

白藜芦醇对须癣毛癣菌 体外抑制作用和超微结构初步研究*

张 瑞, 秦永亮, 李 姣, 郭玉楷, 张曼娜, 李永军 (河北医科大学第二医院, 石家庄 050000)

摘要:目的 体外研究 2017 年 9 月~2018 年 3 月收集的 15 株须癣毛癣菌(*Trichophyton mentagrophytes*, *T. mentagrophytes*)对白藜芦醇(resveratrol, Res)的药物敏感性及其超微结构的影响,推测白藜芦醇可能的抑菌机理。方法 参考美国临床和实验室标准化研究所(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) M38-A2 方案,采用微量液基稀释法测定对照组及实验组不同浓度白藜芦醇体外抗须癣毛癣菌的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC),及透射电镜下菌体超微结构的变化。结果 白藜芦醇对须癣毛癣菌的 MIC₅₀和 MIC₉₀分别为 0.064 mg/ml, 0.128 mg/ml;实验组的菌体结构在透射电镜下较正常对照组变化明显:细胞壁剥离、缺如,质壁分离现象严重,且明显肿胀、变形,细胞膜严重皱缩,核膜暴露并膨大,断裂、溶解消失,细胞器完全消失,呈空泡化改变。结论 白藜芦醇对须癣毛癣菌有明显的抑制作用,有治疗皮肤癣菌病的应用潜力。

关键词:白藜芦醇;须癣毛癣菌;抑制作用;超微结构

中图分类号:R969;R379.2 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)05-053-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.05.015

Susceptibility Testing and Mechanism Research of Resveratrol against *Trichophyton Mentagrophytes*

ZHANG Rui, QIN Yong-liang, LI Jiao, GUO Yu-kai, ZHANG Man-na, LI Yong-jun

(the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: Objective To evaluate the susceptibility of Resveratrol(Res) on *Trichophyton mentagrophytes* and influence on the ultrastructure, then speculate the antifungal mechanism. **Methods** Minimum inhibitory concentration(MIC) were determined by Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI) M38-A2 scheme. The ultrastructure was studied by transmission electron microscope (TEM). **Results** The MIC₅₀ and MIC₉₀ were 0.064 and 0.128 mg/ml respectively. Observation under TEM showed obvious morphological changes: there were a few showing gathering state and membranes because of Res on photograph of experimental group and clearly be seen that the fungus had sinking or scarred or distorted body. **Conclusion** Resveratrol was found to possess intense activity on *Trichophyton mentagrophytes*, which makes Res having a potent of substituting antidermatophytic drugs.

Keywords: resveratrol; *Trichophyton mentagrophytes*; susceptibility testing; mechanism research

白藜芦醇(resveratrol, Res)是一些种子植物在遇到紫外线照射、真菌感染等不利条件时产生的多酚类物质,亦称植物防御素,对植物本身起保护作用。随着对白藜芦醇的研究深入,多方面的研究结果已证实其有多种生理活性,其中重要的如抗肿瘤、保护心血管、防止机体老化等,主要作用机制为抗氧化应激和抗炎反应^[1]。近年来,国内外有关白藜芦醇抗微生物抑制作用的研究日益增多,对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、黏质沙雷菌、奈瑟氏菌属、铜绿假单胞菌及白念珠菌等效果良好^[2~5],而对皮肤癣菌鲜有报道,本文则通过白藜芦醇对皮肤癣菌-须癣毛癣菌体外抗菌作用的研究,为拓宽白藜芦醇的实际应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2017年9月~2018年3月河北

医科大学第二医院门诊及住院患者的头发、指甲、皮屑以及一些罕见的深部蜂窝状毛囊炎、Majocchi肉芽肿^[6]等浅部皮肤感染的临床标本中分离的须癣毛癣菌 15 株,所有菌株经氢氧化钾(10 g/dl)涂片镜检阳性株接种于马铃薯葡萄糖琼脂培养基后,置于 28℃ 恒温箱培养 10~14 天,经形态学鉴定符合须癣毛癣菌的判定标准^[7]。

