

DOI:10.13350/j.cjpb.250101

• 论著 •

内酯型槐糖脂对白色念珠菌生长和生物膜形成的影响及机制研究^{*}

江梅¹, 马晓静^{1,2*}, 张慧敏¹, 姜荣悦¹, 周冬³

(1. 合肥工业大学食品与生物工程学院药物科学与工程系, 安徽合肥 230601;

2. 合肥工业大学智能制造技术研究院; 3. 山东大学齐鲁医院儿科)

【摘要】 目的 考察和探讨内酯型槐糖脂(Lactonic sophorolipid, LSL)对白色念珠菌的浮游细胞生长和生物膜形成的影响及机制。 **方法** 以白色念珠菌为受试菌, 采用微量稀释法和平板涂布法测定 LSL 对白色念珠菌的最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MFC); 利用吸光光度法测定 LSL 对白色念珠菌浮游细胞生长的影响并绘制抑菌曲线; 通过结晶紫染色法测定 LSL 对白色念珠菌生物膜形成的影响。采用扫描电镜(SEM)观察 LSL 对菌体超微形态影响; 激光扫描共聚焦显微镜(CLSM)检测处理前后细胞膜通透性变化; 试剂盒检测胞内 ATP 和胞外紫外吸收物质含量变化。 **结果** LSL 对白色念珠菌的 MIC 值为 6.00 mg/mL, MFC 值为 18.00 mg/mL。抑菌曲线显示 LSL 对白色念珠菌浮游细胞的抑制效果显著、快速且长效, 所有处理组在 2 h 内均可达到最大抑菌率。低浓度的 LSL 即可显著抑制白色念珠菌生物膜的形成。LSL 抑制白色念珠菌生长和破坏生物膜形成的效果均与其剂量呈非线性正相关。LSL 处理组细胞的细胞壁完整性和细胞膜通透性发生了明显变化, 细胞出现了严重的破损和死亡现象, 同时胞内 ATP 流失严重, 胞外紫外吸收物质含量显著上升。 **结论** LSL 能够有效抑制白色念珠菌的生长和形成生物膜, 具备被开发为抗菌剂或者佐剂用于治疗白色念珠菌引起的相关疾病的潜力。

【关键词】 白色念珠菌; 内酯型槐糖脂; 抑菌效果; 生物膜; 抑菌机制

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2025)01-0001-07

[Journal of Pathogen Biology. 2025 Jan.; 20(01): 1-7.]

Study on the effects and mechanisms of lactonic sophorolipid on the growth and biofilm formation of *Candida albicans*

JIANG Mei¹, MA Xiaojing^{1,2}, ZHANG Huimin¹, JIANG Rongyue¹, ZHOU Dong³ (1. Department of Pharmaceutical Science and Engineering, School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China; 2. Intelligent Manufacturing Institute of HFUT; 3. Department of Pediatrics, Qilu Hospital of Shandong University) ^{***}

【Abstract】 Objective To investigate and discuss the inhibition effects and mechanisms of lactonic sophorolipid (LSL) on the growth and biofilm formation of *Candida albicans* (*C. albicans*). **Methods** Microdilution method and spread plate method were used to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicide concentration (MFC) values of LSL against *C. albicans*. The effects of LSL on the growth of *C. albicans* plankton cells were measured by absorptiometry method and the antifungal curves were drawn accordingly. Besides, the effect of LSL on the biofilm formation of *C. albicans* was determined by crystal violet staining. The changes of micromorphology and membrane permeability of LSL treated *C. albicans* cells were observed and detected by scanning electron microscope (SEM) and laser scanning confocal microscopy (CLSM), respectively. The contents of intracellular ATP and extracellular UV-absorbing substances were detected by the kits. **Results** The MIC and MFC values of LSL against *C. albicans* were determined at 6.00 mg/mL and 18.00 mg/mL respectively. The inhibition curves showed that the inhibitory effects of LSL on *C. albicans* plankton cells were significant, rapid and long-lasting. All LSL treatment groups could basically reach the maximum inhibitory rate within 2 hours and showed significant inhibition effects on the biofilm formation of *C. albicans*. Finally, the amount of *C. albicans* biofilm formation was reduced by 65.2% to 97.0%. Besides, both the growth inhibiting and biofilm formation destroying of LSL on *C. albicans* was positively correlated with the treatment

* **【基金项目】** 安徽省自然科学基金面上项目(No. JZ2022AKZR0452); 合肥工业大学智能制造技术研究院科技成果培育项目(No. Y2023AC0014); 企业委托项目(H2023TD0032, W2021JSKF0443)。

** **【通讯作者】** 马晓静, E-mail: maxj@hfut.edu.cn

【作者简介】 江梅(1998-), 女, 安徽安庆人, 硕士研究生, 研究方向: 制药工程。E-mail: 3085792175@qq.com

dosages. The SEM and CLSM images revealed an obvious alteration in cell wall integrity and membrane permeability of LSL treated cells, and enhanced cellular damage and cell death when cells were co-cultured with LSL. Meanwhile, a serious loss of the intracellular ATP and a significant increase of the extracellular ultraviolet absorption substances were observed, further suggesting that LSL destroyed the integrity and permeability of the cell wall and membrane of *C. albicans*, resulting in the outflow of ATP, proteins, nucleic acids and other substances in the cells. **Conclusion** LSL can effectively inhibit the growth and biofilm formation of *C. albicans*, and possess the potential to be developed as an antimicrobial agent or adjuvant for the treatment of *C. albicans* related diseases.

