

# 枯草芽孢杆菌 BS-Z15 代谢产物治疗 白色念珠菌感染昆明小鼠的作用

陈忠宜<sup>1</sup>, 李金玉<sup>1</sup>, 葛风伟<sup>1</sup>, 谢尔瓦尼木·阿不都艾尼<sup>1</sup>, 赵晶晶<sup>1</sup>, 宁焕宸<sup>1</sup>, 赵和平<sup>2</sup>, 赵惠新<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>新疆师范大学生命科学学院 干旱区植物逆境生物学实验室, 乌鲁木齐 830054;

<sup>2</sup>北京师范大学生命科学学院, 抗性基因资源与分子发育北京市重点实验室, 北京 100875

**摘要:** 本文就枯草芽孢杆菌 BS-Z15 发酵液中粗提的代谢产物 (metabolites extracted from fermentation broth, MEs) 对白色念珠菌的抑制作用进行了研究, 并探讨了该提取物治疗感染白色念珠菌的昆明小鼠的作用。根据《产孢丝状真菌液基稀释法抗真菌药物敏感性试验方案》测定了 MEs 的最小抑菌浓度 (MIC), 进一步在建立小鼠白色念珠菌感染模型基础上, 以氟康唑 (90 mg/kg) 为阳性药物对照组, 以生理盐水为模型对照组, 以 MEs 高剂量 (90 mg/kg)、MEs 中剂量 (60 mg/kg)、MEs 低剂量 (30 mg/kg) 为实验组, 采用灌胃给药法处理, 以一般状况、体重、死亡率、肝脾病变程度、血清中总抗氧化能力 (T-AOC)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、丙二醛 (MDA) 含量变化为评价指标, 分析 MEs 对小鼠白色念珠菌感染模型的治疗作用。结果表明, MEs 对白色念珠菌的 MIC 为 0.33 mg/mL, MEs 可使酵母态白色念珠菌菌体表面凹陷致死。与模型组比较, MEs 高剂量治疗小鼠表现出更好的生理状态, 肝脾的损伤程度明显改善, 死亡率显著降低, 血清中的总抗氧化活性及 SOD 活性显著增加, MDA 含量显著下降。比较 MEs 不同剂量处理的小鼠, 表明治疗效果在一定浓度范围内与剂量成正相关性。说明枯草芽孢杆菌 BS-Z15 代谢产物对感染白色念珠菌的小鼠有一定的疗效, 具有潜在的治疗白色念珠菌真菌病的药用价值。

**关键词:** 枯草芽孢杆菌 BS-Z15; 代谢产物; 白色念珠菌感染; 小鼠

中图分类号: R96; Q93

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880 (2021) 6-0998-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.6.014

## Effect of *Bacillus subtilis* BS-Z15 metabolites in the treatment of *Candida albicans* infected Kunming mice

CHEN Zhong-yi<sup>1</sup>, LI Jin-yu<sup>1</sup>, GE Feng-wei<sup>1</sup>,

XIEERWANIMU A-bu-du-ai-ni<sup>1</sup>, ZHAO Jing-jing<sup>1</sup>, NING Huan-chen<sup>1</sup>, ZHAO He-ping<sup>2</sup>, ZHAO Hui-xin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Plant Adversity Biology in Arid Regions, School of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China;

<sup>2</sup>Beijing Key Laboratory of Resistance Gene Resources and Molecular Development,

School of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

**Abstract:** In this research, we investigated the inhibitory effect of metabolites extracted from fermentation broth (MEs) of *Bacillus subtilis* BS-Z15 on *Candida albicans*, and discussed the effect of this extract on the treatment of *C. albicans* infected mice in Kunming. The minimum inhibitory concentration (MIC) of MEs was determined according to the "Antifungal Drug Sensitivity Test Protocol for Liquid-Based Dilution of Sporulating Filamentous Fungi". The therapeutic effect of MEs on the murine model of *C. albicans* infection in mice was analyzed using the following parameters: general condition, body weight, mortality, liver and spleen lesions, total antioxidant capacity (T-AOC), superoxide dismutase (SOD) activity, and malondialdehyde (MDA) content in serum. The results showed that the MIC of MEs against *C. albicans* was 0.33 mg/mL, and MEs could cause yeast *C. albicans* surface depression and lethality. Compared with the model group, mice treated with high doses of MEs showed better physiological status, significantly improved liver and spleen damage, significantly reduced mortality, significantly

收稿日期: 2020-10-28 接受日期: 2020-12-29

基金项目: 新疆维吾尔自治区重点实验室开放课题 (2020D0410); 国家自然科学基金联合项目 (U1703112); 新疆师范大学研究生科研创新项目 (XSY202002010)

\* 通信作者 Tel: 86-013319807862; E-mail: zhaohuixin101@sina.com

increased total antioxidant activity and SOD activity in serum, and significantly decreased MDA content. The comparison of MEs in mice treated with different doses showed that the treatment effect was dose-dependent in a certain concentration range. This indicates that *B. subtilis* BS-Z15 metabolites have a certain therapeutic effect on mice infected with *C. albicans* and have potential medicinal value in the treatment of *C. albicans* fungal diseases.

