

研究报告

橄榄苦苷对须癣毛癣菌的抗菌作用及机制分析

林凯¹, 许静¹, 杨爱霞^{*1,2}

1 湖北中医药大学 药学院, 湖北 武汉 430065

2 武汉市第一医院药学部, 湖北 武汉 430030

林凯, 许静, 杨爱霞. 橄榄苦苷对须癣毛癣菌的抗菌作用及机制分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(11): 4699-4711.

LIN Kai, XU Jing, YANG Aixia. Inhibitory activity and mechanism of oleuropein against *Trichophyton mentagrophytes*[J]. Microbiology China, 2024, 51(11): 4699-4711.

摘要:【背景】须癣毛癣菌是一种常见的皮肤浅部致病菌, 由其引发的皮肤癣菌病在人群中发病率较高, 对人们的身体健康构成了极大的威胁。【目的】探究橄榄苦苷单体对须癣毛癣菌的抑菌作用及机制。【方法】测定橄榄苦苷对须癣毛癣菌的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)和最小杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC), 基于 RNA-Seq 测序技术对橄榄苦苷作用后的须癣毛癣菌进行转录测序, 对测序序列进行质量评价与信息注释。使用 DESeq2 软件筛选差异表达基因(differentially expressed gene, DEG), 然后进行 GO 与 KEGG 显著性富集分析, 最后进行 RT-qPCR 验证。【结果】橄榄苦苷对须癣毛癣菌的 MIC 为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, MBC 为 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。RNA-Seq 测序结果显示, 相较于未给药处理组, 给药处理组共筛选出 534 个差异表达基因; 其中上调表达 401 个, 下调表达 133 个。序列已提交至 NCBI 的 Sequence read archive (SRA) 数据库, 登录号为 PRJNA1091040。DEG 主要富集在氧化磷酸化、氨基酸代谢、乙醛酸和二羧酸代谢等通路上, 并且相关基因均有显著性表达($P < 0.05$)。RT-qPCR 验证结果与转录组学表达趋势一致, 表明 RNA-Seq 测序结果可信度高。【结论】探究了橄榄苦苷对须癣毛癣菌产生抑制作用的分子机制, 为进一步揭示橄榄苦苷的抑菌作用机理提供了理论基础。

关键词: 橄榄苦苷; 须癣毛癣菌; 转录组学; 作用机制

资助项目: 湖北省卫生健康委中医药科研重点项目(ZY2019Z011)

This work was supported by the Key Project of Traditional Chinese Medicine Research of Health Commission of Hubei Province (ZY2019Z011).

*Corresponding author. E-mail: yangaixia0407@163.com

Received: 2024-03-27; Accepted: 2024-05-12; Published online: 2024-06-03

Inhibitory activity and mechanism of oleuropein against *Trichophyton mentagrophytes*

LIN Kai¹, XU Jing¹, YANG Aixia^{*1,2}

1 College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, Hubei, China

2 Department of Pharmacy, Wuhan No.1 Hospital, Wuhan 430030, Hubei, China

Abstract: [Background] *Trichophyton mentagrophytes* is a common superficial skin pathogen, and dermatophytosis caused by this pathogen has a high incidence, posing a threat to human health. [Objective] To investigate the inhibitory activity and mechanism of oleuropein against *T. mentagrophytes*. [Methods] We determined the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). RNA-Seq was performed for *T. mentagrophytes* treated with oleuropein and the obtained sequences were subjected to quality evaluation and information annotation. DESeq2 was used to identify the differentially expressed genes (DEGs), which were then subjected to Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment. RT-qPCR was conducted to validate the results. [Results] The MIC and MBC of oleuropein against *T. mentagrophytes* were 400 µg/mL and 800 µg/mL, respectively. A total of 534 DEGs were identified between the treatment group and the control group, including 401 genes with upregulated expression and 133 genes with downregulated expression. The sequence has been submitted to Sequence read archive (SRA) of the NCBI, with the accession number PRJNA1091040. These DEGs were mainly enriched in pathways related to oxidative phosphorylation, amino acid metabolism, and glyoxylate and dicarboxylate metabolism, with significant expression ($P < 0.05$). The RT-qPCR results were consistent with the results from transcriptomics, demonstrating the reliability of RNA-Seq findings. [Conclusion] We investigated the mechanism underlying the inhibitory effect of oleuropein on *T. mentagrophytes*, providing a theoretical basis for deciphering the antifungal mechanism of oleuropein.

Keywords: oleuropein; *Trichophyton mentagrophytes*; transcriptomics; mechanism

真菌性皮肤病是全球最普遍的传染病之一，而皮肤癣菌是其主要的致病菌，按菌属可分为毛癣菌属(*Trichophyton*)、小孢子菌属(*Microsporum*)和表皮菌属(*Epidermophyton*)等^[1-2]。在皮肤癣菌中，须癣毛癣菌(*Trichophyton mentagrophytes*)是真菌性皮肤病的第二大病原体，仅次于红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*)^[3]。目前，临床上治疗皮肤癣菌病主要以口服及外用抗真菌药物为主，包括唑类、丙烯胺类和多

烯类等^[4]。随着广谱抗真菌药物的长期应用导致病原菌耐药性的产生及毒副作用的发生，如毛癣菌对特比萘芬耐药^[5-6]，严重影响了患者的治疗效果，临床亟须新的、高效的、毒性低的抗真菌药物。

橄榄苦苷(oleuropein, OL)是一种天然裂环醚烯萜类化合物，由烯醇酸、羟基酪醇和葡萄糖分子组成^[7]，广泛存在于木樨榄属(油橄榄)、女贞属(女贞)、丁香属(野丁香)等植物中^[8-10]。

OL 在橄榄叶中含量尤为丰富^[8-10], 具有抗炎、抗菌、抗肿瘤、降血糖、皮肤创伤保护等生物活性^[8,11-13]。研究发现, 不同浓度的橄榄叶水提取物对皮肤癣菌和白色念珠菌等病原菌具有抑制作用, 1.25%橄榄叶水提取物能够抑制皮肤癣菌, 15%橄榄叶水提取物能直接杀死白色念珠菌(*Candida albicans*)^[14]。Zorić 等^[15]在体外研究了 OL 对白色念珠菌抗菌活性, 对其的抑制浓度为 12.5 mg/mL。目前关于 OL 单体对皮肤癣菌的研究比较有限, 本研究以须癣毛癣菌为研究对象, 初步探讨 OL 对须癣毛癣菌的抗菌作用及可能机制, 以期为进一步研究开发 OL 提供理论支撑。

