

1543-1553.

[11]

王化强, 吕沈源. 慢性阻塞性肺疾病患者血清 IL-6 与 FEV1 相关性研究[J]. 中国医药科学, 2011, 1(11): 114-115.

[12]

杜海莲, 岳红梅. 慢性阻塞性肺疾病患者血清 IL-17、IL-6、IL-8、CRP、TNF- $\alpha$  的变化及其相关性[J]. 昆明医科大学学报, 2015, 36(9): 95-97.

[13]

张淑利. 慢性阻塞性肺疾病患者 PCT、hs-CRP 及 TNF- $\alpha$  表达水平与肺功能的相关性研究[J]. 世界临床医学, 2016(18): 25.

[14]

邓礼洪. 乌司他丁对重症肺炎患者肺表面活性蛋白、基质金属蛋白酶及其组织抑制剂的影响[J]. 海南医学院学报, 2016, 22(3): 243-244; 247.

[15]

Taha R, Olivenstein R, Utsumi T, *et al.* Prostaglandin H synthase 2 expression in airway cells from patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 161(2 Pt 1): 636-640.

[16]

刘印红, 陈明伟, 张 扬, 等. 乌司他丁对慢性阻塞性肺疾病患者血清 COX-2、PLA-2 及肺功能的影响[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(31): 6069-6071; 6059.

[17]

景红娟, 汪长东, 宋 苏, 等. 麻黄碱对支气管平滑肌细

[18]

胞增殖的影响[J]. 生物学杂志, 2008, 25(3): 27-29.

[19]

文洪林, 桂 红, 贺 红. 丹皮、白芍对牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌的体外抑菌活性研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2012, 11(18): 1469; 1471.

[20]

刘 蓉, 何 婷, 曾 南, 等. 桂枝挥发油及桂皮醛抗流感病毒的机制研究[J]. 中草药, 2013, 44(11): 1460-1464.

[21]

叶 冰, 却 翎, 包·照日格图, 等. 干姜-细辛-五味子药对的止咳、抗炎作用研究[J]. 四川中医, 2010, 28(11): 61-62.

[22]

刘 晶, 孟 莉, 袁子民, 等. 细辛止咳平喘药效物质基础初步研究[J]. 医药导报, 2012, 31(11): 1412-1415.

[23]

陈 花, 许光兰. 小青龙汤治疗慢性阻塞性肺疾病急性发作期临床疗效的 Meta 分析[J]. 湖南中医杂志, 2016, 32(12): 141-143; 173.

[24]

吴亦文, 刘 涛, 刘四平. 小青龙汤对慢性阻塞性肺疾病急性发作期患者肺功能及血清细胞因子的影响[J]. 中国医学创新, 2015, 12(1): 109-111.

[25]

中华医学会呼吸病学会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013 年修订版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2013, 36(4): 255-264; 3.

## 二氢槲皮素联合两性霉素 B 对白色念珠菌生物被膜的干预作用

刘冬梅, 罗 劲\*, 孔晋亮, 王 可, 刘丽华  
(广西医科大学第一附属医院呼吸与危重症医学科, 广西南宁 530021)

**摘要:** **目的** 通过建立体外白色念珠菌生物被膜模型, 研究二氢槲皮素联合两性霉素 B 对白色念珠菌生物被膜的干预作用及机制。**方法** 采用肉汤稀释法测定二氢槲皮素、两性霉素 B 对白色念珠菌悬浮菌最低抑菌浓度 (MIC), 结晶紫定量法测定二氢槲皮素联合两性霉素 B 对白色念珠菌生物被膜的清除作用, 荧光显微镜下观察二氢槲皮素、两性霉素 B 及两药联合对白色念珠菌生物被膜结构的影响, 通过测定生物被膜细胞表面疏水性探讨药物作用机制。**结果** 二氢槲皮素、两性霉素 B 对白色念珠菌悬浮菌的 MIC 分别为 >1 024、16  $\mu\text{g/mL}$ , 两药联合对白色念珠菌悬浮菌的 MIC 为 512、8  $\mu\text{g/mL}$ , 分级抑菌浓度指数 (FICI) 值为 1。两药联用组与阳性对照组比较, 生物被膜胞外基质明显减少, 活菌比例下降, 细胞表面疏水性降低, 菌丝粘附于载体数减少。**结论** 二氢槲皮素联合两性霉素 B 可以促进白色念珠菌生物被膜的清除, 二氢槲皮素通过减少白色念珠菌生物被膜粘附及其胞外基质甘露糖以增强两性霉素 B 的杀菌作用。