**Key words:** *Bacillus subtilis* BS-Z15; metabolites; *Candida albicans* infection; mice

真菌病分为浅部真菌和深部真菌,目前深部真菌感染病例数日益增多,且90%以上临床报道的与真菌有关的死亡病例,都与隐球菌、念珠菌和曲霉菌有关<sup>[1]</sup>,已成为影响人类生活品质、威胁生命健康安全的重要疾病之一。白色念珠菌(*Candida albicans*)是念珠菌属中致病力最强的一种革兰氏阳性条件致病菌,常常侵犯人体皮肤、黏膜,并导致内脏或全身感染<sup>[2]</sup>。造成的全球死亡率在36%至63%之间,已成为公共卫生系统和医疗保健领域亟待解决的重要问题。

已经广泛报道了使用拮抗菌抑制白色念珠菌,其中芽孢杆菌占所筛选的主体,其次是真菌和放线菌<sup>[3]</sup>。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)能分泌多种抗菌代谢产物,并具有多功能,低毒性等优点,被广泛应用于医药,农业,科研等研究领域<sup>[4]</sup>。目前研究多为环脂肽类的抗菌物质,如表面活性素(surfactin)、伊枯草素(iturin)、芬枯草素(fengycin),及链肽类抗菌物质<sup>[5]</sup>,对这些抗菌物质只在体外的抗真菌研究较多,体内效果研究较少,目前只发现伊枯草素在感染白色念珠菌的小鼠中有一定的治疗效果<sup>[6]</sup>,且对枯草芽孢杆菌代谢物中的其他抗菌物质研究较少。

前期从新疆和硕地区土壤中筛选获得了枯草芽孢杆菌 BS-Z15,其发酵液中粗提的代谢产物(metabolites extracted from fermentation broth, MEs)拮抗真菌能力强,且拮抗稳定性好<sup>[7]</sup>,在对 MEs 抗真菌活性及对小鼠给药的安全性评价发现,该菌株能有效抑制多种真菌如大丽轮枝菌、黄曲霉,且对小鼠无毒害作用<sup>[8]</sup>。本文对枯草芽孢杆菌 BS-Z15 发酵液中粗提的 MEs 在体外对白色念珠菌的最低抑菌剂量测定(MIC),研究对酵母态白色念珠菌的杀灭作用,在通过建立白色念珠菌感染小鼠体内模型,探讨 MEs 对其治疗作用。通过研究枯草芽孢杆菌 BS-Z15 发酵液中粗提的 MEs 在体外和体内对白色念珠菌的抑制作用,为开发出具有抗真菌作用强、副作用低的抗真菌药物打下坚实的研究基础。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

二甲基亚砜、氢氧化钠(分析纯);0.9%氯化钠注射液、氟康唑氯化钠注射液、环磷酰胺、三氮吗啡琳丙磺酸、RPMI1640 培养基(含 L 谷氨酰胺,不含碳酸氢钠)、马铃薯培养基(上海研拓生物科技有限公司);总抗氧化能力(T-AOC)测定试剂盒、总超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒(上海信帆生物科技有限公司)。

### 1.2 菌种

枯草芽孢杆菌 BS-Z15 由本实验室自主分离纯化,白色念珠菌由北京师范大学提供。

### 1.3 动物

雄性昆明种小鼠(KM 小鼠)60 只,6 周龄,体重在  $25 \pm 2$  g 左右,由新疆维吾尔自治区实验动物中心提供,动物生产许可证号:SCKK(新)20180003。

## 2 方法

### 2.1 体外抗真菌试验

#### 2.1.1 枯草芽孢杆菌 BS-Z15 发酵液中的 MEs 的提取

参照 Zhao 等<sup>[9]</sup>对活性物质的提取方法,对该菌分泌的胞外抗菌物质进行提取。BS-Z15 菌液 12 000 rpm 离心过滤获得无菌体发酵液,酸沉淀过夜后 12 000 rpm 离心,无菌水溶解获得的沉淀,有机溶剂萃取获得 MEs,最后用正丁醇萃取风干。

#### 2.1.2 MEs 对白色念珠菌抑菌圈及最低抑菌浓度的测定

采用平板对峙法,制备双层培养基平板,底层为琼脂凝胶,上层为加有白色念珠菌孢子悬液的马铃薯固体培养基,后用 1 mL 枪头在上层平板上打孔,并向孔内加入 100  $\mu$ L 按照“2.1.1”方法提取的 MEs。将平板置于 28  $^{\circ}$ C 的黑暗培养箱中,培养 3 天,然后取出,观察并测量抑菌圈大小。

