



荆皮癣湿酊诱导红色毛癣菌凋亡的机制研究

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. 荆皮癣湿酊诱导红色毛癣菌凋亡的机制研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(5): 1982-1990.

HUA Lin, WU Min, ZHANG Wei, LIU Xiaoping, LIU Taofeng, SHAO Jing, WANG Tianming, WANG Changzhong. Jingpixian tincture induces apoptosis of *Trichophyton rubrum*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(5): 1982-1990.

摘要: 【目的】本研究旨在探讨复方中药荆皮癣湿酊(Jingpixian tincture, JPXT)对红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*)的凋亡诱导作用,以阐明其可能的抗真菌作用机制。【方法】采用细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8)评价荆皮癣湿酊对红色毛癣菌生长活力的影响;流式细胞仪检测红色毛癣菌细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平和线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)变化;Annexin V-FITC/PI染色荧光显微镜观察红色毛癣菌细胞磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)外翻情况;流式细胞术检测红色毛癣菌细胞凋亡率;FITC-VAD-FMK染色观察红色毛癣菌偏半胱天冬酶(metacaspase)活性;紫外分光光度计测定红色毛癣菌细胞色素C氧化酶的活性。【结果】荆皮癣湿酊处理后的红色毛癣菌细胞活力与MMP水平均有所降低,ROS水平显著升高,PS外翻与凋亡率明显增加,偏半胱天冬酶活性显著升高,细胞色素C氧化酶活性降低。【结论】荆皮癣湿酊可通过诱导菌体凋亡的方式发挥对红色毛癣菌的抗菌作用。

关键词: 红色毛癣菌; 荆皮癣湿酊; 细胞凋亡

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 Projects of Anhui Province (202104a07020020).

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

Received: 2023-03-17; Accepted: 2023-04-20

Jingpixian tincture induces apoptosis of *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 of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, Anhui, China

Abstract: [Objective] To investigate the role of Jingpixian tincture (JPXT) in inducing apoptosis of *Trichophyton rubrum* and reveal the antifungal mechanism of JPXT. [Methods] Cell counting kit-8 (CCK-8) was used to evaluate the effect of JPXT on the viability of *T. rubrum*. The reactive oxygen species (ROS) level and mitochondrial membrane potential (MMP) in *T. rubrum* were measured by flow cytometry. Annexin V-FITC/PI staining was employed to observe the externalization of phosphatidylserine (PS) in *T. rubrum*. Flow cytometry, FITC-VAD-FMK staining, and an ultraviolet spectrophotometer were employed to determine the apoptosis rate, metacaspase activity, and cytochrome C oxidase activity, respectively. [Results] After JPXT treatment, the viability and MMP of *T. rubrum* decreased, and the ROS level increased. Furthermore, the JPXT treatment promoted PS externalization, increased the apoptosis rate and metacaspase activity, and decreased the cytochrome C oxidase activity. [Conclusion] JPXT can inhibit *T. rubrum* by inducing apoptosis.

Keywords: *Trichophyton rubrum*; Jingpixian tincture; apoptosis

红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*)是导致慢性、广泛和浅部皮肤癣菌病的主要致病真菌, 可通过感染身体各个部位造成体癣、头癣、甲癣和足癣等浅表真菌感染^[1]。传统的抗真菌感染药物主要有唑类、烯丙胺类和多烯类。随着抗真菌药物的长期使用, 致病真菌对其逐渐产生了耐药性, 甚至是多重耐药^[2], 导致发病率和复发率逐年上升, 居高不下, 影响到人们的生活质量和健康, 因此人们开始从中草药中寻找更加高效、安全和毒性更低的抗真菌药物。

荆皮癣湿酊(Jingpixian tincture, JPXT)是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、苦参和百部等中药组成, 临床主要用于治疗足癣等癣病, 临床治疗效果

显著。本课题组之前的研究发现, JPXT 对 *T. rubrum* 有较强的抗菌作用, 但抗 *T. rubrum* 感染的具体机制尚不明确^[3]。本研究将在课题组前期研究的基础上, 进一步探讨 JPXT 对 *T. rubrum* 凋亡的影响, 为其抗 *T. rubrum* 感染提供有力的实验依据。

1 材料与方法

1.1 菌株和药物

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, 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西药房。

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；磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)购自 HyClone；胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) 购自 Biological Industries (BI)；活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒，线粒体膜电位检测试剂盒，胰酶购自碧云天生物科技有限公司；细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8)购自博奥森生物科技有限公司；Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒购自联科生物科技有限公司；细胞色素 C 氧化酶活性测定试剂盒购自南京建成科技有限公司；蜗牛酶购自 PHYGENE；二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)购自 QASEG；无水磷酸氢二钾购自麦克林生化科技有限公司；两性霉素 B (amphotericin B, AmB)购自合肥博美生物科技有限公司；氢氧化钾购自上海沪试实验室器材有限公司；FITC-VAD-FMK 试剂盒购自 Promega。