**关键词:** 二氢槲皮素; 两性霉素 B; 白色念珠菌; 生物被膜; 疏水性

**中图分类号:** R285.5      **文献标志码:** B      **文章编号:** 1001-1528(2022)12-4040-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.12.052

**收稿日期:** 2021-11-18  
**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (81760743, 82104499, 82160783); 广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题资助 (Z20200825); 广西壮族自治区卫生健康委员会重点实验室项目 (ZZH2020004) 及其子课题 (GXHCFM2021002); 广西卫生适宜技术推广广铜绿假单胞菌慢性感染与群体感应系统及毒力基因多样性相关研究 (S2019090); 广西医科大学第一附属医院重点实验室培育项目 (YYZS2020006)  
**作者简介:** 刘冬梅 (1995—), 女, 研究生, 研究方向为呼吸系统感染。E-mail: 938533356@ qq.com  
\* **通信作者:** 罗 劲 (1989—), 男, 博士, 主治医师, 研究方向为呼吸系统感染性疾病发病机制。E-mail: 66875350@ qq.com

白色念珠菌是一种常见的病原体，尤其是在免疫功能低下的群体中会引起严重的感染。在我国医院内侵袭性念珠菌病分离菌株中，白色念珠菌最常见（44.9%~49.9%）<sup>[1-2]</sup>，其中重症监护室（ICU）发病率比其他病房高约 10 倍，这与广谱抗生素的使用、ICU 住院时间长、免疫抑制剂或激素及血管内医疗器械的使用有关<sup>[3]</sup>。白色念珠菌还是医用材料相关感染的主要致病真菌之一，包括中心静脉导管、起搏器、机械心脏瓣膜、关节假体和假牙<sup>[4]</sup>。白色念珠菌形成生物被膜导致了其对抗真菌药物的耐受性增加<sup>[5-6]</sup>，其中生物被膜胞外基质重要成分  $\beta$ -1, 3 葡聚糖阻碍了唑类药物氟康唑的杀真菌作用<sup>[7]</sup>。因此，临床上迫切需要寻找有效的抗白色念珠菌生物被膜药物。

二氢槲皮素，又名紫杉叶素，是从落叶松、水飞蓟等植物中提取出来的生物活性成分，是一种具有抗氧化<sup>[8]</sup>、抗肿瘤<sup>[9]</sup>、抗病毒的二氢黄酮醇类化合物。现有研究表明，类黄酮物质具有抗真菌作用，其机制包括质膜破坏和抑制真菌壁形成、真菌分裂、RNA 和蛋白质合成以及外排泵系统<sup>[10]</sup>。二氢槲皮素也是类黄酮物质，但其抗真菌的作用以及机制尚无研究报道。

1 材料

白色念珠菌 SC5314（第二军医大学药学院姜远英教授馈赠）。二氢槲皮素（纯度 98%，批号 RM1074RP201216，成都麦德生科技有限公司）。酵母浸出粉葡萄糖液体培养基（YPD，1% 酵母提取物、2% 蛋白胨和 2% 葡萄糖）、二甲基亚砜（DMSO）、含有 5% 胎牛血清 RPMI 1640 培养基（北京索莱宝科技有限公司）；两性霉素 B、结晶紫粉末（美国 Sigma 公司）；正辛烷（山东力昂新材料科技有限公司）。酶标仪（美国 Thermo 公司）；24/96 孔板（广州洁特生物过滤股份有限公司）；TCS SP8 型共聚焦显微镜（德国徕卡公司）。