1 材料与方 法

1.1 菌株

须癣毛癣菌标准菌株 ATCC 9533 购自上海保藏生物技术中心(Shanghai Bioresource Collection Center, SHBCC)。

1.2 主要试剂和仪器

橄榄苦苷(CFS202202, $\geq 98\%$), 武汉京标科技有限公司; 胎牛血清(11011-8611), 浙江天杭生物科技股份有限公司; TRIzol 试剂盒, Thermo Fisher Scientific 公司; 反转录试剂盒和 2 \times Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix, 武汉赛维尔生物科技有限公司。生物安全柜, 莱特(南通)科学仪器有限公司; 电热恒温培养箱, 上海力辰邦西仪器; 多功能酶标仪和 RT-PCR 仪, Bio-Rad 公司; PCR 仪, 北京东胜创新生物科技有限公司。

1.3 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基(g/L): 马铃薯浸出粉 12.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 14.0, 溶剂为超纯水, 121 °C 灭菌 15 min。RPMI-1640 培养基, 武汉赛维尔生物

科技有限公司。

1.4 药物工作液与菌悬液的制备

药物工作液: 称取 0.128 g OL 溶解于 10 mL 含 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 RPMI-1640 中, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 使终浓度为 12.8 mg/mL, 即得 OL 工作液。

菌悬液: 使用接种环将菌株接种在 PDA 培养基上进行传代培养, 28 °C 恒温培养 1 周。培养完成后加入适量生理盐水轻轻吹打, 无菌纱布过滤后经血细胞计数板计数, 用含 10% FBS 的 RPMI-1640 液体培养基调整菌悬液浓度至 2×10^5 – 3×10^5 CFU/mL 备用。

1.5 抑菌活性的测定

采用牛津杯琼脂扩散法测定抑菌活性。吸取 100 μL 菌悬液(2×10^5 – 3×10^5 CFU/mL)至 PDA 培养基上均匀涂布, 在平板上放置 3 个牛津杯, 分别加入 100 μL 药物工作液、咪康唑药液和生理盐水, 28 °C 培养 5 d, 独立重复 3 次试验, 测量抑菌圈直径。

1.6 生长曲线及最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)的测定

参照美国临床和实验室标准化研究所 M38-A2 的方案, 采用微量肉汤稀释法测定 OL 对须癣毛癣菌的 MIC^[16-17]。取无菌 96 孔板, 向第 1 孔中加入 8 $\mu\text{g/mL}$ 咪康唑药液作为阳性对照, 分别向 2–12 孔中加入 100 μL 用培养基稀释 100 倍的菌悬液(2×10^3 – 3×10^3 CFU/mL), 然后在第 2 孔中加入 12.8 mg/mL 药物工作液 100 μL 进行倍比稀释, 第 12 孔不含药物作为生长对照, 每孔总体积为 100 μL , 设置 3 个复孔。28 °C 培养 5 d。采用多功能酶标仪检测 OD_{600} 值记录光密度变化, 即须癣毛癣菌的生长变化, 每 24 h 检测 1 次(0、24、48、72、96 和 120 h)。相较于生长对照组, 将能够抑制须癣毛癣菌 80%以上生长的最低药物浓度确定为 MIC。

1.7 最小杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)的测定

采用平板回收法测定 MBC, 从上述 96 孔板中吸取整数倍 MIC 孔内容物均匀涂布至 PDA 培养基上, 28 °C 恒温培养 5 d, 以 PDA 培养基无菌落生长所对应的最小药物浓度为 MBC, 进行 3 次生物学重复。

1.8 测序样本的制备

选取生长良好的须癣毛癣菌加入 MIC 的 OL 诱导处理 8 h 后, 无菌 EP 管收集菌丝, 用无菌 PBS 清洗, 7 000×g 离心 5 min 弃上清液, 重复 2 次, 放入液氮速冻, 以干冰储存送至上海阿趣生物科技有限公司进行转录组测序分析。

1.9 总 RNA 的提取、文库建立及 RNA-Seq 测序

按照 TRIzol 试剂盒操作方法提取 RNA, 然后对 RNA 的量与纯度进行质控, 质控合格后构建转录组文库进行测序, 测序平台为 Illumina NovaSeq™ 6000, 测序读长为双端 2×150 bp (PE150)。RNA 的提取、文库建立及测序由上海阿趣生物科技有限公司完成。

1.10 测序结果统计分析

为确保满足分析要求, 对低质量的剪接原

始读长进行过滤, 以获得高质量的干净读长, 用于后续的测序分析。对原始数据去除测序接头及不合格序列后得到有效数据(clean data), 随后对 clean data 进行组装及标准化处理得到 Unigene。使用 DESeq2 软件筛选样品的差异表达基因(differentially expressed genes, DEG), 以 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$, $P < 0.05$ 为筛选条件。随后对 DEG 进行基因本体(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析。

1.11 差异表达基因的 RT-qPCR 验证

为了验证转录组结果的准确性, 选取 10 个 DEG 进行 RT-qPCR 验证。以 18S rRNA 作为内参基因, 利用 Primer 5.0 设计引物, 委托武汉赛维尔生物科技有限公司合成, 引物序列见表 1。使用反转录试剂盒将 1.9 提取的总 RNA 逆转录为 cDNA, 反应体系(20.0 μL): 5×SweScript All-in-One SuperMix for qPCR 4.0 μL, gDNA Remover (10 U/μL) 1.0 μL, 总 RNA (200 ng/μL) 10.0 μL, RNase free water 补足 20.0 μL。反应条件: 25 °C 5 min, 42 °C 30 min, 85 °C 5 s。RT-qPCR 反应体系(20.0 μL): 2×Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix 10.0 μL, 上、下游引

表 1 RT-qPCR 的引物序列

Table 1 Primer sequences of RT-qPCR

Name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
Trinity-dn4606-c0-g1	GTGCTGGATTCCCATCTGGTT	ACCCTCATCAGCGTTCACGAC
Trinity-dn4552-c1-g1	ATTTGTGGAAGTTGTGCGATGA	GATAGATGCGAGTCTCCTTGGTAG
Trinity-dn1850-c0-g1	GCTGGTATAACTAACGCCCGTCT	CACAGAGCACAGCGTCAAGAAC
Trinity-dn1618-c0-g1	CAGCACCCAATGCCGAATAT	GGTTCCCCTTGTACCCGTTT
Trinity-dn23841-c0-g1	CTGAAGAGTTTATGCGTCTCCTACC	CTACCCACATACCGCAGTACCTT
Trinity-dn3425-c0-g1	GACTACGGCACGACCGAACA	GGCGGAAGGAAATGAGGGT
Trinity-dn6259-c0-g1	CCTACGACCACCCAGATACCA	AATTCAGACCTCCTCCACCCAC
Trinity-dn3120-c0-g1	TCTGTAACATGGGTGCCGAAAT	CGTATTGGGCGTTCTCGTCA
Trinity-dn2673-c0-g1	ACCTTTACTTCGGTAGCCGTGTC	TGAGCGGGTGATGATGGTAGG
Trinity-dn1066-c0-g1	CGACGAGAATGGAAAGGACAAA	ATCGGCAGTTCCGGATCTTGTC
18S rRNA	AGGCGCGCAAATTACCCAATCC	GCCCTCCAATTGTTCTCGTTAAG

