



荆皮癣湿酊对红色毛癣菌的抗菌作用机制

花琳^{1,2}, 吴敏³, 章纬³, 刘小平³, 刘涛峰³, 邵菁^{1,2}, 汪天明^{1,2}, 汪长中^{1,2*}

1 安徽中医药大学中西医结合学院, 安徽 合肥 230012

2 安徽省中医药科学院中西医结合研究所, 安徽 合肥 230012

3 安徽中医药大学第一附属医院皮肤科, 安徽 合肥 230031

花琳, 吴敏, 章纬, 刘小平, 刘涛峰, 邵菁, 汪天明, 汪长中. 荆皮癣湿酊对红色毛癣菌的抗菌作用机制[J]. 微生物学报, 2023, 63(3): 1035-1046.

HUA Lin, WU Min, ZHANG Wei, LIU Xiaoping, LIU Taofeng, SHAO Jing, WANG Tianming, WANG Changzhong. Mechanism of Jingpixian Tincture against *Trichophyton rubrum*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(3): 1035-1046.

摘要:【目的】探讨荆皮癣湿酊(Jingpixian Tincture, JPXT)对红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*)的抗菌作用和机制。【方法】微量稀释法测定荆皮癣湿酊对红色毛癣菌的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC); 荧光显微镜观察荆皮癣湿酊对红色毛癣菌孢子萌发和菌丝生长的影响; 山梨糖醇保护试验测定荆皮癣湿酊对红色毛癣菌细胞壁的影响; 流式细胞仪检测红色毛癣菌细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平; 酶标仪测定细胞内核酸释放量; 高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)检测细胞膜麦角甾醇含量; 酶标仪检测 β -1,3-葡聚糖合酶(β -1,3-glucan synthase, β -1,3-GS)、几丁质合成酶(chitin synthetase, CS)、角鲨烯环氧酶(squalene epoxidase, SQLE)、14 α -去甲基化酶(14-alpha demethylase, CYP51)活性; 实时荧光定量PCR (real-time quantitative PCR, qRT-PCR)测定 β -1,3-GS、CS、SQLE、CYP51 mRNA 表达水平。【结果】荆皮癣湿酊能抑制红色毛癣菌生长, MIC 为原液浓度 1/8; 对孢子萌发和菌丝生长具有良好的抑制效果; 荆皮癣湿酊处理红色毛癣菌 24、48 h 后胞内核酸释放量明显增加; ROS 水平显著升高; β -1,3-GS、CS 酶活性和 mRNA 表达水平均无明显变化, 但 SQLE、CYP51 酶活性和 mRNA 表达水平显著降低。【结论】荆皮癣湿酊能够抑制红色毛癣菌的生长, 其作用机制可能与破坏红色毛癣菌细胞膜、增加细胞氧化应激水平、影响胞内物质合成有关。

关键词: 红色毛癣菌; 荆皮癣湿酊; 抗真菌机制

资助项目: 国家自然科学基金(81774034, 81573725); 安徽省重点研究与开发计划(202104a07020020)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81774034, 81573725) and the Key Research and Development Project of Anhui Province (202104a07020020).

*Corresponding author. E-mail: ahwc63@sina.com

Received: 2022-07-09; Accepted: 2022-08-28; Published online: 2022-09-06

Mechanism of Jingpixin Tincture against *Trichophyton rubrum*

HUA Lin^{1,2}, WU Min³, ZHANG Wei³, LIU Xiaoping³, LIU Taofeng³, SHAO Jing^{1,2}, WANG Tianming^{1,2}, WANG Changzhong^{1,2*}

1 School of Integrated Traditional and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, Anhui, China

2 Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230012, Anhui, China

3 Department of Dermatology, The First Affiliated Hospital to Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, Anhui, China

Abstract: [Objective] To investigate the mechanism of Jingpixin Tincture (JPXT) on *Trichophyton rubrum*. [Methods] Microdilution method was employed to determine the minimal inhibitory concentration (MIC), and fluorescence microscopy to observe the effect of JPXT on spore germination and mycelial growth of *T. rubrum*. Sorbitol was used to detect the effect of JPXT on fungal cell wall. Flow cytometry was employed to determine the intracellular reactive oxygen species (ROS) level of *T. rubrum* treated by JPXT. A microplate reader was used to determine the leakage of intracellular nucleic acid. High performance liquid chromatography (HPLC) was adopted to determine ergosterol content in the cell membrane. A microplate reader was used to measure the activities of β -1,3-glucan synthase (β -1,3-GS), chitin synthetase (CS), squalene epoxidase (SQLE), and 14- α demethylase (CYP51). The mRNA levels of β -1,3-GS, CS, SQLE, and CYP51 were measured by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). [Results] The MIC of JPXT against *T. rubrum* was determined as 1/8 of the stock solution concentration. JPXT inhibited the spore germination and mycelial growth of *T. rubrum*. It increased the leakage of intracellular nucleic acid significantly after treatment for 24 and 48 h, elevated the ROS level, and decreased the ergosterol content. It did not affect the activities or mRNA levels of β -1,3-GS and CS, while it inhibited the activities and down-regulated the mRNA levels of SQLE and CYP51. [Conclusion] JPXT may inhibit the growth of *T. rubrum* by destroying the cell membrane, increasing the oxidative stress, and affecting the synthesis of intracellular substances.

