

多酚类化合物对白色念珠菌超微结构的影响

孙淑娟^{1,2}, 娄红祥^{1*}, 李宏建², 苏乐群², 马 斌¹, 葛蔚颖¹, 凌 霄¹

(¹ 山东大学药学院, 济南 250012; ² 山东省千佛山医院, 济南 250014)

【摘要】 目的: 电镜观察白色念珠菌与多酚类化合物作用后形态和超微结构的改变, 进一步评价该类化合物的抗真菌作用, 探讨其抗真菌作用机制。方法: 将临床新分离的白色念珠菌与多酚类化合物共同培养 24 h 后, 分离菌体, 按常规方法进行样品处理, 在扫描电镜与透射电镜下观察其细胞表面形态结构变化与细胞内超微结构变化。结果: 扫描电镜下观察可见酚类化合物作用后的白色念珠菌, 细胞表面皱缩不平, 细胞壁膜有严重皱折、变薄、剥脱等现象, 并且质地变脆, 有裂纹形成。透射电镜下可见, 细胞壁不完整, 局部有缺损, 质地疏松, 厚薄不均; 细胞膜轮廓不清, 不连续, 有凸起; 胞质不均匀, 细胞内成分聚集成团成电子密度较高的团块, 且形成大量电子密度高的光亮区, 间或有电子光点和空胞状物。结论: 酚类化合物与白色念珠菌作用后, 可使其超微结构发生明显的改变, 此改变表明了其抗真菌作用, 并为其抗真菌作用机制的研究提供了线索。

【关键词】 酚类化合物; 白色念珠菌; 扫描电镜; 透射电镜

【中图分类号】 R965 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2005)01-0052-04

白色念珠菌(*Candida albicans*)又称白假丝酵母, 是常见的条件致病性真菌^[1]。近年来, 随着原发及继发性免疫功能低下的人群不断扩大, 全身性真菌感染, 尤其是念珠菌感染日益增多, 而且真菌感染的增多是各种疾病患者死亡率增加的主要原因^[2-4]。抗真菌药物的广泛应用, 又使真菌耐药现象不断产生, 使真菌感染的治疗变得更加困难^[5,9]。上述原因大大增强了新抗真菌药物的活性筛选与开发的迫切性。

本实验室自苔藓植物中提取分离得到一系列天然植物多酚类化合物, 对其结构进行改造得到一系列衍生物。对所得到的化合物进行抗真菌活性测定发现, 酚类化合物具有良好的抗白色念珠菌的活性。其中两种天然多酚类化合物 Albicanyl caffeate 及 Resveratrol 和氟取代衍生物 3, 4'-Difluorostilben 抗白色念珠菌的作用尤为明显。本实验旨在通过扫描电子显微镜和透射电子显微镜显微观察了这三种化合物与白色念珠菌作用后其超微结构的变化, 从而从另一方面证实其抗真菌活性。

1 材 料

1.1 仪 器

扫描电子显微镜(日立 S-570 型); 透射电子显微镜(日本电子 JEOL JEM-1200EX 型); 超净工作台(北京半导体一厂); 离心机(美国雅培公司)。

1.2 菌 株

白色念珠菌为山东省千佛山医院临床新近分离菌, 经山东省卫生防疫中心微生物室按标准的真菌鉴定方法鉴定^[7-9]。此菌株于 -70℃ 保存, 用前于沙氏葡萄糖琼脂培养基上至少传代两次。

1.3 药品与培养基

实验用化合物其结构及名称见图 1。培养基为沙氏葡萄糖琼脂培养基及 RPMI 1640 液体培养基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, lot No. 1095479, 24 h Chemical Hazard Emergency No. USA. (301) 431-8585), 含 L-谷氨酸, 不含碳酸氢钠, pH 6.3, 加葡萄糖至 2%, 加吗啉代丙磺酸(MOPS)至 0.165 mol/L, 以 0.1 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 7.0, 所用试剂均为分析纯。

*【收稿日期】 2004-08-27 【*通讯作者】 Tel: 0531-8382019 E-mail: louhongxiang@sdu.edu.cn

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(No. 30271537)

