

抗菌肽 MAF-1A 衍生物体外抗白念珠菌 生物膜活性及机制研究

邓思波^{1,2}, 黄敏慧^{1,2}, 张迎春¹, 李彩多^{1,2}, 吴建伟¹, 陈峰宏^{1,2}, 王 涛^{1,2}

摘要: 目的 探讨抗菌肽 MAF-1A 衍生物体外抗白念珠菌生物膜活性及潜在机制。方法 采用微量稀释法检测 MAF-1A 衍生物对白念珠菌的 MIC、MFC; 通过扫描电镜等方法观察 MAF-1A 衍生物对白念珠菌生物膜形态学的影响; 以 XTT 法测定 MAF-1A 衍生物对不同阶段生物膜活性的影响及生物膜 80% 抑制浓度(SMIC₈₀); 采用流式细胞术、激光共聚焦显微技术、qRT-PCR 等分析 MAF-1A 衍生物抗白念珠菌生物膜的作用机制。结果 MAF-1A 衍生物对白念珠菌的 MIC、MFC 及 SMIC₈₀ 均低于模板肽, 分别为 62.5 μg/mL、125 μg/mL 和 62.5~125 μg/mL。MAF-1A 衍生物可明显抑制白念珠菌的黏附和菌丝形成, 且抑制作用呈剂量依赖性; 可使菌细胞黏附及菌丝形成相关基因(ALS3、HWP1、SUN41、UME6)的 mRNA 表达量降低($t_{UME6} = 12.42, P < 0.001$; $t_{ALS3} = 12.20, P < 0.001$; $t_{SUN41} = 7.206, P < 0.001$; $t_{HWP1} = 22.52, P < 0.001$); 可使形成的生物膜和成熟生物被膜活性明显降低($t_{250} = 3.680, P < 0.05$; $t_{500} = 4.153, P < 0.05$; $t_{1000} = 4.934, P < 0.05$; $t_{250} = 0.5335, P < 0.05$; $t_{500} = 1.504, P < 0.05$; $t_{1000} = 6.431, P < 0.05$)。62.5 μg/mL 浓度的 MAF-1A 衍生物即可直接破坏白念珠菌成熟生物膜结构, 引起成熟生物膜的细胞凋亡、ROS 含量明显增加, 线粒体膜电位显著降低。结论 MAF-1A 衍生物具有较好的体外抗白念珠菌生物膜活性, 不仅能通过抑制细胞黏附、菌丝形成来干扰生物膜的早期形成, 还能通过直接损伤以及 ROS 累积、线粒体膜电位去极化所引发的细胞凋亡来破坏成熟生物膜。

关键词: 抗菌肽; 白念珠菌; 生物膜; 细胞凋亡; 活性氧; 线粒体膜电位

中图分类号:R384

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2021)06-0502-09

Effects and mechanisms of antimicrobial peptide MAF-1A derivatives anti-*Candida albicans* biofilm in vitro

DENG Si-bo^{1,2}, HUANG Min-hui^{1,2}, ZHANG Ying-chun¹,
LI Cai-duo^{1,2}, WU Jian-wei¹, CHEN Zheng-hong^{1,2}, WANG Tao^{1,2}

(1.School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China;

2.Key Laboratory of Medical microbiology and parasitology of Education

Department of Guizhou, Guiyang 550025, China)

Abstract: The purpose of this study was to investigate the effect and the underlying mechanisms of antimicrobial peptide MAF-1A derivatives against *Candida albicans* biofilms in vitro. In this research, MIC and MBC of MAF-1A derivatives against *C. albicans* was determined with microdilution method; the morphological changes of *C. albicans* biofilm were observed by scanning electron microscopy (SEM) and inverted microscope; the effects of MAF-1A derivatives on biofilm activity at different stages and 80% inhibitory concentration on biofilm (SMIC₈₀) were determined by XTT assay. Flow cytometry, laser confocal microscope and qRT-PCR were used to investigate the mechanism for its anti-*C. albicans* biofilm activities. The MIC, MFC and SMIC₈₀ of MAF-1A derivatives against *C. albicans* were lower than those of template peptides, which were 62.5 μg/mL, 125 μg/mL and 62.5~125 μg/mL, respectively. MAF-1A derivatives could significantly inhibit *C. albicans* adhesion and hyphal development in a dose-dependent manner. The expression of biofilm-related genes (ALS3, HWP1, SUN42, UME6) in *C. albicans* decreased after treatment with MAF-1A derivatives ($t_{UME6} =$

国家自然科学基金(No.81360254),贵州省科技计划项目[黔科合平台人才(2018)5799-22、黔科合支撑(2020)4Y236号]

通讯作者:王 涛,Email:wangtao309@163.com;

ORCID:0000-0002-1388-5181

陈峰宏,Email:chenzhenghong@gmc.edu.cn;

ORCID:0000-0002-2944-6001

作者单位:1. 贵州医科大学基础医学院,贵阳 550025;

2. 贵州省普通高等学校病原生物学特色重点实验室,贵阳 550025

laser confocal microscope and qRT-PCR were used to investigate the mechanism for its anti-*C. albicans* biofilm activities. The MIC, MFC and SMIC₈₀ of MAF-1A derivatives against *C. albicans* were lower than those of template peptides, which were 62.5 μg/mL, 125 μg/mL and 62.5~125 μg/mL, respectively. MAF-1A derivatives could significantly inhibit *C. albicans* adhesion and hyphal development in a dose-dependent manner. The expression of biofilm-related genes (ALS3, HWP1, SUN42, UME6) in *C. albicans* decreased after treatment with MAF-1A derivatives ($t_{UME6} =$

12.42, $P < 0.001$; $t_{ALS3} = 12.20, P < 0.001$; $t_{SUN41} = 7.206, P < 0.001$; $t_{HWP1} = 22.52, P < 0.001$). MAF-1A derivatives can significantly reduce the activity of both the forming and mature biofilms ($t_{250} = 3.680, P < 0.05$; $t_{500} = 4.153, P < 0.05$; $t_{1000} = 4.934, P < 0.05$; $t_{250} = 0.5335, P < 0.05$; $t_{500} = 1.504, P < 0.05$; $t_{1000} = 6.431, P < 0.05$). MAF-1A derivatives with a concentration of 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ could not only directly destroy the mature biofilm structure of *C. albicans*, but also significantly increase the cell apoptosis and ROS content, and significantly decrease the mitochondrial membrane potential. This study suggests that MAF-1A derivatives have remarkably inhibitory effects on *C. albicans* biofilm, the mechanisms may be associated with the inhibiting *C. albicans* adhesion and hyphal development, biofilm damage, promoting cell apoptosis.