Keywords: *Trichophyton rubrum*; Jingpixin Tincture; antifungal mechanism

皮肤癣菌病(dermatophytosis), 简称癣, 是由癣菌引起的高度流行的机体浅表真菌感染, 影响全球 20%–25%的成年人^[1-2]。由于其病程持久, 容易反复发作, 难以彻底根治, 因此对患者的生活质量造成了严重影响。红色毛癣菌作为一种专性致病菌, 可以引起人类表皮、毛

发、甲板等部位感染, 是皮肤癣菌病的主要致病菌, 约占病例的 80%–90%^[3-5]。目前, 临床用于治疗皮肤癣菌病的药物主要有抗真菌抗生素、糖皮质激素、免疫抑制剂等西药。这些药物短期使用具有一定的疗效, 但长期用药会增加真菌耐药性, 疗效不理想, 同时药物对组织

器官易产生严重毒副作用。因此,迫切需要高效、广谱、毒性低的新型抗真菌替代药物^[6]。

中草药因其来源广泛、抗菌谱广、对哺乳动物毒性较低、不会因长期使用而增加耐药性等优点成为开发抗真菌药物的一个非常重要的渠道^[6-7]。研究表明,许多中药在抗红毛癣菌感染方面有一定的疗效^[8-9]。荆皮癣湿酊是由安徽中医药大学第一附属医院开发的院内制剂,由土荆皮、蛇床子、苦参、百部等中药组成,主要用于足癣等癣病的治疗,疗效显著,但其抗癣菌作用机制不详^[10]。本研究主要探讨荆皮癣湿酊的体外抗癣菌作用及其机制,为其治疗皮肤癣菌病提供有力的实验依据。

1 材料与方法

1.1 菌株与药物

红色毛癣菌标准菌株 ATCC MYA-4438 购自广东省微生物菌种保藏中心(Guangdong Microbial Culture Collection Center, GDMCC),在马铃薯葡萄糖琼脂培养基上连续转种 2 次,进行培养和鉴定,再选取生长状态良好的菌落进行传代。

荆皮癣湿酊购自安徽中医药大学第一附属医院药房,皖药制字 BZ20080009,批号 20210427。

1.2 试剂

马铃薯葡萄糖琼脂平板购自广东环凯微生物科技有限公司,批号 L2291Y; PBS 购自 HyClone,批号 AD24464280; 氢氧化钾购自西陇科学股份有限公司,批号 2101251; 活性氧检测试剂盒购自碧云天生物科技有限公司,批号 011521210319; 无水乙醇与异丙醇均购自上海广诺化学科技有限公司,批号分别为 20210914 和 20210716; TRIzol 购自 Life Technologies,批号 350508; DEPC-H₂O 购自

捷瑞生物工程有限公司,批号 2107G20; Novostart[®] sSYBR qPCR SuperMix Plus 购自 novoprotein,批号 05229413; PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser 购自 TaKaRa,批号 AL21115A; 几丁质合成酶(chitin synthetase) ELISA 检测试剂盒、 β -1,3-葡聚糖合成酶(β -1,3-GS) ELISA 检测试剂盒、角鲨烯环氧酶(SQLE) ELISA 检测试剂盒、14 α -去甲基化酶(CYP51) ELISA 检测试剂盒均购自上海优选生物科技有限公司,批号 202204; 真菌荧光染色液(安徽信灵检验医学科技股份有限公司,批号 20220221)。

1.3 仪器

高速冷冻离心机(Eppendorf, 型号为 5430R); 全波长酶标仪(BioTek, 型号为 Epoch 2); 电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械有限公司, 型号为 HDPN-II-88); 倒置显微镜(OLYMPUS, 型号为 KE0003087/KA0056573); 低速离心机(湖南可成仪器设备有限公司, L4-5K); 荧光定量 PCR 仪(Thermo Scientific, 型号为 PIKOREAL 96); 超微量分光光度计(南京五义科技有限公司, 型号为 OD1000+); 凝胶检测仪(Tanon, 型号为 3500); 紫外分光光度计(Eppendorf, 型号为 BioSpectrometer basic)。

1.4 菌液的配制

将红色毛癣菌接种于马铃薯葡萄糖琼脂培养基, 28 °C 培养 7–14 d。吸取 1 mL 无菌的 0.9% NaCl 溶液覆盖菌落, 用移液器尖端或无菌拭子轻轻摩擦菌落, 将菌悬液转移至无菌 EP (Eppendorf) 管中, 振荡器振荡 15 s, 血细胞计数板计数, RPMI-1640 调整菌悬液浓度为 2×10^6 CFU/mL, 备用^[11]。

1.5 荆皮癣湿酊对红色毛癣菌最低抑菌浓度的测定

参照美国临床和实验室标准化研究所

M38-A2 方案,测定荆皮癣湿酊对红色毛癣菌最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)^[12]。向 96 孔板第 1 列中加入 60 μL 药物原液(即未经稀释的荆皮癣湿酊),第 2 列至第 11 列每个孔中加入 60 μL RPMI-1640,向第 2 列孔中加入 60 μL 药物原液,混合后移取 60 μL 至第 3 列孔,以此类推,至第 10 列孔。再向每列孔中分别加入 60 μL 制备好的菌悬液(1×10^6 CFU/mL),确保最终总体积为 120 μL 。药物浓度分别为荆皮癣湿酊原液的 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128、1/256、1/512、1/1 024。第 11 孔为阴性对照组,加入 PBS 处理。于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵育 5–7 d,当阴性对照孔生长出菌丝时,以肉眼观察没有菌落生长的最低药物浓度为 MIC。

1.6 红色毛癣菌孢子萌发抑制试验

为了测定荆皮癣湿酊是否对红色毛癣菌的孢子萌发有抑制作用,取 500 μL 液体 SDA 培养基稀释的荆皮癣湿酊(MIC、1/2 MIC、1/4 MIC)于无菌 EP 管中,再加入 500 μL 的菌悬液(2×10^6 CFU/mL),于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵育 24 h。用血细胞计数板计数,然后计算分生孢子的萌发率^[8]。

1.7 红色毛癣菌菌丝生长抑制试验

取 100 μL 菌液(2×10^6 CFU/mL)分别与 100 μL 荆皮癣湿酊(MIC、1/2 MIC)在无菌 EP 管中混合均匀,用稀释涂布法均匀涂布于马铃薯葡萄糖琼脂培养基表面,于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 7 d,用洁净透明胶布贴取平板上菌落,真菌荧光液染色,在荧光显微镜 350–460 nm 波段观察菌丝形态并拍照记录^[11]。

1.8 山梨糖醇保护试验

向 96 孔板第 1 列中加入 60 μL 药物原液,第 2 列至第 11 列每个孔中加入 60 μL RPMI-1640,向第 2 列孔中加入 60 μL 药物原液,混

合后移取 60 μL 至第 3 列孔,以此类推,至第 10 列孔。再向每列孔中分别加入 60 μL 制备好的菌悬液(1×10^6 CFU/mL),再分别加入 0.8 mol/L 山梨糖醇。第 11 孔为阴性对照组,加入 PBS 处理。96 孔板置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵育,7 d 后测定荆皮癣湿酊对红色毛癣菌的 MIC^[8]。