【Keywords】 *Candida albicans*; lactonic sophorolipid; antimicrobial property; biofilm formation; antimicrobial mechanism

白色念珠菌(*Candida albicans*), 又称白假丝酵母菌, 是一种机会性致病真菌, 主要存在于人类胃肠道和泌尿生殖道中。该真菌的过度生长与包括鹅口疮、阴道念珠菌病等在内的多种疾病相关, 近年来还发现该菌与炎症性肠病、胃肠道癌等疾病息息相关^[1-2]。流行病学研究发现, 免疫缺陷和免疫功能低下的患者以及携带医疗植入装置的患者更易感染念珠菌^[3-4]。目前, 主要使用抗真菌药物进行白色念珠菌感染的治疗, 但由于延迟诊断和白色念珠菌产生耐药性等原因, 念珠菌病在世界范围内与高死亡率相关联^[5-6]。

生物膜是指附着于有生命或无生命物体表面被微生物胞外大分子包裹的有组织的细胞群体。不同于浮游细胞, 以生物被膜形式存在的细胞对杀菌剂、恶劣环境及宿主免疫防御机制具有更强的抗性^[4,7]。如白色念珠菌生物膜对抗真菌药物的抵御能力是浮游细胞的 10~1000 倍, 极大增加了相关疾病治疗的难度和风险^[8]。因此, 迫切需要开发能够单独使用或与目前抗真菌药物联合使用的新型抗真菌药物, 以有效对抗白色念珠菌浮游细胞和生物膜, 降低白色念珠菌耐药性和应对持续性感染。

近年来, 具有广泛抗菌和抗黏附活性的生物表面活性剂在医疗保健中的研究和使用的越来越被关注^[9-10], 槐糖脂(Sophorolipids, SLs) 是一类主要由球拟假丝酵母(*Starmerella bombicola*) 等发酵产生的糖脂类生物表面活性剂, 其在制药和食品行业的应用已获美国 FDA 批准^[7,11]。天然合成的 SLs 是内酯型(Lactonic Sophorolipid, LSL) 和酸型(Acidic Sophorolipid, ASL) 的混合物, 其中, LSL 具有更优秀的抗菌活性和抗肿瘤特性。SLs 对某些致病性细菌和真菌的抗菌活性已被报道^[12-14], 但 LSL 对白色念珠菌浮游细胞和生物膜形成的抑制作用及抑制机制还有待进一步加强。本研究旨在考察 LSL 对白色念珠菌浮游细胞和生物膜形成的影响, 同时探讨 LSL 介导的白色念珠菌生长抑制和生物膜抑制机制, 以期对白色念珠菌引起的相关疾病的临床治疗提供参考。

材料与方 法

1 材料

1.1 菌株 白色念珠菌(*Candida albicans* ATCC10231), 购于美国典型培养物菌种保藏中心(ATCC), 现保存于实验室。

1.2 主要试剂 内酯型槐糖脂(LSL) 由实验室使用熊峰生假丝酵母(*Starmerella bombicola*) 以葡萄糖和菜籽油为底物发酵后经分离纯化获得, 产品纯度为 95%; 沙氏培养基购自国药集团化学试剂有限公司; 羧基荧光素双乙酸酯(cFDA)、碘化丙啶(PI)、1.0% 结晶紫染料、BC0300 ATP 测定试剂盒购自北京 Solarbio 科技有限公司。

1.3 主要仪器设备 UV759CRT 紫外-可见分光光度计购于上海佑科仪器仪表有限公司; HX-10N-50B 真空冷冻干燥机购于上海沪析实业有限公司; 3K30 冷冻高速离心机购于德国 Sigma 公司; GeminiSEM 450 场发射扫描电子显微镜(SEM) 和 FV1000 激光共聚焦显微镜(CLSM) 均购于德国蔡司公司; 318C 酶标仪购于上海沛欧分析仪器有限公司。

2 方法

2.1 LSL 对白色念珠菌 MIC 和 MFC 的测定 采用微量稀释法测定 LSL 对白色念珠菌的 MIC。使用液体沙氏培养基溶解 LSL 制备不同浓度的 LSL 溶液, 取 100 μ L 培养至对数生长期的白色念珠菌菌液(菌浓已调整为 1×10^6 CFU/mL) 与等体积 LSL 溶液混合使 LSL 终浓度为 0~20 mg/mL, 分别接种 96 孔板后在 37 $^{\circ}$ C 下培养 12 h, 每 2 h 分别置于酶标仪中测定其 A_{600} 值。当某一浓度下的初始菌液与最终菌液的 A_{600} 相差稳定在 5% 以内时, 将该浓度作为 LSL 对白色念珠菌的 MIC^[7]。采用平板涂布法测定 LSL 对白色念珠菌的 MFC, 分别取大于 MIC 浓度的各混合液 100 μ L 涂布固体沙氏培养基, 37 $^{\circ}$ C 下培养 24 h 后观察白色念珠菌的生长情况, 以没有菌落生长的固体平板对应的最低 LSL 浓度为 LSL 对白色念珠菌的 MFC。每组测定实验重复 3 次, 每次测定设置 3 个平行实验。