1.2 试剂和仪器

1.2.1 质控菌株:近平滑念珠菌 ATCC22019 北京协和医院惠赠。

1.2.2 药物:Res 购自 sigma 公司,将 Res 用二甲基亚砜(100%)溶解制成浓度为 100 mg/ml 的储存液,且二甲基亚砜浓度不超过 1%。用 RPMI-1640 将 Res 配制工作浓度范围为 2.048, 1.024, 0.512, 0.256, 0.128, 0.064, 0.032, 0.016, 0.008

* 作者简介:张 瑞(1984-),女,硕士,主管检验师,主要从事临床检验的研究, E-mail:lyjydeyjyk@163.com。

mg/ml。

1.2.3 仪器:透射电镜(Hiachi 公司),培养箱(中大仪器厂),生物安全柜(江苏净化设备厂)。

1.3 方法

1.3.1 真菌菌悬液的制备:取1 ml的无菌0.85%生理盐水覆于马铃薯葡萄糖琼脂培养基上的须癣毛癣菌落,轻轻用移液器尖端摩擦菌落制成菌悬液,用血细胞计数板计数调整至浓度为 $(1 \times 10^4) \sim (3 \times 10^5)$ CFU/ml后,再用RPMI-1640将其稀释10倍备用。

1.3.2 MIC的判定:参考美国临床和实验室标准化研究所(clinical and laboratory standards institute, CLSI)《产孢丝状真菌的液基稀释法抗真菌药物敏感性试验方案》M38-A2方案^[8]进行,用无菌96(12×8)孔板进行实验,取100 μ l RPMI-1640加入第1列孔作为空白对照;第2~11列孔各加新鲜配制好的菌悬液100 μ l及各浓度药物100 μ l,使得Res各孔的终浓度分别为2.048, 1.024, 0.512, 0.256, 0.128, 0.064, 0.032, 0.016和0.008 mg/ml,配制过程中每一浓度梯度完成后应更换枪头;第12列孔只加200 μ l菌液作为阳性生长对照。且同时制备质控菌株药敏板,于28℃培养箱内温育7天。其最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)参考值:质控菌株为近平滑念珠菌,药物为酮康唑,只有当酮康唑MIC界于0.062 5~0.5 μ g/ml时,可认为试验操作准确可靠。若同时试验菌株生长良好,则认为试验成功,结果接受。采用肉眼判读与酶标分析仪相结合的方式

进行判读:2人在自然光线下进行,与对照孔相比 $\geq 80\%$ 为生长抑制的最低药物浓度(生长显著减少80%),酮康唑 $\geq 100\%$ 生长抑制的最低药物浓度(未见菌生长);酶标仪于630 nm测各孔吸光度(A)值,阳性对照孔的A值在0.2左右,与阳性对照孔比较,以A值下降80%以上的最小浓度孔中的药物浓度为MIC值,酮康唑以A值下降100%的最小浓度孔中的药物浓度为MIC值。肉眼和酶标仪测定相结合,以避免结果误差。上述实验均平行操作2~3次,当MIC值能准确重复或只差一个浓度时被接受,并以最低浓度作为MIC值;当MIC值相差两个浓度以上时,则需重新试验,直到符合要求为止^[18]。

1.3.3 透射电镜标本制备:透射电镜观察Res对须癣毛癣菌超微结构的影响:取在PDA新鲜纯培养的直径约1 mm菌落作为正常对照组。采用含药培养基接种法,含药培养基的最终浓度分别为0.064, 0.128 mg/ml,再接种PDA 27℃培养箱中孵育7~14天,取直径约1 mm的菌落作为实验组。将正常对照组与实验组的菌落分别用戊二醛(2.5%)固定,PBS漂洗,四氧化锇(1%)再固定,系列浓度的丙酮脱水,Epon812,包埋、超薄切片,醋酸铀及枸橼酸铅双重染色,透射电镜观察^[18]。

