

不同浓度二甲基亚砜对白色念珠菌的抑菌作用研究[△]

崔光富^{1*}, 刘瑞琪¹, 郭巧梅¹, 崔晶晶¹, 贺晓丹², 郭庆合¹, 贺志安^{1#} (1. 新乡医学院医学检验系, 河南新乡 453000; 2. 新乡医学院药学院, 河南新乡 453000)

中图分类号 R914.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)05-0407-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.05.09

摘要 目的: 探讨不同浓度二甲基亚砜(DMSO)对白色念珠菌的抑菌作用。方法: 用稀释法在含有0.14、0.42、0.70、0.99、1.27、1.55 mol/L 6个梯度DMSO的培养基中培养白色念珠菌24 h; 加入DMSO作为阳性对照组; 加入沙保罗液体培养基作为阴性对照组。计算白色念珠菌在不同浓度DMSO中的生长抑制率和芽管萌发抑制率。结果: DMSO浓度为0.14 mol/L时, 白色念珠菌生长活跃, 生长抑制率和芽管萌发抑制率与相应的阴性对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$); 浓度 ≥ 0.42 mol/L时, 2~4 h时90%最小抑菌浓度(MIC₉₀)为0.70 mol/L, 芽管萌发MIC₉₀为0.70 mol/L; 浓度达到1.55 mol/L时, 无活菌体存在(生长抑制率达100%)。DMSO浓度 > 0.42 mol/L时, 生长抑制率和芽管萌发抑制率与各自的阴性对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论: DMSO浓度 ≥ 0.42 mol/L时对白色念珠菌生长、芽管萌发具有较强的抑制作用, 且随着浓度的增加和时间的延长其作用效果越明显。

关键词 二甲基亚砜; 白色念珠菌; 抑菌作用; 芽管萌发

Inhibitory Activity of Different Concentrations of Dimethyl Sulfoxide against *Candida albicans*

CUI Guang-fu¹, LIU Rui-qi¹, GUO Qiao-mei¹, CUI Jing-jing¹, HE Xiao-dan², GUO Qing-he¹, HE Zhi-an¹ (1. Dept. of Medical Laboratory, Xinxiang Medical University, Henan Xinxiang 453000, China; 2. Medical of Pharmacy College, Xinxiang Medical University, Henan Xinxiang 453000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the inhibitory activity of different concentrations of dimethyl sulfoxide (DMSO) on *Candida albicans*. METHODS: *C. albicans* was separately cultured with dilution method in medium containing 0.14, 0.42, 0.70, 0.99, 1.27 and 1.55 mol/L DMSO for 24 h, using DMSO as positive control and liquid sabouraud medium as negative control. The inhibitory rates of *C. albicans* growth in different concentrations of DMSO and germ tube germination were calculated. RESULTS: The growth of *C. albicans* was active when the concentration of DMSO was 0.14 mol/L. There was no significant difference in inhibitory rates of *C. albicans* growth and germ tube germination between 0.14 mol/L group and negative control group ($P > 0.05$); when the concentration of DMSO was higher than 0.42 mol/L, MIC₉₀ of *C. albicans* was 0.70 mol/L during 2-4 h and MIC₉₀ of germ tube germination was 0.70 mol/L; when the concentration of DMSO was up to 1.55 mol/L, there is no bacterial survival (inhibitory rate of bacteria growth reached 100%). When the concentration of DMSO was higher than 0.42 mol/L, there was significant difference in inhibitory rates of *C. albicans* growth and germ tube germination among DMSO medium groups and negative control group ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Higher than 0.42 mol/L, DMSO has a strongly inhibitory activity on the growth and germ tube germination of *C. albicans*. With the concentration and time increasing, DMSO shows more apparent inhibitory effect.