2.2 LSL 对白色念珠菌生长的影响 以抑菌率(%) 为指标考察 LSL 对白色念珠菌的生长抑制作用。配制含不同浓度 LSL 的液体沙氏培养基, 灭菌后按

2.0%(v/v)的接种量将已活化至对数生长期的白色念珠菌(菌浓已调整为 1×10^6 CFU/mL)接种至不同培养基中恒温振荡培养12 h(37 °C, 200 rpm),每组重复3次并设未添加LSL的阴性对照组以及未接种的空白培养基对照组。每隔2 h分别吸取培养物200 μ L于96孔板中测定 A_{600} ,根据抑菌率计算公式计算抑菌率并绘制时间-抑菌率曲线。抑菌率(%)=[1-(实验组 A_{600} -空白组 A_{600})÷(阴性组 A_{600} -空白组 A_{600})]×100%。

2.3 LSL对白色念珠菌细胞微观结构的影响 采用参考文献[10]的方法,使用SEM观察LSL处理不同时间后白色念珠菌细胞微观结构的变化。处理组取培养好的对数生长期白色念珠菌菌液(菌浓已调整为 1×10^6 CFU/mL),以2.0%(v/v)接种量将其接种到LSL浓度为MIC值的50 mL液体培养基中,对照组取上述白色念珠菌菌液接种于等体积未添加LSL的液体培养基中。分别在培养2、4、8、12 h时各取出3 mL培养物于6 000 r/min(离心半径9.25 cm)离心10 min收集菌泥,PBS溶液洗涤3次后使用2.5%戊二醛在4 °C冰箱中固定12 h,PBS溶液洗涤3次后离心并分别以乙醇梯度脱水(50%,70%,80%,90%,100%),真空条件下干燥,喷金,SEM观察并拍照。

2.4 LSL对白色念珠菌细胞膜通透性和完整性的影响 使用CLSM观察LSL处理前后白色念珠菌细胞膜通透性和完整性的变化。使用荧光探针羧基荧光素双乙酸酯(FDA)和碘化丙啶(PI)标记和区分活细胞与死细胞。分别在培养2、4和12 h时取按2.3步骤制备的处理组和对照组细菌悬液各500 μ L,4 °C下6 000 r/min离心10 min后收集菌体,等体积PBS溶液重悬后加入cFDA使其终浓度为100 μ mol/L,避光反应10 min后加入PI使其终浓度为30 μ mol/L,避光反应10 min后10 000 r/min离心2 min收集菌体,PBS溶液重复洗涤3次,最终将菌体悬浮于500 μ L PBS中。吸取3.0 μ L菌液置于CLSM下观察并拍照。

2.5 LSL对白色念珠菌胞内ATP含量的影响 通过测定胞内ATP浓度的变化,分析LSL对白色念珠菌细胞膜通透性的影响。按2.3步骤制备处理组和对照组细菌悬液,分别在培养不同时间后取样,将上述样品在10 000 r/min下离心1 min后分别收集菌体和上清液置于冰上备用。取菌体按照ATP测定试剂盒说明书处理样品并测定和计算样品胞内ATP含量。每组测定实验重复3次,每次测定设置3个平行。

2.6 LSL对白色念珠菌胞外紫外吸收物质含量的影响 取2.5中制备所得上清液样品,使用酶标仪分别测定其在波长为260 nm下的吸光度值,评估LSL处

理不同时间后白色念珠菌胞外紫外吸收物质(主要为核酸和蛋白质等)浓度的变化。

2.7 LSL对白色念珠菌生物膜形成的影响 采用结晶紫染色法评估LSL对白色念珠菌生物膜形成的抑制作用^[13]。取100 μ L培养至对数生长期的白色念珠菌菌液(菌浓调整为 1×10^6 CFU/mL)与等体积LSL溶液混合,使LSL终浓度为0~20 mg/mL。37 °C下共孵育24 h后将液体轻轻吸出,使用PBS溶液清洗3次以去除浮游细胞,其余贴壁细胞使用99%甲醇固定15 min,之后将甲醇吸出并静置,待甲醇完全挥发后加入100 μ L 0.1%结晶紫染色5 min。染色结束后将染液吸出并使用PBS清洗3次,最后加入100 μ L 95%乙醇溶解细胞中结合的结晶紫。以未经LSL处理菌液为对照组,以波长600 nm处测定的吸光度为生物膜质量的量度,参照生物膜抑制率公式计算LSL对白色念珠菌的生物膜抑制率。每组实验重复3次。生物膜抑制率(%)=[1-(实验组 A_{600} ÷对照组 A_{600})]×100%。

2.8 数据处理与分析 采用GraphPad Prism 8.0软件对数据进行统计和绘图。结果以平均值±标准偏差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 LSL对白色念珠菌MIC和MFC

实验结果显示,当LSL浓度为6.00 mg/mL时,最终菌液与初始菌液的 A_{600} 差值稳定在5%以内;当LSL浓度为18.00 mg/mL时,平板上无菌落生长。因此,LSL对白色念珠菌的MIC为6.00 mg/mL,MFC为18.00 mg/mL。如无特殊说明,后续实验中所使用的LSL处理浓度均为LSL对白色念珠菌的MIC值。

2 LSL对白色念珠菌生长的影响

图1为以12 h为一生长周期绘制所得的LSL对白色念珠菌浮游细胞的时间-抑菌率变化曲线。可以发现,LSL对白色念珠菌浮游细胞的生长抑制效应快速且显著,且抑制效果随LSL浓度的增加而提升。其中,0~2 h内的抑菌率增速最快,2 h后8.00 mg/mL的LSL即可发挥稳定的抑菌效果;当浓度高于8.00 mg/mL时,LSL还表现出明显的杀菌和溶菌作用,此结果与LSL对白色念珠菌的MIC和MFC测定结果一致。