1.3 仪器

倒置显微镜(OLYMPUS)；高速冷冻离心机(Eppendorf)；电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械有限公司)；低速离心机(湖南可成仪器设备有限公司)；紫外可见分光光度计(Eppendorf)；流式细胞仪(Beckman Counter Life Sciences)；全波长酶标仪(BioTek)；涡旋混合器(其林贝尔仪器制造有限公司)。

1.4 菌液的配制

将 *T. rubrum* ATCC MYA-4438 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 管中，振荡器振荡 15 s，血细胞计数板计数，液体沙氏葡萄糖琼脂(Sabouraud dextrose agar, SDA)培养基调整菌悬液浓度为

2×10^6 CFU/mL，备用。

1.5 *T. rubrum* 凋亡诱导及原生质体的制备^[4-5]

将 2 mL (浓度为 2×10^6 CFU/mL) 的菌悬液接种于 24 孔培养板，同时将 2 mL JPXT [终浓度为 1/2 最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)、1 MIC] 分别加入孔板中，另设不加药的空白组和阳性对照药组(0.5 μ g/mL AmB)，28 °C 静置孵育 16 h，PBS 缓冲液清洗 3 次，然后对各组细胞进行脱壁处理，步骤如下：加入预先配好的脱壁促进剂(50 mmol/L K_2HPO_4 ，5 mol/L EDTA，50 mmol/L DTT)，温和摇晃均匀，于 28 °C 恒温培养箱中孵育 30 min，PBS 缓冲液清洗 2 次，转移至 1.5% 蜗牛酶溶液中，28 °C 恒温培养箱中孵育 45 min，PBS 缓冲液清洗 2 次，得到已脱壁的原生质体状态的 *T. rubrum*。

1.6 CCK-8 法检测 JPXT 对 *T. rubrum* 生长活力的影响^[6]

T. rubrum 在 PDA 固体平板上活化后，以液体 SDA 培养基稀释菌悬液至 2×10^6 CFU/mL。向菌悬液中加入 JPXT (终浓度为 1/2 MIC、1 MIC)，置于 28 °C 恒温培养箱中孵育 6 d，并在不同时间点按照 CCK-8 检测试剂盒说明书，每孔加入 10 μ L CCK8 溶液，继续培养 3 h。用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的吸光值。

1.7 流式细胞仪检测线粒体膜电位水平^[6]

T. rubrum 在 PDA 固体平板上活化后，以液体 SDA 培养基稀释菌悬液至 2×10^6 CFU/mL。向菌悬液中加入 JPXT (终浓度为 1/2 MIC、1 MIC)，设置阳性对照组(0.5 μ g/mL AmB)和不加药的空白对照组，置于 28 °C 恒温培养箱中孵育 4 h。按照线粒体膜电位检测试剂盒说明书，加入 2.5 μ g/mL JC-1 染色工作液并于 37 °C、5% CO_2 的培养箱中孵育 20 min，离心收集真菌细胞，弃上清。JC-1 染色缓冲液洗涤真菌细胞 2 次，并以 JC-1 染色缓冲液重悬细胞，流式细胞仪检测线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)水平并分析结果。

1.8 流式细胞仪检测 ROS 水平^[6]

按照活性氧检测试剂盒说明书在脱壁后的菌悬液中加入浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 试剂, 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 缓冲液洗涤细胞 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。

1.9 Annexin V-FITC/PI 染色并以流式细胞仪检测细胞凋亡率^[7]

收集上述经过药物干预与脱壁处理的真菌细胞, 用预冷的 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 按照 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒说明书, 用双蒸水将 5 \times Binding Buffer 稀释为 1 \times 工作液, 取 500 μL 1 \times Binding Buffer 悬浮真菌细胞, 每管加入 5 μL Annexin V-FITC, 轻轻混匀后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min, 对细胞膜上的磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 进行标记。再加入 10 μL 碘化丙啶(propidium iodide, PI)染液, 轻轻混匀后, 室温避光孵育 5 min, 对坏死细胞进行染色, 在荧光显微镜下观察真菌细胞 PS 外翻情况并用流式细胞仪对细胞凋亡率进行分析。

1.10 偏半胱天冬酶(metacaspase)酶活性的测定^[7]