Keywords: antimicrobial peptides; *Candida albicans*; biofilm; apoptosis; ROS; mitochondrial membrane potential

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81360254), Science and Technology Plan Project of Guizhou Province([2018]5799-22,[2020]4Y236)

Corresponding authors: Wang Tao, Email: wangtao309@163.com; Chen Zheng-hong, Email: chenzhenghong@gmc.edu.cn

白念珠菌(*Candida albicans*)是常见的条件致病性真菌,当机体菌群失调、免疫功能降低或机体处于应激、严重感染时,可导致皮肤黏膜感染或侵袭性真菌感染的发生。据统计,*C. albicans* 所致的侵袭性感染的死亡率高达 60%^[1-2]。抗真菌药物的使用对真菌感染性疾病的控制起到了重要作用,但随着耐药菌株的不断增加,耐药性已成为临床抗真菌感染治疗失败的重要原因。*C. albicans* 在生长繁殖的过程中,不但能以浮游状态存在,还可以形成生物膜(biofilm)^[3-4],而生物膜的形成是导致 *C. albicans* 产生耐药性的主要因素之一。文献[5-6]报道,生物膜状态 *C. albicans* 对临床常用抗菌药物的耐受性较浮游菌显著增强。因此,寻找新型药物抑制或破坏生物膜已成为临床抗真菌治疗的必然要求。

抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)是机体抵抗细菌、真菌、病毒等多种病原体感染的小分子先天免疫功能多肽。由于 AMPs 抗病原微生物范围广、不易产生耐药性、低毒等特性,具备新型抗菌药物开发的潜力^[7-8]。家蝇抗真菌肽-1A (*Musca domestica* antifungal peptide-1A, MAF-1A) 是来源于家蝇幼虫的小分子阳离子活性多肽,课题组以 MAF-1A 的氨基酸序列为基础上,采用氨基酸分子突变法设计获得了一个 MAF-1A 衍生物。前期研究表明^[9],MAF-1A 衍生物是一种稳定性高、抗菌活性强的人工合成 AMPs,其不仅对 *C. albicans* 浮游菌的抑杀效果优于其模板肽 MAF-1A,且对 *C. albicans* 生物膜也具有明显抑制作用,但该衍生物对 *C. albicans* 生物膜抑制活性及作用机制尚不清楚。本文在此基础上,进一步探讨 MAF-1A 衍生物的抗 *C. albicans* 生物膜活性和作用机制,为抗生物膜药物研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 MAF-1A 衍生物的化学合成 MAF-1A 衍生物的氨基酸序列为 KKFLKTAKLLIK-SALLLKSLALKMK,委托生工生物工程(上海)股份有限公司采用 FMOC 固相合成法合成,高效液相色谱(HPLC)纯化、液相色谱-质谱(LC-MS)验证,多肽合成纯度≥98%。

1.1.2 菌株 白念珠菌(*Candida albicans*, ATCC10231)由贵州医科大学病原生物学特色重点实验室保存。

1.1.3 主要试剂 四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)购自北京博奥拓达科技有限公司; RNAiso Plus 试剂盒、逆转录试剂盒(PrimeScript™ RT Master Mix)、荧光定量 PCR 试剂盒(SYBR Premix Ex TaqTM II)均购自 TaKaRa(大连)有限公司; 沙氏葡萄糖琼脂培养基(Sabouraud Dextrose Agar, SDA)、酵母浸出粉胨葡萄糖(Yeast Peptone Dextrose, YPD)液体培养基、氟康唑(FLC)、两性霉素 B(AMB)、活性氧(ROS)检测试剂盒、FITC-Annexin-V/PI 细胞凋亡检测试剂盒均购自 Solarbio(北京)有限公司; JC-1 线粒体膜电位测定试剂盒购自 MCE(上海)有限公司。

1.1.4 引物合成 使用 SnapGene 软件设计引物序列,并在 NCBI 上进行引物序列比对,选择特异性引物序列,委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成生物膜形成相关基因(ALS3、HWP1、SUN41、UME6)和内参基因(ACT1)引物,相关引物序列见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 引物
Tab.1 Primers for Quantitative Real-time PCR

目的基因	引物序列(5'-3')	片段大小/ bp	Tm/ ℃
ALS3	F: TTACTGGACCACCAGG-AAACA	196	58
	R: GATTCTGACCAAGTACT-CGGTAG		
HWP1	F: ACTGGTGTGTTGTTGTTAC	150	56
	R: GGCAGGCATGGATGGTTCT		
SUN41	F: TGATTTCCTTCAGGTC-AAGG	150	47
	R: GTCTTGGACATACCAC-TTGGCA		
UME6	F: TGCAGCAAACCCATCAT-CAATC	175	59
	R: CGATGCATTACTGAATTCCAATCAT		
ACT1	F: TCCCCTTTCAAAGTT-CACG	159	56
	R: CACAAGTACACGTAGG-AAAAC		

1.2 方法

1.2.1 菌株活化及菌悬液制备 无菌操作下取 *C. albicans* 冻存物划线接种于 SDA 平板, 置于 37 ℃ 温箱培养 18~24 h 后, 挑取菌株单菌落接种于 5 mL YPD 液体培养基中, 于 37 ℃、180 r/min 震摇培养 16 h; 离心收集菌体, 用无菌 PBS 洗涤 2 次, 以 RPMI 1640 培养基制成 2×10^6 CFU/mL 菌悬液备用。

1.2.2 MAF-1A 衍生物抗 *C. albicans* 活性检测 参考 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) M27-A3 方法^[10], 采用微量稀释法检测 MAF-1A 衍生物的抗 *C. albicans* 最小抑菌浓度 (minimal inhibit concentration, MIC) 以及最小杀菌浓度 (minimum fungal concentration, MFC); 参考文献[11], 用 XTT 法检测 MAF-1A 衍生物对 *C. albicans* 生物膜 80% 的抑制浓度 (SMIC₈₀), 同时以 FLC (4 μg/mL) 为药物对照。