3 LSL对白色念珠菌细胞微观结构的影响

使用SEM考察LSL对白色念珠菌细胞微观结构的影响。最小抑菌浓度的LSL与白色念珠菌相互作用2、4、8、12 h后的菌体微观形态如图2所示。未经

LSL 处理的空白对照菌体表面光滑,形态完整且饱满,细胞壁边缘清晰,界限明显,菌体呈椭球状形态(图 2A);LSL 处理 2 h 后大部分菌体形态完整,少量细胞形态发生改变,表现在菌体出现凹陷、皱缩和塌陷现象,部分内容物外泄(图 2B);LSL 处理 4 h 后菌体皱缩现象更加明显,少量菌体出现破损现象(图 2C);LSL 处理 8 h 后,部分细胞失去完整形态,菌体破损严重呈“爆破”状,且内容物外泄产生的粘性使破损细胞聚集在一起,细胞间界限不再明显(图 2D);LSL 处理 12 h 后,所有细胞均变形且严重破损,菌体因被部分溶解而黏连在一起聚集成团(图 2E)。LSL 处理不同时间后白色念珠菌细胞的微观形态变化表明,LSL 具有很强的群体生长抑制作用,菌体细胞壁和细胞膜的完整性均遭到了不同程度的破坏。

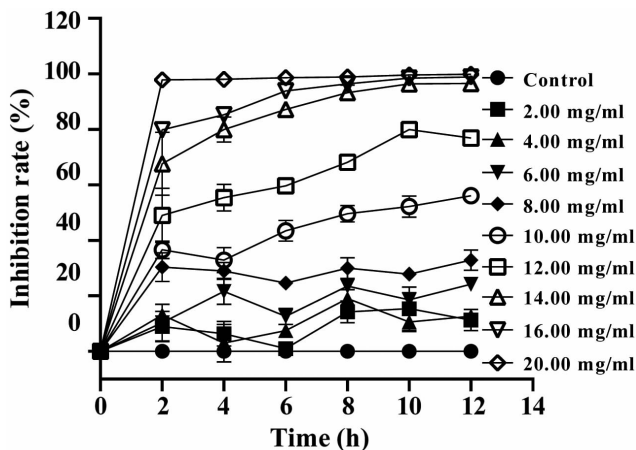


图 1 不同浓度 LSL 对白色念珠菌的生长抑制作用
Fig. 1 Inhibition effects of different concentrations of LSL on the growth of *C. albicans*

4 LSL 对白色念珠菌细胞膜通透性和完整性的影响

使用 CLSM 进一步观察和评估 LSL 对白色念珠菌细胞膜完整性和通透性的影响。细胞膜完整的白色念珠菌细胞染色后呈绿色荧光,细胞膜受损后染色呈红色荧光。图 3 展示了未处理组和 LSL 处理 2、4、12 h 后白色念珠菌细胞膜完整性的变化。可以发现,未处理的细胞呈明亮的绿色荧光,表明真菌细胞膜完整性良好(图 3A),而 LSL 处理后,红绿荧光比率随时间延长呈非线性增加,处理 4 h 后视野中基本均为红色荧光,表明真菌细胞膜的完整性被 LSL 逐步破坏(图 3B-D)。由此可知,LSL 能够通过改变白色念珠菌细胞膜的通透性,破坏细胞膜的完整性,使其无法维持正常的生命活动实现抑菌和杀菌目的。

5 LSL 对白色念珠菌胞内 ATP 含量的影响

通过测定胞内 ATP 含量的变化考察 LSL 对白色念珠菌能量代谢的影响。如图 4 所示,在整个培养过程中,LSL 处理组的 ATP 含量始终显著低于对照组

($P < 0.05$),提示处理组细胞 ATP 的合成一直处于被抑制状态。其中,0~2 h 内两者差距倍数最大,这可能与作用初期部分白色念珠菌细胞壁完整性和细胞膜通透性的改变导致的胞内 ATP 的快速流失有关。随着培养时间的延长,未处理组内 ATP 含量呈持续增加趋势,LSL 处理组内 ATP 含量呈先增大后减小趋势,均与其生长曲线保持一致。可以推断,在处理浓度为 MIC 的 LSL 作用下,虽然白色念珠菌细胞的能量代谢被抑制,细胞供能不足,影响了细胞的生理代谢,导致了部分细胞生长停滞甚至死亡,但仍有大量细胞存活,这一结果与上述显微镜观察结果一致。

