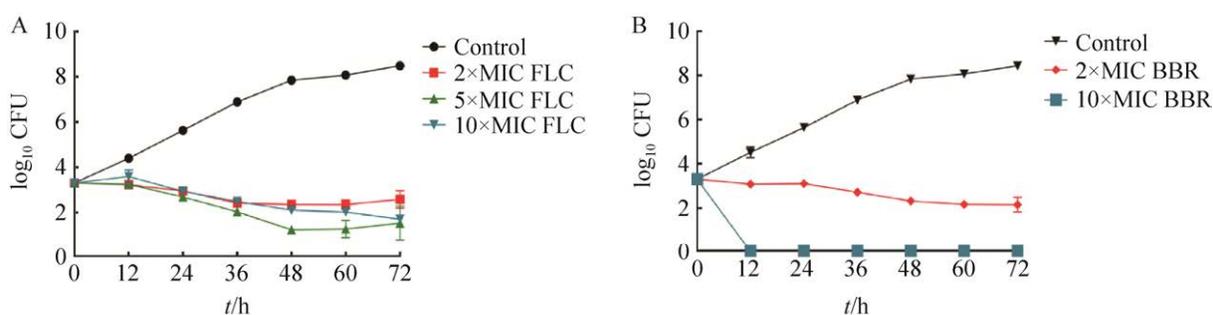


图 1 小檗碱对新生隐球菌的杀菌活性

Figure 1 The effect of Berberine on *Cryptococcus neoformans*. Time dependent killing of *C. neoformans* by fluconazole (A) or berberine (B) at 2 $\times$ , 5 $\times$  and 10 $\times$  MIC. The fungal CFUs at different time points during treatment were determined. Data are the means $\pm$ SD for three biological repeats.

真菌感染的重要策略, 不仅有望缩短治疗周期, 降低药物毒副作用和使用剂量, 还能拓展新的抗真菌药物, 避免耐药菌株的出现<sup>[11]</sup>。因此, 我们进一步测试了小檗碱与氟康唑或两性霉素 B 联用的抗菌效果, 结果显示小檗碱与氟康唑或两性霉素 B 的联用为相加作用, FICI 值分别为 0.625 和 1.000, 表明小檗碱具有与其他抗真菌药物联用的潜力。

## 2.2 小檗碱抑制荚膜和黑色素等重要毒力因子的合成

荚膜是新生隐球菌的重要毒力因子, 荚膜不仅能削弱宿主的免疫反应, 同时还能提供重要的抗氧化防御, 从而极大提高了新生隐球菌在感染中的存活机会<sup>[12]</sup>。小檗碱处理(1 $\times$  MIC 和 4 $\times$  MIC)显著抑制新生隐球菌的细胞体大小以

及荚膜大小(图 2A–2C)。黑色素是新生隐球菌另一个重要毒力因子, 在维持新生隐球菌细胞壁和荚膜结构, 以及抗氧化功能中发挥了重要的作用<sup>[2]</sup>。小檗碱处理(4 $\times$  MIC)显著抑制了新生隐球菌黑色素的产生(图 2D)。

## 2.3 小檗碱抑制新生隐球菌有性生殖

有性生殖是新生隐球菌进化的关键策略, 通过该过程产生的孢子能通过呼吸进入体内, 进而感染肺, 并可能突破血脑屏障而感染脑部, 造成致命的隐球菌脑膜炎<sup>[13]</sup>。为了检测小檗碱对新生隐球菌的有性生殖产生影响, 将 KN99a 与 H99 $\alpha$  菌株等体积混匀后滴至未加小檗碱及添加不同浓度小檗碱的 MS 培养基上, 于 25  $^{\circ}\text{C}$  培养, 并分别在培养第 5 天和第 15 天观察新生隐球菌是否正常产生菌丝。结果显示, 当小檗

碱浓度为  $1\times\text{MIC}$  时抑制了菌丝形成, 当小檗碱浓度达到  $4\times\text{MIC}$  时几乎完全抑制了菌丝形成(图 2E)。