2 方法

2.1 二氢槲皮素及两性霉素 B 最低抑菌浓度（MIC）测定 取-80℃冻存的白色念珠菌复苏 24 h，挑取平板上单个菌落接种到 YPD 培养基，37℃摇床孵育 16 h。根据临床和实验室标准协会的肉汤微量稀释方案，用 YPD 培养基稀释计数浮游菌浓度为  $1 \times 10^3$  CFU/mL，二氢槲皮素及两性霉素 B 药物分别用 DMSO 溶解，并用 YPD 培养基稀释后加入到含 100  $\mu$ L 白色念珠菌菌液的 96 孔培养板中，最终质量浓度分别为 64~8 192、1~128  $\mu$ g/mL，总体积为 200  $\mu$ L，另设等体积仅含菌液的 YPD 培养基作为阳性对照组，等体积不含菌液及药物的 YPD 培养基作为阴性对照组，37℃培养 24 h 后判定结果，肉眼可见清液孔的药物浓度为 MIC。每种药物浓度设 3 个平行实验，3 次重复实验。

2.2 二氢槲皮素及两性霉素 B 分级抑菌浓度指数（FICI）测定 联合抑制实验前将药物浓度及菌液按“2.1”项下方法稀释后，将 50  $\mu$ L 不同质量浓度药物按照棋盘法先后加入 96 孔板中，再加入制备好的菌液 100  $\mu$ L，阳性对照及阴性对照组处理同“2.1”项，37℃培养 24 h。读取结果

并记录单药 MIC，选择联合作用效果最佳的各自药物浓度（MIC<sub>二氢槲皮素联用</sub>和 MIC<sub>两性霉素B联用</sub>），计算分级抑菌浓度指数（FICI）， $FICI = (MIC_{二氢槲皮素联用} / MIC_{二氢槲皮素单药}) + (MIC_{两性霉素B联用} / MIC_{两性霉素B单药})$ 。FICI<0.5 或 FICI $\leq$ 0.5 为协同作用，0.5<FICI $\leq$ 1.0 为相加作用，1<FICI $\leq$ 2 为无关作用，FICI>2 为拮抗作用。

2.3 二氢槲皮素联合两性霉素 B 对生物被膜的清除作用 将 200  $\mu$ L 含  $1 \times 10^6$  CFU/mL 白色念珠菌的 RPMI 1640 培养基加入 96 孔板中孵育 24 h，直到形成生物被膜，然后轻轻吸弃上清液，每孔用 PBS 轻轻冲洗 3 次，联合用药组采用棋盘法先后加入 100  $\mu$ L 不同质量浓度两性霉素 B（128、64、32、16、8、4、0  $\mu$ g/mL）、100  $\mu$ L 不同质量浓度二氢槲皮素（8 192、4 096、0  $\mu$ g/mL），总体积为 200  $\mu$ L，另设不含白色念珠菌生物被膜及药物的 RPMI 1640 培养基作为阴性对照组，37℃下培养 24 h，各孔弃去培养液后用双蒸水轻轻清洗 3 次，晾干后加入 200  $\mu$ L 0.1% 结晶紫染色 15 min，双蒸水冲洗多余的结晶紫至清亮后晾干，加入 220  $\mu$ L 95% 乙醇溶解 10 min，用酶标仪检测 590 nm 波长处光密度（OD）值，每组设 3 个平行实验，重复 3 次。

2.4 二氢槲皮素和两性霉素 B 对生物被膜体外抑制作用的形态学观察 将 2 mL 含  $1 \times 10^6$  CFU/mL 白色念珠菌的 RPMI 1640 培养基加入含 PVC 载体的 24 孔培养板中孵育 24 h，形成生物被膜后吸弃上清液，双蒸水轻轻清洗去浮游菌，并分别加入新鲜 RPMI 1640 培养基（阳性对照组）、32  $\mu$ g/mL 两性霉素 B（两性霉素 B 组）、4 096  $\mu$ g/mL 二氢槲皮素（二氢槲皮素组）、32  $\mu$ g/mL 两性霉素 B 联合 4 096  $\mu$ g/mL 二氢槲皮素（联合用药组），37℃下继续培养 24 h 后，将有生物被膜的载体轻轻清洗后进行染色观察，以共聚焦显微镜观察二氢槲皮素与两性霉素 B 单用及联合用药对白色念珠菌生物被膜的干预效果。