1.2.3 MAF-1A 衍生物对生物膜形成的影响

1.2.3.1 衍生物对 *C. albicans* 黏附的影响 将衍生物与菌液 (2×10^6 CFU/mL) 各 100 μL 混合于 96 孔板中, 使 MAF-1A 衍生物终浓度分别为 0、62.5、125、250、500 和 1 000 μg/mL; 混合液 37 ℃ 孵育 2 h 后, 于倒置显微镜下观察白念珠菌黏附情况; 参考文献[12], 采用 XTT 法检测其生物活性。同样方

法作 FLC (4 μg/mL) 为药物对照。

1.2.3.2 MAF-1A 衍生物对 *C. albicans* 菌丝形成的影响 将 100 μL 菌液 (2×10^6 CFU/mL) 置于 96 孔板中, 37 ℃ 恒温培养 2 h 后, 用无菌 PBS 洗去浮游菌; 加入终浓度分别为 0、62.5、125、250 和 500 μg/mL 的 MAF-1A 衍生物 100 μL, 继续培养 16 h 后, 弃上清液, 无菌 PBS 洗涤 2 次, 倒置显微镜下观察菌丝形成情况。同样方法以 FLC (4 μg/mL) 为药物对照。

1.2.4 MAF-1A 衍生物对生物膜形成相关基因转录水平的影响 将 1 mL MAF-1A 衍生物与等体积菌悬液 (2×10^6 CFU/mL) 混匀, 使 MAF-1A 衍生物的终浓度分别为 0、62.5、125 和 250 μg/mL, 将混合液于 37 ℃ 培养 24 h 后, 5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体; 参照 RNAiso Plus 和逆转录试剂盒使用说明书, 提取菌细胞 Total RNA 并逆转录为 cDNA; 参考文献[13], 使用 qRT-PCR 反应试剂盒以管家基因 ACT1 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对 *C. albicans* 生物膜形成相关基因 mRNA 水平进行相对定量。反应条件为: 95 ℃ 15 s, 55 ℃ 15 s, 72 ℃ 45 s, 共 40 个循环。

1.2.5 MAF-1A 衍生物抗成熟生物膜活性 将 200 μL 菌液 (2×10^6 CFU/mL) 置于 96 孔板中, 37 ℃ 恒温培养 2 h 后, 无菌 PBS 洗去浮游菌, 加入 RPMI 1640 培养基 200 μL, 37 ℃ 培养 24 h 后, 弃上清液, 无菌 PBS 洗涤 3 次, 获得 *C. albicans* 成熟生物膜; 向成熟生物膜加入终浓度分别为 0、62.5、125、250、500 和 1 000 μg/mL 的 MAF-1A 衍生物 200 μL, 培养 24 h 后, 弃上清液, 无菌 PBS 洗涤 2 次, 参考文献[12], 以 XTT 法检测生物膜活性; 采用扫描电镜观察衍生物对成熟生物膜结构的影响。同样方法以 FLC (4 μg/mL) 为药物对照。

1.2.6 生物膜细胞凋亡检测 将 MAF-1A 衍生物 (终浓度分别为 0、62.5、125 和 250 μg/mL) 处理 24 h 后的 *C. albicans* 成熟生物膜细胞重悬于 400 μL Annexin V 结合液, 加入 Annexin V-FITC 染液 5 μL, 混匀后于 37 ℃ 避光孵育 15 min, 再加入 PI 染液 10 μL 继续孵育 5 min; 采用激光共聚焦扫描显微镜观察生物膜细胞凋亡。同样方法以 AMB (2 μg/mL) 为药物对照。

1.2.7 活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 水平检测 以终浓度为 0、62.5、125、250 和 500 μg/mL 的 MAF-1A 衍生物分别处理 *C. albicans* 成熟生物膜 24 h 后, 按试剂盒说明加入 DCFH-DA 荧光试剂, 于 37 ℃ 避光孵育 20 min 后, 无菌 PBS 洗

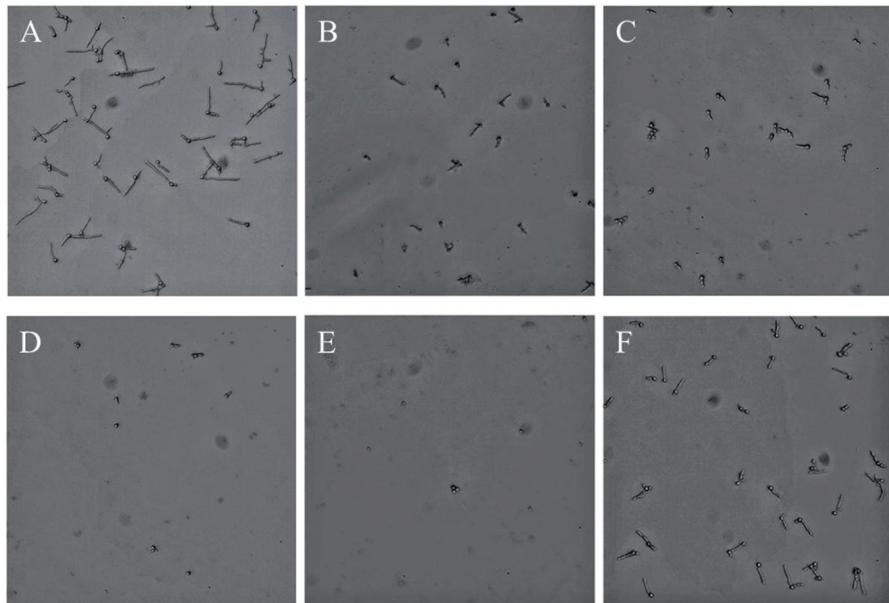
涤 2 次,流式细胞仪检测荧光强度。

1.2.8 线粒体膜电位检测 以终浓度为 0、62.5、125、250 和 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 MAF-1A 衍生物分别处理 *C. albicans* 成熟生物膜 24 h 后,按试剂盒说明加入 JC-1 染色工作液,37 °C 避光孵育 15 min,无菌 PBS 洗涤 2 次,多功能酶标仪检测 JC-1 的荧光转变,通过计算 FL2/FL1 比值得出线粒体膜电位的变化。

1.3 统计学处理 所有的实验重复 3 次,数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 Graphpad prism 8.0 软件采用 *t* 检验检验各组的统计学差异,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 MAF-1A 衍生物抗 *C. albicans* ATCC10231



