

番木瓜籽提取物对白色念珠菌及菌丝特异性基因表达的研究

易国辉, 张菁芸, 姚孟霞, 陈锦萍, 何小稳

海南医学院科学实验中心, 海南 海口 571199

【摘要】目的 研究番木瓜籽提取物对游离态白色念珠菌的抑制效果, 并探讨对其相关菌丝特异性基因表达的影响。**方法** 采用微量稀释法测定番木瓜籽提取物对白色念珠菌标准株 SC5314 的最小抑菌浓度(MIC)与最小杀真菌浓度(MFC); 采用荧光定量 PCR 法检测不同浓度的番木瓜籽提取物对白色念珠菌相关菌丝特异性基因 *Efg1*、*Als3* 与 *Ece1* 的表达水平。**结果** 番木瓜籽提取物对白色念珠菌的 MIC 为 8 μg/mL, MFC 为 8 μg/mL; 不同浓度下的番木瓜籽提取物能抑制白色念珠菌相关菌丝基因 *Efg1*、*Als3* 与 *Ece1* 的表达, 在 1 μg/mL 时, 使其分别下调了 1.7 倍、2.1 倍和 0.20 倍, 2 μg/mL 时, 分别下调了 3.4 倍、2.8 倍和 1.35 倍。**结论** 番木瓜籽提取物能抑制白色念珠菌的生长, 并能下调白色念珠菌相关菌丝特异性基因的表达。

【关键词】 白色念珠菌; 番木瓜籽; 荧光定量 PCR; 最小抑菌浓度; 最小杀真菌浓度

【中图分类号】 R379.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2019)01—0019—03

Expression of extract from *Carica papaya* seed on *Candida albicans* and hyphae-specific genes. YI Guo-hui, ZHANG Jing-yun, YAO Meng-xia, CHEN Jin-ping, HE Xiao-wen. Scientific Experimental Center, Hainan Medical University, Haikou 571199, Hainan, CHINA

[Abstract] **Objective** To study inhibiting effect of *Carica papaya* seed extract on free *Candida albicans* and to explore the impact on the expression of related hyphae-specific gene. **Methods** Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC) of *Carica papaya* seed extract against *Candida albicans* standard strain SC5314 were determined by microdilution method. Fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression levels of *Candida albicans*-specific hyphae-specific genes *Efg1*, *Als3*, and *Ece1* in different concentrations of *Carica papaya* seed extracts. **Results** MIC and MFC of *Carica papaya* seed extract against *Candida albicans* were both 8 μg/mL. *Carica papaya* seed extract at different concentrations can inhibit the expression of hyphae-specific genes in *Candida albicans* (*Efg1*, *Als3*, and *Ece1*). The expression levels of the three genes were down-regulated by 1.7 times, 2.1 times, and 0.20 times with the concentration of *Carica papaya* seed extract at 1 μg/mL, and by 3.4 times, 2.8 times, and 1.35 times with the concentration of *Carica papaya* seed extract at 2 μg/mL, respectively. **Conclusion** *Carica papaya* seed extract can inhibit the growth of *Candida albicans* and down-regulate the expression of related hyphae-specific genes.

[Key words] *Candida albicans*; *Carica papaya* seed; qR-PCR; Minimal inhibitory concentration (MIC); Minimal fungicidal concentration (MFC)

白色念珠菌(*Candida albicans*)广泛存在于正常人口腔、阴道、上呼吸道等部位, 是条件性致病菌^[1-2]。当机体免疫力下降时, 条件性致病菌就会大量繁殖引起感染从而导致机体致病。在临床致病真菌感染中, 白色念珠菌检出率位列第一位^[3-4]。目前, 已有研究表明白色念珠菌具有较高耐药性, 而且临床治疗中抗真菌药物不良反应较多, 耐药程度也有增高趋势, 因此寻找新型高效性、低毒性抗真菌药物迫在眉睫^[5-6]。番木瓜(*Carica papaya* L.)是木瓜酶的原材, 且在医药、美容、食品、纺织等都有广泛应用^[7-8]。番木瓜籽提取物中含有丰富的异硫氰酸苄酯(Benzyl Isothiocyanate, BITC), 属异硫氰酸酯类(Isothiocyanata, ITCs)^[9-10]。ITCs 是防癌、抗癌的有效物质^[11-12]。目前, 异硫氰酸苄酯主要用于抗癌研究^[13-14], 在抗真菌方面研究较少, 其抗菌机制有待进一步研究。