2.4.1 生物被膜胞外基质观察 用 ECA/ConA 进行染色，200  $\mu$ g/mL ECA 与 ConA 没过载体，避光染色 90 min，用 PBS 漂洗多余染料，于共聚焦显微镜下观察生物被膜胞外基质情况<sup>[11]</sup>。

2.4.2 生物被膜死活菌比例观察 将碘化丙啶及 Syto-9 荧光染料按 1：1 比例配置好后用灭菌生理盐水 1：500 稀释，没过载体避光染色 30 min，用 PBS 漂洗去掉多余染料，于共聚焦显微镜下观察生物被膜内死活菌比例<sup>[11]</sup>。

2.4.3 真菌形态染色观察 用 Calcofluor White 染色，滴加 50  $\mu$ L 卡尔科弗卢尔荧光增白剂和 50  $\mu$ L 10% 氢氧化钾，没过载体避光染色 1 min，于共聚焦显微镜下生物被膜真菌形态。

2.5 细胞表面疏水性实验（CSH） 按“2.4”项下方法分组并进行干预，取载体上形成的生物被膜在 YPD 培养基中制备白色念珠菌悬液，吸取其中 1.2 mL 悬液移至干净的玻璃管中，并用 0.3 mL 正辛烷覆盖，将混合物涡旋震荡 3 min，静置 15 min 等待两相分离后，于 600 nm 波长测定下层水相（B）OD 值，以未用正辛烷覆盖作为对照（A），测定 OD 值，得到细胞表面疏水性 =  $(OD_A - OD_B) / OD_A \times$

100%<sup>[12]</sup>，每组重复 3 次，取平均值。

2.6 统计学分析 通过 SPSS 22.0 软件进行处理，计量资料以 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示，组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 二氢槲皮素、两性霉素 B 单药及联合用药对白色念珠菌浮游菌的 MIC 及 FICI 值 二氢槲皮素、两性霉素 B 单药及联合用药 MIC 如表 1 所示，FICI 值为 1，提示二氢槲皮素与两性霉素 B 对抑制白色念珠菌浮游菌具有相加作用。

表 1 二氢槲皮素、两性霉素 B 单药及联合用药对白色念珠菌浮游菌的 MIC 值 (μg/mL)

| 药物     | 联合用药前 MIC | 联合用药后 MIC |
|--------|-----------|-----------|
| 二氢槲皮素  | >1 024    | 512       |
| 两性霉素 B | 16        | 8         |

3.2 二氢槲皮素联合两性霉素 B 对白色念珠菌生物被膜的清除作用 如图 1 所示，4 096 μg/mL 二氢槲皮素联合 32 μg/mL 两性霉素 B 组  $OD_{590}$  值最低，提示该组合对白色念珠菌生物被膜清除能力最强。

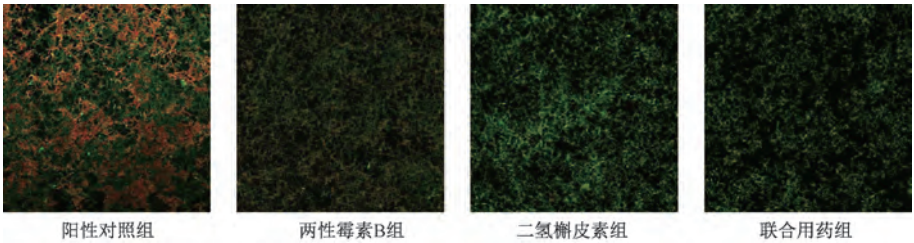


图 2 各组白色念珠菌生物被膜 ECA/ConA 染色图 (×20)