MAF-1A 衍生物浓度为 A: 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; B: 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; C: 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$; D: 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$; E: 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; F: 为 FLC 对照 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$

图 1 MAF-1A 衍生物对白念珠菌黏附的影响($\times 200$)

Fig.1 Effects of MAF-1A derivatives on the adhesion of *C. albicans* ($\times 200$)

2.3 MAF-1A 衍生物对 *C. albicans* ATCC10231 菌丝形成的影响 镜下可见,阴性对照组的 *C. albicans* 可以正常形成菌丝,其菌丝较多,菌丝细长、纵横交错;但 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 MAF-1A 衍生物即可明显抑制 *C. albicans* 菌丝的形成,且随着浓度的增加,*C. albicans* 菌丝明显变短、稀疏,甚至不能形成菌丝(图 3)。

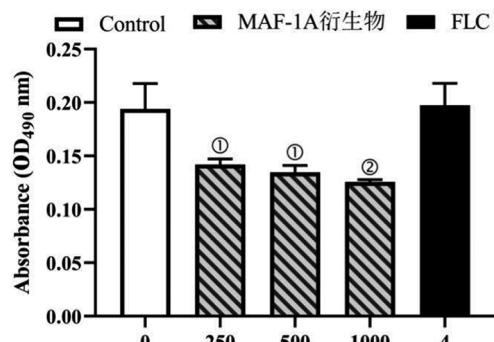
2.4 MAF-1A 衍生物下调白念珠菌生物膜形成相关基因的表达 qRT-PCR 结果显示(图 4),与未经

活性 检测结果显示,MAF-1A 衍生物对 *C. albicans* 浮游菌的 MIC 为 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,MFC 为 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$;对 *C. albicans* 生物膜的 SMIC₈₀ 为 62.5~125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。而其模板肽对 *C. albicans* 的 MIC、MFC 和 SMIC₈₀ 值均高于 MAF-1A 衍生物,分别为 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以及 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2 MAF-1A 衍生物减少 *C. albicans* ATCC-10231 的黏附 镜下可见,当浓度达 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,MAF-1A 衍生物可明显降低 *C. albicans* 的黏附(图 1)及其生物活性($t = 3.680, P < 0.05$),并且这一作用随 MAF-1A 衍生物浓度增加而更加明显(图 2)。

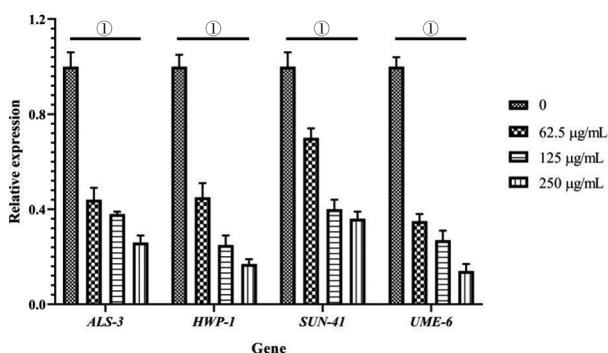
处理的对照组相比,62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 MAF-1A 衍生物即可使生物膜形成相关基因 UME6、ALS3、SUN41、HWP1 的 mRNA 表达量明显下调($t_{UME6} = 12.42, P < 0.001$; $t_{ALS3} = 12.20, P < 0.001$; $t_{SUN41} = 7.206, P < 0.001$; $t_{HWP1} = 22.52, P < 0.001$)。

2.5 MAF-1A 衍生物抗 *C. albicans* ATCC10231 成熟生物膜活性 通过扫描电镜观察可见,未经 MAF-1A 衍生物处理的成熟生物膜结构完整,生物膜细胞未出现破损现象,细胞外基质丰富;但浓度为



注:①代表与阴性对照相比 $P < 0.05$, ②代表与阴性对照相比 $P < 0.01$

图 2 MAF-1A 衍生物对白念珠菌黏附期生物活性的影响
Fig.2 Effect of MAF-1A derivatives on the biological activity of *C. albicans* in the adhesion stage



注:①与阴性对照相比 $P < 0.001$

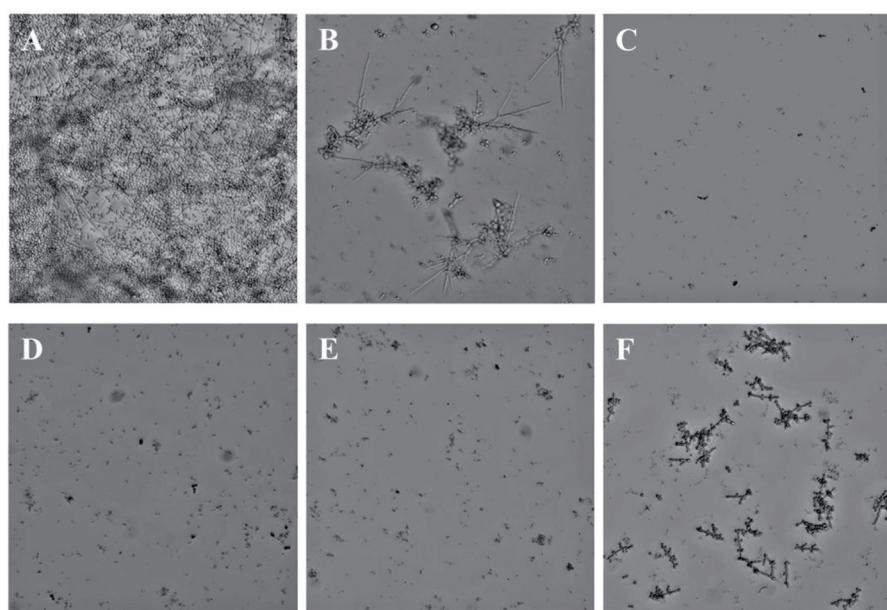
图 4 MAF-1A 衍生物对白念珠菌生物膜形成相关基因 mRNA 表达的影响
Fig.4 Effects of MAF-1A derivatives on mRNA expression of genes related to biofilm formation in *C. albicans*

62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 MAF-1A 衍生物作用后,即可导致生物膜结构被破坏,生物膜细胞皱缩溶解,菌丝断裂,细胞外基质减少(图 5)。成熟生物膜活性检测发现,当 MAF-1A 衍生物浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,与未经处理组相比,成熟生物膜的生物活性明显降低($t = 1.19$, $P < 0.05$)(图 6)。