KEY WORDS DMSO; *Candida albicans*; Inhibitory activity; Germ tube germination

二甲基亚砜(DMSO)为含硫有机化合物, 常温下为无色无臭的透明液体, 具有高极性、易与水混溶、渗透性好的特点, 常作为细胞的渗透性保护剂和透皮剂^[1]以及药物溶媒广泛使用。白色念珠菌为临床常见机会性致病菌, 近年来感染率、耐药率均呈上升趋势^[2], 在其药物敏感试验中部分抗真菌药物需借助DMSO助溶^[3], 但是DMSO是否对白色念珠菌的生长有影响, 少有文献报道。为此, 笔者采用不同浓度DMSO对白色念珠菌生长以及芽管萌发的抑制作用进行了考察, 并初步探讨

其抑菌机制。

1 材料

1.1 仪器

电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂); BSC-1100 II B2-X型生物安全柜(山东博科生物产业有限公司); 血球计数板(上海求精生化试剂仪器有限公司)。

1.2 菌株

菌株来源于临床分离株, 经新乡医学院第三附属医院微生物室按《全国临床检验操作规程》(第3版)方法鉴定为白色念珠菌, 于沙保罗固体培养基上至少传代2次后, 用生理盐水调至 $(1\sim 5)\times 10^7$ CFU/ml混匀备用。

1.3 药物与培养基

DMSO(美国Sigma公司, 批号: D5879, AR级); 台盼蓝(美国Sigma公司, 批号: T6146, GR级); 沙保罗培养基(杭州天和微生物试剂有限公司, 批号: HTWSB157, BR级); 葡萄糖(北

△ 基金项目: 河南省教育厅课题项目资助(No.2009B310004); 新乡医学院2010年大学生科研创新项目资助; 新乡医学院2011年大学生科研课题资助项目(No.DXSKYKT2011-017)

* 在校本科生。研究方向: 真菌感染机制。E-mail: cgf0204@163.com

通信作者: 教授, 硕士。研究方向: 药物活性检验。电话: 0373-3029967。E-mail: sx06@xxmu.edu.cn

京奥博星生物技术有限公司,批号:20071120,AR级);胰蛋白酶[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号:TN5250,BR级];各种规格的96孔平底培养板均购自美国Coring Costar公司。

2 方法

2.1 培养基的制备

沙保罗琼脂培养基:含1%胰蛋白酶、4%葡萄糖、1.5%琼脂,蒸馏水配制,pH值(5.6±0.2),灭菌后备用;沙保罗液体培养基:含1%胰蛋白酶、4%葡萄糖,蒸馏水配制,pH值(5.6±0.2),灭菌后备用。

2.2 试验方法

2.2.1 浊度试验。试验组:以无菌程序操作,在沙保罗液体培养基中加入DMSO,配成0.14、0.42、0.70、0.99、1.27、1.55 mol/L 6个浓度备用,各取995 μl加入无菌标记试管中;阳性对照组:加入995 μl DMSO;阴性对照组:加入995 μl沙保罗液体培养基。以上各管分别接种白色念珠菌悬液5 μl,混匀,置35℃培养箱中培养24 h,观察各试管浊度。

2.2.2 DMSO杀菌作用。试验组:以无菌程序操作,在沙保罗液体培养基中加入DMSO,配成0.14、0.42、0.70、0.99、1.27、1.55 mol/L 6个浓度,再分别取480 μl加入无菌标记试管中;阳性对照组:加入480 μl DMSO;阴性对照组:加入480 μl沙保罗液体培养基。各管加入白色念珠菌悬液20 μl。对白色念珠菌染色方法进行改良:每管加入0.4 mg/ml台盼蓝100 μl,置35℃培养箱中培养24 h,湿片观察。死细胞被染成蓝色,活细胞无色透明,折光性较强。分别对各浓度中的蓝染细胞计数,计算死亡率(死亡率=死亡细胞数/本试验组真菌总数×100%)。

2.2.3 时间依赖抑菌作用。照“2.2.1”项下方法操作,用血球计数板按照白细胞计数法分别在2、4、6、8、10、12 h计算细胞生长抑制率(抑制率=试验组真菌浓度/阴性对照组真菌浓度×100%)。

2.2.4 芽管萌发抑制作用。试验组:以无菌程序操作,取6支无菌标记试管分别加入适量0.14、0.42、0.70、0.99、1.27、1.55 mol/L DMSO,再依次加入500 μl血清;阳性对照组:加入110 μl DMSO、500 μl血清;阴性对照组:加入500 μl血清。最后各管加入白色念珠菌悬液20 μl,再用生理盐水将最终体积调整到1 ml。将试管放入培养箱中于36.8℃培养3 h^[4],取出用血球计数板按照白细胞计数法观察并记录正常芽管和受抑制芽管数,芽管长度大于或等于菌体2倍者为正常芽管,2倍以下者为受抑制芽管。芽管萌发抑制率=(试验组受抑制芽管数/该组萌发芽管总数)×100%。