收集上述经过药物干预与脱壁处理的真菌细胞, 用预冷的 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 加入 100 μL 10 mol/L FITC-VAD-FMK, 28 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色 1 h 后, 均匀涂布于含有多聚赖氨酸的洁净载玻片上, 置于荧光显微镜下观察并拍照。

1.11 细胞色素 C 氧化酶活性的测定^[7]

将经上述药物处理后的 *T. rubrum* 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵育 12 h, 收集真菌细胞, 严格按照细胞色素 C 氧化酶活性测定试剂盒说明书操作, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下、550 nm 波长处测得细胞色素 C 氧化酶活性。

1.12 统计学分析

选用 SPSS 23.0 统计软件进行统计分析, 单

因素方差分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA) 检验进行组间统计学分析, 计量资料均以平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义, 并以 GraphPad Prism 8.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 JPXT 对 *T. rubrum* 生长活力的影响

为了明确 JPXT 对 *T. rubrum* ATCC MYA-4438 生长活力的影响, 检测了不同培养时间点的细胞活力。与空白对照组相比, JPXT (1/2 MIC、1 MIC) 处理后的 *T. rubrum* 细胞活力有所降低, 并且表现出剂量依赖性, 表明 JPXT 对 *T. rubrum* 的活力具有抑制效果(图 1)。

2.2 JPXT 可显著降低 *T. rubrum* 线粒体膜电位

真菌细胞线粒体膜通透性增高引起膜电位水平下降是凋亡早期的典型标志之一。本研究采用 JC-1 作为荧光探针, 在正常情况下, JC-1 可以通过线粒体膜, 作为聚集物存在, 发出红色或橙红色荧光。但在凋亡细胞中, 由于 MMP 的改变, JC-1 被释放到细胞质中并发出绿色荧光。通过测定 JC-1 从红色到绿色荧光的转变(FL2/FL1) 来测定 MMP 的变化。实验结果显示(图 2), 与空

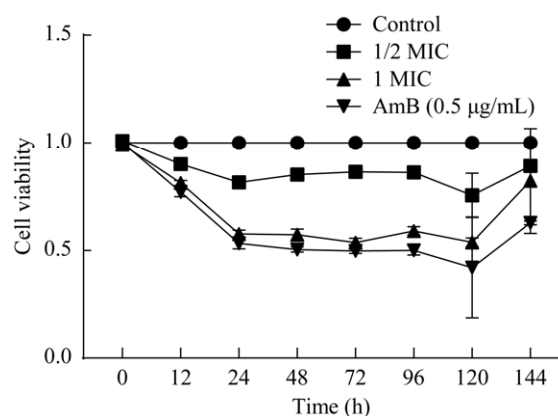


图 1 JPXT 对 *Trichophyton rubrum* 生长活力的影响

Figure 1 Effects of JPXT on the growth activity of *Trichophyton rubrum*. Data represent mean \pm SEM.

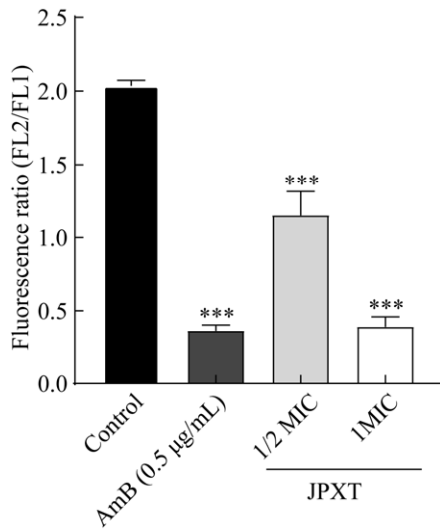


图2 JPXT对 *Trichophyton rubrum* 线粒体膜电位水平的影响

Figure 2 Effects of JPXT on mitochondrial membrane potential of *Trichophyton rubrum*. Data represent mean±SEM. ***: $P<0.001$.

白对照组 FL2/FL1 值(2.04)相较, 0.5 µg/mL AmB 可使 FL2/FL1 值降至为 0.36, 1/2 MIC、1 MIC JPXT 干预后, FL2/FL1 值分别降低为 1.21 和 0.39, 说明 JPXT 可降低 *T. rubrum* 线粒体膜电位水平, 且随着 JPXT 浓度的升高而增强 ($P<0.001$).