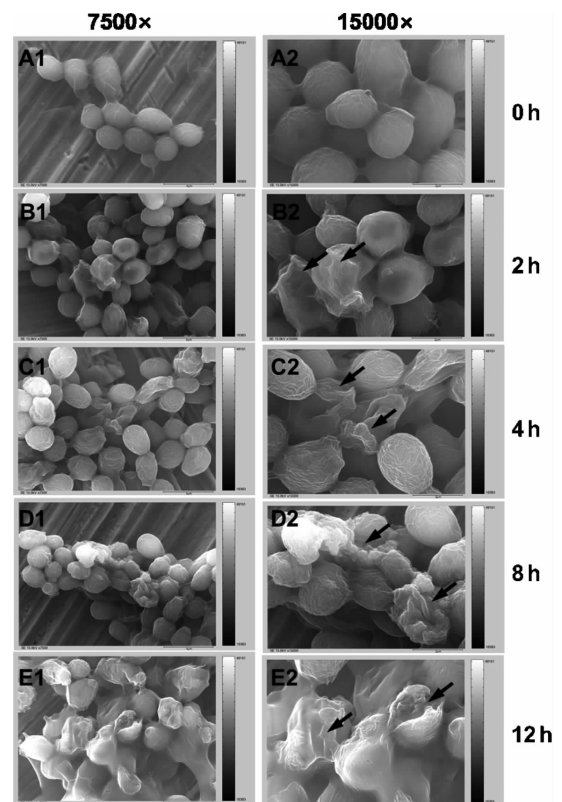
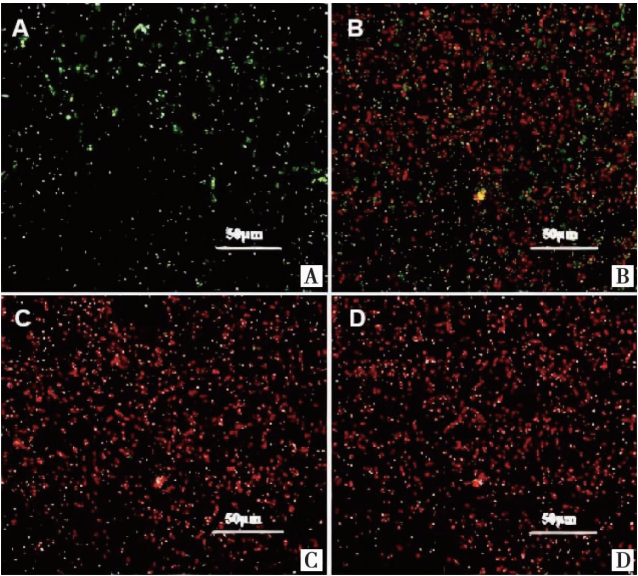


图 2 SEM 观察 LSL 作用后白色念珠菌细胞微观结构的变化
Fig. 2 Observation of the microstructure changes of *C. albicans* cells by SEM after treating with LSL

6 LSL 对白色念珠菌胞外紫外吸收物质浓度的影响

通过测定 LSL 对白色念珠菌胞外核酸和蛋白质等紫外吸收物质含量的影响,进一步确定其对细胞膜的破坏作用。如图 5 所示,在整个培养过程中,LSL 处理组的 OD_{260} 在每个时间点均显著高于未处理对照组($P < 0.05$)。LSL 处理组胞外紫外吸收物质含量随培养时间延长持续增长,与此同时,未处理对照组胞外紫外吸收物质则一直保持较低水平,且两者的差距随时间的延长逐渐扩大。上述结果进一步表明,LSL 破坏了白色念珠菌细胞膜的完整性,导致胞内的蛋白质、核酸等物质外流,而正常培养条件下,细胞膜完整程度高,胞内物质流出比例较低。



A~D 分别为未处理组以及 LSL 处理 2、4 和 12 h 后的白色念珠菌细胞 CLSM 图

图 3 CLSM 观察 LSL 作用不同时间后白色念珠菌细胞荧光信息的变化

A—D Showed CLSM images of *C. albicans* cells without treatment (A) and treated with LSL for 2 h (B), 4 h (C), and 12 h (D)

Fig. 3 Observation of the fluorescence information changes of *C. albicans* cells by CLSM after treating with LSL at different time intervals

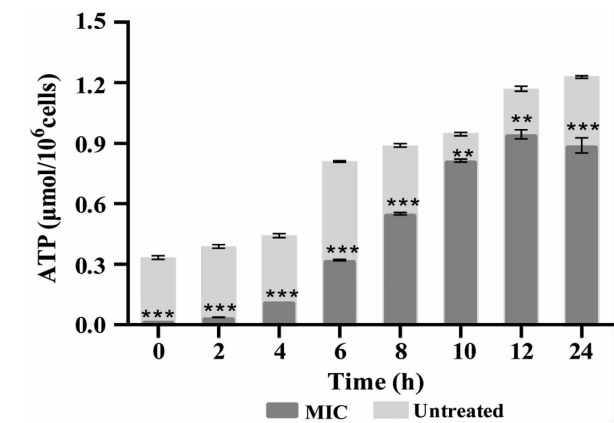


图 4 LSL 处理对白色念珠菌胞内 ATP 含量变化的影响

Fig. 4 Changes in intracellular ATP content of *C. albicans* cells after treating with LSL

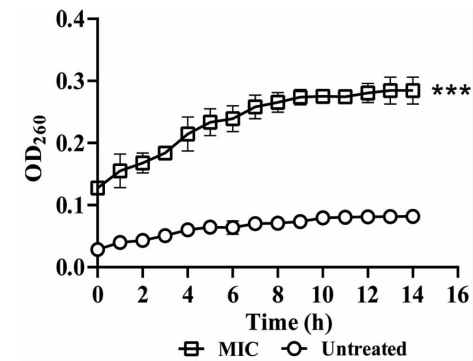


图 5 LSL 处理对白色念珠菌胞外紫外吸收物质含量变化的影响

Fig. 5 Changes in extracellular ultraviolet absorption substances of *C. albicans* after treating with LSL

7 LSL 对白色念珠菌生物膜形成的影响

在微孔板中培养生物膜,使用结晶紫染色法考察 LSL 对白色念珠菌生物膜形成的影响,结果如图 6 所示。与对照组相比,不同浓度 LSL 处理后,最终白色念珠菌生物膜形成量减少了 65.2%~97.0%,说明低浓度的 LSL 即可有效抑制白色念珠菌生物膜的形成 ($P<0.05$)。此外,LSL 对生物膜形成的破坏作用与其剂量呈正相关,LSL 浓度越高,抑制效果越强。在 MIC 浓度的 LSL 作用下,生物膜的形成下降了 86.6%,这可能还与 LSL 导致白色念珠菌细胞受损或不能生存,无法形成生物膜有关。