采用微量肉汤稀释法<sup>[10]</sup>,参考美国国家临床实验室标准化委员会(NCCLS)推荐的《产孢丝状真菌液基稀释法抗真菌药物敏感性试验方案》(M38-A)<sup>[11]</sup>。测定最终浓度为 1.32、0.66、0.33、0.165、

0.082 5、0.041 2、0.020 6 mg/mL 的 MEs 抑菌能力,并设真菌生长对照孔、空白对照孔和氟康唑对照孔(0.02 mg/mL)于 36 °C 孵育 48 h 在 530 nm 处读结果。并通过目视观察分级(4:生长浊度不减低;3:生长浊度轻度减低或约 75% 受试菌生长;2:生长浊度显著减低或约 50% 受试菌生长;1:轻度生长或约 25% 受试菌生长;0:肉眼观察清晰或不生长),以轻度生长或约抑制 25% 受试菌生长管为 MIC 判断终点。所有实验均设 3 组重复。

### 2.1.3 MEs 对酵母态白色念珠菌影响的观察

制备白色念珠菌悬浮液,使用血球计数板计数  $1.0 \times 10^7$  /mL,并加入测得最低抑菌浓度的 MEs,温度为 31 °C,180 rpm,黑暗条件下振荡培养至 3 天,每 12 h 取样一次。以等体积蒸馏水为对照。制备电子扫描显微镜样品,所有实验均设 3 组重复。

## 2.2 对小鼠白色念珠菌感染模型的治疗作用

### 2.2.1 试验分组

昆明种雄性小鼠 60 只,6 周龄,体质量  $25 \pm 2$  g,每组 10 只,分笼饲养,将小鼠饲养在  $22 \pm 2$  °C 的房间内,给予充足的饮水和食物。所有小鼠在研究开始前均喂以标准的啮齿动物饲料,并进行 1 周的驯化。在研究开始之前,各组之间的体重没有统计学上的显著差异( $P > 0.05$ ),按体重随机分为 6 组。即空白组、模型组、阳性对照药氟康唑组(90 mg/kg)、MEs 低剂量组(30 mg/kg)、MEs 中剂量组(60 mg/kg)和 MEs 高剂量组(90 mg/kg)。

### 2.2.2 动物模型的建立与给药

空白组除正常饮水外,每日灌胃生理盐水溶液 0.02 mL/g。模型组在建立念珠菌感染小鼠模型前 3 天,每天腹腔注射环磷酰胺(Cyc)200 mg/kg,第 4 天即接种尾静脉无菌注射  $2 \times 10^6$  CFU/mL 白色念珠菌悬液 1 mL,第 5 天开始连续 7 天腹腔无菌注射 0.02 mL/g 生理盐水。给药组在前 4 天与模型组处理相同,第 5 天开始连续 7 天灌胃预设剂量的各组药物<sup>[12]</sup>。

### 2.2.3 小鼠一般状态及病理形态学观察

在第五天起观察每组小鼠的总体状况,最后一次给药后 24 h 后对所有小鼠称重,麻醉后进行腹部主静脉取血。取血后立即脱颈椎处死小鼠,并快速剖腹取出肝脏、脾脏和胸腺,用生理盐水冲洗多余组织,再用滤纸吸去生理盐水后称重并记录,计算肝脏、脾脏和心脏指数。并将各组小鼠的脾脏和肝脏组织用 10% 的甲醛溶液固定 72 h,石蜡包埋切片,

用常规苏木精-伊红(HE)染色后进行镜检。

### 2.2.4 不同处理对小鼠总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)的影响

腹腔主静脉取血后,离心 20 min(2500 rpm),吸取上层血清按试剂盒操作说明测定血清中总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量。小鼠尸体全部浇乙醇火烧处理。

## 2.3 统计学分析

实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,以 SPSS20.0 统计软件进行单因子方差分析(One-way ANOVA),各组间比较用 Duncan 法, $P < 0.05$  有统计学意义,作图使用 Sigma Plot 和 Adobe illustrator。

## 3 结果

### 3.1 MEs 对白色念珠菌最低抑菌浓度

在使用平板对峙法后,发现 MEs 对白色念珠菌有良好的抑菌能力,如图 1 所示。



图 1 MEs 对白色念珠菌抑菌圈

Fig. 1 Inhibition zone of MEs against *C. albicans*

随后我们进行了 MEs 对白色念珠菌最低抑菌浓度的测定,如表 1 所示,在 48 h 后,0.020 62 mg/mL 孔的浑浊度与阴性对照孔相差无几,在 0.041 2 mg/mL 孔生长浊度轻度减低,当浓度为 0.33 mg/mL 时生长浊度显著减低,只有轻度生长,且此时的 OD 值也是显著降低( $P < 0.01$ ),根据丝状真菌肉汤稀释抗真菌敏感性试验参考方法中氟康唑和酮康唑等药物以轻度生长或约抑制 25% 受试菌生长管为 MIC 判断终点。所以我们以 0.33 mg/mL 作为最低抑菌浓度(MIC)。