3.3.2 生物被膜死活菌比例观察 如图 3 所示，生物被膜经 PI 及 Syto-9 染色，活菌标记为绿色，死菌标记为红色，两者重叠时显示出橙色荧光。阳性对照组可见绿色的菌丝

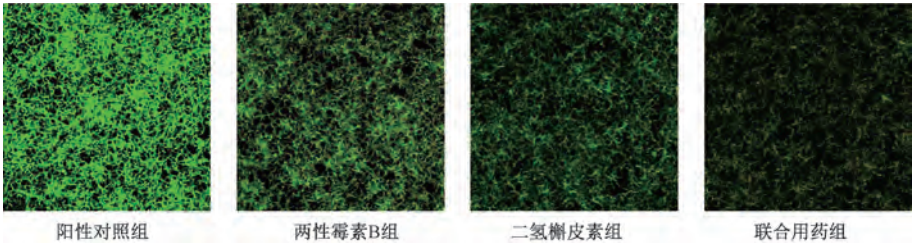


图 3 各组白色念珠菌生物被膜 PI/Syto-9 染色图 (×20)

3.3.3 真菌形态观察 如图 4 所示，Calcofluor White 与真菌细胞壁中的纤维素和壳多糖结合标记为蓝色荧光。阳性对照组可见形成三维立体结构的白色念珠菌生物被膜；与阳性对照组比较，二氢槲皮素、两性霉素 B 单独用药组生物被膜菌丝密度均减少，联合用药组菌丝密度减少得更明显且变短。

3.4 二氢槲皮素及两性霉素 B 对白色念珠菌细胞表面疏水性的影响 如图 5 所示，与阳性对照组比较，两性霉素 B、二氢槲皮素单独用药组和联合用药组均能降低白色念珠菌

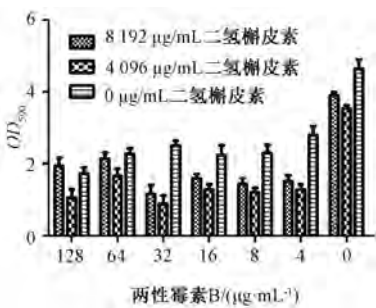


图 1 二氢槲皮素联合两性霉素 B 对白色念珠菌生物被膜的清除作用

3.3 二氢槲皮素和两性霉素 B 对生物被膜体外抑制作用的形态学观察

3.3.1 生物被膜胞外基质观察 如图 2 所示，ECA 染色半乳糖及半乳糖标记为绿色，ConA 染色甘露糖标记为红色，当两者重叠可显示橙色荧光。阳性对照组可见稠厚浓密的白色念珠菌生物被膜胞外基质；与阳性对照组比较，二氢槲皮素、两性霉素 B 单独用药组生物被膜的胞外基质均减少，联合用药组的胞外基质减少得更明显。

浓密交错；与阳性对照组比较，二氢槲皮素、两性霉素 B 单独用药组活菌比例均减少，联合用药组活菌减少得更明显。

细胞表面疏水性 ( $P<0.05$ )，分别为 83%、61%、45%。

4 讨论

已有报道证明白色念珠菌经 24~48 h 即可形成成熟生物被膜，生物被膜的三维立体结构是由平行和交错的菌丝及通道构成，菌丝周围包裹有胞外基质，使得白色念珠菌对抗生素的抗性增高<sup>[6]</sup>。研究表明，大多数黄酮类化合物能一定程度上抑制氟康唑敏感的白色念珠菌浮游菌的生长，对氟康唑耐药的白色念珠菌临床分离株和生物被膜效果欠佳，但他们与氟康唑联合使用后可在清除其生物被膜方面有