1.9 酶标仪检测红色毛癣菌细胞内核酸释放量

为确认荆皮癣湿酊是否破坏红色毛癣菌的细胞膜,对细胞内核酸的释放情况进行测定。用不同浓度的荆皮癣湿酊(1/2 MIC、MIC)处理红色毛癣菌 ATCC MYA-4438,以 25%氢氧化钾-乙醇溶液作为阳性对照(可引起细胞完全渗透),以 PBS 作为阴性对照。置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中分别培养 4、24、48 h。每组样品 3 000 r/min 离心 5 min,将样品上清转移至 96 孔板中,酶标仪测定 OD_{260} 。胞内物质释放率(%)=样品 OD 值/裂解剂 OD 值 $\times 100\%$ ^[8]。

1.10 流式细胞术检测红色毛癣菌细胞内活性氧

取 1 mL 菌悬液(1×10^6 CFU/mL)与 1 mL MIC 于 6 孔板中混合培养 7 d,并设 PBS 对照组。收集各组孢子,按照试剂盒说明书加入浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 DCFH-DA,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,期间每隔 3–5 min 颠倒混匀 1 次,使探针和细胞充分作用。再用 PBS 洗涤细胞 3 次,以去除未进入细胞内的 DCFH-DA。流式细胞仪检测 DCFH-DA 的荧光强度,该值代表活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平^[11]。

1.11 酶标仪检测红色毛癣菌 β -1,3-GS、CS、SQLE、CYP51 酶活性

取 1 mL 菌悬液(1×10^6 CFU/mL)与 1 mL MIC 于 6 孔板中混合培养 7 d。离心收集真菌,加入提取液在冰浴中超声提取酶。于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 5 000 $\times g$ 离心 5 min,收集上清液。严格按照检

测试试剂盒说明书测定 OD_{450} ^[8]。

1.12 qRT-PCR 检测红色毛癣菌特异性基因转录水平

(1) 总 RNA 的提取: 2 mL 菌液 (1×10^6 CFU/mL) 与 2 mL 终浓度为 MIC 的荆皮癣湿酊混合后于 28 °C 培养 7 d, 离心收集菌体, 无菌 PBS 冲洗 3 次后进行总 RNA 的提取, 调节 RNA 浓度, 使菌体模板量一致。具体操作方法参照 TRIzol 提取说明书进行^[13]。

(2) 引物的设计与合成: 根据 NCBI 基因库查得所需基因序列, 并用 Primer Premier 5.0 软件设计所需引物, 委托上海生工合成引物, 各引物情况见表 1。

(3) 反转录为 cDNA: 按照 TaKaRa 反转录试剂盒说明书将提取的总 RNA 反转录为 cDNA。在 0.2 mL EP 管中, 加入总 RNA 1 μ g、5 \times DNA Eraser Buffer 2 μ L、gDNA Eraser 1 μ L、DEPC-H₂O 补足至 10 μ L, 轻轻混匀后离心。PCR 仪上 42 °C 加热 2 min, 立即冰浴 1 min; 在上述 EP 管中加入 PrimeScript RT Enzyme Mix I 1 μ L、RT Primer Mix 1 μ L、RNase Free dH₂O 4 μ L、RevertAidTM M-MuLV Reverse-Transcriptase 4 μ L; 37 °C 15 min, 85 °C 5 s; 取出上述反应液, 即为 cDNA, -80 °C 保存备用。

(4) 荧光实时定量: 采用 Novo[®] start SYBR qPCR SuperMix Plus 试剂盒, 按下列组成配制 PCR 反应体系, 总反应体系为 10 μ L: 2 \times SYBR

Green mixture 5 μ L, 上游引物 (10 μ mol/L) 1 μ L, 下游引物 (10 μ mol/L) 1 μ L, cDNA 1 μ L, 无酶水 2 μ L。扩增反应在荧光定量 PCR 仪上进行, 反应条件: 预变性 95 °C 15 s; 退火 50 °C 15 s; 延伸 72 °C 45 s; 熔解曲线 (melting curve): 60–95 °C, 加热速率为 0.1 °C/s。内参基因为 *EF1- α* 。每个样品均设置 3 个重复, 实验重复 3 次。

(5) 定量分析: 实时荧光定量 PCR 分析分别测得目的基因 *β -1,3-GS*、*CS*、*SQLE*、*CYP51* 及内参 *EF1- α* 的 C_t 值, 结果取其平均值。基因转录水平用倍数变化来表示 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法)。

1.13 HPLC 检测麦角甾醇含量

用荆皮癣湿酊 (MIC) 处理菌株 7 d, 收集真菌细胞, 每个样品重 0.2 g, 加入裂解剂 (25% 氢氧化钾-乙醇溶液) 涡旋 1 min, 85 °C 水浴孵皂化 1 h, 每隔 15 min 振荡 1 次。将 1 mL 无菌蒸馏水和 3 mL 正庚烷的混合均匀以提取甾醇, 剧烈涡旋 3 min。醚层于 60 °C 水浴挥发干即得未皂化脂。将未皂化脂溶于甲醇中, 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 进行 HPLC 分析。色谱条件: Agilent TC-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇; 检测波长: 282 nm; 柱温: 室温; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μ L。对照品配制: 0.22 mg 麦角甾醇溶于 2 mL 甲醇中, 超声溶解得 110 mg/L 麦角甾醇标准品溶液^[8]。

表 1 各引物序列表

Table 1 The primer sequences

Gene	Length (bp)	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>EF1-α</i>	193	ATTGAGGCCTCCACCAACTG	CGACTGGCACAGTTCCGATA
<i>β-1,3-GS</i>	98	AACGTGTTGCGTGGGATAGT	AGTGCGAGGAGAGTGGTTTG
<i>CS</i>	85	TGACAAGAACGGTCAGGGAC	GTTTGCAGTGAAGACGCCTG
<i>SQLE</i>	123	GACCAAGGCCGTTTCTACCA	GCATAACCATCCGCGACAAC
<i>CYP51</i>	91	CTGGGCAAGAAGACGACTGT	AGACATCCTCTGCGCAAACA