本研究通过微量稀释法检测了番木瓜籽提取物对游离态白色念珠菌的抑制效果, 并利用荧光定量 PCR 法检测了不同浓度下番木瓜籽提取物对白色念珠菌相关菌丝特异性基因 *Efg1*、*Als3* 与 *Ece1* 的表达水平, 期望能为临床研发一种高效低毒的抗真菌药物提供一定的实验验证和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 白色念珠菌 SC5314 (北京百欧博生物技术有限公司); 番木瓜籽提取物(海南医学院科学实验中心何小稳提供); 沙氏液体培养基, 沙氏固体培养基(广东环凯生物科技有限公司); RPMI-1640 培养基(Gibco); Yeast RNAiso Kit 试剂盒(大连宝生物工程有限公司); 反转录试剂盒, SYBR Green 试剂盒(天根生化科技有限公司); 引物(上海生工生物工程有限公司); Mx3005P 荧光定量 PCR 仪(Agilent)。

基金项目:海南省自然科学基金(编号:20168265);海南医学院科研培育基金(编号:HY2015-16)

通讯作者:何小稳, E-mail:xiaowen_he@126.com

1.2 方法

1.2.1 菌悬液配制 活化白色念珠菌标准株 SC5314,并接种于沙氏固体培养基,(29.5±0.5)℃,24 h,温箱培养。后取单克隆菌株,接种于沙氏液体培养基中,(29.5±0.5)℃,24 h,摇床培养,收集菌液并分装。磷酸盐缓冲液(PBS)洗2~3次后,用WGZ-2-XJ细菌浊度仪将菌液浓度调至1McFarland(1×10⁷ CFU/mL),4℃保存备用。

1.2.2 药液的制备 番木瓜籽提取物为海南医学院科学实验中心何小稳老师提供,并经GC-MS分析其异硫氰酸苄酯含量在99%以上,提取物用2%吐温80溶液溶解后用无菌水配制成10 mg/mL的母液放于4℃冰箱保存备用;工作液用RPMI-1640液体培养基将挥发油母液稀释成128 μg/mL。

1.2.3 实验分组 实验组(番木瓜籽提取物组):含浓度分别为64 μg/mL、32 μg/mL、16 μg/mL、8 μg/mL、4 μg/mL、2 μg/mL、1 μg/mL和0.5 μg/mL药液、白色念珠菌菌液和RPMI-1640液体培养基;阴性对照组:白色念珠菌菌液和RPMI-1640液体培养基;空白组:RPMI-1640液体培养基。

1.2.4 最小抑菌浓度(MIC)与最小杀真菌浓度(MFC)的测定 参照NCCLSM27-A方案中的微量液基稀释法,每个梯度设置4个复孔,在96孔细胞培养板中(A~D,1~10)加入100 μL RPMI-1640液体培养基,向2号A-D孔加入100 μL番木瓜籽挥发油工作液(浓度为128 μg/mL),然后依次往后进行倍比稀释至9号孔(每孔挥发油浓度为:64 μg/mL、32 μg/mL、16 μg/mL、8 μg/mL、4 μg/mL、2 μg/mL、1 μg/mL和0.5 μg/mL),1号孔为空白组,加入100 μL RPMI-1640液体培养基,10号孔为阴性对照组,用RPMI-1640液体培养基将1McFarland菌液稀释成1×10⁶ CFU/mL菌液,接种100 μL菌液于96孔细胞培养板中(A~D,2~10),(29.5±0.5)℃,24 h培养,肉眼观察MIC值,吸取MIC值前后孔菌液涂至沙氏固体培养基继续培养,观察有无菌落生长,以计数少于5个菌落作为MFC值。