2.3 JPXT 可提高 *T. rubrum* 细胞内活性氧水平的影响

与空白对照组相比, 阳性药 AmB 组 ROS 水平大幅度升高, JPXT (1/2 MIC、1 MIC) 干预后, *T. rubrum* 内 ROS 水平表现出不同程度的上升, 但低于阳性药组(图 3)。

2.4 JPXT 可诱导 *T. rubrum* PS 外翻

PS 外翻作为真菌细胞凋亡早期的标志, 当处于正常生理条件下时, 磷脂酰丝氨酸位于细胞膜内侧, 而在凋亡发生的早期, 由于细胞内 ATP 缺乏, 胞浆 Ca^{2+} 浓度增加, 使其可以翻转至膜表面, 并与膜联蛋白(Annexin V)发生特异

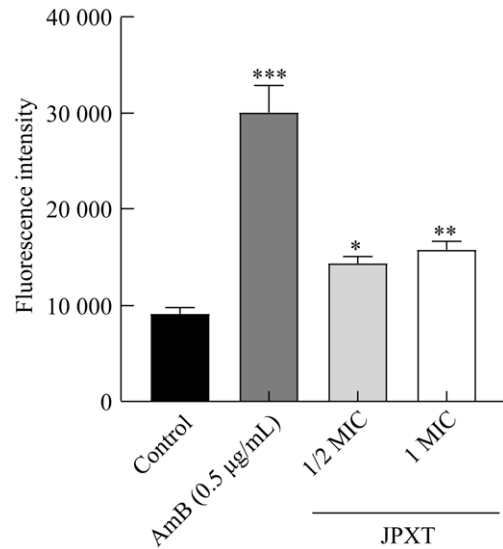


图3 JPXT对 *Trichophyton rubrum* 细胞内 ROS 水平的影响

Figure 3 Effects of JPXT on intracellular ROS levels in *Trichophyton rubrum*. Data represent mean±SEM. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

性结合, 因此 Annexin V 能够作为检测细胞凋亡早期的指标。碘化丙啶(propidium iodide, PI) 染液是一种无法透过细胞膜的红色荧光染料, 可对凋亡晚期及坏死细胞染色。Annexin V 与 PI 的结合使用可以有效分辨早、晚期凋亡细胞。

实验结果如图 4 所示, 与空白对照组相比, 阳性药 AmB 组绿色荧光细胞数量较多。经 JPXT 处理后的细胞中, 随着药物浓度的增高, 绿色荧光细胞数量增多, 但少于阳性药组, 表明 PS 已由细胞膜内侧翻转到细胞膜表面, 提示 JPXT 能够诱导 *T. rubrum* 凋亡。

2.5 JPXT 可显著提高 *T. rubrum* 凋亡率

利用流式细胞仪检测 JPXT 对 *T. rubrum* 凋亡率的影响, 结果显示(图 5), 与空白对照组凋亡率(1.17%)相比较, 阳性药 AmB 组的凋亡率为 10.64%, 而 1/2 MIC、1 MIC JPXT 的凋亡率分别为 9.85%、14.77%, 差异具有统计学意义 ($P<0.001$)。

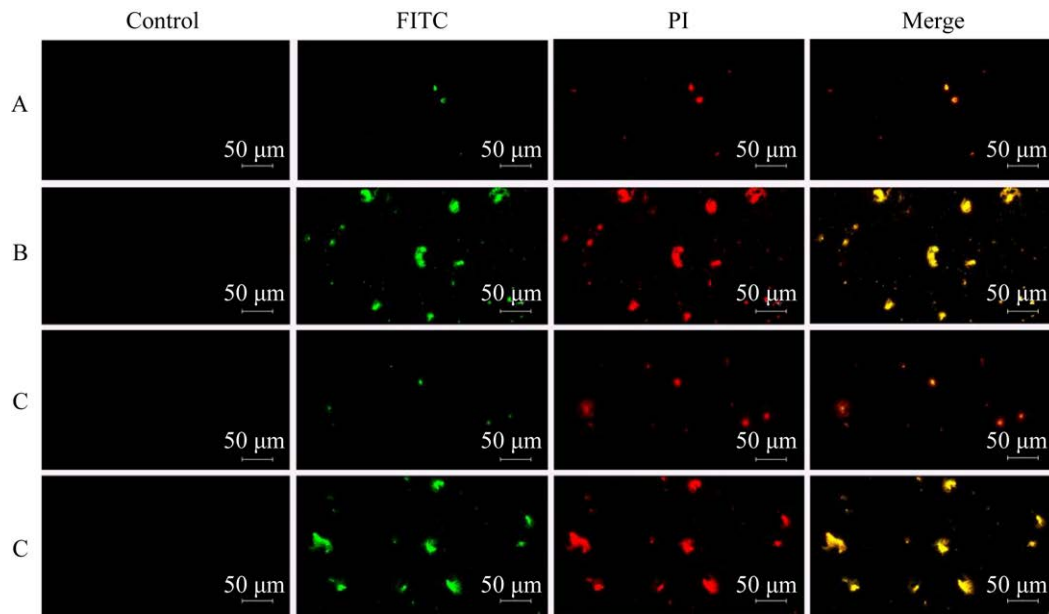


图 4 JPXT 对 *Trichophyton rubrum* 磷脂酰丝氨酸外翻的影响(×200)

Figure 4 Effects of JPXT on phosphatidylserine externalization in *Trichophyton rubrum* (×200). A: Blank control. B: 0.5 μg/mL AmB. C: 1/2 MIC. D: 1 MIC.