1.14 统计学分析

实验重复进行 3 次, 计算几何平均值。所有数据采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。数据用平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。差异比较采用单因素方法分析进行比较, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 荆皮癣湿酊对红色毛癣菌标准菌株的 MIC

荆皮癣湿酊对红色毛癣菌标准菌株的 MIC 为药物原液浓度的 1/8, 提示其具有一定的抗菌能力。

2.2 荆皮癣湿酊对红色毛癣菌孢子萌发的影响

与空白对照组相比, 荆皮癣湿酊显著抑制红色毛癣菌的孢子萌发, 且呈剂量依赖性增强, 差异具有统计学意义($P<0.01$) (图 1)。

2.3 荆皮癣湿酊对红色毛癣菌菌丝生长的影响

空白对照组的红色毛癣菌生长良好, 可见大量密集交织、有分隔的菌丝, 有较多分枝,

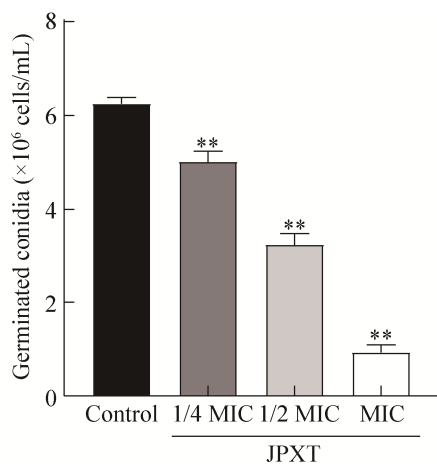


图 1 荆皮癣湿酊对红色毛癣菌孢子萌发的影响
Figure 1 Effects of wet JPXT on spore germination of *Trichophyton rubrum*. **: $P<0.01$.

小分子孢子侧生于菌丝两侧, 偶见大分生孢子。荆皮癣湿酊(1/2 MIC、MIC)处理后, 随着浓度递增, 菌丝生成逐渐减少, 分布更加稀疏, 形态更为松散(图 2)。

2.4 荆皮癣湿酊对红色毛癣菌细胞壁的影响

通过山梨糖醇(sorbitol)保护试验来评价荆皮癣湿酊对红色毛癣菌细胞壁的作用。结果表明(表 2), 与不加山梨糖醇相比, 加入 0.8 mol/L 山梨糖醇后, 荆皮癣湿酊对红色毛癣菌的 MIC 没有发生变化, 说明荆皮癣湿酊对红色毛癣菌细胞壁没有破坏作用。

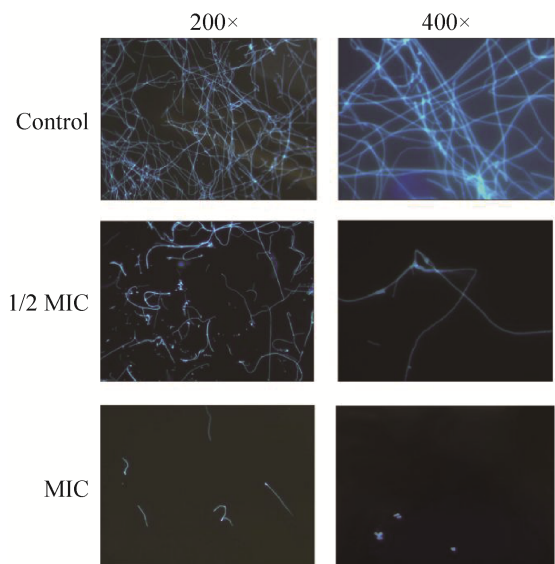


图 2 荆皮癣湿酊对红色毛癣菌菌丝生长的影响 (400 \times , 200 \times)

Figure 2 Effects of JPXT on the growth of *Trichophyton rubrum* mycelium (400 \times , 200 \times).

表 2 山梨糖醇(0.8 mol/L)存在或不存在时对 JPXT 抗红色毛癣菌 MIC 的影响

Table 2 The MIC of JPXT against *Trichophyton rubrum* in the absence or presence of sorbitol (0.8 mol/L)

Group		MIC
Control		Grow well (<i>T. rubrum</i>)
JPXT	Sorbitol (-)	1/8 MIC
	Sorbitol (+)	1/8 MIC

2.5 荆皮癣湿酊对红色毛癣菌细胞内核酸含量的影响

如图 3 所示, 与空白对照组相比, 荆皮癣湿酊(1/2 MIC、MIC)处理红色毛癣菌 4 h 后, 核酸释放量没有明显差异; 但当荆皮癣湿酊分别干预 24 h 和 48 h 时, 真菌细胞内核酸释放量明显增加, 且呈剂量依赖性, 差异具有统计学意义($P<0.05$; $P<0.01$)。

2.6 荆皮癣湿酊对红色毛癣菌细胞内活性氧水平的影响

与空白对照组相比, 荆皮癣湿酊(MIC)干预后, 红色毛癣菌细胞内 ROS 水平明显提高, 差异具有统计学意义($P<0.001$) (图 4)。

2.7 荆皮癣湿酊对红色毛癣菌内相关酶的活性的影响

如图 5 所示, 与空白对照组相比, 荆皮癣湿酊(MIC)处理的红色毛癣菌细胞内 β -(1,3)-D-葡聚糖合成酶、几丁质合成酶活性没有明显变化, 而 SQLE 及 CYP51 酶活性明显下降, 差异具有统计学意义($P<0.001$)。

2.8 荆皮癣湿酊对红色毛癣菌特异性基因表达水平的影响

qRT-PCR 结果显示, 与空白对照组相比, 经荆皮癣湿酊(MIC)处理后, β -1,3-GS、CS 基因的 mRNA 水平没有发生明显变化, 而 SQLE 及 CYP51 基因的 mRNA 水平明显下调, 差异具有统计学意义($P<0.001$) (图 6)。

