

卷柏素对唑类药物体外抗念珠菌的增效作用

曹园^{1*},姚毅¹,刘维达²,沈永年²,郑海林²

¹南京中医药大学附属医院 药学部,南京 210036;²中国医学科学院皮肤病研究所 真菌科,南京 210042

摘要: 本文研究中药卷柏中炔多酚类成分卷柏素与氟康唑、酮康唑联用对念珠菌的体外抗真菌效果,并初步探讨对氟康唑增效的分子机制。采用棋盘法测定两类药物联用对念珠菌体外抗真菌活性,以 FICI 法评价结果。实验结果表明,卷柏素与氟康唑、酮康唑合用对白念珠菌、近平滑念珠菌表现协同作用(FICI ≤ 0.5);对克柔念珠菌表现无关作用(FICI = 1)。qRT-PCR 检测卷柏素与氟康唑联用对白念珠菌相关基因表达的影响显示,卷柏素能显著地逆转氟康唑诱导白念珠菌 *ERG5*、*ERG11*、*CDR1*、*CDR2*、*MDR1*、*FLU1* 和 *SIR2* 表达上调。Western-blot 检测结果亦表明,卷柏素逆转组蛋白去乙酰化酶 Sir2 的上调。卷柏素显示出对氟康唑、酮康唑的抗念珠菌活性的体外增效作用。

关键词: 卷柏素;氟康唑;酮康唑;念珠菌;增效作用;棋盘法

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.9.021

Synergistic Effect of Selaginellin *in Vitro* on Azoles against *Candidasis*

CAO Yuan^{1*}, YAO Yi¹, LIU Wei-da², SHEN Yong-nian², ZHENG Hai-lin²

¹Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210036, China;

²Department of Mycology, Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Sciences, Nanjing 210042, China

Abstract: This study aimed to investigate the synergistic effect of selaginellin on azoles against *Candidasis* and to explore the related mechanism. Checkerboard microdilution method was used to study the antifungal activities of selaginellin in combination with fluconazole (FLC) or ketoconazole (KEC) against *Candidasis*. Fractional inhibitory concentration index (FICI) was employed as the interpretation standard. Synergistic effects were showed by SEL in combination with FLC and KEC against *Candida albicans*, *C. parapsilosis* with FICI of 0.5. However, no synergy was found for SEL and FLC or KEC against *C. kruseri*. mRNA expressions of related genes in *C. albicans* were assayed by quantitative real time PCR (qRT-PCR). SEL exhibited reversal effect on the upregulated expressions of *ERG5*, *ERG11*, *CDR1*, *CDR2*, *MDR1*, *FLU1*, *SIR2* by 86%, 71%, 62%, 67%, 56%, 36% and 52% induced by FLC in *C. albicans*. Furthermore, the expression of Sir2 was detected by Western-blot, and likewise, SEL displayed reversal effect on the upregulated expressions of Sir2 induced by FLC. These results indicated that SEL had the *in vitro* effect to enhance the activities of FLC and KEC against *C. albicans* and *C. parapsilosis*.

Key words: selaginellin; fluconazole; ketoconazole; *Candidasis*; synergistic effects; checkerboard microdilution method

念珠菌是人体重要的条件性致病真菌,是医院引起感染性疾病的重要原因之一。唑类药物为临床常用药物,其日益严重的耐药性问题,给念珠菌病的治疗带来挑战。寻找唑类药物的增效剂是抗真菌治疗的重要方向。中药卷柏为卷柏科(Selaginellaceae)卷柏属(*Selaginella* P. Beauv)植物卷柏[*Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring]或垫状卷柏[*S.*

pulvinata (Hook. et Grev.) Maxim.]的干燥全草。作为传统药用资源,在中医临床及民间应用较为广泛,用于癌症、降血压、降血糖和呼吸道感染等病^[1]。其中结构新颖的炔多酚类成分一经发现即引起了关注,新结构和新活性相继被报道^[2-8]。本课题组前期研究发现炔多酚类成分具有一定的抗真菌活性^[9]。