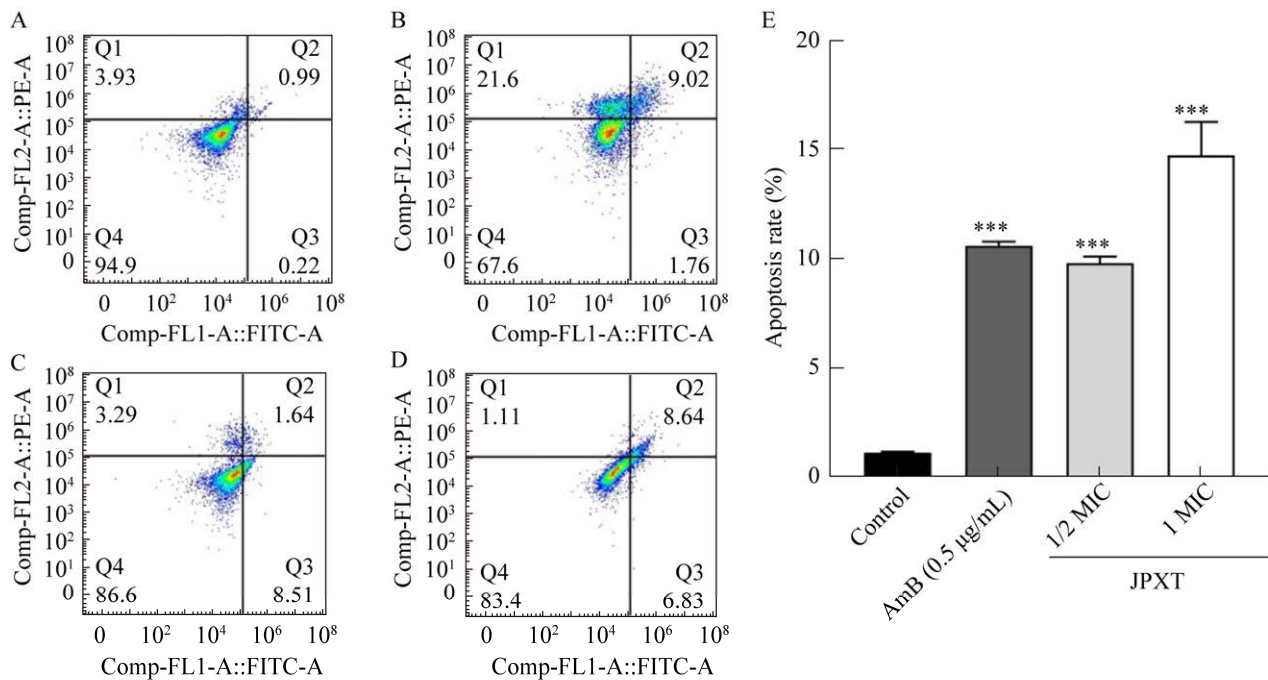


图 5 JPXT 对 *Trichophyton rubrum* 凋亡率的影响

Figure 5 Effects of JPXT on apoptosis rate in *Trichophyton rubrum*. Flow cytometric analysis with FITC-labeled Annexin V staining at the early stage of apoptosis in *Trichophyton rubrum*. A: Control. B: 0.5 μg/mL AmB. C: 1/2 MIC. D: 1 MIC. E: Apoptosis rate of *T. rubrum*. Data represent mean±SEM. ***: $P < 0.001$.