2.9 荆皮癣湿酊对红色毛癣菌麦角甾醇含量的影响

HPLC 结果显示(表 3), 与空白对照组相比, 荆皮癣湿酊(MIC)处理后菌丝中麦角甾醇含量显著降低, 差异具有统计学意义($P<0.001$)。

3 讨论与结论

皮肤癣菌病是皮肤科常见的浅部真菌感染病, 虽然不具有致死性, 但严重影响患者的生

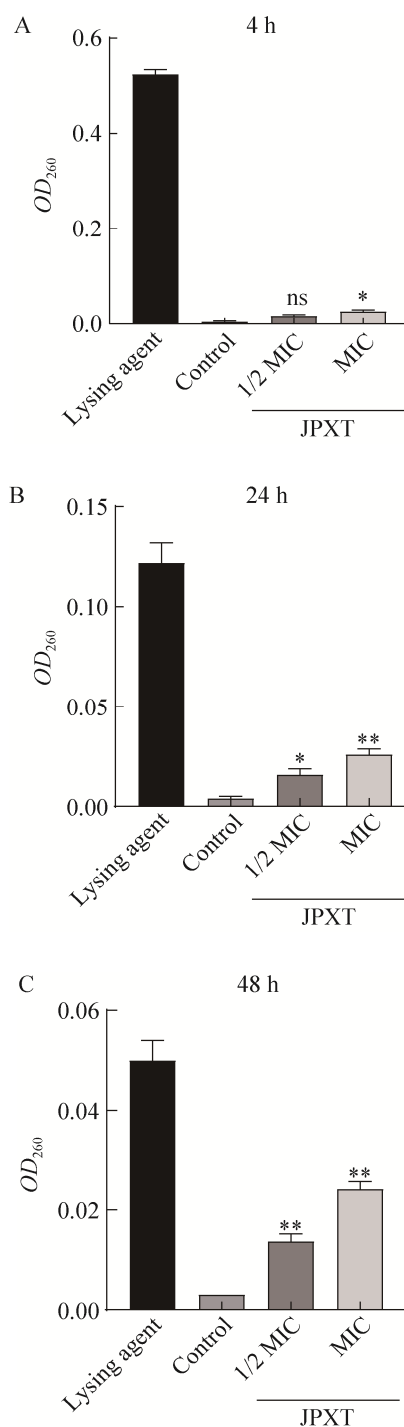


图 3 荆皮癣湿酊对红色毛癣菌细胞内核酸含量的影响

Figure 3 Effects of JPXT on nucleic acid content in *Trichophyton rubrum*. Changes of nucleic acid content in *T. rubrum* cells treated by JPXT for 4 h (A), 24 h (B), 48 h (C). *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ns: $P>0.05$.

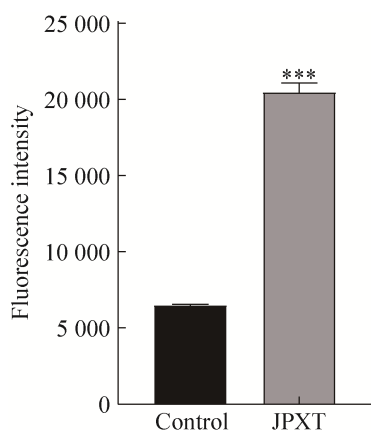


图4 荆皮癣湿酊对红色毛癣菌细胞内ROS水平的影响

Figure 4 Effects of JPXT on intracellular ROS levels in *Trichophyton rubrum*. ***: $P < 0.001$.

活质量。目前虽然开发了很多不同作用靶标的抗真菌药物，但长期用药所引起的毒副作用以及耐药性问题却不容忽视。临床常见药物如多烯类抗真菌药物对机体具有发热、肾毒性等毒副作用^[14]。烯丙胺类抗菌药物有胃肠道反应和一定的肝毒性，严重者甚至会导致肝硬化，特比萘芬是治疗皮肤癣菌病的烯丙胺类代表药物，长期使用会引起角鲨烯环氧酶靶基因的点突变，导致耐药性的产生，这涉及到麦角甾醇合成通路中复杂的酶促反应及基因调控^[15]。唑类抗真菌药物由于经肝脏代谢，也具有一定的肝毒性^[16]。因此，研发安全、高效的抗癣病药物具有积极意义。

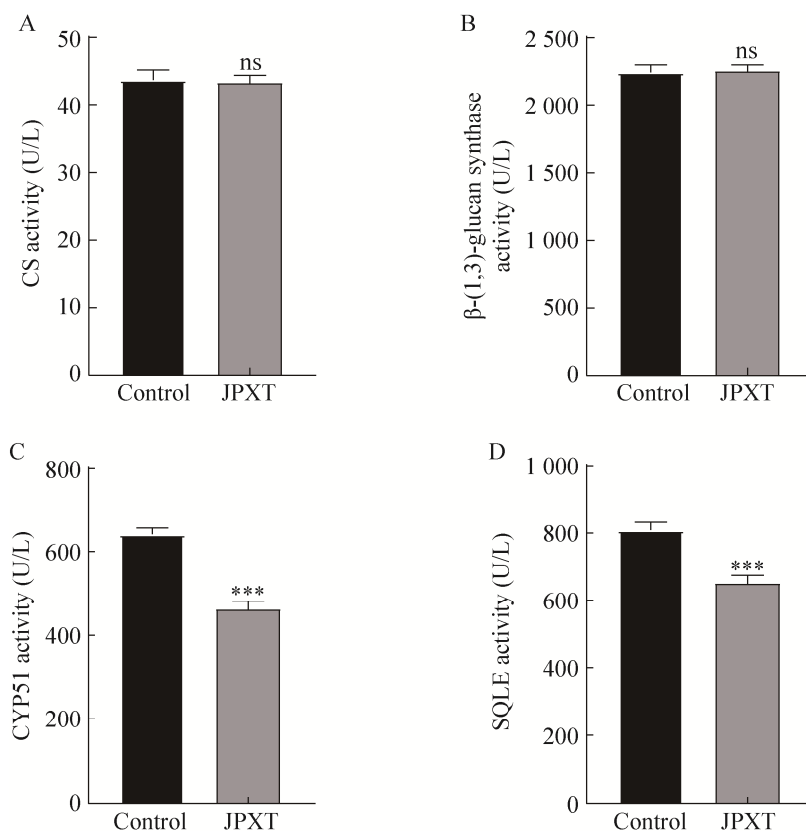


图5 荆皮癣湿酊对红色毛癣菌内相关酶的活性的影响

Figure 5 Effects of JPXT on the activities of related enzymes in *Trichophyton rubrum*. A: Chitin synthetase activity. B: β -(1,3)-glucan synthase activity. C: CYP51 activity. D: SQLE activity. ***: $P < 0.001$; ns: $P > 0.05$.