## 2.4 小檗碱抑制巨噬细胞内新生隐球菌的增殖

新生隐球菌的一个关键特征是它能在巨噬细胞的吞噬溶酶体内存活和复制, 并进而从巨噬细胞逃逸, 造成进一步的感染<sup>[12]</sup>。为了研究小檗碱对巨噬细胞中新生隐球菌生长的影响, 我们开展了新生隐球菌与巨噬细胞互作的实验。结果显示, 当小檗碱浓度仅为  $2.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$  时就能限制抑制巨噬细胞内(图 3A)、巨噬细胞

外(图 3B)新生隐球菌的生长, 这表明小檗碱有效抑制巨噬细胞内外新生隐球菌的生长, 从而抑制新生隐球菌在巨噬细胞间的传播和逃逸。

## 2.5 *NRG1* 在新生隐球菌抗小檗碱过程中发挥重要作用

*NRG1* 编码一个真菌中保守的锌指家族转录因子<sup>[14]</sup>。在新生隐球菌中, *NRG1* 缺失导致突变株荚膜变小、合成黑色素能力下降、有性生殖受到抑制<sup>[15]</sup>, 这些都与小檗碱对新生隐球菌的影响类似, 暗示 *NRG1* 可能在小檗碱抗菌过程中发挥重要作用。为了测试 *Nrg1* 的功能, 我们通过同源双交换替换手段得到了新生隐