物(表 1) (2.5 $\mu\text{mol/L}$)各 1.0 μL , cDNA 2.5 μL , 灭菌水补足 20.0 μL 。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 循环 40 次。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因表达水平。

2 结果与分析

2.1 OL 对须癣毛癣菌的抗菌活性分析

2.1.1 抑菌活性测定结果

通过牛津杯琼脂扩散法检测 OL 的抗菌活性,结果如图 1 所示,须癣毛癣菌在培养 5 d 后,OL 的抑菌圈直径为(1.52 \pm 0.04) cm,咪康唑的抑菌圈直径为(3.51 \pm 0.02) cm,表明 OL 对须癣毛癣菌有一定的抑制作用。

2.1.2 OL 对须癣毛癣菌的生长曲线及 MIC 与 MBC 分析

MIC 与 MBC 常用于评估各种抗菌化合物的抗菌功效。不同浓度 OL 作用于须癣毛癣菌后,测定其 MIC,结果如图 2A 和 2B 所示。生长曲线和抑制曲线结果表明 OL 对须癣毛癣菌的 MIC

为 400 $\mu\text{g/mL}$ 。平板上无菌落生长的最小浓度即为 MBC,如图 2C 所示, MBC 为 800 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 转录测序结果

2.2.1 RNA-Seq 质量评估及基因对比结果

测序结果质量评估如表 2 所示。在转录组测序数据中,将 OL 诱导的须癣毛癣菌原始序列进行过滤剔除不合格的序列后得到有效数据(clean data)占比大于 93.54%,Q30 大于 96.53%,G+C 含量占比在 52.43%–52.76%之间,表明转录组测序数据是可靠的,可用于下一步分析。

2.2.2 DEG 的可视化分析

以 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ 且 $P < 0.05$ 为标准筛选 DEG。相较于对照组,给药组菌株共筛选出 534 个 DEG,其中上调基因 401 个,下调基因 133 个(图 3)。将 DEG 表达程度进行聚类分析(图 3C)。颜色由蓝色经由白色至棕色,表示基因表达量逐渐升高。相较于对照组,给药前后有较大差异,表明 OL 能够改变原始菌株作用基因的表达。

2.2.3 DEG 的 GO 富集分析

GO 功能富集分析能够反映 DEG 在生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)中的分布情况,将 DEG 映射到 GO 数据库中进行功能注释,共注释到 791 个 GO 词条,其中 BP 440 个,CC 137 个, MF 214 个,分别选取前 10 个 GO 词条进行展示,如图 4A 和 4B 所示。在 OL 干预处理条件下,须癣毛癣菌的 DEG 在 BP、CC 和 MF 中均有显著性富集,BP 中主要富集在氧化还原过程(GO: 0055114)、翻译(GO: 0006412)和跨膜转运(GO: 0055085);CC 中主要富集在中间纤维(GO: 0005882)、内质网(GO: 0005783)和细胞外泌体(GO: 0070062);MF 中主要富集在蛋白质结合(GO: 0005515)、结构分子活性(GO: 0005198)及氧化还原酶活性

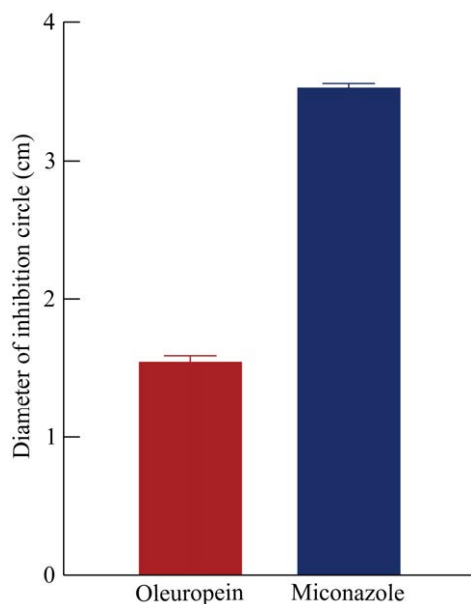


图 1 OL 对须癣毛癣菌的抗菌作用

Figure 1 Inhibitory effect of OL on *T. mentagrophytes*.