1.2.5 荧光定量PCR法检测番木瓜籽提取物对白色念珠菌相关菌丝特异性基因*Efg1*、*Als3*与*Ece1*的影响

1.2.5.1 总RNA提取及逆转录 选取番木瓜籽提取物浓度为1 μg/mL、2 μg/mL和0 μg/mL作用白色念珠菌24 h后的菌液,按照Yeast RNAiso Kit试剂盒操作说明提取白色念珠菌总RNA,检测总RNA质量合格后,使用First Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒,制备模板cDNA。

1.2.5.2 荧光定量PCR 按照SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)试剂盒选用二步法PCR反应程序进行荧光定量PCR反应,每组设定3个重复,选取白色念珠菌相关菌丝特异性基因*Efg1*、*Als3*与*Ece1*作为目的基因,18s rRNA作为内参基因,NCBI Primer-BLAST设计,引物(上游、下游)序列见表1,由上海生工生物工程有限公司合成。

表1 引物序列

基因	引物序列(5'-3')
18s rRNA(内参)	F:GCCAGCGAGTATAAGCCTTG R:AGGCCTCACTAACCCATTCA
<i>Efg1</i>	F:TATGCCAGCAAACAACTG R:TTGTGTCCTGCTGTCTGTC
<i>Als3</i>	F:CTATGCTGCTACGTATAATT R:CCTGAAATTGACATGTAGCA
<i>Ece1</i>	F:GCTGGTATCATTGCTGATAT R:TTCGATGGATTGTTAACAC

1.3 统计学方法 基因荧光定量数据采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法处理,并应用SPSS 17.0进行统计学分析,采用Student's *t* test检验,所有的实验数据均采用3次相同条件下的独立实验结果,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,以P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 番木瓜籽提取物对白色念珠菌作用的MIC和MFC 肉眼观察,通过对比空白组与阴性对照组,发现随着药物浓度增大,抑菌作用逐渐增强,在5号孔白色念珠菌的生长受到明显抑制,该孔的药物浓度8 μg/mL即为MIC。取4,5,6,7号的C,D菌液于沙氏固体培养基继续培养观察,MFC值为8 μg/mL,见表2和图1。

表2 番木瓜籽提取物对白色念珠菌的MIC观察结果

菌液	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
B	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
C	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
D	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

注:“-”表示培养液澄清、肉眼不可见;“+”表示培养液浑浊,肉眼可见;1号为空白组,2~9号为番木瓜籽提取物浓度梯度组,10号为阴性对照组,A,B,C,D为重复。

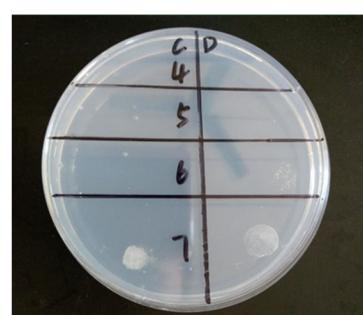


图1 4~7号番木瓜籽提取物浓度(16 μg/mL、8 μg/mL、4 μg/mL和2 μg/mL)

2.2 番木瓜籽提取物对白色念珠菌菌丝特异性基因表达水平的影响 提取总RNA后进行琼脂糖凝胶电泳,见图2,可见两条清晰明亮的带,28S与18S, A_{260}/A_{280} 范围为1.8~2.2, RNA浓度为400~800 ng/μL,表示总RNA质量稳定,无降解,符合后续实验要求。