### 3.2 MEs 对酵母态白色念珠菌孢子形态影响

将 0.33 mg/mL MEs 加入培养白色念珠菌的 YPD 培养基中,对照组为加入等量无菌水,对酵母态白色念珠菌孢子形态的影响如图 2。培养初期,处理组与对照组的白色念珠菌孢子体形态有些许差

表 1 不同浓度 MEs 对白色念珠菌生长的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effect of different concentrations of MEs on *C. albicans* growth ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	空白对照 Blank control	阳性对照 Positive control	MEs(mg/mL)							阴性对照 Negative control
			1.32	0.66	0.33	0.165	0.082 5	0.041 2	0.020 6	
分级 Classification	0	1	1	1	1	2	2	3	4	4
OD <sub>530 nm</sub>	0.01 ± 0.01	0.24 ± 0.06 **	0.03 ± 0.01 *	0.11 ± 0.02 *	0.25 ± 4.2 **	0.56 ± 4.2 **	0.61 ± 4.2 **	0.82 ± 4.2 **	1.14 ± 4.2 **	1.45 ± 4.2 **

注:与空白对照组比较, \*P < 0.05; \*\*P < 0.01。

Note: Compared with blank control, \*P < 0.05; \*\*P < 0.01.

异, 总体孢子形态呈椭球型, 孢子体饱满、表明光滑, 但有少数孢子体凹陷属于正常的死亡现象; 处理组, 即白色念珠菌在 0.33 mg/mL MEs 的 YPD 液体培养基中培养了 12、24、48、72 h 后孢子体随着处理时间的延长出现皱缩、凹陷、光滑度明显降低的现象。处理 12 h 后, 处理组白色念珠菌孢子体开始出现凹陷的现象, 对照组较为正常; 在处理 24 h 后, 白色念珠

菌孢子体出现皱缩、干瘪、凹陷等现象, 对照组孢子体依旧较为饱满、圆润。处理 48 h 后, 白色念珠菌孢子体更加干瘪凹陷, 且出现菌体破裂死亡等现象, 对照组也出现少许菌体皱缩凹陷等正常死亡现象。处理 72 h 后, 处理组孢子体死亡情况最为严重, 几乎无正常孢子, 对照组依旧存在正常的少数孢子体凹陷的状况。

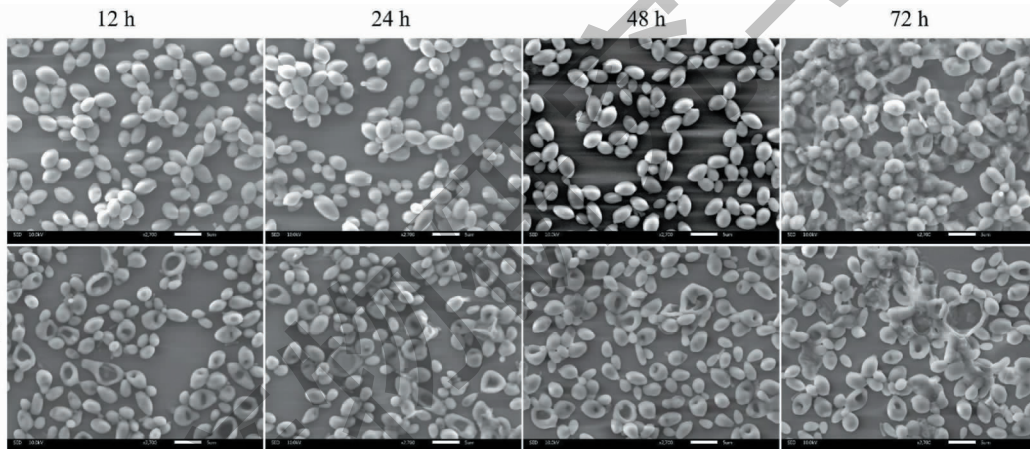


图 2 MEs 对酵母态白色念珠菌影响的电镜照片 (×2 700)

Fig. 2 Electron micrographs of the effects of MEs on *C. albicans* in yeast (×2 700)

### 3.3 不同处理对小鼠体征情况的影响

正常对照组小鼠实验过程中均较活泼, 毛色光亮, 饮食正常, 行动自如。模型组接种白色念珠菌后第 2 天开始出现皮毛不整、无光泽, 倦缩驼背, 活动减少, 进食量减少, 精神不振、相互撕咬, 体重下降等

现象。如表 2 所示, 阳性药物氟康唑组和 MEs 高、中剂量组小鼠生长状况给药后症状有所改善。在各组死亡率统计上, 正常组、氟康唑组小鼠在实验期间无小鼠死亡现象, 死亡率为 0%, 模型组在实验第二天就出现了小鼠死亡现象, 实验期间共死亡 5 只小