2.6 MAF-1A 衍生物诱导 *C. albicans* ATCC10231 成熟生物膜细胞凋亡 激光共聚焦显微镜检测结果显示:与阴性对照相比,经不同浓度的 MAF-1A 衍生物处理之后,生物膜细胞磷脂酰丝氨酸外翻,生物膜细胞细胞膜的通透性发生改变,细胞膜的完整性被破坏,成熟生物膜中凋亡细胞的数量明显增多(图 7)。

2.7 MAF-1A 衍生物对 *C. albicans* ATCC10231 生物膜细胞内 ROS 的影响 经不同浓度的 MAF-1A 衍生物处理后,生物膜细胞内 ROS 的含量较阴性对照均明显增加,且随着 MAF-1A 衍生物浓度的增加,生物膜细胞内的 ROS 含量不断增加(图 8)。

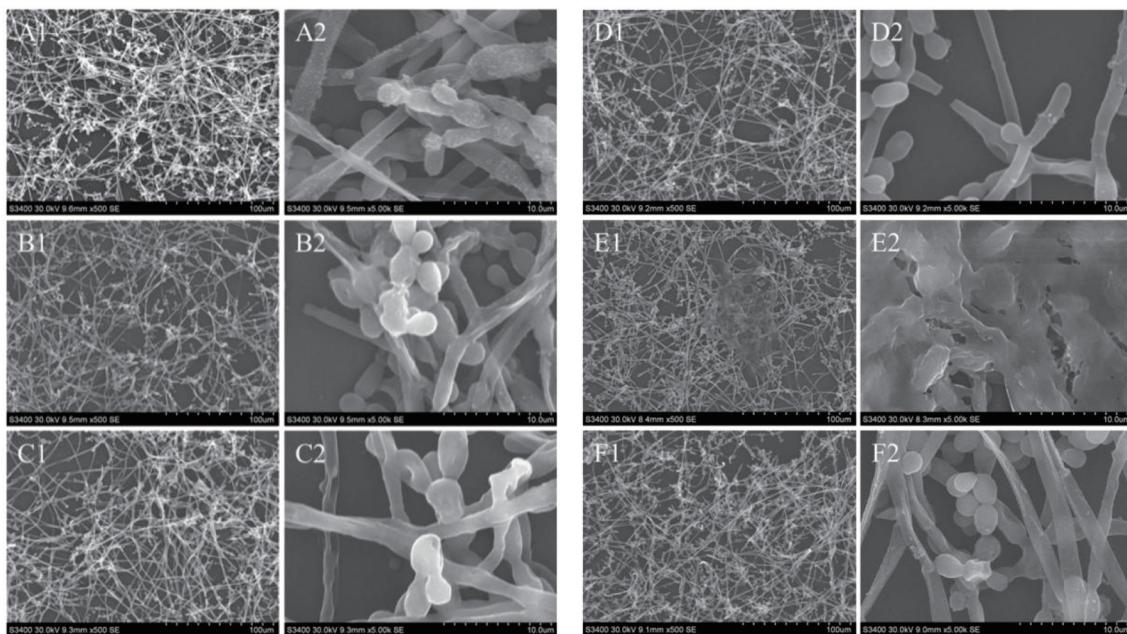
2.8 对 *C. albicans* ATCC10231 生物膜细胞线粒体膜电位的影响 经不同浓度的 MAF-1A 衍生物处理之后,线粒体膜电位较阴性对照组明显降低($t_{62.5} = 17.59$, $t_{125} = 33.26$, $t_{250} = 35.48$, $t_{500} = 41.27$, 均 $P < 0.0001$)(图 9),且随着 MAF-1A 衍生物浓度的增加,线粒体膜电位也随之降低,呈浓度依赖性。



MAF-1A 衍生物浓度为 A: 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; B: 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; C: 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$; D: 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$; E: 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; F: 为 FLC 对照 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$

图 3 MAF-1A 衍生物对白念珠菌菌丝形成的影响 ($\times 200$)

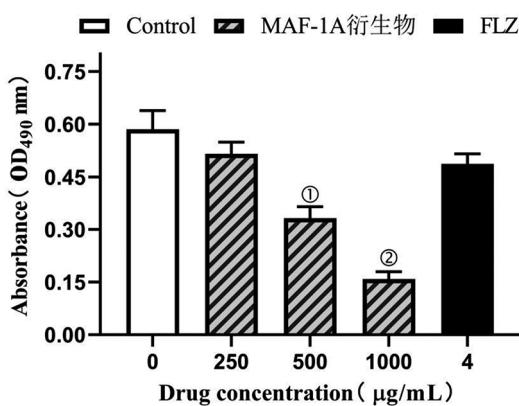
Fig.3 Effect of MAF-1A derivatives on the formation of *C. albicans* hypha ($\times 200$)



MAF-1A 衍生物浓度为 A: 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; B: 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; C: 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$; D: 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$; E: 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; F: 为 FLC 对照 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 1 表示: $\times 500$; 2 表示: $\times 5000$

图 5 MAF-1A 衍生物对白念珠菌成熟生物膜形态结构的影响

Fig.5 Effect of MAF-1A derivatives on the morphological structure of mature biofilm of *C. albicans*