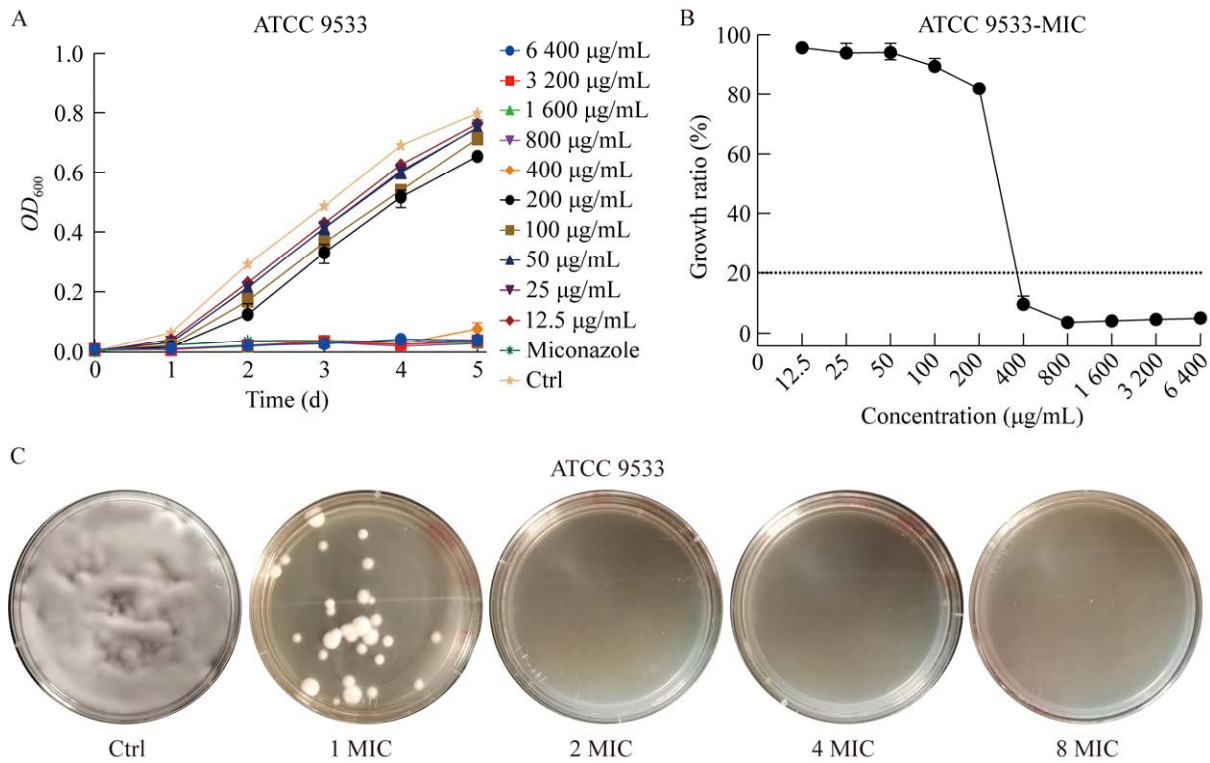


图 2 OL 对须癣毛癣菌的抗菌作用 A: 生长曲线: 不同浓度作用下须癣毛癣菌 0–5 d 内的生长变化, 随着 OL 浓度的增加, 须癣毛癣菌的生长逐渐受到抑制. B: 生长率: 第 5 天各浓度下须癣毛癣菌生长变化与对照组须癣毛癣菌生长变化的比率. C: 整数倍 MIC 给药处理后须癣毛癣菌在平板上 5 d 内的生长情况, 最小倍数 MIC 平板上无菌落生长即为 MBC

Figure 2 Inhibitory activity of OL on *T. mentagrophytes*. A: Growth curve: The growth changes of *T. mentagrophytes* within 0 to 5 days under the influence of different concentrations, and with the increase of OL concentration, the growth of *T. mentagrophytes* is gradually inhibited; B: Growth ratio: The ratio of the growth changes of *T. mentagrophytes* under various concentrations on the 5th day to the growth changes of *T. mentagrophytes* in the control group; C: Growth of *T. mentagrophytes* on the plate after treatment with integer multiples of MIC for 5 days, and the absence of colony growth on the minimum multiple MIC plate indicates the MBC.

表 2 转录组测序数据统计

Table 2 The summary of RNA-Seq datas

样品	原始数据	有效数据	有效数据占比	碱基所占百分比	G+C 含量
Sample	Raw read	Clean data	Clean data (%)	Q30 bases ratio (%)	G+C content (%)
Ctrl1	41 625 954	39 603 276	95.14	96.75	52.51
Ctrl2	40 294 160	37 692 002	93.54	96.53	52.69
Ctrl3	38 487 594	36 255 778	94.20	96.61	52.76
OL1	41 767 828	39 646 092	94.92	96.83	52.44
OL2	39 950 214	37 555 346	94.01	96.77	52.43
OL3	40 257 390	37 885 796	94.11	96.73	52.43

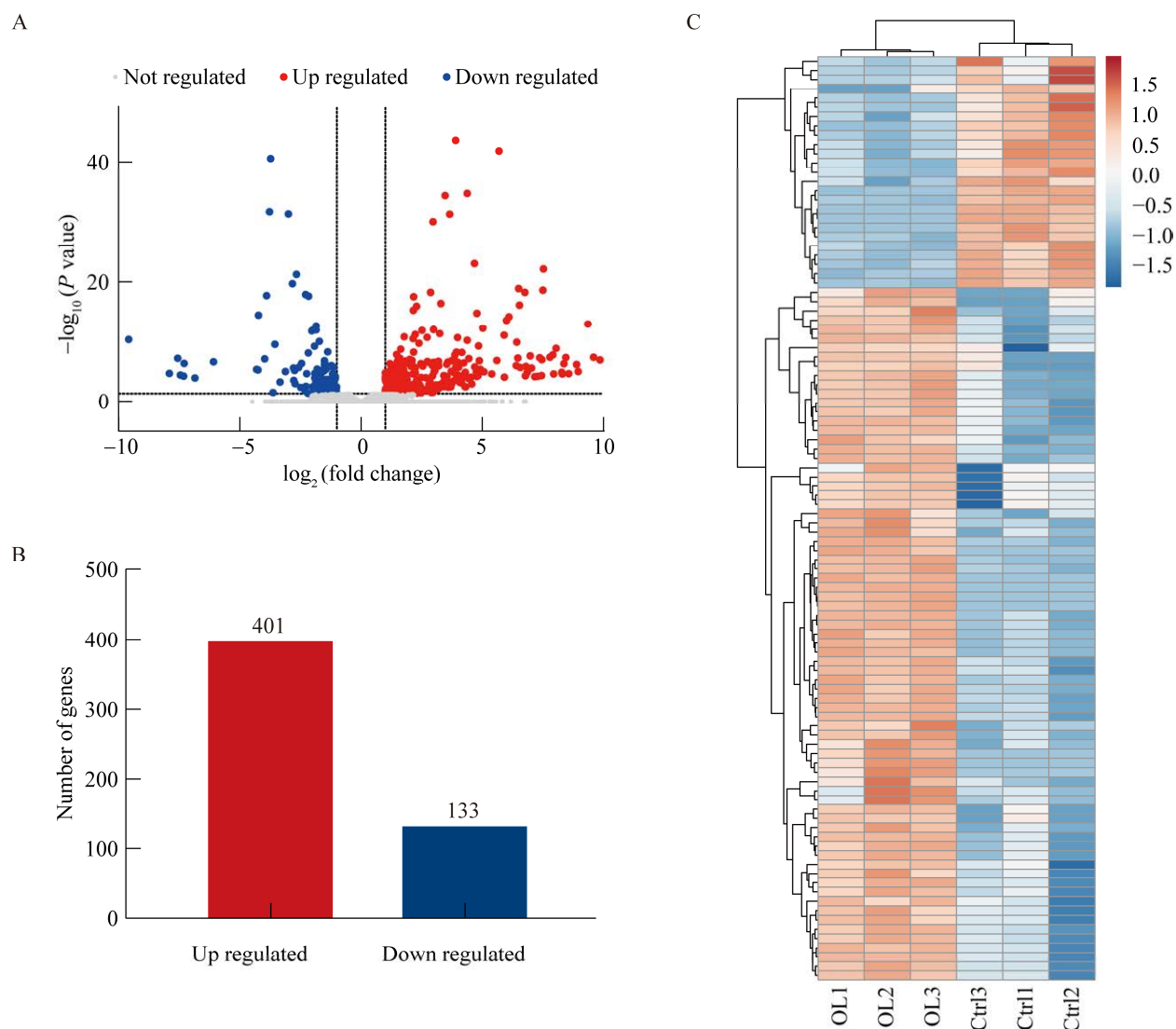


图3 差异表达基因筛选分析 A: 差异表达基因火山图. B: 差异表达基因柱状图. C: 差异表达基因聚类热图

Figure 3 Analysis of differentially expressed gene screening. A: Volcano map of differentially expressed gene. B: Up-and-down histogram of differentially expressed gene. C: Cluster heat map of differentially expressed gene.