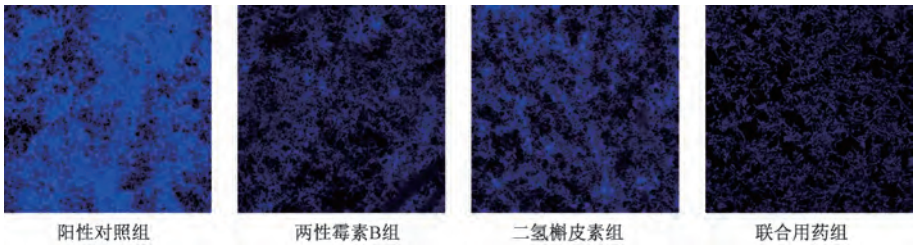
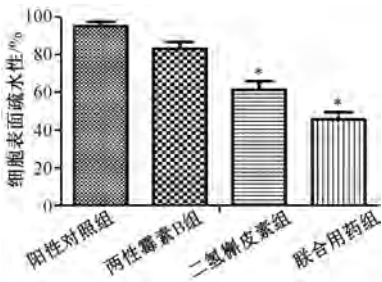


图 4 各组白色念珠菌生物被膜 Calcofluor White 染色图 (×20)



注：与阳性对照组比较，\* $P<0.05$ 。

图 5 各组白色念珠菌细胞表面疏水性比较

较好的效果<sup>[13]</sup>。Shevelev 等<sup>[14]</sup>证实二氢槲皮素对体内感染金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌以及白色念珠菌的伤口愈合有促进作用；Mishra 等<sup>[15]</sup>认为二氢槲皮素可以抑制白色念珠菌的菌丝形成。本实验结果显示，二氢槲皮素与两性霉素 B 联合使用对清除白色念珠菌浮游菌产生相加作用，这与类黄酮表没食子儿茶素没食子酸酯和氟康唑联用后对耐氟康唑的热带念珠菌凋亡有协同作用相似<sup>[16]</sup>。

生物被膜和浮游菌是白色念珠菌两种不同的存在形式，本研究基于预实验结果选择 4 096、8 192  $\mu\text{g}/\text{mL}$  二氢槲皮素联合两性霉素 B 对白色念珠菌生物被膜的清除作用进行探究，结晶紫染色结果表明，4 096  $\mu\text{g}/\text{mL}$  二氢槲皮素联合 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  两性霉素 B 组对白色念珠菌生物被膜清除能力最强，并选择此浓度进行形态学观察。ECA/ConA 染色结果提示，白色念珠菌生物被膜的胞外多糖主要以甘露聚糖为主链，有报道还发现生物被膜甘露聚糖合成受损可增加其对药物的敏感性<sup>[17]</sup>；二氢槲皮素可明显减少生物被膜胞外基质的甘露糖成分，提示二氢槲皮素有抑制胞外基质甘露糖的作用，与两性霉素 B 联合用药后胞外基质、活菌比例及菌丝密度均较单独用药组减少。此外，有研究发现白色念珠菌生物被膜形成的定植过程与粘附相关，而高细胞表面疏水性是粘附的关键因素之一<sup>[18]</sup>。本研究结果表明，二氢槲皮素单用时白色念珠菌生物被膜相对疏水性减少，联合两性霉素 B 作用后疏水性进一步减少，表明白色念珠菌细胞的粘附性减弱，提示二氢槲皮素可能通过减少细胞表面疏水性，抑制真菌粘附在 PVC 表面从而增强白色念珠菌对两性霉素 B 的易感性。因此，二氢槲皮素的抗生物被膜作用与其抗粘附及抗胞外基质甘露糖的活性有关。

目前的抗真菌药有多烯类、唑类、棘白霉素类等，而白色念珠菌对唑类和棘白菌素的耐药性增加是临床上需要

解决的问题<sup>[19]</sup>，其中生物被膜的抗性增高更容易引起耐药。有研究发现，将抗真菌药与增效剂组合以增强其抗生物被膜活性，是抗生物被膜治疗的新颖方法<sup>[20]</sup>。两性霉素 B 具有相当大的剂量依赖性肾毒性，而安全性更高的脂质体两性霉素 B 价格昂贵，若两性霉素 B 可以与黄酮类化合物一起以较低剂量使用能达到清除生物被膜效果，则有希望达到降低肾毒性和降低成本的目的。本研究结果提示，两性霉素 B 联合二氢槲皮素作用于白色念珠菌生物被膜将可能成为抗真菌感染的新组合疗法。

参考文献：

[ 1 ] Xiao M, Sun Z Y, Kang M, *et al.* Five-year national surveillance of invasive candidiasis: Species distribution and azole susceptibility from the China Hospital Invasive Fungal Surveillance Net ( CHIF-NET) Study [ J ]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56( 7 ): e00577-e00518.