本研究参照了美国临床和实验室标准协会(CLSI)推荐的M27-A3方案^[10],采取棋盘式微量稀释法(简称棋盘法)观察中药卷柏中的炔多酚类成分—卷柏素(Selaginellin, SEL)对氟康唑(Fluconazole, FLC)、酮康唑(Ketoconazole, KEC)体外敏感性

收稿日期:2017-07-10 接受日期:2017-09-01

基金项目:国家自然科学基金(81102772);国家科技重大专项(2009X09308-04)

*通信作者 Tel:86-25-86529291; E-mail:caoy2002@126.com

的影响,联合用药结果以分数抑菌浓度指数(FICI)法评估;通过 qRT-PCR 和 Western-blot 检测相关基因,以及组蛋白去乙酰化酶 Sir2 表达水平的变化,初步探讨了 SEL 对 FLC 体外增效的分子机制,并为抗真菌药物新靶点提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

SEL 为实验室自制,使用¹H NMR、¹³C NMR 及 HRESIMS 对其进行结构鉴定,经 HPLC-UV 面积归一化法确证,纯度 98% 以上。FLC(辉瑞制药有限公司)。KEC(辉瑞制药有限公司),RMPI-1640 培养基(美国 Gibco 公司),Trizol(美国 Invitrogen 15596-026),cDNA 第一链合成试剂盒(美国 Thermo Fisher K1622),Real time PCR Master Mix(SYBR Green,日本 TOYOBO),Sir2(Santa Cruz Biotechnology, Inc. sc-6666), β -tubulin(英国 Abcam ab139983)。

1.1.2 菌株

美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC)标准菌株白念珠菌(*Candida albicans*) ATCC90028、近平滑念珠菌(*C. parapsilosis*) ATCC22019、克柔念珠菌(*C. kruseri*) ATCC6258 和白念珠菌临床株(62342)。

1.1.3 培养基

RMPI-1640 培养基:RMPI-1640 10.0 g,葡萄糖 20 g,吗啡啉丙磺酸(Sigma) 34.5 g,加双蒸水 900 mL 溶解,定容至 1 000 mL,滤过消毒,-20℃ 保存。SDA 培养基:葡萄糖 20 g,蛋白胨 10 g,琼脂 15 g,加双蒸水 1 000 mL,高压灭菌,4℃ 备用。YEPD 培养液:酵母浸膏 10 g,蛋白胨 20 g,加双蒸水 1 000 mL,高压灭菌,4℃ 备用。

1.1.4 仪器

恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司),全自动酶标分析仪(美国 Thermo Scientific),全自动高压消毒锅(日本 SANYO),96 孔细胞培养板(美国 Corning),高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 5024R),台式恒温振荡器(中国上海精宏实验设备有限公司 THZ-312),凝胶成像分析系统(SYNGENE G:BOXChemiXR5),荧光定量 PCR 循环仪(美国 ABI Step one plus Real time-PCR system)。

1.2 实验方法

1.2.1 菌液制备

念珠菌菌液:从 4℃ 保存的 SDA 培养基上挑取少量菌,接种至 1 mL YEPD 培养液,于 30℃ 以 100 r/min 振荡培养活化,使真菌处于指数生长期。吸取菌液至适量无菌生理盐水中,经血球计数板计数,孢子数约为(1.0~5.0) × 10⁶ cfu/mL。用倍量 RMPI-1640 液体培养基稀释成菌 1.0 × 10³ cfu/mL。

1.2.2 药液的配制

FLC 以灭菌蒸馏水配成 2.56 mg/mL,KEC 以灭菌蒸馏水配成 2.56 mg/mL,SEL 以 DMSO 配成 2.56 mg/mL,置于-20℃ 冰箱冻存。依次进行倍比稀释。96 孔平板孔内 DMSO 终浓度 ≤ 1%,对菌株生长的影响可忽略不计。

1.2.3 最小抑菌浓度(MIC)的测定

100% MIC:以空白对照为参照,肉眼观察药基孔中无菌生长为最低抑菌浓度。

1.2.4 联合药敏试验(n = 3)

参照 M27-A3 方案。联合药敏孔内药物终浓度范围如下,FLC:16~0.03 μg/mL,KEC:4~0.008 μg/mL,SEL:128~2 μg/mL。将加过药的平板置于恒温培养箱中,35℃ 培养 48 h。