表 2 不同处理对小鼠体征状态及死亡率的影响

Table 2 Effect of different treatments on physical status and mortality of mice

体征状态 Symptom status	正常组 Normal group	模型组 Model group	阳性对照 Positive control	MEs(mg/mL)		
				90	60	30
皮毛光泽度 Glossiness	毛色光亮	皮毛不整	毛色光亮	毛色光亮	皮毛不整	皮毛不整
灵敏度 Sensitivity	较活泼	活动较少	较活泼	较活泼	较活泼	活动较少
精神状态 Mental state	良好	不振	良好	良好	不振	不振
死亡率 Mortality	0%	50%	0%	10%	30%	40%



鼠,死亡率最高,为50%;MEs灌胃组,实验期间均有小鼠死亡现象,其中高剂量组与氟康唑组的死亡率相当为10%,低剂量组与模型组的死亡率相当为40%,可看出死亡率随MEs剂量的升高而降低。

如表3所示,与正常组比较,模型组和MEs中、低剂量组的小鼠体重均有显著性降低,与模型组比

较,MEs高剂量组、氟康唑组体重具有显著性恢复。脾脏指数中,与空白对照组相比,各组均有下降,模型组小鼠的脾脏指数具有显著性降低;与模型组相比,氟康唑组、高剂量组小鼠具有显著性恢复;心脏和脾脏指数均无明显变化。

表3 不同处理对小鼠脏器指数及体重的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effect of different treatments on visceral index and body weight of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

脏器指数 Organs index	正常组 Normal group	模型组 Model group	阳性对照 Positive control	MEs(mg/mL)		
				90	60	30
脾脏指数 Spleen index	2.70 ± 0.51	2.45 ± 0.41 *	1.62 ± 0.19	1.99 ± 0.17	2.26 ± 0.11	2.34 ± 0.15
心脏指数 Cardiac index	6.25 ± 1.12	6.17 ± 0.91	6.12 ± 1.62	6.50 ± 1.21	6.47 ± 0.84	6.24 ± 0.31
肝脏指数 Liver index	62.81 ± 7.19	63.36 ± 5.75	61.51 ± 6.48	60.30 ± 2.27	62.39 ± 4.31	60.63 ± 0.81
体重 Weight (g)	33.11 ± 1.40	26.25 ± 1.35 **	31.55 ± 1.45 <sup>#</sup>	31.15 ± 1.54 <sup>#</sup>	29.71 ± 1.13 *	28.31 ± 1.13 *

注:与正常组相比,\* $P < 0.05$ ;\*\* $P < 0.01$ ;与模型组相比,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ 。

Note:Compared with normal group,\* $P < 0.05$ ;\*\* $P < 0.01$ ;\*\*\* $P < 0.001$ ;Compared with model group,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ .

### 3.4 不同处理对小鼠组织病理学变化的影响

肝脏 HE 染色切片显示,各组小鼠肝组织细胞核被染成蓝色,肝细胞质被染成粉紫色。模型组(B组)小鼠的肝细胞损伤病变严重,呈气球样,明显肿胀变形,部分细胞膜破裂,细胞质区分不明显,有炎性细胞浸润,可见造模较成功。正常组(A组)小鼠肝脏内部各组织排列清晰,肝细胞条索状排列整齐疏松,未出现水肿,细胞间无明显间隙,肝细胞排列

紧密,中心静脉内皮结构完整,细胞质区分明显,无炎性细胞浸润。氟康唑组(C组)和高剂量组(D组)小鼠的肝脏细胞病变程度较轻,细胞形态较阴性对照组大幅度好转,炎性细胞浸润减少,肝细胞结构基本正常,虽然有轻度肿胀,但病变程度大幅度降低,细胞呈多面体单核,位于细胞中央;中剂量(E组)、低剂量(F组)小鼠肝细胞形态虽有小幅好转,但细胞间隙还是增大严重(图3)。

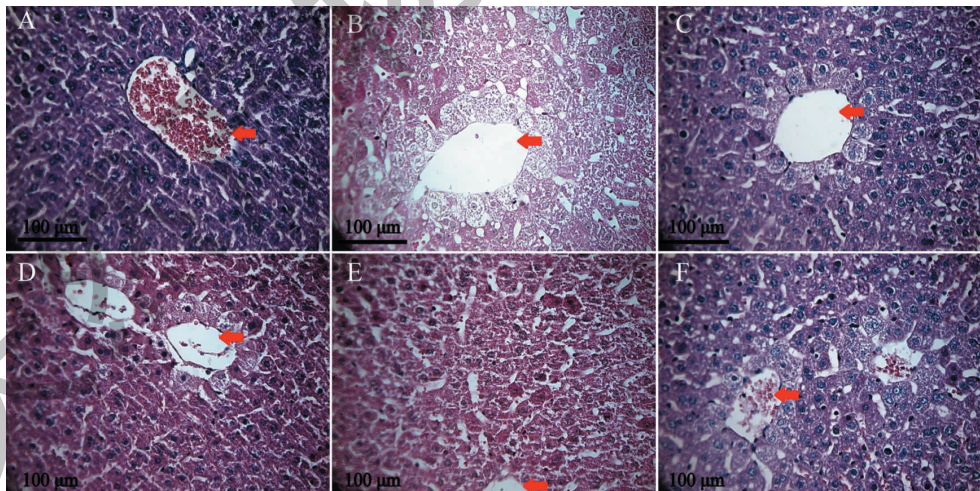


图3 小鼠肝脏切片 HE 染色后显微照片( $\times 400$ )