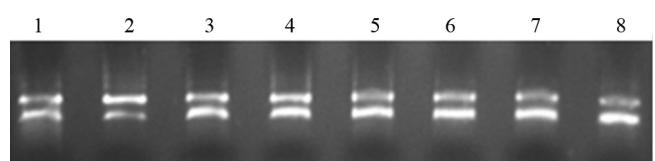


图2 总RNA电泳图

注:1~2:0 μg/mL,3~5:1 μg/mL,6~8:2 μg/mL。

2.3 荧光定量 PCR 结果显示,以番木瓜籽提取物浓度为 0 μg/mL 时作为参照,番木瓜籽提取物浓度分别在 1 μg/mL 和 2 μg/mL 时对白色念珠菌菌丝特异性基因 *Efg1*、*Als3* 与 *Ece1* 相对表达情况进行两两比较,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表 3。与番木瓜籽提取物浓度为 0 μg/mL 比较,番木瓜籽提取物浓度在 1 μg/mL 和 2 μg/mL 时,白色念珠菌菌丝特异性基因 *Efg1*、*Als3* 与 *Ece1* 基因的表达量降低:在 1 μg/mL 时,分别下调了 1.7 倍、2.1 倍和 0.20 倍;在 2 μg/mL 时,分别下调了 3.4 倍、2.8 倍和 1.35 倍。

表 3 白色念珠菌菌丝特异性基因 *Efg1*、*Als3* 与 *Ece1* 的相对表达情况(±s)

番木瓜籽提取物浓度(μg/mL)	1	2
<i>Efg1</i>	0.369±0.041 ^a	0.229±0.035 ^a
<i>Als3</i>	0.323±0.027 ^a	0.265±0.030 ^a
<i>Ece1</i>	0.830±0.038 ^b	0.425±0.026 ^a

注:^a $P<0.01$,^b $P<0.05$ 。

3 讨论

白色念珠菌具备酵母-菌丝两相,正常情况下白色念珠菌在机体内以酵母相形态存在,一般不引起疾病,当机体出现免疫能力下降、防御力下降或正常菌群间相互制约失调的情况,机体内的白色念珠菌则大量繁殖,同时通过形态转变形成芽生菌丝相,对机体宿主细胞造成损害。有研究发现芽生菌丝相白色念珠菌其黏附、侵袭力均增强,同时也参与白色念珠菌生物被膜的形成,而生物被膜的形成极大地提高了白色念珠菌的致病性和耐药性。白色念珠菌两相形态的转变主要通过改变菌丝特异性基因的表达而实现,因此抑制菌丝特异性基因的表达就能抑制白色念珠菌酵母-菌丝两相形态的转化,从而达到防治白色念珠菌的目的。*Efg1* 是真菌菌丝形成时重要的转录调控因子,在 cAMP/PKA 信号通路中,外界信号刺激启动 cAMP/PKA 途径,激活转录因子 *Efg1*,进而引起基因 *Als3* 与 *Ece1* 的转录表达,调控菌丝发育生长^[15]。*Als3* 是白色念珠菌黏附的主要基因家族 *Als* 成员,是至关重要的黏附素,主要与宿主的相互黏附有关,一般在生物被膜中期有高表达,当 *Als3* 缺失时会明显抑制其与宿主上皮细胞的黏附^[16]。*Ece1* 是菌丝诱导基因,参与编码一种细胞膜蛋白,该蛋白可刺激菌丝的形成,促进菌丝的延长,维持菌丝的形态及功能^[17]。

本实验用微量稀释法测定了番木瓜籽提取物对白色念珠菌的 MIC 与 MFC,并通过荧光定量 PCR 法检测番木瓜籽提取物浓度在 1 μg/mL 和 2 μg/mL 时对白色念珠菌菌丝特异性基因 *Efg1*、*Als3* 与 *Ece1* 的相对表达水平,结果显示番木瓜籽提取物浓度在 8 μg/mL 时对白色念珠菌具有明显抑制生长作用,而且番木瓜籽提取物浓度在 1 μg/mL 和 2 μg/mL 时能明显下调白色念珠菌菌丝特异性基因 *Efg1*、*Als3* 与 *Ece1* 的表达,且各基因表达下调程度与番木瓜籽提取物的浓度呈正相关,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