以 FICI(fractional inhibitory concentration index)法评价唑类药物与 SEL 的体外联合效果,其公式为 $\sum FIC = FICA + FICB = MICAB/MICA + MICBA/MICB$,式中的 MICA 和 MICB 分别表示 A 和 B 单用时的 MIC 值,MICAB 和 MICBA 分别表示两种药物联用时各自的 MIC 值。FICI ≤ 0.5 为协同作用,FICI > 4 为拮抗作用,0.5 < FICI ≤ 4 为无关作用^[1]。

1.2.5 分组

qRT-PCR 和 Western Blot 实验为 4 个组别:空白对照组,FLC 单用组(0.25 μg/mL),SEL 单用组(64 μg/mL),两药联用组(0.25 μg/mL FLC + 64 μg/mL SEL)。

1.2.6 qRT-PCR 检测相关基因的表达水平

TRIZOL 法提取总 RNA。从 NCBI 基因库中查得所需基因序列,并用 Primer 5 软件设计所需引物,委托南京金斯瑞科技有限公司合成引物,各引物情况详见表 1。

按照 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 试剂盒说明将 RNA 逆转录成 cDNA。反应程序:95℃ × 15 s(变性),60℃ × 20 s(退火),72℃ × 15 s(延伸)。以 GAPDH 作为内参标准,一个样本基因做 3

个复孔,结果应用软件 Graphpad Prism 5.0 分析,基因水平采用倍数变化来表示[$2^{(\Delta\Delta Ct)}$ 法]。

表 1 目的基因的 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequence of the targeted gene

基因 Gene	引物(5→3) Primer (5→3)	
GAPDH	F:GTCACGATCCATTTCATTGC	R:GACCATCAATGACCAAGTCC
CDR1	F:CTCATGTTGCCAAACAATCC	R:TCGACGGATCACCTTTCATA
CDR2	F:CCATTGGTGTCTTACAACC	R:CCAGCATAAATGATCATGGC
MDR1	F:TTTCGGTTGGTCAGCAAATA	R:GGCTTAAATGAAGCACCCAT
FLU1	F:CTGTTGGTCTTGCTGCCTTA	R:TTGCTGGAGTCCAACCAATA
EGR5	F:TGCTTCATCTCGTGATTTGG	R:CCCAGTTGGTTGGCTAAGG
EGR11	F:GAGACGTGATGCTGCTCAA	R:CACACCATCTTTATAAGTTGAATGAA
SIR2	F:GCCACTGCTACTGCTGCTAC	R:GGTGTGGGTGTAATCATTGCT

注:F. forward, R. reverse.

Note:F. forward, R. reverse.

1.2.7 Western Blot 检测 Sir2 蛋白表达水平

依据酵母蛋白提取试剂盒说明书,根据所测得的菌细胞重量,加入相应体积的抑制剂,4 ℃ 12 000 rpm × 20 min 离心取上清液,分装于-70 ℃。蛋白定量(Bradford 法)后测定蛋白浓度。以 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质。电泳后将蛋白转印至硝酸纤维素膜上,加入 Western 封闭液封闭后,一抗(Sir2 抗体和 β -tubulin 抗体)封闭过夜,再以辣根过氧化物酶标记的二抗封闭液封闭 2 h, GeneSnap 成像,使用 Gel-Pro32 软件对结果进行灰度分析。

表 2 棋盘法检测 SEL 与 FLC、KEC 联用对 *C. albicans*、*C. parapsilosis*、*C. kruser* 的 MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

Table 2 Interaction of SEL and FLC, KEC respectively against *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. kruser* by checkerboard microdilution assay

菌株 Stain	MIC 单独		MIC 合用		FICI	MIC 单独		MIC 合用		FICI
	FLC	SEL	FLC	SEL		KEC	SEL	KEC	SEL	
ATCC90028	0.25	>128	0.06	128	0.24	0.5	>128	0.015	128	0.03
ATCC22019	1.0	>128	0.5	128	0.5	2.0	>128	1.0	2.0	0.5
ATCC6258	>16	>128	>16	>128	1	>4	>128	>4	>128	1
62342	0.25	>128	0.125	128	0.5	0.5	>128	0.25	64	0.5