Fig. 3 Micrographs of mouse liver sections after HE staining ( $\times 400$ )

注:A为正常组;B为感染组;C为感染后用90 mg/mL 氟康唑治疗组;D为感染后用90 mg/mL MEs 治疗组;E为感染后用60 mg/mL MEs 治疗组;F为感染后用30 mg/mL MEs 治疗组(下同)。红箭头标注为中心静脉。Note:A is the normal group;B is the infected group;C is the group treated with 90 mg/mL fluconazole after infection;D is the group treated with 90 mg/mL MEs after infection;E is the group treated with 60 mg/mL MEs after infection;and F is the group treated with 30 mg/mL MEs after infection (the same below). Red arrows are labeled as central veins.

脾脏 HE 染色切片显示,正常组(A组)小鼠脾脏红髓、白髓和边缘区细胞表现出细胞形态的一致性,没有出现细胞损伤的现象;模型组(B组)小鼠脾脏细胞白髓和红髓之间界限不清晰,淋巴细胞排列疏松,细胞间隙明显变大,红髓区充血出血。氟康唑组(C组)和高剂量组(D组)小鼠,脾脏细胞的形

态得到了明显的改善,淋巴细胞间隙明显减小,脾脏结构逐渐恢复正常,C组形态稍好于D组。中剂量(E组)、低剂量(F组)小鼠肝细胞较B组,形态虽有小幅度好转,但病变依然明显,细胞间隙明显,红髓充血出血明显,E组形态明显好于F组(见图4)。

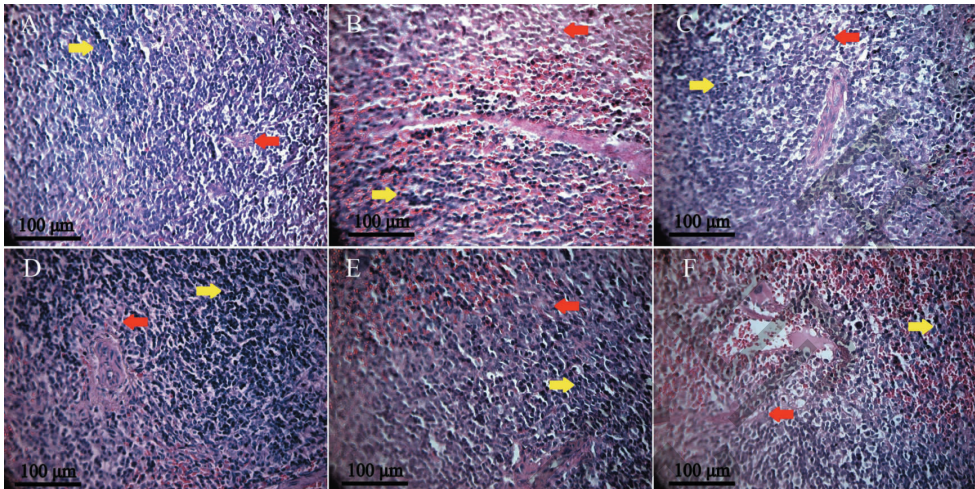


图4 小鼠脾脏切片 HE 染色后显微照片(×400)

Fig. 4 Micrographs of mouse spleen sections after HE staining (×400)

注:红箭头标注为红髓;黄箭头标注为白髓。Note: Red arrows are labeled as red marrow; Yellow arrows are labeled as white marrow.

### 3.5 不同治疗处理对小鼠总抗氧化(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量的影响

分析显示,模型组中的总抗氧化能力和SOD活性较正常组显著降低( $P < 0.05$ ),而MDA含量显

著升高。与模型组比较,氟康唑组和高剂量组的总抗氧化能力和SOD活性显著升高( $P < 0.05$ ),MDA含量显著降低。在中、低剂量组中各氧化指标比模型组都有好转但均无显著性。

表4 不同处理对小鼠T-AOC、SOD、MDA活性的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 4 Effect of different treatments on the activities of T-AOC, SOD and MDA in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

抗氧化指标 Antioxidant index	正常组 Normal group	模型组 Model group	阳性对照 Positive control	MEs (mg/kg)		
				90	60	30
T-AOC(U/mL)	6.82 ± 0.24	3.36 ± 0.45 *	5.63 ± 0.52 #	4.67 ± 0.23 * #	3.90 ± 0.22 *	3.42 ± 0.21 *
SOD(U/mL)	13.10 ± 0.99	8.07 ± 0.89 *	10.05 ± 0.88 * #	8.96 ± 1.00 * #	8.50 ± 0.80 *	8.18 ± 1.76 *
MDA(μmol/mL)	2.32 ± 0.01	2.35 ± 0.04 *	2.33 ± 0.13 #	2.34 ± 0.04 * #	2.35 ± 0.03 *	2.35 ± 0.01 *

注:与正常组相比,\* $P < 0.05$ ;与模型组相比,# $P < 0.05$ 。

Note: Compared with normal group, \* $P < 0.05$ ; Compared with model group, # $P < 0.05$ .