2 结果

2.1 MIC Res对须癣毛癣菌的MIC₅₀和MIC₉₀分别为0.064, 0.128 mg/ml,其对实验菌株具有良好的抑制作用,累积抑菌率见表1。

表1

Res对T. mentagrophytes的浓度累积抑菌率

浓度(mg/ml)	0.008	0.016	0.032	0.064	0.128	0.256	0.512	1.024	2.048
抑制菌株数	0	0	1	10	13	15	15	15	15
累积抑菌率(%)	0	0	6	67	87	100	100	100	100

2.2 透射电镜结果 见图1。

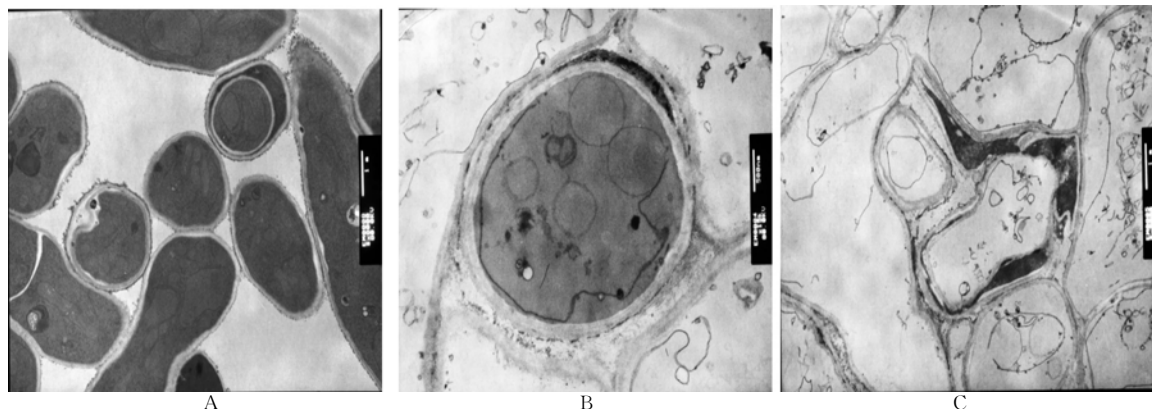


图1 Res对T. mentagrophytes超微结构的影响

正常组(图1A)须癣毛癣菌细胞壁厚薄均匀、边缘完整、排列紧密,清晰可见细胞核、核仁、线粒体等完整、层次清楚的细胞器,细胞基质含量密实、丰富;0.064 mg/ml Res作用后(图1B)的须癣毛癣菌细胞体积明显变小,部分细胞壁疏松、层次不清,细胞器结构模糊,细胞核内有致密颗粒出现,胞浆内有空泡,细胞基质浅染,有明显高电子致密颗粒聚集,大部分消失可见较多的泡状结构,有脂粒出现;经0.128 mg/ml Res作用后(图1C),细胞壁剥离、缺如,质壁分离现象严重,且明显肿胀、变形,细胞膜严重皱缩,核膜暴露并膨大,断裂、溶解消失,细胞器完全消失,呈空泡化改变。

3 讨论

3.1 Res抗须癣毛癣菌机制推测 本实验应用美国临床和实验室标准化研究所(clinical and laboratory standards institute, CLSI) M38-A2方案的微量液基稀释法测定Res对须癣毛癣菌的MIC,再次验证了M38-A2方案之于皮肤癣菌药敏试验的可行性和可重复性^[9]。透射电镜下实验组的须癣毛癣菌细胞较对照组具有明显的形态学变化,进一步证实了Res对须癣毛癣菌有明显的抑制作用,为今后对其抑菌机理的深入研究提供了形态学依据。Res能有效抑制须癣毛癣菌的增殖,可能是通过氧分子的提取对线粒体膜及核膜蛋白产生干扰作用,出现细胞器的破坏及细胞膜的溶解;抑或是通过干扰细胞壁合成,药物入细胞后,增强抗氧化酶活性,破坏自由基,导致细胞内基质的pH值和渗透压等发生改变,造成细胞器损坏^[10,11]。