综上所述,番木瓜籽提取物对白色念珠菌具有很好的生长抑制效果,由于番木瓜籽为食用番木瓜的废弃物,来源广泛,作为开发新型的高效性、低毒性抗真菌药物具有良好的应用前景。

参考文献

- ILKIT M, DURDU M. Tinea pedis: The etiology and global epidemiology of a common fungal infection [J]. Crit Rev Microbiol, 2015, 41(3): 374-388.
- MA CF, LI FQ, SHI LN, et al. Surveillance study of species distribution, antifungal susceptibility and mortality of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in China [J]. BMC Infect Dis, 2013, 13(1): 337.
- SHOHAM S. Emerging fungal infections in solid organ transplant recipients [J]. Infect Dis Clin North Am, 2013, 27(2): 305-316.
- SGANGA G. Fungal infections in immunocompromised patients [J]. Mycoses, 2011, 54: 1-3.
- YI YY, HE JJ, SU JQ, et al. Synthesis and antimicrobial evaluation of pogostone and its analogues [J]. Fitoterapia, 2013, 84: 135-139.
- MADEIRA PL, CARVALHO LT, PASCHOAL MA, et al. In vitro effects of lemongrass extract on *Candida albicans* biofilms, human cells viability, and denture surface [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2016, 6: 71.
- ASGHAR N, NAQVI SA, HUSSAIN Z, et al. Compositional difference in antioxidant and antibacterial activity of all parts of the *Carica papaya* using different solvents [J]. Chem Cent J, 2016, 10(1): 5.
- SARALA N, PAKNIKAR S. Papaya extract to treat dengue: a novel therapeutic option? [J]. Ann Med Health Sci Res, 2014, 4(3): 320-324.
- HE XW, MA YZ, YI GH, et al. Chemical composition and antifungal activity of *Carica papaya Linn.* Seed essential oil against *Candida spp.* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2017, 64(5): 350-354.
- ZHANG T, CHEN WJ. The *Candida albicans* inhibitory activity of the extract from papaya (*Carica papaya L.*) seed relates to mitochondria dysfunction [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(9): 1-11.
- NGUYEN TT, SHAW PN, PARAT MO, et al. Anticancer activity of *Carica papaya*: a review [J]. Mol Nutr Food Res, 2013, 57(1): 153-164.
- PATHAK N, KHAN S, BHARGAVA A, et al. Cancer chemopreventive effects of the flavonoid-rich fraction isolated from papaya seeds [J]. Nutr Cancer, 2014, 66(5): 857-871.
- TANG Y, ABE N, YOSHIMOTO M, et al. Benzyl isothiocyanate inhibits IL-13 expression in human basophilic KU812 cells [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2015, 79(1): 159-163.
- ZHU Y, LIU A, ZHANG X, et al. The effect of benzyl isothiocyanate and its computer-aided design derivants targeting alkylglycerone phosphate synthase on the inhibition of human glioma U87MG cell line [J]. Tumour Biol, 2015, 36(5): 3499-3509.
- SAPUTO S, KUMAR A, KRYSAN DJ. *Efg1* directly regulates ACE2 expression to mediate cross talk between the cAMP/PKA and RAM pathways during *Candida albicans* morphogenesis [J]. Eukaryot Cell, 2014, 13(9): 1169-1180.
- CLEAR IA, REINHARD SM, MILLER CL, et al. *Candida albicans* adhesin Als3p is dispensable for virulence in the mouse model of disseminated candidiasis [J]. Microbiology, 2011, 157(6): 1806-1815.
- BIRSE CE, IRWIN MY, FONZI WA, et al. Cloning and characterization of *ECE1*, a gene expressed in association with cell elongation of the dimorphic pathogen *Candida albicans* [J]. Infect Immun, 1993, 61(9): 3648-3655.

(收稿日期:2018-10-09)