注:①与阴性对照相比 $P < 0.05$; ②与阴性对照相比 $P < 0.01$

图 6 MAF-1A 衍生物对白念珠菌成熟生物膜活性的影响

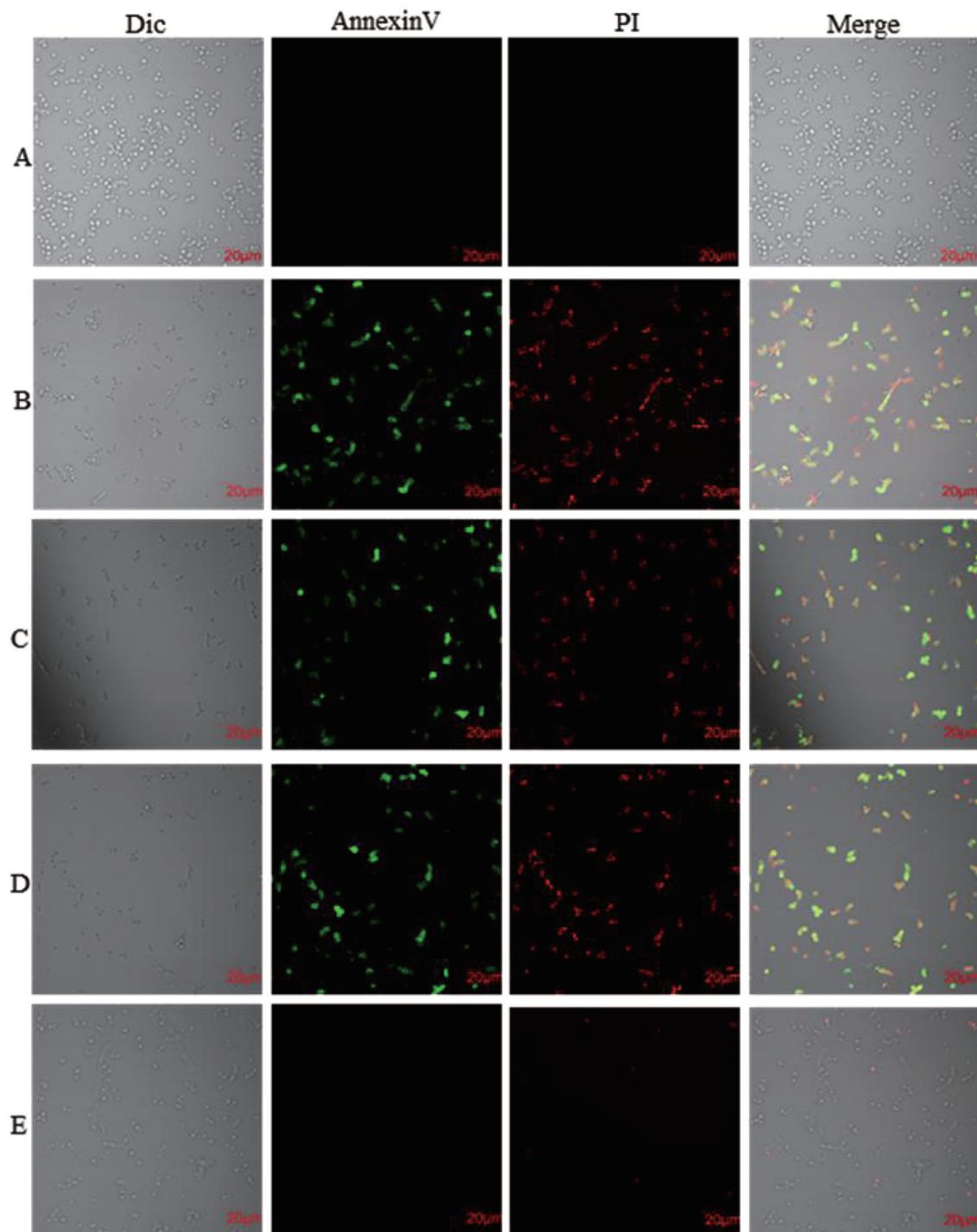
Fig.6 Effect of MAF-1A derivatives on the mature biofilm activity of *C. albicans*

3 讨 论

C. albicans 在机体内及物体表面常以生物膜的形式存在,生物膜的形成可以提高 *C. albicans* 的环境适应能力和耐药性,导致 *C. albicans* 疾病治疗的难度增加,目前临床抗 *C. albicans* 治疗失败的一个重要原因是生物膜的形成^[14]。因此,迫切需要能够有效抑制生物膜的新型抗真菌药物。实验研究发现,AMPs 除具有广谱高效的抗菌活性外,对多重耐药微生物的生物膜也表现出很强的抑杀活性^[15-17],因此,AMPs 作为新型抗生素的研究已引起

国内外学者的普遍关注^[16-18]。本研究结果显示,MAF-1A 衍生物对 *C. albicans* 的 MIC、MFC 及 SMIC₈₀ 为 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 均小于模板肽,结果表明 MAF-1A 衍生物对 *C. albicans* 浮游菌和生物膜具有抑杀活性,且抑杀效果优于模板肽,提示其具有抗生物膜药物开发的研究价值。

C. albicans 生物膜是由细胞外基质包裹菌体、假菌丝、菌丝形成的具有三维立体结构的微生物群落,其形成大致分为黏附(1~2 h)、菌丝形成(2~18 h)、成熟(24~72 h)3 个阶段^[19-20]。由此可见,*C. albicans* 细胞对物体表面的粘附和菌丝的形成是生物膜形成的关键。倒置显微镜下观察其形态学改变发现,MAF-1A 衍生物可明显减少 *C. albicans* 的黏附和菌丝的形成,且作用呈剂量依赖性,表明 MAF-1A 衍生物可以通过抑制菌体黏附和菌丝形成而阻止生物膜形成。文献报道,ALS3、HWP1 所编码的蛋白与 *C. albicans* 细胞的黏附密切相关,而 SUN41、UME6 的编码产物有促进 *C. albicans* 菌丝形成的作用^[21-24]。本实验用 qRT-PCR 方法检测了 MAF-1A 衍生物上述基因在转录水平的表达,结果表明,相较于阴性对照,MAF-1A 衍生物可使上述基因的 mRNA 表达水平明显下调($P < 0.0001$),从而影响相应蛋白的表达,提示 MAF-1A 衍生物可能通过降低 *C. albicans* 细胞黏附及菌丝形成相关



MAF-1A 衍生物浓度为 A: 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; B: 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; C: 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$; D: 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$; E: 为 AMB 对照 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$