### 4 讨论

随着目前抗生素的滥用,病原真菌对现有药物的耐药性越来越严重,使真菌感染容易发生,难以控制且存在一定的副作用。如两性霉素B有严重的肾毒性,氮唑类药物存在严重的肾毒性与肝毒性<sup>[13]</sup>。因此,新型高效低毒抗真菌药物的研发受到越来越多的关注。

时,可以使酵母态白色念珠菌体皱缩凹陷,破裂致死,在体内模型中,由于当白色念珠菌感染后,小鼠机体遭受有害刺激,会引发机体内部免疫系统的反应,释放大量免疫炎症因子从而导致炎症反应<sup>[14]</sup>。脾和肝分别是小鼠机体内行使免疫及解毒的重要器官,在肝脏HE染色切片和脾脏HE染色切片观察中发现模型组中小鼠的肝、脾内细胞明显肿胀变形,部分细胞膜破裂,细胞质区分不明显,有大量炎性细

在体外试验中,当使用浓度为0.33 mg/mL MEs



胞浸润,有明显的组织损伤。在 MEs 灌胃组中这些损伤程度明显改善,其中炎症细胞减少显著,且与 MEs 的剂量成正相关。说明 MEs 可以减轻脏器中的炎症,从而恢复组织细胞结构。

同时,在白色念珠菌感染后也会导致小鼠体内抗氧化失衡从而导致组织损伤。抗氧化平衡一方面包括体内产生脂质过氧化的程度也就是自由基产生的水平,另一方面包括机体通过酶促反应和氧化反应。MDA<sup>[15]</sup>含量常常可以反映机体内脂质过氧化的程度,而 SOD<sup>[16]</sup>活性的高低间接反映了机体清除氧自由基的能力,T-AOC<sup>[17]</sup>反映机体酶促及非酶促体系总的抗氧化水平高低,与健康程度存在密切联系。与模型组小鼠相比 90 mg/kg MEs 治疗后可以显著降低体内脂质过氧化的程度,显著提高 SOD 活性从而提高了小鼠体内的 T-AOC 总抗氧化能力,同时在 30 mg/kg 和 60 mg/kg 剂量组中有稍有提高。总抗氧化能力的测定中也表明通过灌胃 MEs 治疗后,可以帮助机体恢复正常的抗氧化水平,这也可能是减轻脏器病变程度的原因之一。

目前利用拮抗菌代谢物治疗白色念珠菌感染已有大量报道,抗菌肽 P3<sup>[18]</sup>是牛血红蛋白源的一种人工合成的抗菌肽,能够导致白色念珠菌出现凹陷,突出和裂纹。盐芽孢杆菌 LAY<sup>[19]</sup>发酵上清液可拮抗白色念珠菌,且进行 PCR 筛查中发现含有可产聚酮类化合物的基因,聚酮类化合物具有高的生物活性。Lei<sup>[6]</sup>等通过研究枯草芽孢杆菌代谢物伊枯草素发现,可以通过消除肾脏和肾脏的真菌负担,减缓小鼠体重变化去逆转白念珠菌感染所带来的器官结构和功能的损害。本研究结果与这些所报道的常见抗菌肽的作用效果相似,且 MEs 的提取方法与脂肽类物质提取比较相似,但在实验室前期对 BS-Z15 的全基因组测序研究中<sup>[20]</sup>发现,BS-Z15 枯草芽孢杆菌不含主流拮抗真菌基因的完整操纵子,如表面活性素、伊枯草素、芬枯草素等,所以我们推测 MEs 中的抑菌活性成分可能是新的脂肽类物质。但具体成分及活性成分在体内是否是直接抑制白色念珠菌的生长还待通过 LC-MS、MS/MS、NMR 及高通测序等技术进一步研究。综上所述,BS-Z15 发酵液中粗提的代谢产物体内抗白色念珠菌作用明显。本研究为从枯草芽孢杆菌的代谢物中寻找新型抗真菌先导化合物提供一定的实验依据。