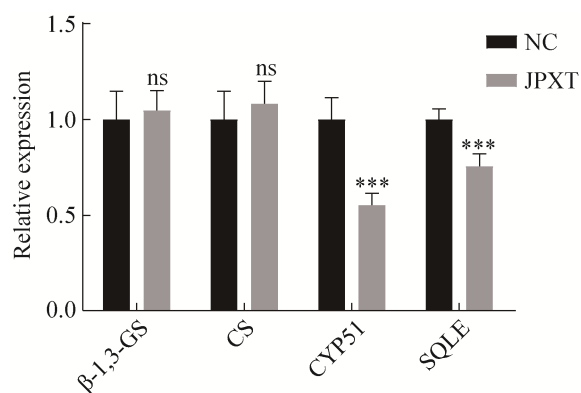


图 6 荆皮癣湿酊对红色毛癣菌特异性基因表达水平的影响

Figure 6 Effects of JPXT on the expression levels of *Trichophyton rubrum*-specific genes. ***: $P < 0.001$; ns: $P > 0.05$.

表 3 荆皮癣湿酊对红色毛癣菌菌丝中麦角甾醇含量变化的影响

Table 3 Effects of JPXT on ergosterol content in mycelium of *Trichophyton rubrum*

Groups	Sample weight (g)	Ergosterol content in mycelium (ng/mL)
Control	0.2	1 956.72±0.44
JPXT	0.2	7.64±0.02***

***: $P < 0.001$.

红色毛癣菌是引起皮肤癣菌病的主要病原体, 本研究结果表明, 中药制剂荆皮癣湿酊对红色毛癣菌有显著抑制作用。荆皮癣湿酊是由土荆皮、蛇床子、苦参、百部等多味中药组成的中药复方制剂, 其中, 土荆皮具有祛风除湿、杀虫止痒的功效, 主要用于疥癣瘙痒^[17]。蛇床子对红色毛癣菌、新型隐球菌、镰刀菌、白念珠菌、曲霉菌等临床分离的病原真菌均有抑制作用^[18]; 蛇床子的水提物和醇提物对红色毛癣菌均有显著的抑制作用, 抗菌效果呈剂量依赖性^[19], 并且蛇床子常与苦参、黄柏、樟脑等中药联合使用, 采用水煎剂和酊剂, 通过熏蒸和湿敷的方式可治疗顽固性皮肤瘙痒、湿疹和浅表真菌感染^[20]。本研究结果证实, 由上述各种

药物配伍而成的荆皮癣湿酊显示出对红色毛癣菌的良好干预效应。与单一的抑菌或杀菌作用不同, 中药复方制剂将抗菌、免疫调节、提高机体抗感染能力等作用多方面组合, 并降低药物对人体的毒副作用。

真菌分生孢子通常附着在宿主角化组织的上皮细胞上, 萌发并侵入角质层^[21]。菌丝可加剧损伤并穿透更深的角化组织, 是人和动物产生皮肤癣菌病的主要原因。本研究发现, 荆皮癣湿酊通过抑制分生孢子萌发和菌丝生长以及破坏菌丝形态来抑制红色毛癣菌的活性。

常见抗真菌药物的作用机制主要在于破坏细胞壁完整性, 影响细胞膜, 干扰胞内核酸及蛋白质合成等方面^[22-23]。真菌细胞壁作为一种动态结构, 可保护真菌菌体免受外部渗透冲击, 维持细胞固有形态, 使细胞可以进行正常的代谢和离子交换。在没有添加渗透稳定剂山梨糖醇的情况下, 作用于真菌细胞壁的药物能够破坏细胞壁, 但当添加山梨糖醇时, 可一定程度上增强细胞壁的稳定性^[24], 因此, 通过作用于细胞壁的抗真菌药物的 MIC 值应有所升高。但在本研究中, 山梨糖醇保护试验结果显示, 当存在山梨糖醇时, 荆皮癣湿酊对红色毛癣菌的 MIC 值并没有升高, 初步表明荆皮癣湿酊没有破坏红色毛癣菌细胞壁。

β-(1,3)-D-葡聚糖作为真菌细胞壁的重要组成部分, 不仅构成真菌细胞的骨架, 维持细胞的形态, 也参与维持细胞渗透压的平衡与稳定, 在细胞生长过程中发挥重要作用^[25]。抑制 β-(1,3)-D-葡聚糖合成酶的活性, 会阻碍葡聚糖的合成, 破坏真菌的细胞壁结构, 进而导致细胞裂解死亡。几丁质是真菌细胞壁的另一重要组成部分, 也参与保持细胞壁结构和功能的完整性, 其生物合成可被几丁质合成酶激活^[26]。抗真菌药物可下调几丁质合酶的表达, 致使细

胞壁损伤^[27]。由于 β -(1,3)-D-葡聚糖和几丁质是真菌细胞壁是不可或缺的成分,而哺乳动物的细胞没有细胞壁,因此抑制 β -(1,3)-D-葡聚糖或几丁质的生物合成不会对人体造成严重的不良反应,这也因此成为目前抗真菌药物的研发策略之一^[28]。但在本研究中,荆皮癣湿酊对红色毛癣菌的 β -(1,3)-D-葡聚糖合成酶和几丁质合成酶的活性和 mRNA 的表达水平均没有明显影响,因此,结合上述的山梨糖醇保护试验结果,进一步充分表明荆皮癣湿酊没有作用于真菌细胞壁,而是通过其他机制来发挥抗真菌作用的。