图 7 CLSM 检测白念珠菌成熟生物膜细胞凋亡

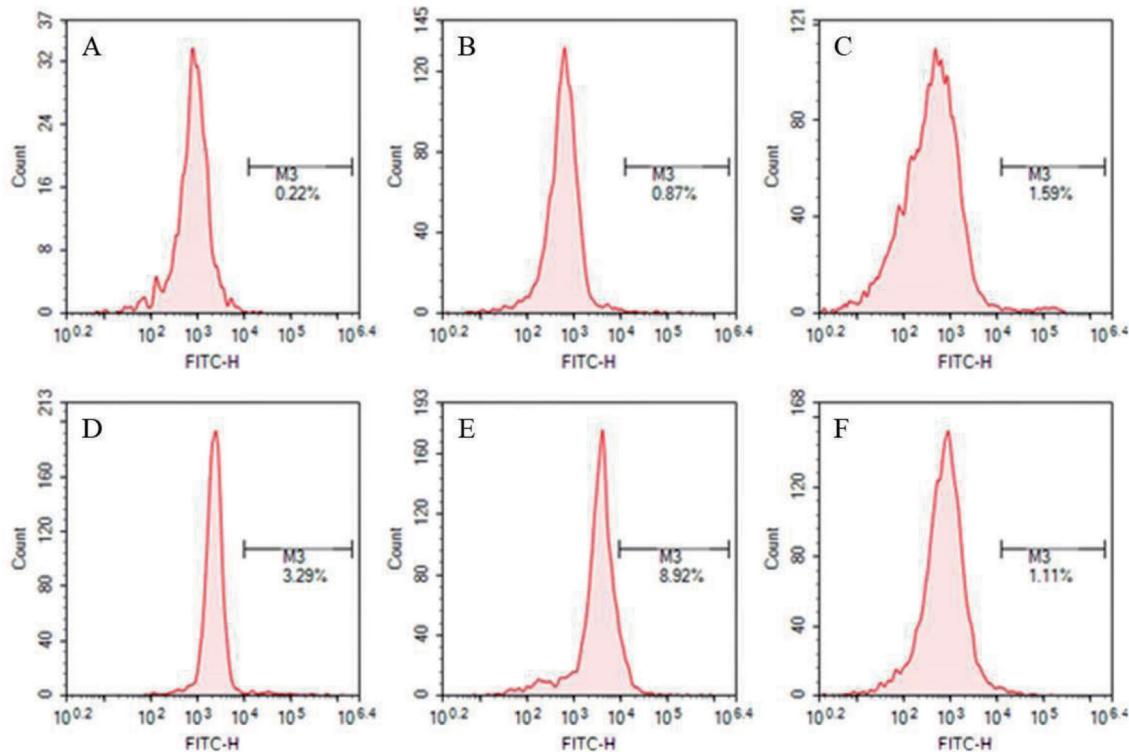
Fig.7 Detection of cell apoptosis in mature biofilms of *C. albicans* by CLSM

基因的表达来抑制生物膜的形成。

实验研究证明,AMPs 不仅能通过抑制微生物细胞黏附等方式以干扰生物膜的早期形成,少数AMPs 还能通过杀死生物膜细胞或使生物膜细胞脱落的方式来破坏成熟生物膜^[25-26]。扫描电镜结果显示,MAF-1A 衍生物作用后,生物膜细胞皱缩溶解,

菌丝断裂,细胞外基质稀少,当 MAF-1A 衍生物的浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,*C. albicans* 成熟生物膜的生物活性明显降低($t = 1.19$, $P < 0.05$),表明 MAF-1A 衍生物可杀伤生物膜内的 *C. albicans* 细胞,提示 MAF-1A 衍生物可以破坏成熟生物膜。

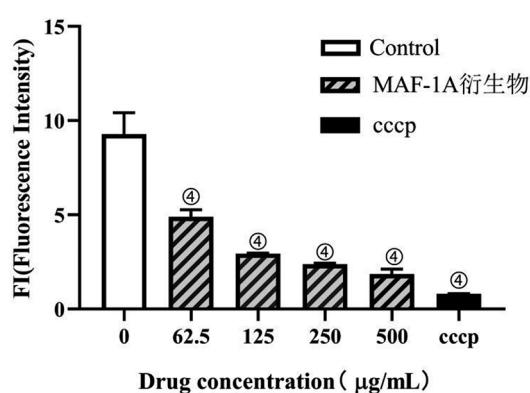
文献报道,AMB 等抗真菌化学药物及 AMPs



MAF-1A 衍生物浓度为 A: 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; B: 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; C: 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$; D: 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$; E: 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; F: 为 AMB 对照 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$

图 8 白念珠菌成熟生物膜细胞内活性氧检测

Fig.8 Detection of ROS in mature biofilm cells of *C. albicans*



注:cccp 为氧化磷酸化解偶联剂(阳性对照),分子式为 C₉H₅ClN₄,④与阴性对照相比 $P < 0.0001$

图 9 MAF-1A 衍生物对成熟生物膜细胞线粒体膜电位的影响

Fig.9 Effect of MAF-1A derivatives on mitochondrial membrane potential of mature biofilm cells

均可诱导 *C. albicans* 细胞凋亡^[27-29]。本研究在进一步探讨 MAF-1A 衍生物破坏成熟生物膜的机制时发现,MAF-1A 衍生物作用后,*C. albicans* 成熟生物膜细胞磷脂酰丝氨酸外翻,生物膜细胞细胞膜的通透性发生改变,细胞膜的完整性被破坏,而在细胞凋亡过程中,细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻是细胞早

期凋亡的标志^[30-31],结果表明 MAF-1A 衍生物可以诱导成熟生物膜细胞凋亡。细胞内 ROS 失衡已被证明是细胞凋亡的关键步骤之一,细胞内 ROS 的积累在酵母细胞凋亡中起着重要作用^[30,32]。本实验研究发现,经 MAF-1A 衍生物作用后,成熟生物膜细胞内的 ROS 明显增加,且呈剂量依赖性,表明 MAF-1A 衍生物能通过提高成熟生物膜细胞内 ROS 含量,进而诱导细胞凋亡。线粒体在 *C. albicans* 的正常代谢活动中起着至关重要的作用,由于细胞氧化应激可引起线粒体膜去极化,导致线粒体功能障碍,功能受损的线粒体可以通过 caspase 等途径引起细胞凋亡^[33]。本研究发现,相较于阴性对照,MAF-1A 衍生物可明显降低线粒体膜电位($t_{62.5} = 17.59$ 、 $t_{125} = 33.26$ 、 $t_{250} = 35.48$ 、 $t_{500} = 41.27$, $P < 0.0001$),使线粒体膜电位去极化,提示 MAF-1A 衍生物可能通过线粒体损伤机制引起细胞凋亡。

综上所述,MAF-1A 衍生物不仅可以通过抑制细胞黏附、菌丝形成来干扰 *C. albicans* 生物膜的早期形成,还能通过直接损伤及 ROS 累积、线粒体膜电位去极化所引发的细胞凋亡来破坏 *C. albicans* 成熟生物膜,提示 MAF-1A 衍生物是通过多途径发挥抗生物膜效应,但其抗生物膜作用的关键机制及