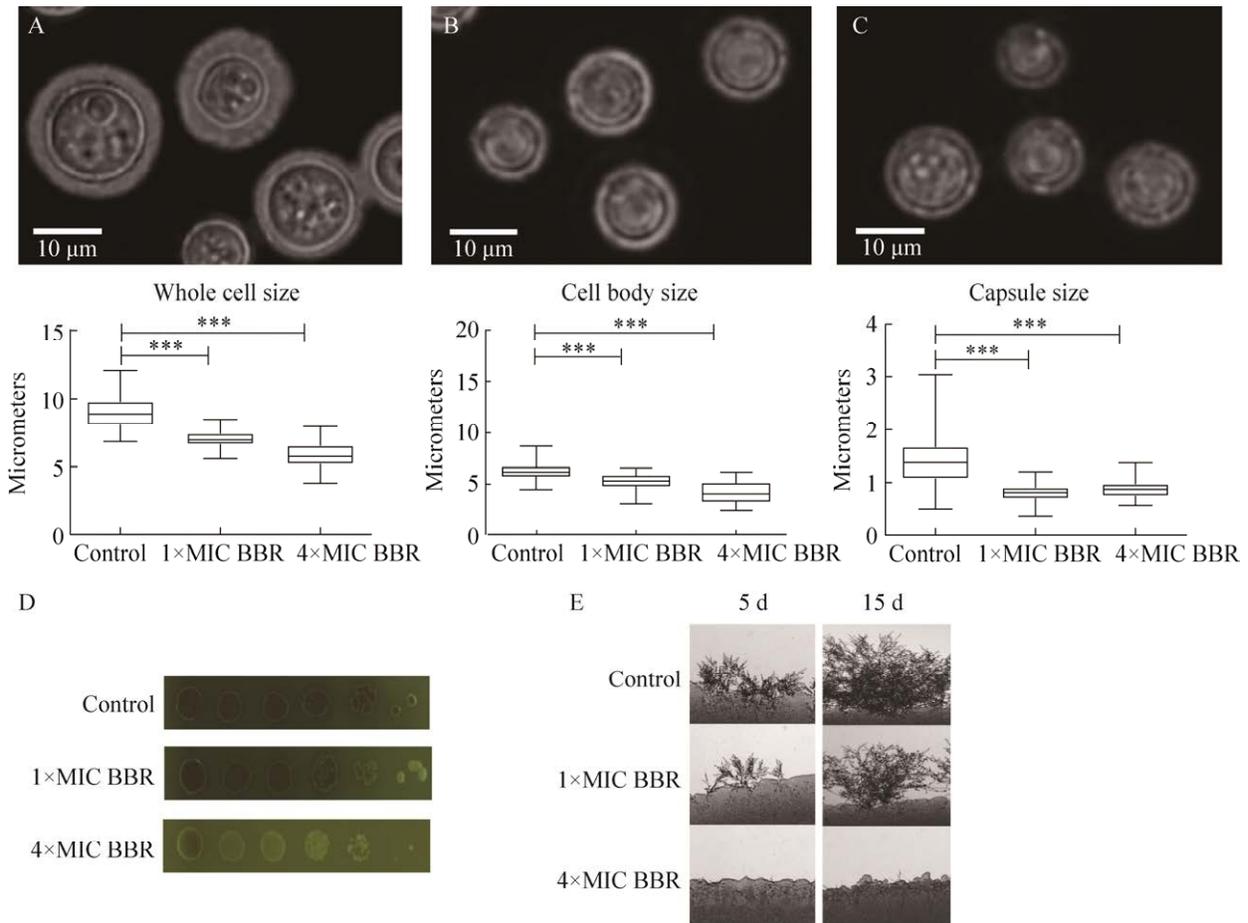


图 2 小檗碱对隐球菌重要毒力因子表达和有性生殖过程的影响

Figure 2 The effect of Berberine treatment on capsule generation (A–C), melanin production (D) and mating process (E) of *Cryptococcus neoformans*. The capsule generation experiment was performed twice, and at least 100 cells were analyzed. \*\*\*:  $P < 0.001$  by two-way ANOVA compared to the respective untreated control.

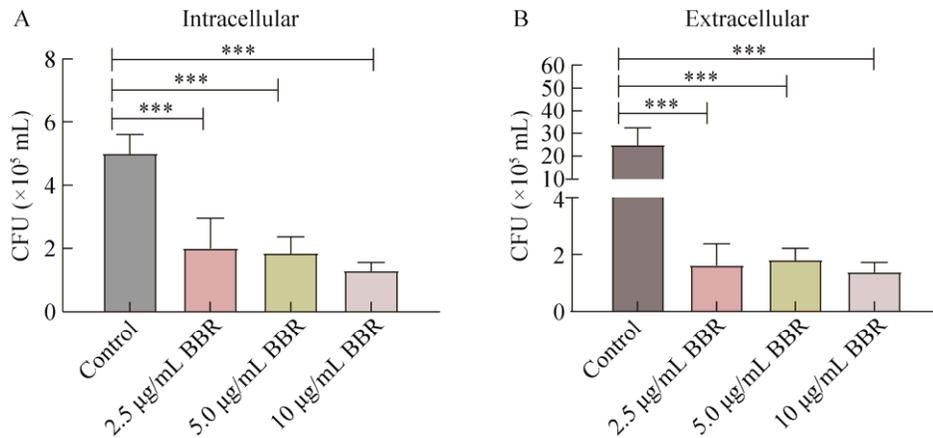


图3 小檗碱对巨噬细胞内和巨噬细胞外新生隐球菌的生长的影响

Figure 3 The effect of Berberine on the growth of *Cryptococcus neoformans* in (A) and outside (B) macrophage. The fungal CFUs with different treatments were determined. Data are the means $\pm$ SD for three biological repeats. \*\*\*:  $P < 0.001$  indicates significance.

球菌的 *NRG1* 敲除菌株和回补菌株。敲除菌株的表型与文献报道一致(数据未呈现)。小檗碱 (20 µg/mL) 显著抑制了 *NRG1* 敲除菌株的生长, 回补菌株则恢复至与野生型表型一致, 这表明

*NRG1* 缺失后新生隐球菌抗小檗碱能力大幅下降(图 4A)。转录分析发现, 小檗碱处理导致 *NRG1* 转录上调(图 4B)。这些结果表明 *NRG1* 是新生隐球菌抗小檗碱的重要基因。