2.6 JPXT 可激活 *T. rubrum* metacaspase 活性

Caspase 是一组半胱氨酸蛋白酶，负责选择性地剪切某些蛋白。在丝状真菌中，metacaspase 是 caspase 的同源结构类似物。过往研究表明，约有 40% 的真菌细胞凋亡由 metacaspase 介导^[8]。ROS 的累积可以激活 metacaspase 的活性，因此本研究采用 FITC-VAD-FMK 检测 *T. rubrum* 细胞中 metacaspase 的活性。

如图 6 所示，与空白对照组相比，阳性药 AmB 组的 metacaspase 活性显著升高，JPXT(1/2 MIC)处理后的真菌细胞的绿色荧光较为微弱，而 JPXT (1 MIC)与阳性药组显示明亮的绿色荧光，提示 JPXT 激活了 *T. rubrum* 细胞内的 metacaspase。

2.7 JPXT 可降低细胞色素 C 氧化酶的活性

细胞色素 C 氧化酶(cytochrome C oxidase, COX)位于真核生物线粒体上，为线粒体电子传递链末端氧化酶，通过氧化磷酸化提供为生命活动提供所需能量。相关研究认为 COX 活性的降低不仅会使 ATP 水平下降，促进细胞凋亡，而且会导致 MMP 下降，膜电位通透转换孔打开，细胞色素 C 释放进入胞浆，启动 caspase 系统，最终诱导细胞凋亡。

如图 7 所示，与空白对照组相比，阳性药

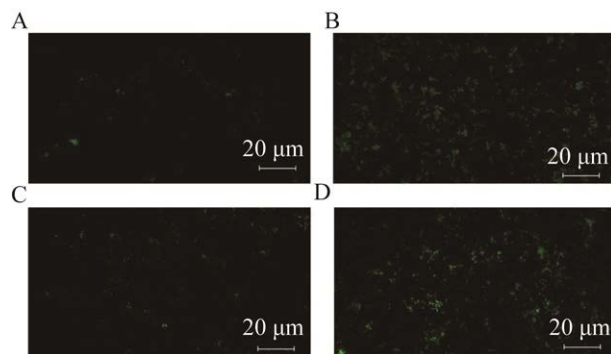


图 6 JPXT 对 *Trichophyton rubrum* metacaspase 酶活性的影响($\times 400$)

Figure 6 Effects of JPXT on metacaspase activity in *Trichophyton rubrum* ($\times 400$). A: Control. B: 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AmB. C: 1/2 MIC. D: 1 MIC.

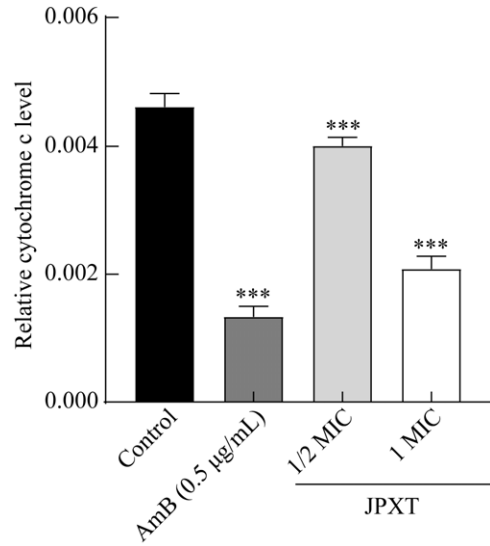


图 7 JPXT 对 *Trichophyton rubrum* 细胞色素 C 氧化酶活性的影响

Figure 7 Effects of JPXT on cytochrome C oxidase activity in *Trichophyton rubrum*. Data represent mean \pm SEM. ***: $P < 0.001$.

AmB 组 COX 活性大幅降低，JPXT 也可降低 COX 活性，并随着 JPXT 浓度的升高而降低，表现为剂量依赖性，差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。

3 讨论与结论

皮肤癣菌病是由病原真菌侵犯和感染人的角化组织如毛发、皮肤和指甲等所引起的，主要表现为局部红肿、炎症等。常见的致病真菌有表皮癣菌属、小孢子菌属和毛癣菌属。近年来耐药菌株的出现与增加，使得真菌感染复发的频率逐步升高，为皮肤癣菌病的治疗带来了新的挑战^[9]。

细胞凋亡是真核生物中一种保守的程序性死亡机制，由基因调控，在清除受损或衰老细胞、维持细胞动态平衡等方面发挥重要作用。细胞凋亡可导致细胞形态学的改变，如细胞皱缩、染色体凝缩和 DNA 裂解等^[10]，也表现为 ROS 的蓄

积^[11]、metacaspase 的激活^[12]、细胞色素 C 氧化酶活性及线粒体膜电位降低、细胞凋亡率的升高和细胞膜内侧 PS 外翻等。因诱发因素不同, 凋亡过程也有所不同, 通常包括线粒体通路、内质网通路及死亡受体通路等途径^[13]。

T. rubrum 属于丝状真菌, 是一种重要的病原体, 它会引起大多数皮肤癣菌病, 引发全世界范围内的公共卫生问题, 目前对其凋亡现象相关的研究较少。近年来研究表明, 过氧化氢^[14]、特比萘酚^[15]和两性霉素 B^[16]等药物在适当浓度下均可诱导真菌细胞凋亡, 表明有望通过药物干预诱导 *T. rubrum* 凋亡, 成为防治 *T. rubrum* 感染的新策略。