GO: 0016491)。说明 OL 作用下会影响须癣毛癣菌以上过程基因的表达, 从而发挥其抗菌作用。

2.2.4 DEG 的 KEGG 通路富集分析

在生物体中, 基因之间的协同作用是发挥其生物学功能的基础, 以 KEGG 通路为单元, 对 DEG 参与的生化代谢与信号转导通路进行富集分析, 如图 5 所示。OL 诱导处理后, 须癣毛

癣菌的 DEG 主要富集在氧化磷酸化(oxidative phosphorylation)、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢(glycine, serine, and threonine metabolism)、乙醛酸和二羧酸代谢(glyoxylate and dicarboxylate metabolism)、类固醇生物合成(steroid biosynthesis)、柠檬酸循环(citrate cycle)及色氨酸代谢(tryptophan metabolism)等通路中。其中氧化磷酸化与柠檬

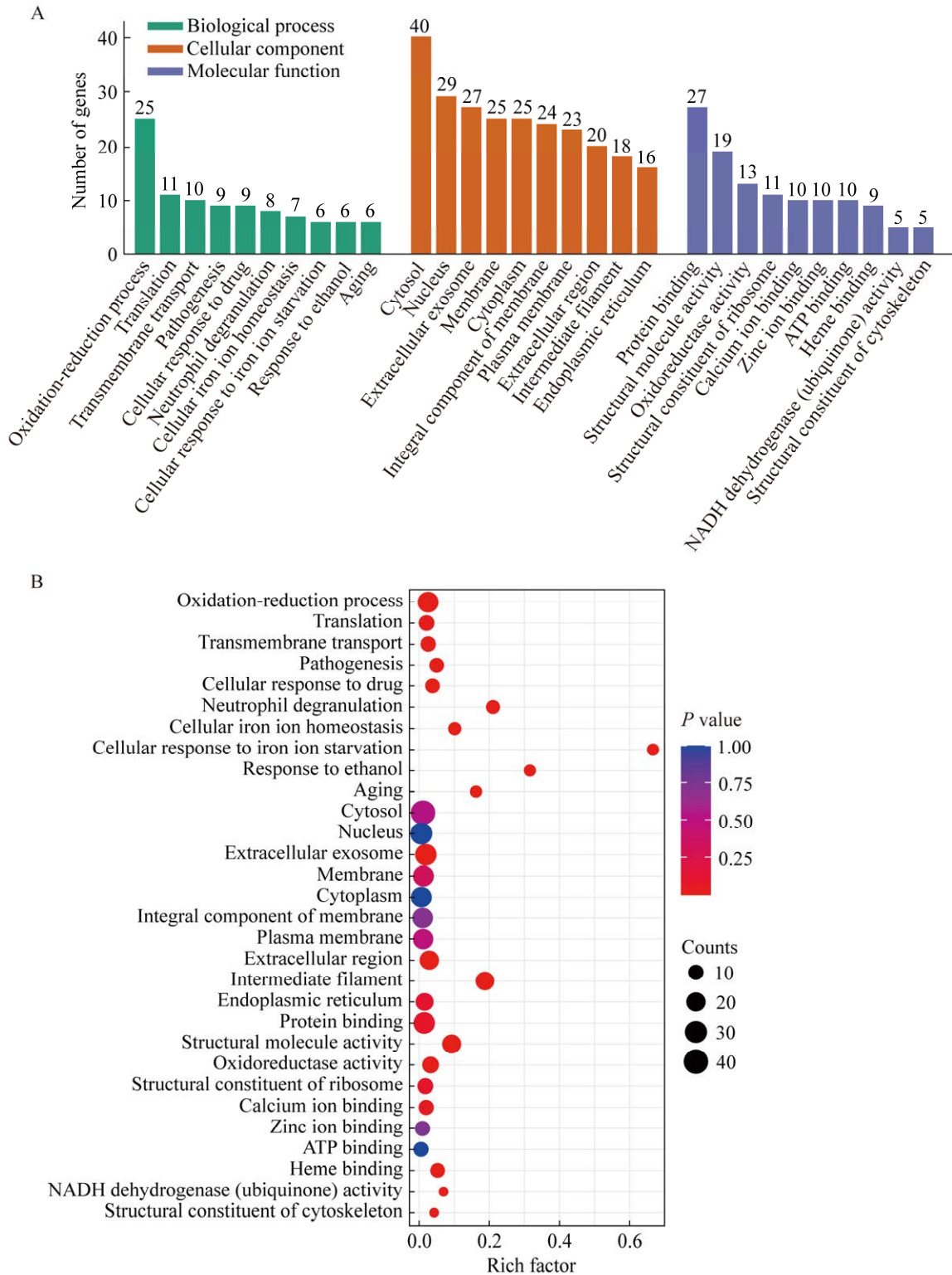


图 4 差异表达基因的 GO 富集分析 A: GO 富集分析柱状图. B: GO 富集分析气泡图

Figure 4 GO enrichment of differentially expressed gene. A: Histogram of GO enrichment analysis. B: Bubble plot of GO enrichment analysis.