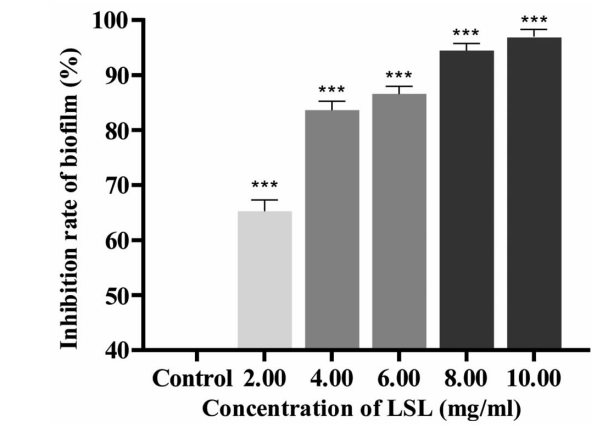


图 6 不同浓度 LSL 对白色念珠菌 形成生物膜的抑制作用

Fig. 6 Inhibition effects of different concentrations of LSL on biofilm formation of *C. albicans*

讨 论

生物表面活性剂一直被认为是可用于环境和生物医学相关领域的,具有潜在应用价值的物质。近年来,生物表面活性剂在医疗保健相关中的应用受到越来越多的关注,大量研究表明,生物表面活性剂具有广泛的抗菌和抗黏附活性,其主要通过防止微生物黏附在固体表面来抑制、控制或破坏生物膜的形成^[15-16]。

SLs 是一类最具应用潜力的生物表面活性剂,已表现出优秀的表面活性剂和广泛的抗菌活性^[17-19]。在抗细菌方面, Kim 等研究发现, 30 μg/mL 的 SLs 可以抑制大肠埃希菌的生长^[20],但 Ma 等^[21] 研究发现, LSL 对金黄色葡萄球菌以及铜绿假单胞菌均有显著的生长抑制效应, MIC 值分别为 0.05 mg/mL 和 4.00 mg/mL,但对大肠埃希菌和乳杆菌的抑制作用较差。 Lydon 等^[22] 报道 20 mg/mL 的 ASL 对粪肠球菌和铜绿假单胞菌具有抗菌作用,但大多数报道认为 ASL 不具备抑菌活性^[13]。在抗细菌生物膜形成方面, Diaz De Rienzo 等^[16] 研究发现, 5% 的 SL 能够破坏枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的单菌培养和混合培养形成的生物膜。 Seena 等^[14] 的研究发现, 基于 ASL 和抗菌肽的制剂可以用作金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌抗菌

剂和抗菌生物膜剂。在抗真菌方面,SLs 被报道能够抑制植物源致病真菌水稻纹枯菌、水稻稻瘟菌和马铃薯晚疫病菌孢子的萌发以及菌丝的生长^[23]。LSL 还被报道具有抑制红色毛癣菌、犬小孢子菌、马拉色菌等皮肤致病性真菌生长和菌丝蔓延的作用^[24]。

机会性致病真菌白色念珠菌是真菌相关院内感染的主要原因之一,其感染范围从浅表到全身^[25-26]。当外界环境或人体免疫系统发生改变时,白色念珠菌可以快速增殖并形成生物膜,侵袭机体细胞、组织,造成黏膜和真皮感染^[27]。临床研究表明,白色念珠菌等微生物可以以生物膜的形式黏附于创口或者医疗器械表面,引起机体的持续性感染^[8]。

目前已有少量有关 SLs 对白色念珠菌浮游细胞的抗真菌活性及生物膜活性的报道。如 Dengle-Pulate 等^[28]研究表明,以月桂醇为底物制备的 SLs 有抗白色念珠菌浮游细胞生长作用,5.00 mg/mL 的 SLs 的抑制率为 30%;细胞微观形态观察发现未处理组细胞膜和细胞内含物完整,处理组出现细胞质体积增加等现象。Haque 等^[7]的研究发现,浓度为 0.48 mg/mL 的 LSL 即可抑制 80% 的白色念珠菌生物膜的形成,并降低预制生物膜的活力;且 LSL 与两性霉素 B 或氟康唑的联用对破坏生物膜的形成和预形成的生物膜有协同作用。

虽然上述文献以及前期实验室研究已确定了 SLs 的抗菌活性及抗生物膜作用,但同时也发现,SLs 的结构和来源,被处理菌株的细胞形态、SLs 的浓度及作用时间等的不同均会影响 SLs 的抑菌效果,给 SLs 的临床应用带来困扰。基于此,本研究以白色念珠菌浮游细胞和生物膜为研究对象,从浓度和作用时间两个维度,系统评价和探讨 LSL 对其生长和生物膜形成的抑制作用和抑制机制,评估 LSL 在抗菌药物开发中的潜在用途,为临床治疗白色念珠菌引起的相关疾病提供参考。