JPXT 是由土荆皮、蛇床子、苦参、百部、苯甲酸和水杨酸组成的中药复方制剂, 本课题组之前的研究发现, JPXT 对 *T. rubrum* 具有良好的抑制作用^[3]。其中, 经 JPXT 处理的 *T. rubrum* 表现出 ROS 水平的大幅提升, 提示其抗真菌机制可能与诱导 *T. rubrum* 细胞凋亡有关。为了区分凋亡与其他类型的细胞死亡, 本研究采用多种方法联合检测多个凋亡特征以确定 JPXT 对诱导 *T. rubrum* 凋亡的影响及机制。

已有研究发现线粒体在细胞凋亡中发挥重要作用^[17-19]。当线粒体受到 ROS 的破坏时会产生氧化应激反应, 诱导细胞发生凋亡, 细胞因此会产生更多的 ROS^[20]。本研究结果发现, JPXT 处理后 *T. rubrum* 的生长活力明显受到抑制, ROS 水平上升, MMP 水平下降, 提示 ROS 造成的氧化损伤破坏了线粒体稳态, 并导致 MMP 的改变。

JPXT 干预后, 细胞色素 C 氧化酶活性有所降低, 导致呼吸链断裂, 不仅使 ATP 水平降低, 还会引起 ROS 的过度生成^[21]。Metacaspase 是在真菌中参与凋亡途径的半胱氨酸依赖型蛋白酶^[12], caspase 受体

FITC-FMK-VAD 可以用来检测真菌中 metacaspase 酶活性^[22]。JPXT 处理后, *T. rubrum* metacaspase 酶也被激活。本研究进行了 AnnexinV-FITC/PI 染色, 观察到 JPXT 干预后的 *T. rubrum* 细胞膜 PS 从细胞膜内侧翻转至表面, 表明菌体凋亡。流式细胞仪检测结果也进一步证实, JPXT 可提高 *T. rubrum* 细胞凋亡率。由于 *T. rubrum* 具有较厚的细胞壁, 因此在进行 AnnexinV-FITC/PI 染色及凋亡检测时需先采用脱壁促进剂将其制成原生质体状态, 再进行相关实验。

综合上述研究结果表明, JPXT 可通过诱导 *T. rubrum* 凋亡来发挥抗真菌作用, 为 JPXT 在临床上治疗 *T. rubrum* 引起的真菌感染提供了重要的实验依据, 进一步丰富了中药抗真菌感染的科学理论, 也为药物以诱导细胞凋亡的方式治疗真菌感染性疾病带来新的启发。

参考文献

- [1] MARTINEZ DA, OLIVER BG, GRÄSER Y, GOLDBERG JM, LI WJ, MARTINEZ-ROSSI NM, MONOD M, SHELEST E, BARTON RC, BIRCH E, BRAKHAGE AA, CHEN ZH, GURR SJ, HEIMAN D, HEITMAN J, KOSTI I, ROSSI A, SAIF S, SAMALOVA M, SAUNDERS CW, et al. Comparative genome analysis of *Trichophyton rubrum* and related dermatophytes reveals candidate genes involved in infection[J]. mBio, 2012, 3(5): e00259-e00212.
- [2] EBERT A, MONOD M, SALAMIN K, BURMESTER A, UHRLAß S, WIEGAND C, HIPLER UC, KRÜGER C, KOCH D, WITTIG F, VERMA SB, SINGAL A, GUPTA S, VASANI R, SARASWAT A, MADHU R, PANDA S, DAS A, KURA MM, KUMAR A, et al. Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: a multicentre study[J]. Mycoses, 2020, 63(7): 717-728.
- [3] 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 L, WU M, ZHANG W, LIU XP, LIU TF, SHAO J, WANG TM, WANG CZ. Mechanism of Jingpixian tincture against *Trichophyton rubrum*[J]. Acta

