

二氢杨梅素-镍配合物体内抗白假丝酵母菌作用研究

杨文¹, 麦明晓², 李海霞³, 王英¹, 周贞鉴¹, 李文广¹

(1.海南医学院热带医学与检验医学院, 海口 571101;

2.海南医学院理学院, 海口 571101;

3.海南医学院药学院, 海口 571101)

【摘要】 目的 观察二氢杨梅素-镍配合物(DMY-Ni)体外对白假丝酵母菌的抗菌活性,探讨DMY-Ni治疗小鼠白假丝酵母菌阴道炎的疗效。方法 采用试管二倍稀释法测定DMY-Ni对临床30例白假丝酵母菌(海南医学院附属医院门诊患者阴道分泌物中分离)的最低抑菌浓度(MIC)值和最低杀菌浓度(MBC)值,同时模拟小鼠白假丝酵母菌阴道炎模型,分组给药,SPSS17.0单因素方差分析法和配对 t 检验进行统计学分析。结果 DMY-Ni对白假丝酵母菌具有较强的抗菌活性, MIC为6.25~50 $\mu\text{g/ml}$, MBC为12.5~200 $\mu\text{g/ml}$, 分别于模型组和给药前比较, 4种剂量组给药7 d后小鼠阴道内白假丝酵母菌落数均明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 阴道局部病变肉眼观察逐渐好转, 且高剂量组的治疗效果最佳。结论 4种剂量DMY-Ni对白假丝酵母菌阴道炎模型小鼠都有明显治疗效果, 高剂量组的治疗效果要优于另外3种剂量组, 为获得临床治疗白假丝酵母菌阴道炎提供一个可参考的途径。

【关键词】 二氢杨梅素-镍配合物; 白假丝酵母菌; 抗菌活性

【中图分类号】 R711.34 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2015)16-2341-04

Study on the anti-*Candida albicans* activity of Dihydropyricetin-Nickel complex *in vivo* and *in vitro*. YANG Wen¹, MAI Ming-xiao², LI Hai-xia³, WANG Ying¹, ZHOU Zhen-jian¹, LI Wen-guang¹. 1. School of Tropical and Laboratory Medicine, Hainan Medical University, Haikou 571101, Hainan, CHINA; 2. School of Basic Medicine, Hainan Medical University, Haikou 571101, Hainan, CHINA; 3. College of Pharmacy, Hainan Medical University, Haikou 571101, Hainan, CHINA

【Abstract】 Objective To study the anti-*Candida albicans* activity of Dihydropyricetin-Nickel complex (DMY-Ni complex) *in vitro*, and to explore the efficacy of DMY-Ni complex for treating mice model of vulvovaginitis candidiasis (VVC). **Methods** Tube double dilution method is used to determine the minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimum bactericidal concentrations (MBCs) value of DMY-Ni complex to *Candida albicans* (samples were isolated from the vaginal secretions of 30 out-patients in the Affiliated Hospital of Hainan Medical College). At the same time, we established mice model of VVC, and DMY-Ni complex as vaginal drug delivery was assigned to observe the efficacy for VVC mice model. The data were analyzed using statistical software SPSS17.0 single factor analysis of variance and t test comparative analysis. **Results** DMY-Ni complex has strong activity *in vitro* against *Candida albicans* with MIC ranging from 6.25 $\mu\text{g/ml}$ to 50 $\mu\text{g/ml}$ and MBC ranging from 12.5 $\mu\text{g/ml}$ to 200 $\mu\text{g/ml}$. Compared with the mice model of VVC, four kinds of DMY-Ni complex concentration could significantly reduce the colony number of *Candida albicans* in vagina ($P<0.05$ or $P<0.01$). Vaginal local symptoms gradually improved, and high dose group had the best therapeutic effect. **Conclusion** Four doses DMY-Ni complex all have significant therapeutic effect in the VVC mice, and the effect of high dose group is superior to that of other three dose groups. The results can provide reference for the treatment of VVC.