3.2 Res抗须癣毛癣菌的研究意义 皮肤癣菌是一类特殊的真菌,包括毛癣菌属、表皮癣菌属和小孢霉属等,可引起人类和其他脊椎动物的皮肤感染,这些感染不会危及生命,但会给感染者带来身体不适。据统计,在免疫功能低下的患者中,如艾滋病、糖尿病、癌症和器官移植患者等,其皮肤癣菌病的感染几率逐年递增;同时可继发全身性感染,与导致全身性皮肤感染的继发性细菌感染密切相关^[12,13]。临床中应用多种抗真菌药物治疗皮肤癣菌的感染,从最初的灰黄霉素到克霉唑、萘替芬、环吡酮胺、伊曲康唑、氟康唑、酮康唑和特比萘芬等,均有良好的药效。本实验中的须癣毛癣菌又称石膏样毛癣菌,是头癣、体癣、股癣、手足癣和甲癣的病原菌之一,是临床上除红色毛癣菌外最常见的皮肤癣菌。但近年来的报道均显示其耐药性有逐年上升和副作用大等问题^[14]。因此通过寻找和发现新药物以抑制皮肤癣菌的活性,成为亟待解决的问题。

Res作为一种植物提纯成分,既有传统中药的

疗效,又可避免产生耐药性和毒副作用。本实验中通过测定MIC及观察微观结构的改变,证实了Res对须癣毛癣菌有明显的抑制作用,为临床治疗皮肤癣菌病提供新的思路,具有潜在的应用价值。

3.3 国内外相关研究的比较 国内有研究报道,瑞香狼毒对须癣毛癣菌的MIC为0.312 5 mg/ml, MFC为0.625 mg/ml^[15]。凤仙花水提液对须癣毛癣菌具有明显的抑制作用^[16];甾体皂苷的MIC₈₀为1.148 7 μg/ml, MFC为32 μg/ml^[17]。王鑫等^[18]进一步证实Res对红色毛癣菌、羊毛状小孢子菌和絮状表皮癣菌等浅部真菌具有明显的抑制作用。而Res对须癣毛癣菌增殖是否有明显的抑制作用,国内外尚未见报道。本实验首次通过观察Res对随机分离的15株临床分离须癣毛癣菌的作用,证实其具有较好的抑菌效果,填补了Res抗须癣毛癣菌作用研究领域的空白,为今后探讨其机制提供新的可靠数据,同时也为Res早日应用于临床治疗提供了新的理论基础。

3.4 本研究的局限性 本实验中选取15株临床分离株测定其敏感度,结果尚有代表性,但还需大样本的临床株研究以及动物体内试验进一步证实,其次Res抗须癣毛癣菌作用的研究除形态学外,其分子水平的抑菌机制还需深入探究。本课题组下一步将选择大样本的皮肤癣菌继续观察Res的体内、外抑制作用,通过对药物作用后的菌体进行基因检测等,从分子水平上探讨其抑菌机理。王鑫等^[18]已证实Res对红色毛癣菌、羊毛状小孢子菌和絮状表皮癣菌等浅部真菌具有明显的抑制作用,为进一步研究Res抑菌机制及浅部真菌感染动物模型试验提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 李颖,向瑶,邓惠萍,等.白藜芦醇对花萼海绵诱癌素所致小鼠空间记忆障碍的预防作用[J].中国病理生理杂志,2017,33(5):951-955.
Li Y, Xiang Y, Deng HP, et al. Prevention of resveratrol on spatial memory loss of mice induced by calyculin A[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2017, 33(5):951-955.
- [2] 王鑫,张瑞,李雅静,等.白藜芦醇对金黄色葡萄球菌标准株抑菌作用及超微结构的影响[J].现代检验医学杂志,2016,31(3):55-58.
Wang X, Zhang R, Li YJ, et al. Antibacterial and ultrastructure effect of RES on *Staphylococcus aureus* standard strains ATCC 25823[J]. J Mod Lab Med, 2016, 31(3):55-58.
- [3] Kolouchová L, Matátková O, Paldrychová M, et al. Resveratrol, pterostilbene and baicalein: plant-derived anti-biofilm agents[J]. Folia Microbiologica, 2018, 63(3):261-272.
- [4] Lee J, Lee DG. Novel antifungal mechanism of