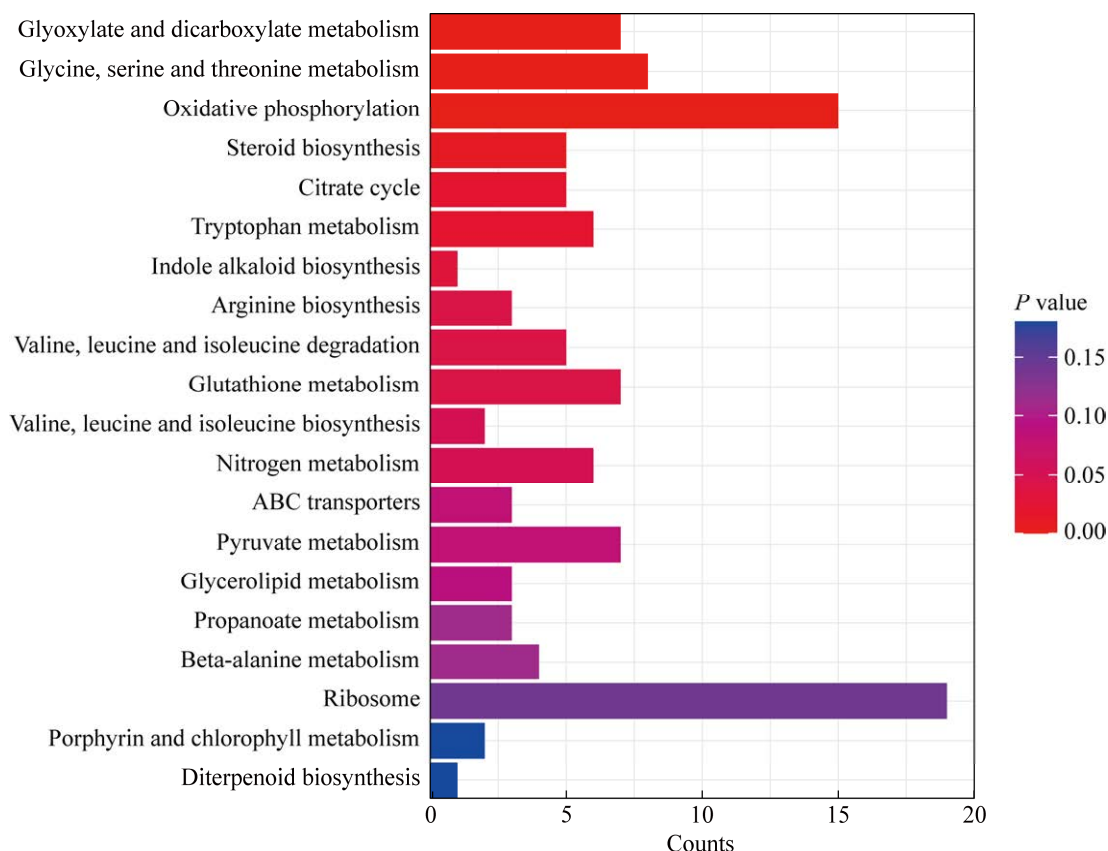


图 5 差异表达基因 KEGG 通路富集分析

Figure 5 KEGG enrichment of differentially expressed gene.

酸循环通路中涉及的 DEG 均显著上调表达,而在其他通路中有显著上调表达,也有显著下调表达。虽然核糖体通路富集不显著,但有较多的 DEG 富集在该通路中。KEGG 富集分析发现大部分 DEG 富集在代谢通路,表明 OL 可能通过干扰代谢途径来抑制其生长,从而诱导细胞凋亡。

2.3 DEG 的 RT-qPCR 验证

基于转录组测序结果选取了 10 个 DEG 进行 RT-qPCR 验证,对基因表达水平标准化分析处理后以 2 为底数对基因表达倍数取对数,将得到的结果与转录组数据进行对比分析,见图 6。RT-qPCR 验证结果与转录组基因表达趋势相一致,即基因上调和下调的表达趋势一致,表明转录组测序结果的可靠性。

3 讨论与结论

真菌性皮肤病已成为当前备受关注的皮肤健康问题,皮肤癣菌是真菌性皮肤病最常见的致病菌^[18]。近年来,由于抗真菌药物在临床上的大量使用,皮肤癣菌对抗真菌药物表现出一定的耐受性或耐药性,因此寻找新的抗真菌靶点以及天然或合成产品中新的抗真菌化合物具有重要意义^[19]。本研究以须癣毛癣菌为研究对象,基于转录组学初步探究 OL 对须癣毛癣菌的抑制作用。转录组学结果分析显示,OL 给药处理组与对照组中须癣毛癣菌的基因表达水平有明显差异,说明 OL 能够影响须癣毛癣菌的基因表达。以 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$, $P < 0.05$ 为

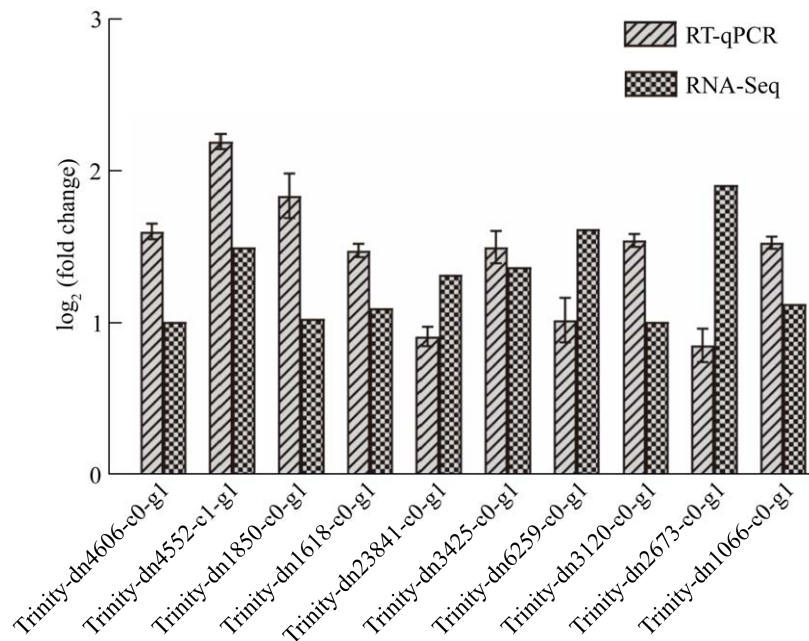


图 6 RNA-Seq 转录组数据 RT-qPCR 验证

Figure 6 RT-qPCR validation of RNA-Seq transcriptomics data.

标准共筛选出 534 个 DEG。综合 GO 与 KEGG 富集分析发现较多的 DEG 富集在能量代谢与氨基酸代谢通路, 在这些代谢途径中大部分 DEG 显著上调表达, 表明 OL 对须癣毛癣菌的代谢过程影响比较大。

能量代谢的调控对于维持细胞的稳态至关重要, 而氧化磷酸化是细胞生命活动所需的主要能量来源, 相关酶的活性直接影响细胞的生命活动^[20]。本研究中, 与氧化磷酸化和柠檬酸循环相关的酶如 NADH、SDH1 在 OL 给药处理后上调表达, 表明须癣毛癣菌在外部环境的刺激下, 加速能量代谢来应对外部环境的改变。NADH 脱氢酶又称复合体 I, 是呼吸链的核心部分, 催化电子从 NADH 通过呼吸链转移而产生能量。OL 干预处理后, 柠檬酸循环相关表达因子上调, NADH 作为柠檬酸循环的产物^[21], 提高了 NADH 的产生。NADH 作为电子提供体增加了菌体细胞中活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产