【Key words】 Dihydropyricetin-Nickel complex; *Candida albicans*; Antimicrobial activity

外阴阴道假丝酵母菌病(Vulvovaginitis candidiasis, VVC)是一种常见的由假丝酵母菌属引起外阴阴道炎症的妇科疾病。其主要以白假丝酵母菌(*Candida albicans*)感染居多,发病率高^[1]。Magliani等^[2]研究

报道,大约75%的妇女一生中至少患过1次VVC,而再次发作的妇女占40%~50%,其中约有5%的妇女发展成复发性外阴阴道假丝酵母菌病,严重影响着妇女的工作和生活质量。目前,临床对本病的治疗仍以西

医抗真菌药物直接杀灭病原菌为主,但仍存在首次治疗的不彻底、抗真菌药的滥用、诊治不规范等问题,使假丝酵母菌的耐药性明显增加,从而影响 VVC 的疗效^[3]。因此,提高对 VVC 的临床诊治和预防水平,对保护广大妇女的身心健康有着不可忽视的临床意义。

二氢杨梅素(Dihydromyricetin, DMY)为具有抗氧化、清除自由基、抗菌、抗病毒、护肝、抗肿瘤等作用的黄酮类化合物^[4-6]。镍是生命体必需的微量元素,主要作用是激活体内的各种酶,控制核酸的代谢,维持细胞膜的结构等,对机体的生理功能起重要作用^[7-8]。黄酮类与金属元素形成配合物的生物活性通常与金属中心离子的性质有关,具有提高生物活性的作用,甚至产生新的独特的生物活性^[9-12]。本研究拟采用试管二倍稀释法测定 DMY-Ni 对白假丝酵母菌标准株和 30 例临床分离株的最低抑菌浓度和最低杀菌浓度,研究其体外抗菌活性,同时构建白假丝酵母菌阴道炎小鼠模型,初步探讨 DMY-Ni 治疗小鼠白假丝酵母菌阴道炎的疗效,为将来防治白假丝酵母菌阴道炎及相关的感染性疾病提供一个可参考的途径。

1 材料与方法

1.1 实验菌株及动物 白假丝酵母临床分离株 30 株,2013 年 9~12 月分离于海南医学院附属医院门诊患者的阴道分泌物,并经梅里埃公司的全自动生物鉴定和药敏系统鉴定为白假丝酵母菌。白假丝酵母菌标准株,购自广东省微生物菌种保藏中心,编号为 ATCC10231。昆明小鼠(SPF 级)[海南医学院药物安全评价中心,许可证号:SCXK(湘)2009-0012]。

1.2 药物及主要试剂、仪器 DMY-Ni(海南医学院药学院提供),沙氏琼脂培养基、沙氏液体培养基(规格:250 g/瓶,购自杭州天和微生物试剂有限公司),苯甲酸雌二醇注射液(规格:2 ml:4 mg,宁波市三生药业有限公司,批号:120207)。Ⅱ级生物安全柜(海尔有限公司)、全自动高压蒸汽灭菌器(美国致微(厦门)仪器公司)、生化培养箱(上海博迅仪器有限公司)等。

1.3 DMY-Ni 体外抗白假丝酵母菌的活性

1.3.1 培养基的制备 按试剂使用说明进行配制并高压灭菌处理,4℃冷藏备用。

1.3.2 实验药物的配制 称取 DMY-Ni 0.040 g,用无菌注射用水溶解,并加入 1.8%盐酸 3 滴助溶,定容至 50 ml,此时药物的终浓度为 800 μg/ml,经 115℃ 10 min 高温灭菌处理后备用。

1.3.3 受试菌的活化 将白假丝酵母菌标准株及临床分离株接种至沙氏琼脂培养基,28℃ 培养 48 h,活化后备用。

1.3.4 菌悬液的制备 将受试菌株编号排序,用血细胞计数板计数后,调整菌液浓度为 1×10^5 CFU/ml 备用。

1.3.5 最低抑菌浓度(MIC)测定 无菌条件下将药物 DMY-Ni 用沙氏液体培养基以二倍稀释法将药物稀释,使药物含有不同浓度的应用液,分别为:400 μg/ml、200 μg/ml、100 μg/ml、50 μg/ml、25 μg/ml、12.5 μg/ml、6.25 μg/ml、3.125 μg/ml、1.562 5 μg/ml、0.781 25 μg/ml 共 10 个浓度,每管 1 ml,同时设阴性、阳性对照及药物空白管。在上述 10 个不同药物浓度及阳性对照管中,每管加入试验菌液 0.1 ml,充分混匀,置 28℃ 培养 48 h,观察并记录结果。在阴性对照管、药物空白管无菌生长,阳性对照管菌株生长良好的条件下,以肉眼观察无菌生长的试管中所含的药物最低浓度即为最低抑菌浓度,重复试验 3 次。