(下转60页)

- resveratrol;apoptosis inducer in candida albicans[J]. Curr Microbiol,2015,70(3):383-389.
- [5] Docherty JJ, Fu MM, Tsai M. Resveratrol selectively inhibits *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2001,47(2):243-244.
- [6] 王敬茶,魏晓丽,吕新翔,等.石膏样毛癣菌致皮肤癣菌肉芽肿一例[J].中国麻风皮肤病杂志,2016,32(7):423-424.
- Wang JC, Wei XL, Lü XX, et al. Trichophytic granuloma caused by trichophyton mentagrophytes: a case report[J]. Chin J Lepr Skin Dis, 2016, 32(7): 423-424.
- [7] 陈柏毅,孙毅,胡小平,等.须癣毛癣菌的形态学及分子生物学鉴定[J].中国真菌学杂志,2010,5(6):321-326.
- Chen BR, Sun Y, Hu XP, et al. Morphology and molecular biological identification of *Trichophyton mentagrophytes*[J]. Chin J Mycol, 2010, 5(6): 321-326.
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard. 2nd Ed[S]. Wayne: PA CLSI M38-A2, 2008.
- [9] Gupta P, Khare V, Kumar D, et al. Comparative evaluation of disc diffusion and E-test with broth microdilution in susceptibility testing of amphotericin B, voriconazole and caspofungin against clinical *Aspergillus* isolates[J]. J Clin Diagn Res, 2015, 9(1): DC04-DC07.
- [10] Wang H, Lei Y, Yan L, et al. Deep sequencing analysis of transcriptomes in *Aspergillus flavus* in response to resveratrol[J]. BMC Microbiology, 2015, 15(1): 182.
- [11] Adrian M, Jeandet P, Veneau J, et al. Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound, from grapevines, against botrytis cinerea, the causal agent for gray mold[J]. J Chem Ecol, 1997, 23(7): 1689-1702.
- [12] Bhatia VK, Sharma PC. Epidemiological studies on dermatophytosis in human patient in Himachal Pradesh India[J]. Springerplus, 2014, 3(1): 134.
- [13] Gong JQ, Liu XQ, Xu HB, et al. Deep dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum*: Report of two cases[J]. Mycoses, 2007, 50(2): 102-108.
- [14] Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infection[J]. Int J Microbiol, 2012, 2012(3): 713687.
- [15] 欧阳秋,黄晓,陶科,等.瑞香狼毒对石膏样毛癣菌的抑制作用及对超微结构的影响[J].华西药理学杂志,2008,23(1):010-012.
- Ouyang Q, Huang X, Tao K, et al. Fungistasis activity of *Stellera chamaejasme* L. and influence on the ultrastructure of *Trichophyton mentagrophytes*[J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008, 23(1): 010-012.
- [16] 董晨虹,段秀俊,阴孟凡,等.凤仙花不同部位水提液抑真菌效果的实验研究[J].山西中医学院学报, 2017, 18(5): 19-21.
- Dong CH, Duan XJ, Yin MF, et al. Experimental study on antifungal effect of different parts of impatiens[J]. Journal of Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, 2017, 18(5): 19-21.
- [17] 谭翠雯,吴碧娟,孙婧雯,等.改良 CLSI M38-A2 应用于皮肤癣菌对甾体皂苷敏感性的测定[J].中成药, 2017, 39(4): 828-830.
- Tang CW, Wu BJ, Sun JW, et al. Modified CLSI M38-A2 was used to determine the sensitivity of tinea to saponin[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2017, 39(4): 828-830.
- [18] 王鑫,张瑞,李雅静,等.白藜芦醇对红色毛癣菌和烟曲霉菌抑菌作用比较[J].现代检验医学杂志, 2014, 29(2): 92-93, 96.
- Wang X, Zhang R, Li YJ, et al. Antibacterial effect comparison of resveratrol against *Trichophyton rubrum* and *Aspergillus fumigatus*[J]. J Mod Lab Med, 2014, 29(2): 92-93, 96.

收稿日期:2018-06-21

修回日期:2018-07-24