生^[22]。ROS 作为能量代谢的副产物, 具有许多毒副作用, 在细胞内过度积累会破坏各种细胞结构, 降解细胞内的 DNA、蛋白质和膜脂等基本细胞成分^[23-25]。Sheng 等^[26]的研究表明柚皮素可显著上调柠檬酸循环和氧化磷酸化相关基因的表达水平, 刺激菌体内产生了大量的 ROS, 激活 ROS 介导的杀菌过程。Benot-Dominguez 等^[27]研究发现 OL 能够增加细胞内线粒体 ROS 水平, 产生氧化应激而损伤线粒体, 激活线粒体凋亡因子从而诱导细胞凋亡。本研究也有类似的发现, 表明 OL 作用于须癣毛癣菌后, 很有可能是通过 ROS 介导的氧化损伤来诱导细胞凋亡, 如图 7 所示。

氨基酸代谢可以维持蛋白质、糖、脂质代谢的平衡, 使生物体能够抵抗外界环境的压力^[28]。Wang 等^[29]研究发现, 腐败希瓦氏菌在景天总黄酮干预处理后 DEG 在氨基酸代谢中存在显著上下调现象, 细胞外氨基酸的摄入减少, 进而迫

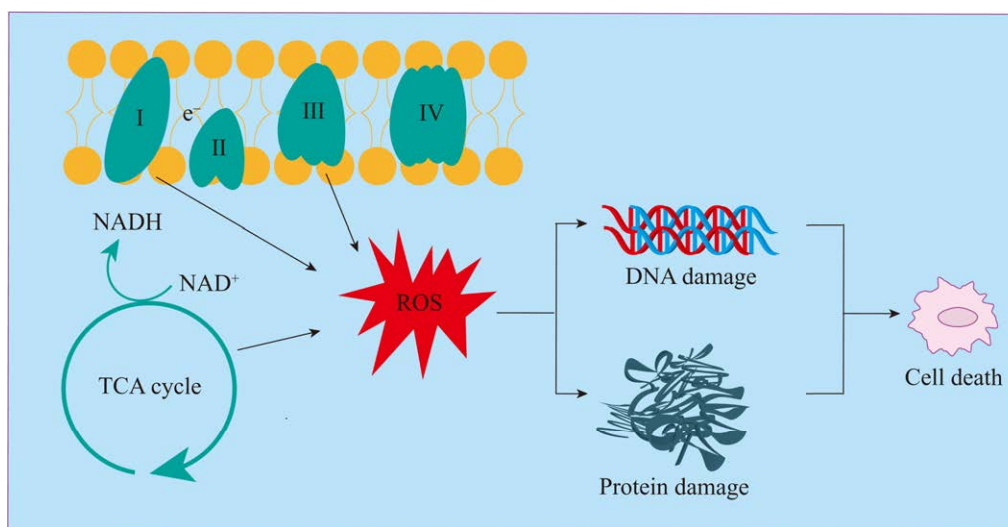


图 7 橄榄苦苷对须癣毛癣菌的可能作用机制 I: NADH 脱氢酶; II: 琥珀酸脱氢酶; III: 细胞色素 C 还原酶; IV: 细胞色素氧化酶

Figure 7 Possible mechanism of action of OL on *Trichophyton mentagrophytes*. I: NADH dehydrogenase; II: Succinate dehydrogenase; III: Cytochrome C reductase; IV: Cytochrome oxidase.

使细胞从自身生化过程中获取氨基酸，导致细胞内氨基酸代谢紊乱，从而对腐败希瓦氏菌起到抑制作用。本研究也有类似发现，在 OL 干预处理后，DEG 在色氨酸代谢、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解途径中显著上调；在甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、精氨酸生物合成途径中显著下调。推测 OL 对须癣毛癣菌的氨基酸代谢过程产生了干扰。氨基酸作为蛋白质合成的原料，菌体细胞内氨基酸代谢紊乱可能引起蛋白质合成的紊乱，破坏蛋白质平衡，进而抑制菌体生长^[28]。

本研究初步探究了 OL 抑制须癣毛癣菌的作用分子机制，为进一步揭示 OL 抑制须癣毛癣菌生长的作用机理提供了理论基础，对有效开发 OL 作为抗菌药物具有指导意义。

REFERENCES

[1] MARTINEZ-ROSSI NM, PERES NTA, BITENCOURT TA, MARTINS MP, ROSSI A. State-of-the-art dermatophyte infections: epidemiology aspects,

pathophysiology, and resistance mechanisms[J]. *Journal of Fungi*, 2021, 7(8): 629.

[2] SALEHI Z, SHAMS-GHAHFAROKHI M, RAZZAGHI-ABYANEH M. Molecular epidemiology, genetic diversity, and antifungal susceptibility of major pathogenic dermatophytes isolated from human dermatophytosis[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 643509.

[3] GNAT S, ŁAGOWSKI D, DYŁĄG M, JÓŹWIĄK G, TROŚCIAŃCZYK A, NOWAKIEWICZ A. *In vitro* activity of ebselen and diphenyl diselenide alone and in combination with drugs against *Trichophyton mentagrophytes* strains[J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(6): 1158.

[4] BANGIA R, SHARMA G, DOGRA S, KATARE OP. Nanotechnological interventions in dermatophytosis: from oral to topical, a fresh perspective[J]. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2019, 16(4): 377-396.

[5] MONOD M. Antifungal resistance in dermatophytes: emerging problem and challenge for the medical community[J]. *Journal De Mycologie Medicale*, 2019, 29(4): 283-284.

[6] JABET A, BRUN S, NORMAND AC, IMBERT S, AKHOUNDI M, DANNAOUI E, AUDIFFRED L, CHASSET F, IZRI A, LAROCHE L, PIARROUX R, BACHMEYER C, HENNEQUIN C, SABATER AM.