1.3.6 最低杀菌浓度(MBC)测定 将未见真菌生长管,每管取出 0.01 ml 培养液接种于沙氏琼脂培养基上,28℃ 培养 48 h,观察并记录结果。在阴性对照管、药物空白管无菌生长,阳性对照管菌株生长的条件下,接种于培养基上菌落数少于 5 个的药物最低浓度即为最低杀菌浓度,重复试验 3 次。

1.4 DMY-Ni 治疗白假丝酵母菌阴道炎的疗效

1.4.1 受试菌活化 将白假丝酵母标准株 ATCC10231 接种于沙氏琼脂培养基,28℃ 培养 48 h,活化后备用。

1.4.2 小鼠 VVC 模型的构建 参考 Yano 等^[13]方法构建小鼠 VVC 模型,将 SPF 级的雌性昆明小鼠 50 只,每只小鼠隔日皮下注射 2 mg/ml 苯甲酸雌二醇油剂 0.05 ml,连续三次,使之处于假发情状态,假发情诱导成功第 3、4 天连续小鼠阴道内给予接种 10^7 数量白假丝酵母菌(ATCC10231)感染建模。在感染后 72 h 分别取阴道分泌物进行涂片镜检和培养,均检查有假菌丝和芽生孢子的白假丝酵母菌,证实造模成功。

1.4.3 实验分组 将造模成功的小鼠随机分为六组,每日分别阴道内给予 400 μg/ml(高剂量组)、200 μg/ml(次高剂量组)、100 μg/ml(中剂量组)、50 μg/ml(低剂量组) DMY-Ni 1 次,每次 30 μl,连续 7 d,给予同等剂量无菌磷酸盐缓冲液(PBS)的为模型组,未感染的为空白组,每组 10 只,给药前及治疗 7 d 后,用 50 μl PBS 液灌洗阴道 8~10 次,对冲液内的白假丝酵母菌进行菌落计数,分别统计给药前(0 d),给药后第 8 天小鼠阴道内菌落数的变化情况,观察药物对感染小鼠阴道内白假丝酵母菌的杀灭或

抑制作用。同时观察阴道局部病变情况,按“-”,“+”,“++”,“+++”给予评分。

1.5 统计学方法 实验所得数据用SPSS17.0软件进行分析和处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,各组小鼠阴道内菌落数的比较采用单因素方差分析,各剂量组在给药前后的比较采用配对t检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DMY-Ni抗白假丝酵母菌的体外活性测定 采用试管二倍稀释法测定DMY-Ni对1株白假丝酵母菌标准株和30株临床分离株的最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC),见表1。

表1 DMY-Ni对白假丝酵母菌的体外抑菌情况

白假丝酵母菌株号	DMY-Ni浓度 ($\mu\text{g/ml}$)		阴性对照	阳性对照	药物对照
	MIC	MBC			
1	6.25	200	-	+	-
2	6.25	50	-	+	-
3	6.25	25	-	+	-
4	6.25	50	-	+	-
5	6.25	50	-	+	-
6	25	200	-	+	-
7	12.5	100	-	+	-
8	12.5	100	-	+	-
9	25	100	-	+	-
10	25	50	-	+	-
11	25	50	-	+	-
12	12.5	50	-	+	-
13	12.5	25	-	+	-
14	12.5	100	-	+	-
15	50	200	-	+	-
16	25	100	-	+	-
17	25	100	-	+	-
18	12.5	100	-	+	-
19	12.5	200	-	+	-
20	25	100	-	+	-
21	12.5	100	-	+	-
22	25	100	-	+	-
23	6.25	12.5	-	+	-
24	6.25	12.5	-	+	-
25	6.25	50	-	+	-
26	25	100	-	+	-
27	12.5	50	-	+	-
28	12.5	50	-	+	-
29	25	200	-	+	-
30	12.5	50	-	+	-
白假丝酵母菌标准株 ATCC10231	6.25	25	-	+	-