2.2 qRT-PCR 考察 SEL 和 FLC 联用后相关基因的表达差异

采用 qRT-PCR 技术检测了组蛋白去乙酰化酶编码基因 *SIR2*, 真菌细胞膜麦角固醇生物合成的关键基因 *ERG5*、*ERG11*, 外排泵基因 *CDR1*、*CDR2*、*MDR1* 及 *FLU1* 的表达水平。结果显示, 单用 FLC 显著上调 *SIR2*、*ERG5*、*ERG11*、*CDR1*、*CDR2*、*MDR1*、

2 结果与分析

2.1 念珠菌体外联合药敏实验

以棋盘法检测 SEL 分别与 FLC、KEC 合用后对 *C. albicans* ATCC90028 和临床分离株 62342, 以及 *C. parapsilosis* ATCC22019、*C. kruser* ATCC6258 的 MIC 值(表 2), 计算对应的 FICI 指数。结果显示, SEL 与 FLC、KEC 对 *C. albicans* ATCC90028 和临床株 62342, *C. parapsilosis* ATCC22019 显示出了较好的协同增效作用, 对 *C. kruser* ATCC6258 无协同作用。

FLU1 的表达, 单用 SEL 也有一定的上调作用, 但二者合用后, SEL 逆转 FLC 引起的上述基因的表达上调, 分别下调 52%、86%、71%、62%、67%、56% 和 36% (图 1)。

2.3 SEL 与 FLC 联用对 Sir2 蛋白表达的影响

采用 Western blot 技术检测 SEL 与 FLC 联用对 Sir2 蛋白表达的影响, 结果显示(图 2), 单用 FLC 显

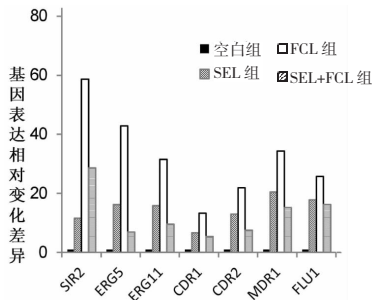


图1 SEL联合FCL对白念珠菌相关基因表达的影响

Fig. 1 The effects of SEL in combination with FLC on the expression of related genes in *C. albicans*

著上调 Sir2 蛋白的表达, 单用 SEL 对 Sir2 蛋白表达亦有上调作用, 二者合用后, SEL 逆转 FLC 对 Sir2 蛋白的上调作用。

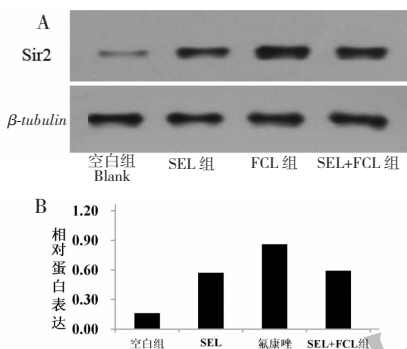


图2 SEL联合FCL对白念珠菌 Sir2 表达的影响 (A: Sir2 蛋白表达显影图; B: Sir2 蛋白表达柱状图)

Fig. 2 The effects of SEL in combination with FLC on the expression of Sir2 in *C. albicans*

3 讨论与结论

氟康唑等唑类药物至今仍是治疗念珠菌病的一线药物, 作用于真菌细胞膜麦角甾醇合成的关键酶发挥抑菌作用。由于长期、反复应用, 致病真菌的耐药现象日趋严重, 其中以白念珠菌耐药情况最严峻。编码外排蛋白的基因过度表达, 增加白念珠菌的外排作用, 减少药物在细胞内蓄积, 导致菌株对药物的敏感性降低, 从而引起耐药; 因此, 编码外排蛋白的基因过表达为耐药的主要机制之一。目前已知, ABC 转运蛋白超家族的 CDR1、CDR2, 多药耐药转运子 MDR1, 以及易化扩散转运子 FLU1 等外排蛋白与白念珠菌耐药相关。药物靶酶的突变是引起耐药的另一重要原因, 如: 由 ERG11 编码的 14 α -羊毛甾醇-去甲基化酶 (14-DM) 和由 ERG5 编码的 Δ 222 去饱和酶。因此, CDR1、CDR2、MDR1、FLU1、ERG11