- Extensive dermatophytosis caused by terbinafine-resistant *Trichophyton indotineae*, France[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2022, 28(1): 229-233.
- [7] MONTEIRO M, SILVA AFR, RESENDE D, BRAGA SS, COIMBRA MA, SILVA AMS, CARDOSO SM. Strategies to broaden the applications of olive biophenols oleuropein and hydroxytyrosol in food products[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(3): 444.
- [8] 张育贵, 张淑娟, 辛二旦, 司昕蕾, 边甜甜, 牛江涛, 李东辉, 吴红伟, 李越峰. 橄榄苦苷的药理作用研究现状[J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 35(24): 3265-3268.
- ZHANG YG, ZHANG SJ, XIN ED, SI XL, BIAN TT, NIU JT, LI DH, WU HW, LI YF. Research statue on pharmacological action of Oleuropein[J]. *The Chinese Journal of Clinical Pharmacology*, 2019, 35(24): 3265-3268 (in Chinese).
- [9] 叶子雨, 何学东, 郑永军, 李婉婧, 曾晴勤, 李瑞, 刘梦琪, 张璟, 郑亚东, 杨永春, 赵金国, 宋厚辉. 女贞子活性成分抗肝纤维化作用机制研究进展[J]. *中草药*, 2024, 55(4): 1389-1396.
- YE ZY, HE XD, ZHENG YJ, LI WJ, ZENG QQ, LI R, LIU MQ, ZHANG J, ZHENG YD, YANG YC, ZHAO JG, SONG HH. Research progress on mechanism of active components of *Ligustri Lucidi Fructus* against hepatic fibrosis[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2024, 55(4): 1389-1396 (in Chinese).
- [10] 高佳琪, 焦顺刚, 马瑾煜, 刘娟, 柴兴云. 丁香属植物中萜类成分研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(10): 2343-2352.
- GAO JQ, JIAO SG, MA JY, LIU J, CHAI XY. Advances on terpenoids from genus *Syringa*[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2020, 45(10): 2343-2352 (in Chinese).
- [11] 郭卫平, 鲁绪, 褚泽军, 罗登林, 向进乐, 徐云凤. 橄榄苦苷提取工艺及生物活性研究进展[J]. *食品与机械*, 2023, 39(10): 233-240.
- GUO WP, LU X, CHU ZJ, LUO DL, XIANG JL, XU YF. Research progress in extraction technology and biological activity of oleuropein[J]. *Food & Machinery*, 2023, 39(10): 233-240 (in Chinese).
- [12] 刘天亮, 王玲洁, 宋宗辉, 于波涛. 橄榄苦苷的药理作用及其研究进展[J]. *西南国防医药*, 2016, 26(6): 685-687.
- LIU TL, WANG LJ, SONG ZH, YU BT. Pharmacological action and research progress of oleuropein[J]. *Medical Journal of National Defending Forces in Southwest China*, 2016, 26(6): 685-687 (in Chinese).
- [13] GUO WP, XU YF, YANG YY, XIANG JL, CHEN JL, LUO DL, XIE QG. Antibiofilm effects of oleuropein against *Staphylococcus aureus*: an *in vitro* study[J]. *Foods*, 2023, 12(23): 4301.
- [14] MARKIN D, DUEK L, BERDICEVSKY I. *In vitro* antimicrobial activity of olive leaves[J]. *Mycoses*, 2003, 46(3/4): 132-136.
- [15] ZORIĆ N, KOPIJAR N, BOBNJARIĆ I, HORVAT I, TOMIĆ S, KOSALEC I. Antifungal activity of oleuropein against *Candida albicans*-the *in vitro* study[J]. *Molecules*, 2016, 21(12): 1631.
- [16] BADIEE P, SHOKOHI T, HASHEMI J, MOHAMMADI R, NAJAFZADEH MJ, AMIN SHAHIDI M, GHASEMI F, JAFARIAN H. Comparison of *in vitro* activities of newer triazoles and classic antifungal agents against dermatophyte species isolated from Iranian University Hospitals: a multi-central study[J]. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2023, 22(1): 15.
- [17] 胡小平, 万喆, 李若瑜. 应用 CLSI M38-A2 方案测定须癣毛癣菌对抗真菌药物敏感性[J]. *中国真菌学杂志*, 2011, 6(3): 149-153.
- HU XP, WAN Z, LI RY. Antifungal susceptibilities of 44 isolates of *Trichophyton mentagrophytes* isolates evaluated with CLSI M38-A2 scheme[J]. *Chinese Journal of Mycology*, 2011, 6(3): 149-153 (in Chinese).
- [18] DENG RX, WANG XW, LI RY. Dermatophyte infection: from fungal pathogenicity to host immune responses[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1285887.
- [19] MARTINEZ-ROSSI NM, BITENCOURT TA, PERES NTA, LANG EAS, GOMES EV, QUARESEMIN NR, MARTINS MP, LOPES L, ROSSI A. Dermatophyte resistance to antifungal drugs: mechanisms and prospectus[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1108.
- [20] 黄苏苏, 王雪茹, 袁久术, 杜联. 中医药基于自噬防治糖尿病周围神经病变的实验研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(23): 6315-6323.
- HUANG SS, WANG XR, YUAN JS, DU L. Experimental research progress in traditional Chinese medicine prevention and treatment of diabetic peripheral neuropathy based on autophagy[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2023, 48(23): 6315-6323 (in Chinese).
- [21] NOLFI-DONEGAN D, BRAGANZA A, SHIVA S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement[J]. *Redox Biology*, 2020, 37: 101674.

- [22] DU GF, DONG Y, FAN XL, YIN AK, LE YJ, YANG XY. Proteomic investigation of the antibacterial mechanism of cefiderocol against *Escherichia coli*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(5): e0109322.
- [23] DAS G, PATRA JK. Evaluation of antibacterial mechanism of action, tyrosinase inhibition, and photocatalytic degradation potential of sericin-based gold nanoparticles[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(11): 9477.
- [24] TIWARI S, van TONDER AJ, VILCHÈZE C, MENDES V, THOMAS SE, MALEK A, CHEN B, CHEN M, KIM J, BLUNDELL TL, PARKHILL J, WEINRICK B, BERNEY M, JACOBS WR Jr. Arginine-deprivation-induced oxidative damage sterilizes *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(39): 9779-9784.
- [25] EZRATY B, GENNARIS A, BARRAS F, COLLET JF. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15: 385-396.
- [26] SHENG QS, HOU XN, WANG Y, WANG N, DENG XM, WEN ZM, LI D, LI L, ZHOU YL, WANG JF. Naringenin microspheres as a novel adjuvant reverses colistin resistance via various strategies against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(51): 16201-16217.
- [27] BENOT-DOMINGUEZ R, TUPONE MG, CASTELLI V, D'ANGELO M, BENEDETTI E, QUINTILIANI M, CINQUE B, FORTE IM, CIFONE MG, IPPOLITI R, BARBONI B, GIORDANO A, CIMINI A. Olive leaf extract impairs mitochondria by pro-oxidant activity in MDA-MB-231 and OVCAR-3 cancer cells[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 134: 111139.
- [28] 段天坤, 王燕, 袁佳琪, 苏雅馨, 史璐欣, 王琳, 苏健, 王美琴, 王春伟. 异辛醇对灰葡萄孢的抑菌作用及转录组分析[J]. *中国生物防治学报*, 2023, 39(6): 1434-1445.
- DUAN TK, WANG Y, YUAN JQ, SU YX, SHI LX, WANG L, SU J, WANG MQ, WANG CW. Inhibition Effect and Transcriptome Analysis of Isooctyl alcohol on *Botrytis cinerea*[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2023, 39(6): 1434-1445 (in Chinese).
- [29] WANG J, CHI ZY, ZHAO K, WANG HF, ZHANG X, XU F, SHAO XF, WEI YY. A transcriptome analysis of the antibacterial mechanism of flavonoids from *Sedum aizoon* L. against *Shewanella putrefaciens*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 36(7): 94.