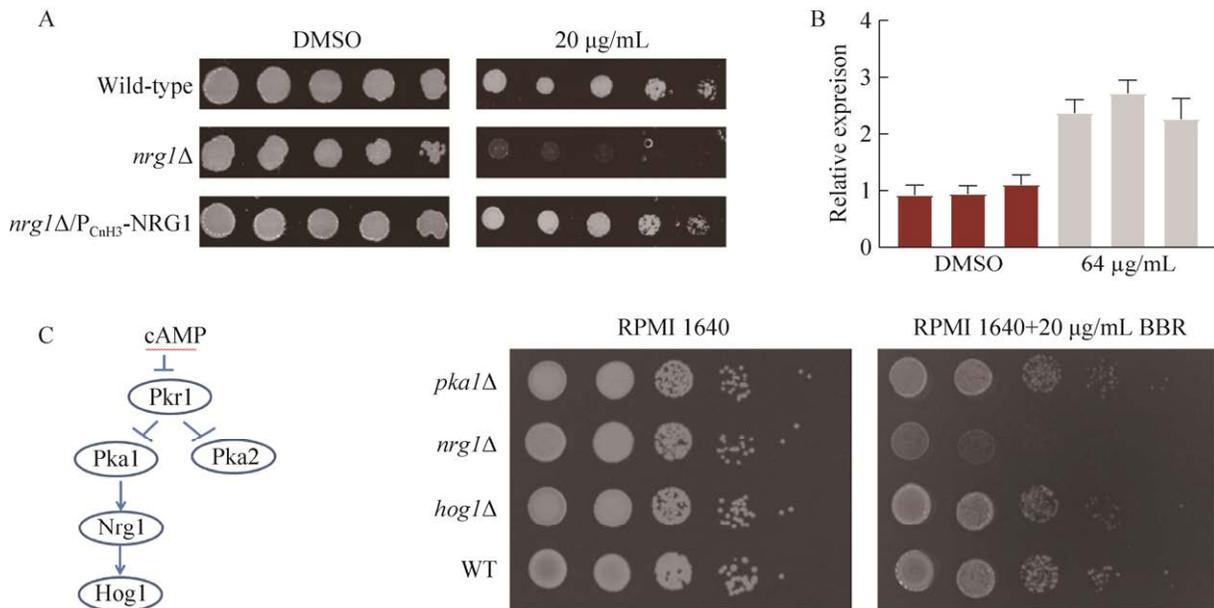


图4 *Nrg1* 在小檗碱抗新生隐球菌活性中发挥的作用

Figure 4 The role of *Nrg1* in berberine against *Cryptococcus neoformans*. A: The phenotype of *NRG1* deletion mutant and its corresponding complemented strain. B: The effect of berberine treatment (64 µg/mL for 2 h) on gene expression of *NRG1*. Data are represented as the mean $\pm$ SD for three biological repeats. C: The phenotype of representative gene mutants in cAMP pathway.

环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)途径对新生隐球菌毒力表达至关重要, negative regulator of glucose-repressed genes 1 (Nrg1)是新生隐球菌 cAMP 途径的重要成员<sup>[16]</sup>。为了分析 cAMP 途径在小檗碱抗隐球菌中的作用,我们检测了位于 Nrg1 上游的 protein kinase A 1 (*PKA1*)敲除菌株、位于 Nrg1 下游的 high osmolarity glycerol response 1 (*HOG1*)敲除菌株的抗隐球菌活性,结果显示 *PKA1* 和 *HOG1* 缺失不影响新生隐球菌的生长,仅 *NRG1* 缺失菌株对小檗碱敏感(图 4C), 这些结果表明 Nrg1 可能通过非 cAMP 途径调控抗小檗碱活性。

### 2.6 小檗碱在真菌感染动物模型中具有活性

体外实验结果表明小檗碱不仅能够抑制隐球菌的生长,还能够降低多种重要毒力因子的表达,这些结果推动我们进一步测定小檗碱在新生隐球菌感染大蜡螟模型中的活性。无药物处理的组中,所有动物在 96 h 时全部死亡; 10 mg/kg BBR 组的动物也在 96 h 全部死亡; 20 mg/kg BBR 组则在 120 h 全部死亡; 40 mg/kg BBR 组在 168 h 全部死亡; 注射 14 mg/kg FCZ 组在 144 h 全部死亡; 联合用药组存活时间最长, 在 192 h 才全部死亡(图 5)。这些结果表明小檗