[ 2 ] Guo L N, Yu S Y, Xiao M, *et al.* Species distribution and antifungal susceptibility of invasive candidiasis: A 2016-2017 multicenter surveillance study in Beijing, China[ J ]. *Infect Drug Resist*, 2020, 13: 2443-2452.

[ 3 ] Pappas P G, Lionakis M S, Arendrup M C, *et al.* Invasive candidiasis[ J ]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4: 18026.

[ 4 ] Kojic E M, Darouiche R O. *Candida* infections of medical devices[ J ]. *Clin Microbiol Rev*, 2004, 17( 2 ): 255-267.

[ 5 ] 梁嘉伟, 白 丽. 白色念珠菌生物被膜及其相关治疗方法研究进展[ J ]. *生物化工*, 2021, 7( 3 ): 157-159; 163.

[ 6 ] Rajendran R, Sherry L, Nile C J, *et al.* Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection-Scotland, 2012-2013[ J ]. *Clin Microbiol Infect*, 2016, 22( 1 ): 87-93.

[ 7 ] Nett J E, Sanchez H, Cain M T, *et al.* Genetic basis of *Candida* biofilm resistance due to drug-sequestering matrix glucan[ J ]. *J Infect Dis*, 2010, 202( 1 ): 171-175.

[ 8 ] Kuang H X, Tang Z Q, Zhang C Y, *et al.* Taxifolin activates the Nrf2 anti-oxidative stress pathway in mouse skin epidermal JB6 P+ cells through epigenetic modifications[ J ]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18( 7 ): 1546.

[ 9 ] Chen H J, Chung Y L, Li C Y, *et al.* Taxifolin resensitizes multidrug resistance cancer cells *via* uncompetitive inhibition of P-glycoprotein function[ J ]. *Molecules*, 2018, 23( 12 ): 3055.

[ 10 ] Aboody M S A, Mickymaray S. Anti-fungal efficacy and mechanisms of flavonoids [ J ]. *Antibiotics ( Basel )*, 2020, 9

(2): 45.

[ 11 ] 张瑾钰, 陈一强, 孔晋亮, 等. 绿原酸、异绿原酸对烟曲霉生物膜抑制作用的体外研究[ J ]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(4): 327-333.

[ 12 ] Cao Y, Dai B, Wang Y, *et al.* *In vitro* activity of baicalein against *Candida albicans* biofilms[ J ]. *Int J Antimicrob Agents*, 2008, 32(1): 73-77.

[ 13 ] Singh B N, Upreti D K, Singh B R, *et al.* Quercetin sensitizes fluconazole-resistant *Candida albicans* to induce apoptotic cell death by modulating quorum sensing[ J ]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(4): 2153-2168.

[ 14 ] Shevelev A B, La Porta N, Isakova E P, *et al.* *In vivo* antimicrobial and wound-healing activity of resveratrol, dihydroquercetin, and dihydromyricetin against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans*[ J ]. *Pathogens*, 2020, 9(4): 296.

[ 15 ] Mishra S, Singh S, Misra K. Restraining pathogenicity in *Candida albicans* by taxifolin as an inhibitor of Ras1-pka pathway[ J ]. *Mycopathologia*, 2017, 182(11-12): 953-965.

[ 16 ] da Silva C R, de Andrade Neto J B, de Sousa Campos R, *et al.* Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin gallate with fluconazole induces apoptosis in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole[ J ]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(3): 1468-1478.

[ 17 ] Dominguez E, Zarnowski R, Sanchez H, *et al.* Conservation and divergence in the *Candida Species* biofilm matrix mannan-glucan complex structure, function, and genetic control[ J ]. *mBio*, 2018, 9(2): e00451-e00418.