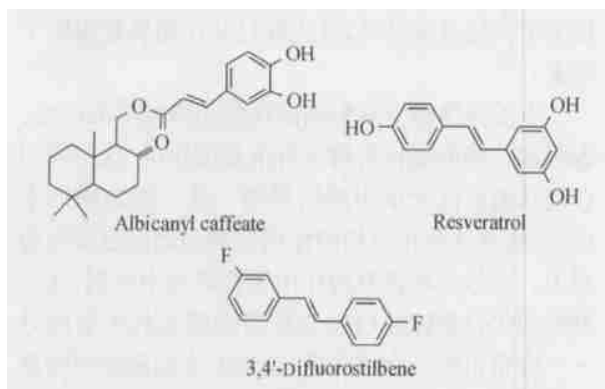


Fig 1. Structures of the phenolic compounds

2 实验方法

2.1 酚类化合物溶液的制备

分别精密称取一定量的 Albicanyl caffeate, Resveratrol, 3, 4'-Difluorostilbene, 用二甲基亚砜(DMSO)溶解配成一定浓度的溶液, 以 RPMI 1640 空白培养液稀释至其终浓度分别为 32, 128, 128 $\mu\text{g/ml}$ 。DMSO 的终浓度低于 2%。

2.2 菌液的配制及与药物的混合培养

取多次传代后的白色念珠菌, 以 0.85% 的氯化钠溶液稀释, 参照真菌浊度标准调节一定浊度(相当于菌液浓度 1.0×10^8 cfu/ml), 然后分别取适量接种到上述含药培养液中, 作为实验组, 菌液最终浓度为 2.5×10^7 cfu/ml。将相同量的菌液接种到不含药物的 RPMI 1640 培养液中, 作为阴性对照组。将实验组及阴性对照组培养液于 35 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 24 h。

2.3 扫描电子显微镜观察

取液体培养基中培养 24 h 的阴性对照组及实验组的新鲜培养液, 用 2.5% 戊二醛(用 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液配制, pH 6.8 ~ 7.0)固定 12 ~ 24 h, 以 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液清洗; 再用 1% 锇酸固定 1.5 h, 用重蒸水洗至无锇酸气味, 乙醇梯度脱水, 醋酸异戊酯置换, 常规临界点干燥; IB-5 离子溅射仪中镀铂, 扫描电子显微镜下观察并拍照。

2.4 透射电子显微镜观察

阴性对照组及实验组的混合培养液(培养方法同上)于 10 000 r/min 离心 5 min, 吸弃上清液, 沉淀物用 3% 戊二醛及 1% 锇酸双重固定, 按常规脱水, 618 包埋, 电镜超薄切片, 以铀铅双染色, 于透射电子显微镜下观察并拍照。

3 结果

3.1 白色念珠菌正常细胞的超微结构

未经任何药物处理的白色念珠菌细胞对照组, 在扫描电镜下可见形态规则, 细胞壁膜光滑、致密, 生长良好。透射电镜下可见细胞壁质地致密、厚薄均匀、规则, 细胞膜完整, 胞质均匀(见图 2)。

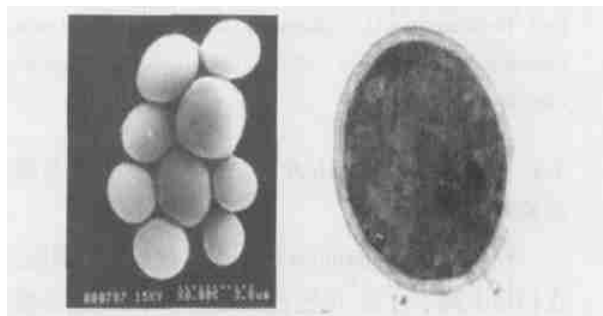


Fig 2. The ultrastructure of normal *C. albicans* cells under scanning electronic microscope (left) and under transmission electronic microscope (right)

3.2 Albicanyl caffeate 处理组白色念珠菌的超微结构

扫描电镜下可见, 细胞变成长椭圆形, 细胞表面皱缩不平, 细胞壁外膜变薄、边缘有细裂纹。透射电镜下可见, 经 Albicanyl caffeate 作用后的白色念珠菌细胞与正常菌细胞比较, 细胞壁不完整, 局部有缺损, 细胞膜不连续, 有凸起。细胞内成分固缩成电子密度较高的团块, 期间有电子光点和空胞状物(见图 3)。

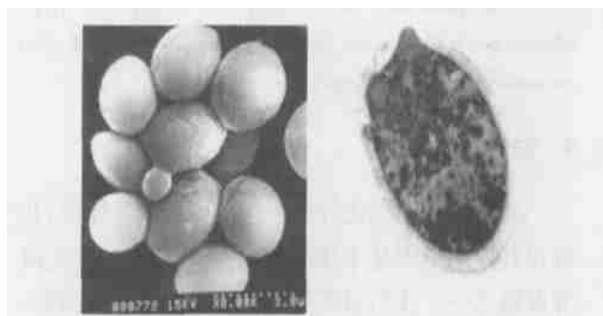


Fig 3. The ultrastructure of *C. albicans* cells treated with albicanyl caffeate under scanning electronic microscope (left) and under transmission electronic microscope (right)