碱处理显著提高了大蜡螟的生存率,并且小檗碱与氟康唑联用使用具有较好的协同效果。

## 3 讨论与结论

随着各种原因造成免疫力低下人群的快速增加, 新生隐球菌等病原真菌给人类健康带来日益严重的威胁。更为严重的是, 病原真菌的耐药性日益严重, 造成临床上能够使用的抗真菌药物非常有限。开发新型抗真菌药物是应对病原真菌威胁的重要策略。传统中药中蕴含丰富的抗真菌活性物质, 小檗碱是其中的典型代表。已有文献报道小檗碱与氟康唑联用通过多种机制逆转白色念珠菌的氟康唑耐药性, 比如通过促进细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生; 作用于药物外排泵基因的表达, 下调药物外排泵的功能, 促进细胞内药物积累。下调编码唑类药物靶标-羊毛甾醇 14- $\alpha$ -脱甲基酶(ERGosterol biosynthesis 11, Erg11)的基因表达, 减少细胞膜麦角甾醇的合成, 造成细胞膜完整性被破坏和细胞死亡<sup>[5-7]</sup>。然而, 小檗碱自身的杀菌活性及其机理尚不明确。本研究表明小檗碱在体内外都具有良好的抗菌效果。除了

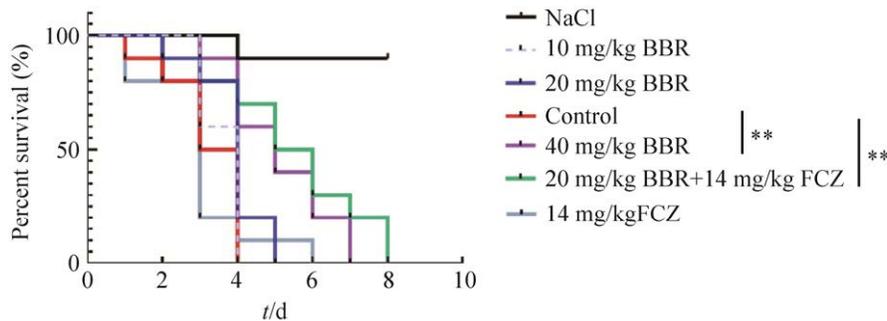


图 5 小檗碱在隐球菌感染模型中的治疗效果

Figure 5 The effect of berberine against *Cryptococcus neoformans* in an animal infection model. Survival rate of *G. mellonella* Larvae ( $n=10$  per group) infected with *C. neoformans* H99 under the treatment of berberine (10 mg/kg, 20 mg/kg or 40 mg/kg), fluconazole (14 mg/kg) or combination (20 mg/kg+14 mg/kg).  $P$  values were determined using the two-sided, log[rank](Mantel-Cox) test. \*\*: indicate significance,  $P < 0.01$ .

直接杀灭隐球菌外, 亚致死浓度的小檗碱还能够抑制新生隐球菌多种毒力因子的表达, 如荚膜和黑色素的形成, 还能够促进巨噬细胞对于隐球菌的杀灭作用。

作用机制研究发现, 新生隐球菌转录因子 Nrg1 介导了小檗碱的抗隐球菌活性。Nrg1 是一种真菌中保守分布的锌指转录因子。酿酒酵母的 Nrg1 控制芽殖酵母生物膜形成, 协调细胞适应碳水化合物, 参与 pH 响应等。白色念珠菌中 Nrg1 调控菌丝特异性基因的表达, 敲除菌株在小鼠感染模型中毒力减弱<sup>[14]</sup>。新生隐球菌中 *NRG1* 缺失后也导致在小鼠感染模型中毒力减弱。本研究中, *NRG1* 缺失导致菌株对于小檗碱更加敏感, 回补 *NRG1* 后, 对小檗碱敏感的表现消失。在野生型菌株过表达 *NRG1* 后, 过表达菌株并未增加对小檗碱的耐药性。此外小檗碱也不改变 Nrg1 在细胞内的亚细胞定位(数据未呈现)。cAMP 途径中位于 Nrg1 上下游调控基因的敲除也不影响对小檗碱的敏感性, 这些结果表明 Nrg1 可能通过新颖的机制来发挥抗隐球菌活性。鉴于小檗碱良好的体内外抗新生隐球菌活性, 深入解析小檗碱通过 Nrg1 介导的抗菌作用机制, 将为开发小檗碱作为新型抗真菌药物奠定坚实的基础。