## 参考文献

1 Xi LY, Li RY. Looking for human pathogenic fungi—the long

- journey for the researchers [J]. *Mycosystema* (菌物学报), 2019, 38: 1211-1212.
- 2 Kriengkauykiat J, Ito JI, Dadwal SS. Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections [J]. *Clin Epidemiol*, 2011, 3: 175-191.
- 3 Förster TM, Mogavero S, Dräger A, et al. Enemies and brothers in arms: *Candida albicans* and gram-positive bacteria [J]. *Cell Microbiol*, 2016, 18: 1709-1715.
- 4 Hashem A, Tabassum B, Abd Allah EF. *Bacillus subtilis*: a plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2019, 6: 1291-1297.
- 5 Yi YJ, Wang K, Zhou GZ, et al. Advance of lipopeptides in *Bacillus* [J]. *Henan Univ Technol Nat Sci* (河南工业大学学报: 自科版), 2018, 3: 19-20.
- 6 Lei SZ, Zhao HB, Pang B, et al. Capability of iturin from *Bacillus subtilis* to inhibit *Candida albicans* *in vitro* and *in vivo* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 11: 4377-4392.
- 7 Wu MJ, Yang QL, Li YH, et al. Role of BS-Z15 metabolites in the control of yellow wilt in cotton and its effect on cotton growth [J]. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2019, 17: 8237-8244.
- 8 Zhao QQ, Wu MJ, Dong YY, et al. Antifungal activity of BS-Z15 metabolites and its safety in mice [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2018, 30: 136-141.
- 9 Zhao JJ. Screening, identification and characterization of the antifungal substance of antagonistic *Bacillus* against *Verticillium dahliae* [D]. Xinjiang: Xinjiang Normal University (新疆师范大学), 2017.
- 10 Fan X, Xiao M, Wang H, et al. Epidemiological cutoff values of antifungal agents for clinical *Cryptococcus neoformans* determined by colorimetric broth microdilution method [J]. *Chin J Nosocomiol* (中华医院感染学杂志), 2016, 26: 2215-2218.
- 11 DA Santos, Hamdan JS. Evaluation of broth micro dilution antifungal susceptibility testing conditions for *Trichophyton rubrum* [J]. *Clin Microbiol*, 2005, 43: 1917-1920.
- 12 Li H, Zhang Y, Gong BY, et al. The establishment of the drug-resistant *Candida albicans* disseminated infected mice model [J]. *Chin J Comp Med* (中国比较医学杂志), 2016, 26: 25-29.
- 13 Guo CH, Wu LM, Qi GR. Advances in the study of azole antifungal drugs [J]. *Pract Prev Med* (实用预防医学), 2011, 6: 1172-1174.
- 14 Tucey TM, Verma J, Harrison PF, et al. Glucose homeostasis is important for immune cell viability during *Candida* challenge and host survival of systemic fungal infection [J]. *Cell Metab*, 2018, 5: 988-1006.

- 15 Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde(MDA) and relatives in biological samples: analytical and biological challenges [J]. *Anal Biochem*, 2017, 524:13-30.
- 16 Hong YA, Lim JH, Kim MY, et al. Extracellular superoxide dismutase attenuates renal oxidative stress through the activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase in diabetic nephropathy [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 17: 1543-1561.
- 17 Zhao K, Wen LB. DMF attenuates cisplatin-induced kidney injury via activating Nrf2 signaling pathway and inhibiting NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 24:8924-8931.
- 18 Zhang W, Hang BL, Si SJ, et al. Analysis of antimicrobial activity and stability of antibacterial peptide JH-3 [J]. *Acta Vet Zootech Sin(畜牧兽医学报)*, 2016, 2:361-366.
- 19 Cao JB, Yu HY, Li X. Identification of *Bacillus* sp. LAY and its antimicrobial activity against *Candida albicans* [J]. *Biotechnol Bull(生物技术通报)*, 2015, 9:163-169.
- 20 Wu MJ. Sequencing and functional annotation of the whole genome of *Bacillus* sp. strain BS-Z15 and optimization of fermentation conditions [D]. Xinjiang: Xinjiang Normal University(新疆师范大学), 2019.

## 《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委(以姓氏笔划为序)

Members

王红兵	戈惠明	尹文兵	尹 胜	吕兆林	刘相国
WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LV Zhaolin	LIU Xiangguo
孙昊鹏	孙桂波	李良成	李国友	邱 莉	汪海波
SUN Haopeng	SUN Guibo	LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li	WANG Haibo
沐万孟	张炳火	陈益华	林昌俊	欧阳杰	易华西
MU Wanmeng	ZHANG Binghuo	CHEN Yihua	LIN Changjun	OU Yangjie	YI Huaxi
罗应刚	周 文	胡友财	袁 涛	夏永刚	高慧敏
LUO Yinggang	ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao	XIA Yonggang	GAO Huimin
唐金山	黄胜雄	韩秀珍	韩淑燕	曾克武	蓝蔚青
TANG Jinshan	HUANG Shengxiong	HAN Xiuzhen	HAN Shuyan	ZENG Kewu	LAN Weiqing
廖晨钟	薛永波				
LIAO Chenzhong	XUE Yongbo				