3.3 Resveratrol 处理组白色念珠菌的超微结构

该处理组的白色念珠菌细胞在扫描电镜下可见, 细胞形态有所改变, 细胞壁仿佛分层, 细胞壁外膜有严重皱折、剥脱及裂纹等现象。透射电镜下可见, 细胞壁有缺损, 质地疏松。细胞膜不完整, 胞质不均匀, 有空胞状物及光亮区形成(见图 4)。

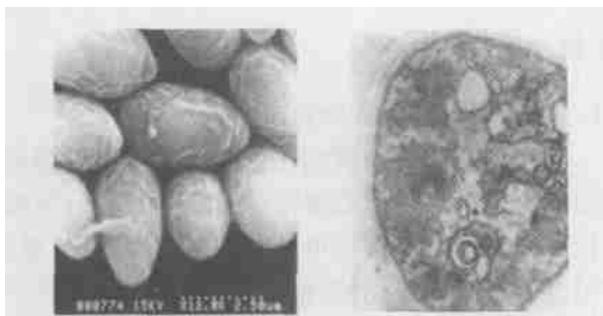


Fig 4. The ultrastructure of *C. albicans* cells treated with resveratrol under scanning electronic microscope (left) and under transmission electronic microscope (right)

3.4 3,4'-Difluorostilben 处理组白色念珠菌的超微结构

经3,4'-Difluorostilben 处理组白色念珠菌细胞,在扫描电镜下可见,细胞壁膜皱缩不平,质地变脆有裂纹。透射电镜下可见,细胞壁质地松散、厚薄不均。细胞膜轮廓不清,细胞质不均匀,聚集固缩且形成大量电子密度高的光亮区(见图5)。

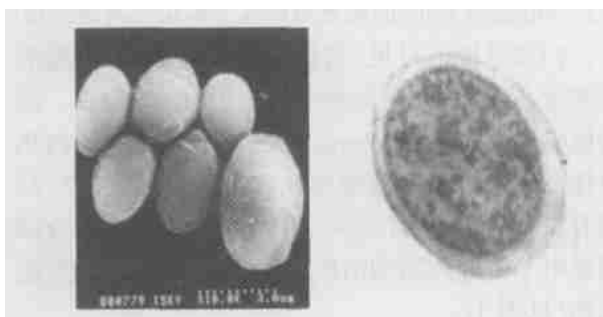


Fig 5. The ultrastructure of *C. albicans* cells treated with 3,4'-difluorostilben under scanning electronic microscope (left) and under transmission electronic microscope (right)

4 讨论

对植物多酚类化合物进行抗真菌活性评价,并探讨其作用机理是本实验室近年来进行的重要研究课题之一。我们自苔藓植物中提取分离得到一系列天然植物多酚类化合物,对其结构进行改造形成一系列衍生物,其结构均已由波谱法确证^[10]。对所得到的化合物进行抗真菌活性测定发现,酚类化合物具有良好的抗白色念珠菌的活性。其中两种天然多酚类化合物 Albicanyl caffeate 及 Resveratrol 和氟取代衍生物 3,4'-Difluorostilben 抗白色念珠菌的作用尤为明显。本实验于扫描电子显微镜和透射电子显微镜下观察了这三种化合物与白色念珠菌作用后其超微结构的变化,从另一方面证实

了其抗真菌活性,并为探讨其作用机理提供了线索。

电子显微镜下观察到的这些超微结构的改变,表明这三种酚类化合物具有抗真菌作用,这与我们在抗真菌活性评价中的结果相一致。细胞膜的不连续,提示这些化合物的作用机制和靶细胞膜密切相关。在另一项抗真菌作用机理研究中发现,这三种酚类化合物能使白色念珠菌细胞膜的主要成分——麦角甾醇的合成降低,这与本实验观察到的现象相吻合。麦角甾醇是真菌细胞特有的脂质,又是其重要的结构组成部分,它在膜结构的完整性、膜流动性、细胞活力及物质运输等方面起着重要的作用^[11]。目前临床常用的抗真菌药物主要是通过作用于麦角甾醇生物合成通路中的不同环节,使真菌的麦角甾醇生物合成受阻,细胞膜结构完整性受损,从而抑制真菌的生长繁殖^[12,13]。

研究发现,真菌细胞壁是真菌特有的一种细胞器,在维持细胞的生长和正常的生理功能中起到了重要的作用,已成为一个新的作用靶点^[14]。而实验用的酚类化合物是否能抑制真菌细胞壁的主要成分葡聚糖、甘露糖蛋白及几丁质的合成以及它们与氟康唑联合用药后所表现出的协同作用机制正在研究之中。本研究超微结构的观察结果所提供的形态结构变化的信息将为进一步揭示酚类化合物抗真菌作用的机制奠定基础。