真菌细胞膜是由脂质双分子层组成的动态结构,其中嵌入了多种酶和转运蛋白,其完整性是真菌细胞正常生长与新陈代谢的保障。麦角甾醇是一种真菌细胞膜的脂质类固醇,与磷脂共同调节细胞膜的流动性、渗透性以及膜结合酶活性,影响细胞内外物质运输与交换。多烯类抗真菌药物如两性霉素 B 是目前最有效的抗侵袭性真菌感染药物之一,在真菌细胞膜中结合麦角甾醇而形成微孔,破坏细胞膜完整性,导致细胞内容物质流出,最终引起细胞死亡^[29]。细胞内容物的释放率是评价细胞膜完整性的重要指标,本研究结果表明,在荆皮癣湿酊处理 24 h 和 48 h 后,红色毛癣菌胞内核酸渗漏水平显著升高,提示荆皮癣湿酊可能影响细胞膜的通透性。

麦角甾醇是真菌细胞膜的重要组分,因此,针对麦角甾醇或/及其生物合成途径的抗真菌疗法已成为研究热点^[30]。角鲨烯环氧酶和 14 α -去甲基化酶是麦角甾醇合成途径中的关键酶,可通过抑制麦角甾醇的生物合成来发挥药物的抗真菌作用^[31]。本研究中,荆皮癣湿酊明显降低角鲨烯环氧酶和 14 α -去甲基化酶的活性。由于插入磷脂之间的甾醇可

以调节真菌细胞膜的流动性,当麦角甾醇含量降低时,细胞膜的完整性和功能会受到影响。本研究观察到,不同浓度的荆皮癣湿酊处理后,麦角甾醇的含量显著降低,提示荆皮癣湿酊能够减少麦角甾醇的生物合成。上述结果表明,荆皮癣湿酊可通过抑制麦角甾醇的生物合成,损伤细胞膜的结构与完整性来发挥抗真菌作用。

ROS 不仅与细胞凋亡密切相关,还会不同程度损害细胞的蛋白质、脂质以及 DNA。ROS 的大量蓄积可通过细胞内一系列氧化应激级联反应引起膜脂质过氧化,导致细胞膜功能与完整性的破坏,最终致使细胞死亡^[32-33]。本研究中对荆皮癣湿酊处理前后红色毛癣菌细胞内的 ROS 水平进行了比较,结果显示,与空白对照组相比,经荆皮癣湿酊处理后的细胞中 ROS 水平有明显的提升。表明荆皮癣湿酊可以通过氧化损伤机制发挥抗真菌作用。

综合上述研究结果表明,荆皮癣湿酊可能通过破坏细胞膜的完整性、提高细胞氧化应激水平、影响胞内物质合成来发挥抗真菌作用,为荆皮癣湿酊治疗红色毛癣菌引起的皮肤癣病提供了理论支持。

参考文献

- [1] SEEBACHER C, BOUCHARA JP, MIGNON B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections[J]. *Mycopathologia*, 2008, 166(5): 335-352.
- [2] ZHAN P, LIU WD. The changing face of dermatophytic infections worldwide[J]. *Mycopathologia*, 2017, 182(1): 77-86.
- [3] SHAPOURZADEH A, RAHIMI-VERKI N, ATYABI SM, SHAMS-GHAHFAROKHI M, JAHANSHIRI Z, IRANI S, RAZZAGHI-ABYANEH M. Inhibitory effects of cold atmospheric plasma on the growth, ergosterol biosynthesis, and keratinase activity in *Trichophyton rubrum*[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2016, 608: 27-33.

- [4] GONG J, WU WW, RAN ML, WANG XW, LIU W, WAN Z, YAO LM, LI RY. Population differentiation and genetic diversity of *Trichophyton rubrum* as revealed by highly discriminatory microsatellites[J]. Fungal Genetics and Biology, 2016, 95: 24-29.
- [5] NENOFF P, KRÜGER C, GINTER-HANSELMAYER G, TIETZ HJ. Mycology-an update. part 1: dermatomycoses: causative agents, epidemiology and pathogenesis[J]. Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG, 2014, 12(3): 188-209.
- [6] 王—安, 陶芸仪, 曲继旭, 杨春宁, 程丽丽, 孙志蓉. 抗真菌中药的研究现状及成果转化分析[J]. 中医药导报, 2017, 23(5): 43-46.
- WANG YA, TAO YY, QU JX, YANG CN, CHENG LL, SUN ZR. Analysis on current situation of the research and achievement transformation of antifungal traditional Chinese medicine[J]. Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2017, 23(5): 43-46 (in Chinese).
- [7] 陈娟, 徐剑. 抗真菌中药研究进展[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(6): 75-76.
- CHEN J, XU J. Research progress of antifungal traditional Chinese medicine[J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2016, 12(6): 75-76 (in Chinese).
- [8] LUO NX, JIN L, YANG CQ, ZHU YR, YE XL, LI XG, ZHANG BS. Antifungal activity and potential mechanism of magnoflorine against *Trichophyton rubrum*[J]. The Journal of Antibiotics, 2021, 74(3): 206-214.
- [9] LIU XP, LIU JY, JIANG T, ZHANG LL, HUANG YX, WAN JF, SONG GQ, LIN HQ, SHEN ZB, TANG CP. Analysis of chemical composition and *in vitro* antidermatophyte activity of ethanol extracts of *Dryopteris fragrans* (L.) Schott[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2018, 226: 36-43.
- [10] 石红, 林琳, 刘涛峰. 荆皮癣湿酊联合盐酸阿莫罗芬乳膏治疗鳞屑角化型足癣的临床研究[J]. 安徽中医药大学学报, 2022, 41(3): 33-36.
- SHI H, LIN L, LIU TF. Jingpi Xuanshi tincture combined with amorolfine hydrochloride cream in treatment of scaly keratotic *Tinea pedis*[J]. Journal of Anhui University of Chinese Medicine, 2022, 41(3): 33-36 (in Chinese).
- [11] 黄昊, 汤红峰, 陈颖, 郑秀芬, 胡勇, 王瑞华, 黄美玲. 强脉冲光对红毛癣菌的体外抑制作用[J]. 南方医科大学学报, 2017, 37(6): 853-857.
- HUANG H, TANG HF, CHEN Y, ZHENG XF, HU Y, WANG RH, HUANG ML. Effect of intense pulsed light on *Trichophyton rubrum* growth *in vitro*[J]. Journal of Southern Medical University, 2017, 37(6): 853-857 (in Chinese).
- [12] 陶开春, 朱育凤, 居文政. 皮脂搽剂体外抗菌作用的实验研究[J]. 中成药, 2002, 24(5): 401.
- TAO KC, ZHU YF, JU WZ. Experimental study on antibacterial effect of sebum liniment *in vitro*[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2002, 24(5): 401 (in Chinese).
- [13] KOBYLAK N, BYKOWSKA B, NOWICKI R, BRILLOWSKA-DĄBROWSKA A. Real-time PCR approach in dermatophyte detection and *Trichophyton rubrum* identification[J]. Acta Biochimica Polonica, 2015, 62(1): 119-122.
- [14] OSHEROV N, KONTOYIANNIS DP. The anti-*Aspergillus* drug pipeline: is the glass half full or empty?[J]. Medical Mycology, 2017, 55(1): 118-124.
- [15] SINGH A, MASI H A, KHURANA A, SINGH PK, GUPTA M, HAGEN F, MEIS JF, CHOWDHARY A. High terbinafine resistance in *Trichophyton interdigitale* isolates in Delhi, India harbouring mutations in the squalene epoxidase gene[J]. Mycoses, 2018, 61(7): 477-484.
- [16] 唐晓莲. 芳樟醇抗红色毛癣菌机理及生物活性研究[D]. 重庆: 重庆理工大学硕士学位论文, 2018.
- TANG XL. Antifungal mechanism and biological activity of linalool against *Trichophyton rubrum*[D]. Chongqing: Master's Thesis of Chongqing University of Technology, 2018 (in Chinese).
- [17] 徐云辉, 张帅, 张念, 孔德云, 华茉莉. 土荆皮抗真菌化学成分研究[J]. 中草药, 2012, 43(2): 220-222.
- XU YH, ZHANG S, ZHANG N, KONG DY, HUA ML. Antifungal constituents of pseudolaricis cortex[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2012, 43(2): 220-222 (in Chinese).
- [18] 王丽纳, 朱焱, 庄永灿, 王红兰. 基于热休克蛋白家族分析醇提蛇床子对红色毛癣菌抗真菌作用的机制[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(5): 908-911.
- WANG LN, ZHU Y, ZHUANG YC, WANG HL. Mechanisms of the inhibition of *Cnidium monnieri* (L.) Cuss to *Trichophyton rubrum* based on heat shock protein[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2017, 37(5): 908-911 (in Chinese).
- [19] CAO YY, TANG Y, KONG W, FANG H, ZHU HJ, ZHENG P, XU SM, WAN J. Preliminary study on