## 参考文献

- [1] IYER KR, REVIE NM, FU C, ROBBINS N, COWEN LE. Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19(7): 454-466.
- [2] MAY RC, STONE NRH, WIESNER DL, BICANIC T, NIELSEN K. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(2): 106-117.
- [3] PLAZAS E, AVILA M MC, MUÑOZ DR, CUCA SLE. Natural isoquinoline alkaloids: pharmacological features and multi-target potential for complex diseases[J]. *Pharmacological Research*, 2022, 177: 106126.
- [4] SINGH S, PATHAK N, FATIMA E, NEGI AS. Plant isoquinoline alkaloids: advances in the chemistry and biology of berberine[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, 226: 113839.
- [5] da SILVA AR, de ANDRADE NETO JB, da SILVA CR, CAMPOS R, COSTA SILVA RA, FREITAS DD, DO NASCIMENTO FB, de ANDRADE LND, SAMPAIO LS, GRANGEIRO TB, MAGALHÃES HIF, CAVALCANTI BC, de MORAES MO, NOBRE JÚNIOR HV. Berberine antifungal activity in fluconazole-resistant pathogenic yeasts: action mechanism evaluated by flow cytometry and biofilm growth inhibition in *Candida* spp.[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016, 60(6): 3551-3557.
- [6] LI DD, XU Y, ZHANG DZ, QUAN H, MYLONAKIS E, HU DD, LI MB, ZHAO LX, ZHU LH, WANG Y, JIANG YY. Fluconazole assists berberine to kill fluconazole-resistant *Candida albicans*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(12): 6016-6027.
- [7] TONG YJ, ZHANG JY, SUN N, WANG XM, WEI Q, ZHANG Y, HUANG R, PU YY, DAI HQ, REN B, PEI G, SONG FH, ZHU GL, WANG XY, XIA XK, CHEN XY, JIANG L, WANG SL, OUYANG LM, XIE N, et al. Berberine reverses multidrug resistance in *Candida albicans* by hijacking the drug efflux pump Mdr1p[J]. *Science Bulletin*, 2021, 66(18): 1895-1905.
- [8] 叶政苑. 小檗碱抗新生隐球菌活性和作用机制研究[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2019.  
YE ZY. Mechanism of berberine killing *Cryptococcus neoformans*[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2019 (in Chinese).
- [9] HAN LT, WU YJ, LIU TB. The F-box protein Fbp1 regulates virulence of *Cryptococcus neoformans* through the putative zinc-binding protein Zbp1[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 794661.
- [10] YE LX, WANG SS, ZHENG J, CHEN L, SHEN L, KUANG Y, WANG YQ, PENG Y, HU CH, WANG LQ, TIAN XY, LIAO GJ. Functional characterization of the GlcNAc catabolic pathway in *Cryptococcus deneoformans*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022, 88(13): e0043722.
- [11] TYERS M, WRIGHT GD. Drug combinations: a

- strategy to extend the life of antibiotics in the 21st Century[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(3): 141-155.
- [12] KRONSTAD JW, ATTARIAN R, CADIEUX B, CHOI J, D'SOUZA CA, GRIFFITHS EJ, GEDDES JMH, HU GG, JUNG WH, KRETSCHMER M, SAIKIA S, WANG J. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(3): 193-203.
- [13] LIU LX, HE GJ, CHEN L, ZHENG J, CHEN YY, SHEN L, TIAN XY, LI EW, YANG EC, LIAO GJ, WANG LQ. Genetic basis for coordination of meiosis and sexual structure maturation in *Cryptococcus neoformans*[J]. *eLife*, 2018, 7: e38683.
- [14] SU C, YU J, SUN QQ, LIU Q, LU Y. Hyphal induction under the condition without inoculation in *Candida albicans* is triggered by Brg1-mediated removal of NRG1 inhibition[J]. *Molecular Microbiology*, 2018, 108(4): 410-423.
- [15] CRAMER KL, GERRALD QD, NICHOLS CB, PRICE MS, ALSPAUGH JA. Transcription factor Nrg1 mediates capsule formation, stress response, and pathogenesis in *Cryptococcus neoformans*[J]. *Eukaryotic Cell*, 2006, 5(7): 1147-1156.
- [16] CAZA M, KRONSTAD JW. The cAMP/protein kinase a pathway regulates virulence and adaptation to host conditions in *Cryptococcus neoformans*[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019, 9: 212.