【参考文献】

- [1] 李绣辉(Li XH), 马廉兰(Ma LL), 曾祥凤(Zeng XF). 白色念珠菌可能具有荚膜结构[J]. 中华微生物学和免疫学杂志(*Chin J Microbiol Immunol*), 2000, 20(3): 202-203.
- [2] Chung SK, Lee KW, Kang HL, et al. Design and synthesis of potential inhibitors of the ergosterol biosynthesis as antifungal agents[J]. *Bioorg Med Chem*, 2000, 8(10): 2475-2486.
- [3] Abi-Said D, Anaisie E, Uzun O, et al. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species[J]. *Clin Infect Dis*, 1997, 24(6): 1122-1128.
- [4] 温旺荣(Wen WR), 戴庚孙(Dai GS). 念珠菌耐药性的研究进展[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2001, 22(1): 38-39.
- [5] Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection[J]. *Microbiol*, 2003, 11(1): 30-36.
- [6] Kontoyiannis DP, Lewis RE. Antifungal drug resistance of pathogenic fungus[J]. *Lancet*, 2002, 359(9312): 1135-1144.
- [7] Baumgartner C, Freydiere A, Gile Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using albicans ID and

- chromagar *Candida* plates[J]. *J Clin Microbiol*, 1996, **34**(2): 454-456.
- [8] Fricker-Hidalgo H, Vandapel O, Duchesne MA, *et al.* Comparison of the new API *Candida* system to the ID 32 C system for the identification of clinically important yeast species[J]. *J Clin Microbiol*, 1996, **34**(7): 1 846-1 848.
- [9] Pfaller MA, Houston A, Coffman S. Application of chromagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* and *Candida (Torulopsis) glabrata*[J]. *J Clin Microbiol*, 1996, **34**(1): 58-61.
- [10] Lou H, Li GY, Wang FQ. A cytotoxic diterpenoid and antifungal phenolic compounds from *Frullania muscicola steph.* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2002, **4**(2): 87-94.
- [11] Lupetti A, Danesi R, Campa M, *et al.* Molecular basis of resistance to azole antifungals[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2002, **8**(2): 76-81.
- [12] Urbina JM, Coré's JCG, Palma A, *et al.* Inhibitors of the fungal cell wall. Synthesis of 4-aryl-4-*N*-arylamino-1-butenes and related compounds with inhibitory activities on β (1-3) glucan and chitin synthases[J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2000, **8**(14): 691-698.
- [13] Joseph-Horne T, Hollamon DW. Molecular mechanisms of azole resistance in fungi[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, **149**(2): 141-149.
- [14] 蒋庆锋(Jiang QF), 周有骏(Zhou YJ), 盛春泉(Sheng CQ), 等. 作用于真菌细胞壁的抗真菌药物的研究进展[J]. 中国药学杂志(*Chin Pharm J*), 2003, **38**(6): 410-412.

Effect of Phenolic Compounds on the Ultrastructure of *Candida albicans*

SUN Shu-Juan^{1, 2}, IOU Hong-Xiang¹, LI Hong-Jian², SU Le-Qun², MA Bin¹, GE Wei-Ying¹, LING Xiao¹

(¹*School of Pharmacy, Shandong University, Jinan 250012*; ²*Qianfoshan Hospital, Jinan 250014, China*)

【ABSTRACT】 AIM: To observe the effects of phenolic compounds on the ultrastructure of *Candida albicans* and to find out the potential mechanism of their antifungal action. **METHOD:** The mixtures of phenolic compounds and *Candida albicans* were incubated at 35 °C in ambient air with agitation for 24 h. The ultrastructure of *Candida albicans* was observed under scanning electron microscope (SEM) and under transmission electron microscope (TEM). **RESULT:** After exposing to phenolic compounds, profound cell wall changes such as cell surface wrinkles, excoriation and fracture were noted under scanning electron microscope. The density of the cell wall decreased and the cell membrane became discontinuous with TEM observation. The cytoplasm aggregated and some high density electron light areas as well as vacuoles were formed. **CONCLUSION:** Phenolic compounds exerted potent impact on the ultrastructure of *Candida albicans*. The ultrastructural changes demonstrated the antifungal effects of tested compounds and provided the hint of the most potential mechanism of antifungal activities.

【KEY WORDS】 Phenolic compounds; *Candida albicans*; Scanning electron microscope; Transmission electron microscope

This project was supported by National Natural Science Foundation of China(No. 30271537)