[ 18 ] Dabiri S, Shams-Ghahfarokhi M, Razzaghi-Abyaneh M. Comparative analysis of proteinase, phospholipase, hydrophobicity and biofilm forming ability in *Candida* species isolated from clinical specimens[ J ]. *J Mycol Med*, 2018, 28(3): 437-442.

[ 19 ] Pristov K E, Ghannoum M A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide[ J ]. *Clin Microbiol Infect*, 2019, 25(7): 792-798.

[ 20 ] Tits J, Cammue B P A, Thevissen K. Combination therapy to treat fungal biofilm-based infections[ J ]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22): 8873.

## 原花青素抗 UVB 诱导皮肤成纤维细胞凋亡和氧化损伤的影响

饶美荣, 曾 芬, 钟 咪, 张佳音  
(江南大学附属医院皮肤科, 江苏 无锡 214000)

**摘要:** **目的** 研究原花青素对中波紫外线 (UVB) 诱导皮肤成纤维细胞凋亡和氧化损伤的影响。**方法** 分离培养人皮肤成纤维细胞, 分成对照组 (不做处理), UVB 组 (UVB 照射), 原花青素低、中、高剂量组 (20、40、80  $\mu\text{g/mL}$  原花青素处理, UVB 照射), 原花青素中剂量+XAV939 组 (40  $\mu\text{g/mL}$  原花青素+1  $\mu\text{mol/L}$  XAV939 处理, UVB 照射)。CCK-8 实验检测细胞增殖能力, 流式细胞术检测细胞凋亡能力, 黄嘌呤氧化法检测细胞 SOD 活性, 硫代巴比妥酸法检测 MDA 水平, 比色法检测 GSH-Px 活性, ELISA 法检测培养液上清 MMP-1、MMP-9 水平, Western blot 法检测 Bax、Bcl-2、Wnt1、 $\beta$ -catenin 蛋白表达。**结果** 与对照组比较, UVB 组细胞存活率, SOD、GSH-Px 活性, Bcl-2、Wnt1、 $\beta$ -catenin 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ ), 凋亡率, Bax 蛋白表达, MDA、MMP-1、MMP-9 水平升高 ( $P<0.05$ ); 与 UVB 组比较, 原花青素各剂量组细胞上述指标均有改善 ( $P<0.05$ ), 并呈剂量依赖性; XAV939 则逆转了原花青素对 UVB 诱导皮肤成纤维细胞的保护作用 ( $P<0.05$ )。**结论** 原花青素通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制 UVB 诱导皮肤成纤维细胞凋亡和氧化损伤。

**关键词:** 原花青素; 中波紫外线 (UVB); 皮肤成纤维细胞; 凋亡; 氧化损伤; Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路

**中图分类号:** R285.5      **文献标志码:** B      **文章编号:** 1001-1528(2022)12-4044-06

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.12.053

皮肤是人体和外界环境直接接触的器官, 经过紫外线照射后皮肤组织会出现光老化现象<sup>[1]</sup>。中波紫外线 (UVB) 能够穿过表皮损伤真皮, 是自然界中导致皮肤光损伤以及光老化的重要原因, 皮肤成纤维细胞是其主要的靶细胞<sup>[2]</sup>。皮肤经过紫外线照射后能够引起氧化损伤, 诱导细胞凋亡, 进而造成皮肤损伤, 促进皮肤光老化<sup>[3]</sup>。原

花青素是一种缩合单宁, 在各类中药的皮、核、种子中存在, 具有抗炎、抗过敏、抗氧化等功效, 对肿瘤和心血管系统疾病有治疗功效<sup>[4]</sup>。原花青素含有数个酚性羟基, 其在机体内被氧化产生氢离子, 这些氢离子与自由基或氧化物结合, 从而避免脂质发生氧化, 改善氧化损伤<sup>[5]</sup>。原花青素能够改善长波紫外线诱导的皮肤成纤维细胞降解细胞