具体途径尚需进一步探讨。本实验研究为该衍生肽的深入研究和开发、利用奠定了基础,为抗生物膜药物的研发提供参考。

利益冲突:无

引用本文格式: 邓思波, 黄敏慧, 张迎春, 等. 抗菌肽 MAF-1A 衍生物体外抗白念珠菌生物膜活性及机制研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2021, 37(6): 502-510, 519. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2021.00.078

参 考 文 献:

- [1] Editorial S. Stopneglecting fungi[J]. Nat Microbiol, 2017, 2(8): 17120. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2017.120
- [2] Schoeters F, Van Dijck P. Protein-protein interactions in *Candida albicans*[J]. Front Microbiol, 2019, 10: 1792. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01792
- [3] de Barros PP, Rossoni RD, de Souza CM, et al. *Candida* biofilms: an update on developmental mechanisms and therapeutic challenges[J]. Mycopathologia, 2020, 185(3): 415-424. DOI: 10.1007/s11046-020-00445-w
- [4] 李水秀, 刘朝红, 张宏, 等. 汉防己甲素对氟康唑抗白念珠菌生物膜增效活性的初步研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(11): 953-957.
- [5] Nett JE, Sanchez H, Cain MT, et al. Interface of *Candida albicans* biofilm matrix-associated drug resistance and cell wall integrity regulation[J]. Eukaryot Cell, 2011, 10(12): 1660-1669. DOI: 10.1128/ec.05126-11
- [6] do Nascimento Dias J, de Souza Silva C, de Araujo AR, et al. Mechanisms of action of antimicrobial peptides toap2 and ndbp-5.7 against *Candida albicans* planktonic and biofilm cells[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 10327. DOI: 10.1038/s41598-020-67041-2
- [7] Lazzaro BP, Zasloff M, Rolff J. Antimicrobial peptides: application informed by evolution [J]. Science, 2020, 368 (6490): eaau5480. DOI: 10.1126/science.aaau5480
- [8] Moravej H, Moravej Z, Yazdanparast M, et al. Antimicrobial peptides: features, action, and their resistance mechanisms in bacteria[J]. Microb Drug Resist, 2018, 24 (6): 747-767. DOI: 10.1089/mdr.2017.0392
- [9] 陈明明, 王涛, 林小金, 等. 家蝇抗真菌肽衍生物 MAF-1C 抗白色念珠菌活性研究[J]. 生物技术, 2016, 26(01): 64-69. DOI: 10.16519/j.cnki.1004-311x.2016.01.012
- [10] Altinba R, Bar A, Sen S, et al. Comparison of the sensititre yeast one antifungal method with the clsi m27-a3 reference method to determine the activity of antifungal agents against clinical isolates of candida spp[J]. Turk J Med Sci, 2020, 50(8): 2024-2031. DOI: 10.3906/sag-19 09-97
- [11] 郭静, 孙静, 张晨, 等. 白假丝酵母菌体外生物膜药敏性不同检测方法的比较[J]. 中国微生态学杂志, 2016, 28(04): 388-391, 395. DOI: 10.13381/j.cnki.cjm.201604004
- [12] Yan Y, Tan F, Miao H, et al. Effect of shikonin against *candida albicans* biofilms[J]. Front Microbiol, 2019, 10: 1085. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01085
- [13] 王勇, 刘微, 王斌赫, 等. qRT-PCR 检测柞蚕中肠热休克蛋白基因 ApHSC70 对微孢子虫入侵的响应[J]. 蚕业科学, 2015, 41(02): 300-307. DOI: 10.1344/j.cnki.cykx.2015.02.015
- [14] 李瑞莲, 王倬, 杜昱光. 白色念珠菌生物被膜研究进展[J]. 微生物学报, 2017, 57(08): 1206-1218. DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20170151
- [15] Batoni G, Maisetta G, Esin S. Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1858(5): 1044-1060. DOI: 10.1016/j.bbamem.2015.10.013
- [16] Wang J, Dou X, Song J, et al. Antimicrobial peptides: promising alternatives in the post feeding antibiotic era[J]. Med Res Rev, 2019, 39(3): 831-859. DOI: 10.1002/med.21542
- [17] 汪文博, 王冠男, 蔡莎莎. 抗菌肽的抗生物膜机理研究进展[J]. 生物工程学报, 2020, 36(07): 1277-1282. DOI: 10.13345/j.cjb.190511
- [18] 尹业师, 陈华海, 曹林艳, 等. 细菌耐药性应对策略研究进展[J]. 生物工程学报, 2018, 34(08): 1346-1360. DOI: 10.13345/j.cjb.180223
- [19] Wall G, Montelongo-Jauregui D, Vidal Bonifacio B, et al. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis[J]. Curr Opin Microbiol, 2019, 52: 1-6. DOI: 10.1010/mib.2019.04.001
- [20] Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, et al. Development and regulation of single- and multi-species candida albicans biofilms [J]. Nat Rev Microbiol, 2018, 16(1): 19-31. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.107
- [21] Hoyer LL, Cota E. *Candida albicans* agglutinin-like sequence (als) family vignettes: a review of als protein structure and function[J]. Front Microbiol, 2016, 7: 280. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00280
- [22] Aaron L, Torsten M. *Candida albicans* in celiac disease: a wolf in sheep's clothing[J]. Autoimmun Rev, 2020, 19(9): 102621. DOI: 10.1016/j.autrev.2020.102621
- [23] Rodríguez-Cerdeira C, Martínez-Herrera E, Carnero-Gregorio M, et al. Pathogenesis and clinical relevance of candida biofilms in vulvovaginal candidiasis [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 544480. DOI: 10.3389/fmicb.2020.544480
- [24] Banerjee M, Uppuluri P, Zhao XR, et al. Expression of ume6, a key regulator of candida albicans hyphal development, enhances biofilm formation via hgc1- and sun41-dependent mechanisms [J]. Eukaryot Cell, 2013, 12(2): 224-232. DOI: 10.1128/EC.00163-12
- [25] Yasir M, Willecox MDP, Dutta D. Action of antimicrobial peptides against bacterial biofilms[J]. Materials (basel), 2018, 11(12): 2468. DOI: 10.3390/matl1122468
- [26] Segev-Zarko L, Saar-Dover R, Brumfeld V, et al. Mechanisms of biofilm inhibition and degradation by antimicrobial peptides [J]. Biochem J, 2015, 468(2): 259-270. DOI: 10.1042/BJ20141251