在本研究中,LSL 对白色念珠菌的 MIC 和 MFC 分别为 6.00 mg/mL 和 18.00 mg/mL,提示 LSL 对白色念珠菌的抑制效果优于已报道的以月桂醇为底物制备所得 SLs 的抗白色念珠菌活性^[28]。LSL 对白色念珠菌的时间-抑菌曲线显示,LSL 对白色念珠菌的动态抑制效果显著且快速,所有处理组在 2 h 内基本均可达到最大抑菌率,且抑制作用具有长效性。生物膜形成抑制实验结果显示,LSL 可以显著抑制白色念珠菌生物膜的形成,生物膜抑制率与其剂量呈非线性正相关;2.00 mg/mL 的 LSL 即可抑制 65.2% 的白色念珠菌生物膜的形成,当 LSL 浓度为 MIC 时,生物膜形成量下降了 86.6%,这一结果与上述 Haque 等^[7]所报道的 0.48 mg/mL 的 LSL 即可抑制 80% 的白色念珠

菌生物膜的形成差异较大。

目前常用抗真菌药物的抑菌作用主要与其对真菌细胞壁、细胞膜、胞内外酶活性和能量代谢的影响等有关^[7,29]。本实验通过 SEM 观察菌体超微形态,CLSM 检测处理前后细胞膜通透性变化,测定胞内 ATP 和胞外紫外吸收物质含量变化发现:(1)LSL 处理后的白色念珠菌细胞表面形态和内部结构均发生改变,菌体细胞壁表面出现凹陷、皱缩和塌陷现象,部分菌体细胞壁及细胞膜被连续性破坏并出现“爆破”现象;(2)LSL 处理后的 CLSM 视野基本均为红色荧光,提示白色念珠菌细胞膜的通透性发生改变,完整性被破坏,细胞逐步死亡;(3)LSL 处理后的白色念珠菌胞内 ATP 含量显著降低,胞外紫外吸收物质含量显著升高,提示菌体内小分子及紫外吸收大分子物质发生泄漏。由此推测,LSL 可能通过以下机制发挥抑菌作用(图 7):(1)双亲性分子 LSL 具备的大环内酯结构通过改变白色念珠菌菌体细胞膜的通透性,使更多的 LSL 穿过细胞壁和细胞膜进入到细胞内,之后与细胞内参与合成细胞壁的物质发生特异性结合,进而影响菌体细胞壁的合成^[23-24];(2)LSL 进入细胞壁后,通过与细胞膜的磷脂层相互作用形成孔洞进一步破坏细胞膜的结构完整性^[30];(3)细胞膜通透性和完整性发生改变,使细胞内物质如小分子物质、离子、ATP、核酸、蛋白质等发生外泄,影响菌体细胞正常新陈代谢系统^[29];(4)细胞壁、细胞膜等细胞器的破坏干扰了细胞内蛋白质及遗传物质的合成与表达,使细胞不能合成正常的蛋白质,从而引起细胞物质、能量和信息的传递中断,最终导致细胞死亡^[14]。

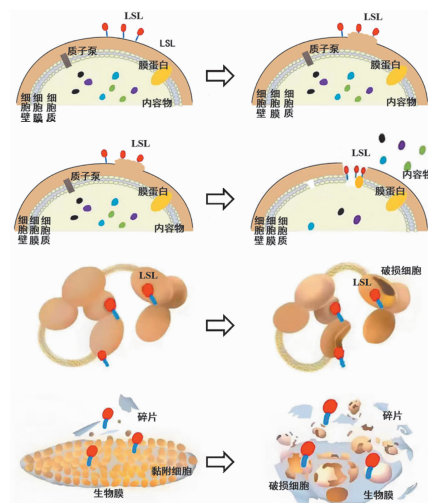


图 7 LSL 对白色念珠菌生长及生物膜形成的抑制机制代表性示意图
Fig. 7 Representative schematic diagram to show the inhibition mechanisms of LSL on the growth and biofilm formation of *C. albicans*

研究已确定白色念珠菌在形成生物膜后对抗真菌药物的耐受性会大幅提高,生物膜抗药能力的增强与

影响细胞初始黏附过程、形成微菌落、细胞外基质阻止药物渗透等多种因素有关^[7-8]。本研究结果表明,低于MIC的亚抑制浓度的LSL即可以有效阻止初始细胞在非生物表面上的附着,进而减少白色念珠菌形成生物膜的数量。此外,LSL诱导的白色念珠菌细胞受损或死亡也使白色念珠菌无法形成成熟的生物膜。因此,抑制初始细胞的黏附和诱导细胞受损并脱离可能是对抗生物膜相关感染的有效策略。

综上所述,LSL能够有效抑制白色念珠菌浮游细胞的生长和生物膜的形成,这种作用主要通过影响细胞壁的合成,提高细胞膜的通透性,破坏细胞膜的完整性,引起胞内ATP、核酸、蛋白质等物质外泄,以及有效阻止初始细胞的黏附和诱导生物膜的分散和脱离实现。上述研究结果可为开发基于LSL的抗真菌制剂或佐剂,用于治疗由白色念珠菌引起的真菌感染提供一定的参考和借鉴。然而,LSL作用后白色念珠菌细胞在分子层面上发生的结构和功能变化,以及细胞的信号传导及遗传信息表达是否受到干扰等相关的研究尚不明确,仍需进一步探究和验证。