和 ERG5 过表达均可引起耐药。

研究表明, 增效剂通过增强真菌对药物的敏感性, 从而减少用量、克服耐药性的产生, 对于提高抗真菌药物疗效具有积极的意义。小檗碱、黄芩素和汉防己甲素等天然产物协同氟康唑增效的作用相继被发现。据报道, 来源于中药卷柏的炔多酚类成分一卷柏素 SEL 具有抗微生物、抗人脐静脉内皮细胞衰老、抑制高血糖引起细胞凋亡和抑制可溶性环氧化物水解酶的活性^[12-15]; 本研究发现, SEL 体外对 FLC 和 KEC 抗念珠菌有明显的增效作用。

本研究采用目前国际上公认的棋盘法和 FICI 法评价卷柏素和唑类药物体外联合作用, 结果准确、重复性好^[16,17]。qRT-PCR 结果表明, 白念珠菌暴露于 FLC 后, ERG11、ERG5、CDR1、CDR2、MDR1 与 FLU1 表达上调, 与以往研究结果类似; 而 SEL 与 FLC 合用可以逆转这一趋势, 提示两药联用通过抑制真菌细胞膜的合成、抑制白念珠菌的外排功能而增强抗菌效果。

研究显示, 白念珠菌的体外敏感性可能与组蛋白去乙酰化修饰有关^[18]。Sir2 为 2000 年新发现的组蛋白去乙酰化酶家族一员。我们发现, FLC 作用于白念珠菌后, 编码 Sir2 的基因 SIR2 的变化与上述耐药基因同向, 推测与耐药形成有关。SEL 与 FLC 合用后显著下调 SIR2 的表达水平。Western-blot 检测亦验证这一趋势。Sir2 能否成为抗真菌治疗的新靶点, 有待于进一步探讨。

克柔念珠菌 (*C. krusei*) 为天然耐药菌, 对 SEL 与 FLC、KEC 联用的体外敏感性较差, 说明两类药物联用对逆转天然耐药效果不好。而临床上病原真菌的耐药主要以获得性耐药为主, 天然耐药并不常见。由于 SEL 在卷柏中含量较高^[15,19], 本课题组将进一步通过体内动物实验验证 SEL 作为抗真菌增效剂的应用前景。

参考文献

- 1 Editorial Board of "Zhong Hua Ben Cao", State Administration of Traditional Chinese Medicine of the People's Republic of China (国家中医药管理局《中华本草》编委会). Chinese materia medica: VoI (中华本草) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999, 4: 387-389.
- 2 Zhang LP, Liang YM, Wei XC, et al. A new unusual natural pigment from *Selaginella sinensis* and its noticeable physicochemical properties [J]. *J Org Chem*, 2007, 72: 3921-3924.