- antifungal mechanism of aqueous extract of *Cnidium monnieri* against *Trichophyton rubrum*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 707174.
- [20] 王玲, 吕雪莲, 孙令, 沈永年, 刘维达. 黄连等 6 味中药提取物对皮肤癣菌的抗真菌活性研究[J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2008, 22(8): 498-500.
WANG L, LV XL, SUN L, SHEN YN, LIU WD. Studies on antifungal activity of extracts from six traditional Chinese medicines against dermatophyte genus[J]. *The Chinese Journal of Dermatovenereology*, 2008, 22(8): 498-500 (in Chinese).
- [21] VERMOUT S, TABART J, BALDO A, MATHY A, LOSSON B, MIGNON B. Pathogenesis of dermatophytosis[J]. *Mycopathologia*, 2008, 166(5): 267.
- [22] MANDALA SM, THORNTON RA, ROSENBACH M, MILLIGAN J, GARCIA-CALVO M, BULL HG, KURTZ MB. Khafrefungin, a novel inhibitor of sphingolipid synthesis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(51): 32709-32714.
- [23] GEORGOPAPADAKOU NH. Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 1998, 1(5): 547-557.
- [24] ESCALANTE A, GATTUSO M, PÉREZ P, ZACCHINO S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* hauman[J]. *Journal of Natural Products*, 2008, 71(10): 1720-1725.
- [25] TING PC, KUANG RZ, WU HP, ASLANIAN RG, CAO JH, KIM DW, LEE JF, SCHWERDT J, ZHOU G, WAINHAUS S, BLACK TA, CACCIAPUOTI A, MCNICHOLAS PM, XU YM, WALKER SS. The synthesis and structure-activity relationship of pyridazinones as glucan synthase inhibitors[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2011, 21(6): 1819-1822.
- [26] CORTÉS JCG, CURTO MÁ, CARVALHO VSD, PÉREZ P, RIBAS JC. The fungal cell wall as a target for the development of new antifungal therapies[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(6): 107352.
- [27] LI B, WANG KY, ZHANG R, LI BH, SHEN YL, JI QG. Design, synthesis and biological evaluation of novel diazaspiro[4.5]decan-1-one derivatives as potential chitin synthase inhibitors and antifungal agents[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 182: 111669.
- [28] LENARDON MD, MUNRO CA, GOW NA. Chitin synthesis and fungal pathogenesis[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2010, 13(4): 416-423.
- [29] PIERCE CG, SRINIVASAN A, UPPULURI P, RAMASUBRAMANIAN AK, LÓPEZ-RIBOT JL. Antifungal therapy with an emphasis on biofilms[J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2013, 13(5): 726-730.
- [30] AHMAD A, KHAN A, MANZOOR N, KHAN LA. Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2010, 48(1): 35-41.
- [31] RUDRAMURTHY SM, SHANKARNARAYAN SA, DOGRA S, SHAW D, MUSHTAQ K, PAUL RA, NARANG TR, CHAKRABARTI A. Mutation in the squalene epoxidase gene of *Trichophyton interdigitale* and *Trichophyton rubrum* associated with allylamine resistance[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2018, 62(5): e02522- e02517.
- [32] LIMA PG, SOUZA PFN, FREITAS CDT, BEZERRA LP, NETO NAS, SILVA AFB, OLIVEIRA JTA, SOUSA DOB. Synthetic peptides against *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum*: mechanisms of action and efficiency compared to griseofulvin and itraconazole[J]. *Life Sciences*, 2021, 265: 118803.
- [33] PAN TT, LIU XJ, LIU CC, LI J, MA WP, QIN YN, CHEN YR, LIN SM, YE F. Evaluation of the photodynamic efficacy and effects of haematoporphyrin monomethyl ether on *Trichophyton rubrum* microconidia *in vitro*[J]. *Mycoses*, 2020, 63(11): 1215-1225.