【参考文献】

- [1] Kashem SW, Kaplan DH. Skin Immunity to *Candida albicans* [J]. Trends Immunol, 2016, 37(7): 440-450.
- [2] 梁嘉伟, 白丽. 白色念珠菌生物被膜及其相关治疗方法研究进展 [J]. 生物化工, 2021, 7(3): 157-159, 163.
- [3] 郝小康, 王宇鹤. 药物联合对耐药白色念珠菌作用的研究进展 [J]. 医学理论与实践, 2021, 34(24): 4256-4258.
- [4] Sardi JCO, Scorroni L, Bernardi T, et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options [J]. J Med Microbiol, 2013, 62: 10-24.
- [5] 王东月, 李运清. 白色念珠菌菌丝的形成机制及防治 [J]. 济宁医学院学报, 2020, 43(5): 356-361.
- [6] Andes DR, Safdar N, Baddley JW, et al. Impact of treatment strategy on outcomes in patients with *Candidemia* and other forms of invasive *Candidiasis*: a patient-level quantitative review of randomized trials [J]. Clin Infect Dis, 2012, 54: 1110-1122.
- [7] Haque F, Alfatah M, Ganesan K, et al. Inhibitory effect of sophorolipid on *Candida albicans* biofilm formation and hyphal growth [J]. Sci Rep, 2016, 6: 23575.
- [8] 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(8): 1206-1218.
- [9] Miceli RT, Corr DT, Barroso M, et al. Sophorolipids: Anti-cancer activities and mechanisms [J]. Bioorg Med Chem, 2022, 65: 116787.
- [10] Oliveira MRD, Magri A, Baldo C, et al. Review: Sophorolipids: A promising biosurfactant and its applications [J]. Chem Biol, 2015, 6(2): 161-174.
- [11] Joshi-Navare K, Prabhune A. A biosurfactant-sophorolipid acts in synergy with antibiotics to enhance their efficiency [J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 512495.
- [12] Haque F, Sajid M, Cameotra SS, et al. Anti-biofilm activity of a sophorolipid-amphotericin B niosomal formulation against *Candida albicans* [J]. Biofouling, 2017, 33(9): 768-779.
- [13] 鲍佳佳, 李倩, 孙铭艳, 等. ϵ -聚赖氨酸对铜绿假单胞菌生长及生物膜形成的影响 [J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(3): 258-260, 265.
- [14] Seena S, Ferro R, Pala M, et al. Acidic sophorolipid and antimicrobial peptide based formulation as antimicrobial and antibiofilm agents [J]. Biotechnol Adv, 2023, 146: 213299.
- [15] 花璇, 王涛, 毕言伟, 等. 家蝇抗真菌衍生物 Mt6-21DLeu 抗白色念珠菌活性及其机制研究 [J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(7): 761-767.
- [16] Diaz De Rienzo MA, Banat IM, Dolman B, et al. Sophorolipid biosurfactants: possible uses as antibacterial and antibiofilm agent [J]. N Biotechnol, 2015, 32(6): 720-726.
- [17] Qazi MA, Wang Q, Dai Z. Sophorolipids bioproduction in the yeast *Starmerella bombicola*: Current trends and perspectives [J]. Bioresour Technol, 2022, 346: 126593.
- [18] Adetunji AI, Olaniran AO. Production and potential biotechnological applications of microbial surfactants: an overview [J]. Saudi J Biol Sci, 2021, 28(1): 669-679.
- [19] Seena S, Ferro R, Pala M, et al. Acidic sophorolipid and antimicrobial peptide based formulation as antimicrobial and antibiofilm agents [J]. Biotechnol Adv, 2023, 146: 213299.
- [20] Kim K, Yoo D, Kim, YB, et al. Characteristics of sophorolipid as an antimicrobial agent [J]. J Microbiol Biotechnol, 2002, 12: 235-241.
- [21] Ma XJ, Wang T, Zhang HM, et al. Comparison of inhibitory effects and mechanisms of lactonic sophorolipid on different pathogenic bacteria [J]. Front Microbiol, 2022, 13: 929932.
- [22] Lydon HL, Baccile N, Callaghan B, et al. Adjuvant antibiotic activity of acidic sophorolipids with potential for facilitating wound healing [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61(5): e02547-16.
- [23] 伏圣秘. 槐糖脂对作物病原真菌的抗菌作用及其新型生物杀菌剂的开发 [D]. 齐鲁工业大学, 2014.
- [24] Pal S, Chatterjee N, Das AK, et al. Sophorolipids: A comprehensive review on properties and applications [J]. ACIS, 2023, 313: 102856.
- [25] 毛沛沛, 乔莎, 贺莹. 多发性骨髓瘤并发侵袭性真菌感染的临床特征及疗效分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(11): 1345-1348, 1355.
- [26] 喻龙凤, 唐梅, 郎冰凝. 妊娠期高血压患者剖宫产后尿路感染病原菌分布及影响因素分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2023, 18(6): 717-720.
- [27] Bommanavar SB, Gugwad S, Malik N. Phenotypic switch: The enigmatic white-gray-opaque transition system of *Candida albicans* [J]. J Oral Maxillofac Pathol, 2017, 21(1): 82-86.
- [28] Dengle-Pulate V, Chandorkar P, Bhagwat S, et al. Antimicrobial and SEM studies of sophorolipids synthesized using lauryl alcohol [J]. J Surfactants Deterg, 2014, 17(3): 543-552.
- [29] Haque F, Verma NK, Alfatah M, et al. Sophorolipid exhibits antifungal activity by ROS mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction pathways in *Candida albicans* [J]. RSC Adv, 2019, 9(71): 41639-41648.
- [30] Sen S, Borah SN, Kandimalla R, et al. Sophorolipid biosurfactant can control cutaneous dermatophytosis caused by *Trichophyton mentagrophytes* [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 329.

【收稿日期】 2024-07-15 【修回日期】 2024-10-21