注:“-”为无真菌生长,“+”为有真菌生长。

由表1可知,DMY-Ni对1株白假丝酵母菌标准株和30株临床分离株均有较强的抗菌活性,MIC分别为6.25~50 $\mu\text{g/ml}$,6.25~50 $\mu\text{g/ml}$,MIC均值为(15.93±9.93) $\mu\text{g/ml}$,MBC分别为12.5~200 $\mu\text{g/ml}$,12.5~200 $\mu\text{g/ml}$,MBC均值为(87.10±58.32) $\mu\text{g/ml}$ 。

2.2 DMY-Ni对VVC的疗效

2.2.1 DMY-Ni对VVC模型小鼠阴道内白假丝酵母菌生长的影响 给药前,模型组和4种药物剂量组与空白组比较,阴道内的菌落数明显增加($P<0.01$),而模型组和4种药物剂量组间差异均无统计学意义($P>0.05$),说明小鼠VVC模型构建成功,且模型组与4种药物剂量组的小鼠感染程度相当。给药后第8天,分别与给药前(0 d)比较,4种药物剂量组阴道内的菌落数明显下降($P<0.01$),且高剂量组的抗菌效果最显著,模型组差异无统计学意义($P>0.05$),见表2。

表2 DMY-Ni对VVC模型小鼠阴道内菌落数的影响

组别	剂量($\mu\text{g/ml}$)	数量(只)	菌落数($\times 10^2\text{CFU/ml}$)	
			给药前	给药后第8天
空白组	-	10	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	-	10	53.00±10.53 ^a	47.1±10.69
高剂量组	400	10	50.90±6.66 ^a	6.8±4.02 ^b
次高剂量组	200	10	50.20±6.14 ^a	10.9±4.58 ^b
中剂量组	100	10	49.40±5.48 ^a	13.7±4.78 ^b
低剂量组	50	10	51.50±5.80 ^a	18.7±6.04 ^b

注:与空白组对照,^a $P<0.01$;与0 d比较,^b $P<0.01$ 。

2.2.2 肉眼观察阴道局部变化情况 小鼠于接种白色念珠菌后,阴道充血水肿、分泌物增加。经过DMY-Ni治疗后小鼠阴道充血水肿等病变逐渐好转,分泌物明显减少,以高剂量组效果更为明显,见表3。

表3 阴道局部变化观察

组别	剂量 ($\mu\text{g/ml}$)	建模前				建模后				给药后第8天			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
空白组	-	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0
模型组	-	10	0	0	0	0	0	0	10	0	0	3	7
高剂量组	400	10	0	0	0	0	0	0	10	9	1	0	0
次高剂量组	200	10	0	0	0	0	0	0	10	8	2	0	0
中剂量组	100	10	0	0	0	0	0	0	10	8	2	0	0
低剂量组	50	10	0	0	0	0	0	0	10	7	3	0	0

注:“-”:外阴阴道无红肿及分泌物极少;“+”:外阴阴道轻微红肿。有少许分泌物;“++”:阴道中度红肿,可见较多的脓性分泌物;“+++”:阴道红肿严重,可见很多脓性分泌物。

3 讨论

外阴阴道假丝酵母菌病(VVC)是临床上表现为妇女外阴阴道炎症的常见疾病,影响着广大妇女的身心健康。该病的发病与多种因素有关,其发病机制目前尚未完全明确,刘朝晖等^[14]认为,VVC发生的重要

原因在于机体的免疫异常和阴道环境的改变,如长期使用抗菌药物、免疫抑制药物、激素或营养失调等都可促使其发生。治疗上常以唑类药物抗真菌为主,效果确切,但在杀灭致病菌的同时也破坏了阴道的正常菌群,且存在药物滥用和诊治的不规范等诸多问题,使得病原菌的耐药性明显增加。二氢杨梅素(DMY)是具有抗菌、抗病毒等作用的黄酮类化合物,与金属离子螯合形成配合物后,金属离子与配体二氢杨梅素可能产生协同作用,通过改变药物的立体构型、分子大小、脂溶性和电荷性等,对靶细胞和受体的选择性增加,从而达到提高抑菌和杀菌效果疗效、降低毒副作用和耐药性^[15-16]。