- 3 Cheng XL, Ma SC, Yu JD, *et al.* Selaginellin A and B, two novel natural pigments isolated from *Selaginella tamariscina* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2008, 56:982-984.
- 4 Yang C, Shao YT, Li K, *et al.* Bioactive selaginellins from *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring [J]. *Beilstein J Org Chem*, 2012, 8:1884-1889.
- 5 Liu X, Luo HB, Huang YY, *et al.* Selaginpulvilins A-D, new phosphodiesterase-4 inhibitors with an unprecedented skeleton from *Selaginella pulvinata* [J]. *Org Lett*, 2014, 16:282-285.
- 6 Nguyen PH, Zhao BT, Ali MY, *et al.* Insulin-mimetic selaginellins from *Selaginella tamariscina* with protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitory activity [J]. *J Nat Prod*, 2015, 78:34-42.
- 7 Xu KP, Li J, Zhu GZ, *et al.* New Selaginellin derivatives from *Selaginella tamariscina* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2015, 17:819-822.
- 8 Huang YY, Liu X, Wu DY, *et al.* The discovery, complex crystal structure, and recognition mechanism of a novel natural PDE4 inhibitor from *Selaginella pulvinata* [J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 130:51-59.
- 9 Cao Y, Yao Y, Huang XJ, *et al.* Four new selaginellin derivatives from *Selaginella pulvinata*; mechanism of racemization process in selaginellins with quinone methide [J]. *Tetrahedron*, 2015, 71:1581-1587.
- 10 Clinical and Laboratory Standards Institute. Clinical laboratory standards institute reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard M27-A3 (third edition) [M]. Wayne, PA:2008.
- 11 Te Dorsthorst DT, Verweij PEMeis JF, Punt NC, *et al.* *In vitro* interactions between amphotericin B, itraconazole, and flucytosine against 21 clinical aspergillus isolates determined by two drug interaction models [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48:2007-2013.
- 12 Wang CJ, Hu CP, Xu KP, *et al.* Effects of selaginellin on homocysteine-induced senescence in human umbilical vein endothelial cells [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2010, 55:560-566.
- 13 Cao Y, Chen JJ, Tan NH, *et al.* Antimicrobial selaginellin derivatives from *Selaginella pulvinata* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20:2456-2460.
- 14 Zhang WF, Xu YY, Xu KP, *et al.* Inhibitory effect of selaginellin on high glucose-induced apoptosis in differentiated PC12 cells; Role of NADPH oxidase and LOX-1 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 694:60-68.
- 15 Kim JH, Cho CW, Tai BH, *et al.* Soluble epoxide hydrolase inhibitory activity of selaginellin derivatives from *Selaginella tamariscina* [J]. *Molecules*, 2015, 20:21405-21414.
- 16 Sun S, Li Y, Guo Q, *et al.* *In vitro* interactions between tacrolimus and azoles against *Candida albicans* determined by different methods [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52:409-417.
- 17 Li Y, Sun S, Guo Q, *et al.* *In vitro* interactions between azoles and cyclosporin against clinical isolates of *Candida albicans* determined by the checkerboard method and time kill curves [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 61:577-585.
- 18 Jose PM, Jose AU, Alexander DJ. Phenotypic switching in *Candida albicans* is controlled by a SIR2 gene [J]. *EMBO J*, 1999, 18:2580-2592.
- 19 Cao Y (曹园), Wu YP (吴永平), Zhou XW (周晓雯), *et al.* Simultaneous determination of selaginellins and biflavones in *Selaginella tamariscina* and *Selaginella pulvinata* by HPLC-DAD [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2012, 37:1254-1258.

(上接第 1557 页)

- 14 Nishina A, Kimura H, Tsukagoshi H, *et al.* Neurite outgrowth of PC12 cells by 4'-O- β -D-glucopyranosyl-3', 4-dimethoxychalcone from brassica rapa L. hidabeni was enhanced by pretreatment with p38MAPK inhibitor [J]. *Neurochem Res*, 2013, 38:2397-2407.
- 15 Yang J (杨军), Song NL (宋娜丽). Chemical constituents from *Clematidis Radix et Rhizoma* [J]. *Chin J Exp T Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2017, 23(9):41-45.
- 16 Huo LN (霍利娜), Wang W (王威), Liu Y (刘洋), *et al.* Chemical constituents from leaves of *Perilla frutescens* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2016, 1(47):26-31.
- 17 Sidanaa J, Neeradib D, Singha IP, *et al.* Antileishmanial polyphenols from *Corymbia maculata* [J]. *J Chem Sci*, 2013, 125(4):765-775.
- 18 Li XZ (李小珍), Yan YM (晏永明), Cheng YX (程永现), *et al.* Compounds from *Clerodendranthus spicatus* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29:183-189.
- 19 Li XZ (李小珍), Yan YM (晏永明), Zhuang XC (庄小翠). Compounds from *Codonopsis pilosula* produced in Xundian of Yunnan province [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发) [J], 2017, 29:1858-1866.
- 20 Qi JJ, Yan YM, Cheng LZ, *et al.* A novel flavonoid glucoside from the fruits of *Lycium ruthenicum* [J]. *Molecules*, 2018, 23:325.