- Microbiologica Sinica*, 2023, 63(3): 1035-1046 (in Chinese).
- [4] AL-DHAHERI RS, DOUGLAS LJ. Apoptosis in *Candida biofilms* exposed to amphotericin B[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2010, 59(Pt 2): 149-157.
- [5] 施高翔, 汪云霞, 冯鑫, 邵菁, 汪天明, 汪长中. 白头翁汤正丁醇提取物诱导白念珠菌生物被膜细胞凋亡[J]. *中国真菌学杂志*, 2017, 12(1): 13-18.
SHI GX, WANG YX, FENG X, SHAO J, WANG TM, WANG CZ. Butyl alcohol extract of Baitouweng decoction induced apoptosis in *Candida albicans* biofilms[J]. *Chinese Journal of Mycology*, 2017, 12(1): 13-18 (in Chinese).
- [6] LEE J, KIM JG, LEE H, LEE TH, KIM KY, KIM H. Antifungal activity of 1,4-dialkoxynaphthalen-2-acyl imidazolium salts by inducing apoptosis of pathogenic *Candida* spp.[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(3): 312.
- [7] KIM H, LEE DG. Naringin-generated ROS promotes mitochondria-mediated apoptosis in *Candida albicans*[J]. *IUBMB Life*, 2021, 73(7): 953-967.
- [8] HILL SM, HAO XX, LIU BD, NYSTRÖM T. Life-span extension by a metacaspase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Science*, 2014, 344(6190): 1389-1392.
- [9] BERKOW EL, LOCKHART SR. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2017, 10: 237-245.
- [10] DOONAN F, COTTER TG. Morphological assessment of apoptosis[J]. *Methods (San Diego, Calif)*, 2008, 44(3): 200-204.
- [11] LIU P, LUO L, GUO JH, LIU HM, WANG BQ, DENG BX, LONG CA, CHENG YJ. Farnesol induces apoptosis and oxidative stress in the fungal pathogen *Penicillium expansum*[J]. *Mycologia*, 2010, 102(2): 311-318.
- [12] TSIATSIANI L, van BREUSEGEM F, GALLOIS P, ZAVIALOV A, LAM E, BOZHKOVA PV. Metacaspases[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2011, 18(8): 1279-1288.
- [13] ELMORE S. Apoptosis: a review of programmed cell death[J]. *Toxicologic Pathology*, 2007, 35(4): 495-516.
- [14] KWUN MS, LEE HJ, LEE DG. β -amyrin-induced apoptosis in *Candida albicans* triggered by calcium[J]. *Fungal Biology*, 2021, 125(8): 630-636.
- [15] 张颖, 张晋巧, 甄莉. 红色毛癣菌对三种抗真菌外用药物敏感性的研究[J]. *中国现代医药杂志*, 2016, 18(12): 35-37.
ZHANG Y, ZHANG JQ, ZHEN L. The sensibility of the three kinds of outside the antifungal drugs for *Trichophyton rubrum*[J]. *Modern Medicine Journal of China*, 2016, 18(12): 35-37 (in Chinese).
- [16] AHMAD NASROLLAHI S, FATTAHI A, NAEIMIFAR A, LOTFALI E, FIROOZ A, KHAMESIPOOR A, SKANDARI SE, MIRAMIN MOHAMMADI A. The *in vitro* effect of nanoliposomal amphotericin B against two clinically important dermatophytes[J]. *International Journal of Dermatology*, 2022, 61(4): 383-389.
- [17] WANG X. The expanding role of mitochondria in apoptosis[J]. *Genes & Development*, 2001, 15(22): 2922-2933.
- [18] COLOMBINI M. Ceramide channels and their role in mitochondria-mediated apoptosis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010, 1797(6/7): 1239-1244.
- [19] BRAS M, QUEENAN B, SUSIN SA. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2005, 70(2): 231-239.
- [20] ZOROV DB, JUHASZOVA M, SOLLOTT SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release[J]. *Physiological Reviews*, 2014, 94(3): 909-950.
- [21] MICK DU, FOX TD, REHLING P. Inventory control: cytochrome C oxidase assembly regulates mitochondrial translation[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2011, 12(1): 14-20.
- [22] SHLEZINGER N, IRMER H, DHINGRA S, BEATTIE SR, CRAMER RA, BRAUS GH, SHARON A, HOHL TM. Sterilizing immunity in the lung relies on targeting fungal apoptosis-like programmed cell death[J]. *Science*, 2017, 357(6355): 1037-1041.



汪长中, 安徽中医药大学教授, 博士研究生导师。1987年毕业于安徽医科大学医学专业, 获学士学位; 1998年毕业于北京大学医学部中西医结合专业, 获硕士学位。1998年至今在安徽中医药大学中西医结合学院(生命科学学院)微生物学与免疫学教研室任教, 从事微生物学与免疫学的教学与科研工作。主要研究方向: 中药抗真菌感染研究; 中药抗生物膜研究; 中药免疫调节作用研究。主持完成国家自然科学基金面上项目3项、省厅级科研项目7项。主持安徽省省级精品资源共享课《医学微生物学》, 获安徽省科学技术奖1项。副主编教材2部, 参编教材4部, 发表学术论文150余篇。