本课题组以黄酮类二氢杨梅素和乙酸镍盐为原料,合成二氢杨梅素-镍配合物,通过红外光谱、紫外光谱、差热-热重分析对配合物进行表征。本研究对 DMY-Ni 在体外对白假丝酵母菌的 MIC、MBC 进行测定,结果表明 DMY-Ni 对 31 株受试白假丝酵母菌株均有较强的抗真菌活性;同时模拟小鼠 VVC 模型,探讨 DMY-Ni 治疗小鼠 VVC 的疗效,通过阴道内给药,7 d 后对阴道内的白假丝酵母菌进行菌落计数及局部病变进行观察,结果表明 DMY-Ni 体内对白假丝酵母菌表现出明显的抑菌、杀菌作用且小鼠阴道局部充血、水肿等病变逐渐好转,以高剂量组更为明显,这为临床治疗 VVC 提供一个可参考的途径。此外,本研究还发现,DMY-Ni 的 4 种剂量组对小鼠阴道内均无明显的刺激性,但整体对阴道组织的病理结果、阴道粘膜免疫及对机体的细胞因子的调节水平有何影响,有待后续深入研究。

参考文献

- [1] Gamarra S, Morsno S, Dudiuk C, et al. Epidemiology and antifungal susceptibilities of yeasts causing vulvovaginitis in a teaching hospital [J]. *Mycopathologia*, 2014, 178(3-4): 251-258.
- [2] Magliani W, Conti S, Cassone A, et al. New immunotherapeutic strategies to control vaginal candidiasis [J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2002, 8(3): 121-126
- [3] 吴文湘, 刘朝晖. 外阴阴道假丝酵母菌病的诊治进展[J]. *国际妇产科学杂志*, 2011, 38(6): 490-493.
- [4] Zheng QK, Xu LL, Zhu LH, et al. Preliminary investigations of antioxidant of Dihydromyricetin in polymers [J]. *Bulletin of Materials Science*, 2010, 33(3): 273-275.
- [5] 白倩, 谢琦, 彭晓莉, 等. 二氢杨梅素通过抑制甲基转移酶诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞 PTEN 基因去甲基化[J]. *第三军医大学学报*, 2014, 36(1): 20-24.
- [6] Zhang QY, Liu B, Liu B, et al. Dihydromyricetin promotes hepatocellular carcinoma regression via a p53 activation-dependent mechanism [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 4628.
- [7] Pandelova M, Lopez WL, Michalke B, et al. Ca, Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, and Zn contents in baby foods from the EU market: Comparison of assessed infant intakes with the present safety limits for minerals and trace elements [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2012, 27(2): 120-127.
- [8] Zhang Y, Vadim N, Gladyshev. General trends in trace element utilization revealed by comparative genomic analyses of Co, Cu, Mo, Ni, and Se [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(5): 3393-3405.
- [9] Kim YA, Tarahovsky YS, Yagolnik EA, et al. Lipophilicity of flavonoid complexes with iron (II) and their interaction with liposomes [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013, 431(4): 680-685.
- [10] Ali A, Abdullah N, Maah MJ, et al. Synthesis, characterization and antioxidant studies of triazine schiff bases and their nickel (II) and zinc (II) Complexes [J]. *Asian Journal of Chemistry*, 2012, 24(11): 5063-5066.
- [11] Li HX, Yang W, Zhai RR, et al. Synthesis and antibacterial activity of dihydromyricetin-Co (II) [J]. *Asian Journal of Chemistry*, 2014, 26(19): 6309-6312.
- [12] 杨文, 李海霞, 陈丽珍, 等. 二氢杨梅素-镍配合物的合成及抗菌活性[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(14): 122-126.
- [13] Yano J, Fidel PL Jr. Protocols for vaginal inoculation and sample collection in the experimental mouse model of *Candida vaginitis* [J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2011, 58: 3382.
- [14] 刘朝晖, 廖秦平. 外阴阴道假丝酵母菌病的致病菌研究[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2005, 21(3): 151-152
- [15] Sobel JD, Faro S, Force RW, et al. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1998, 178(2): 203-211.
- [16] 刘文胜, 罗维早, 张志荣, 等. 中药研究的新学说——中药配位化学[J]. *华西药理学杂志*, 2001, 16(4): 293-294.

(收稿日期:2015-03-17)