2.3 统计学方法

采用SPSS 16.0统计软件进行统计分析,对数据进行四格表的 χ^2 检验,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 浊度试验

培养24 h后,阴性对照组和浓度为0.14~0.70 mol/L的试验组培养基出现浑浊,且随DMSO浓度升高浊度降低,阳性对照组和浓度为0.99~1.55 mol/L的试验组试管中培养基清澈。

3.2 DMSO杀菌作用

不同浓度DMSO作用24 h后对白色念珠菌的死亡率见图1,阴性对照组细胞抑制情况不明显。

由图1可见,DMSO为0.14 mol/L的培养基中细胞较多,且部分有出芽生殖现象;随着DMSO浓度增加,细胞数目逐渐减少;浓度>0.99 mol/L时杀菌作用迅速增强,蓝染死亡的菌

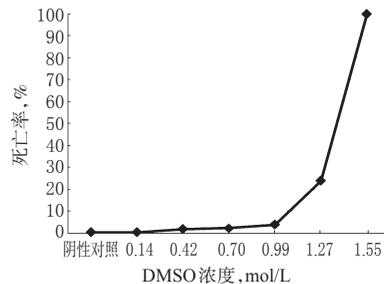


图1 不同浓度DMSO作用24 h对白色念珠菌的死亡率

Fig 1 Mortality rate of different concentrations of DMSO on the growth of *C. albicans* for 24 h

体所占比例增多;浓度达1.27 mol/L时培养基澄清,取该培养物转种至沙保罗琼脂培养基上于35℃培养48 h,偶见单个菌落生长;当浓度达到1.55 mol/L时细胞数极少且呈单个散在分布,经转种无菌落形成,即死亡率为100%。

3.3 时间依赖抑菌作用

不同浓度DMSO作用不同时间对白色念珠菌的生长抑制率见图2。

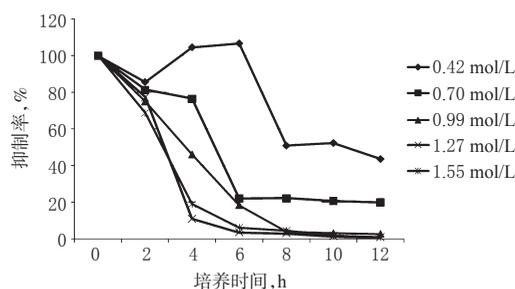


图2 不同浓度DMSO作用不同时间对白色念珠菌的生长抑制率

Fig 2 Inhibitory rate of different concentrations of DMSO on the growth of *C. albicans* after different time

由图2可见,DMSO在0.42~1.55 mol/L、2~4 h即开始对白色念珠菌表现强烈的抑菌活性,其半数最小抑菌浓度(MIC₅₀)为0.42 mol/L,90%最小抑菌浓度(MIC₉₀)为0.70 mol/L。浓度越高,抑菌曲线的斜率越大,即抑菌活性越强;随着浓度增高和时间延长,培养基中真菌浓度就越低,抑菌作用效果明显。浓度为0.14 mol/L时细胞死亡率与阳性对照组比较差异无统计学意义($\chi^2=0.01$, $P>0.05$),故绘制抑菌曲线时未显示该浓度。

3.4 芽管萌发抑制作用

不同浓度DMSO对白色念珠菌芽管萌发的抑制率见图3,阴性对照组芽管萌发抑制情况不明显。

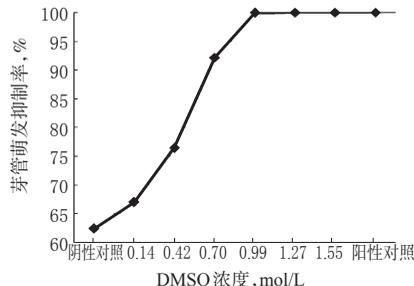


图3 不同浓度DMSO对白色念珠菌芽管萌发的抑制率

Fig 3 Inhibitory rate of different concentrations of DMSO on germ tube germination of *C. albicans*

由图3可见,DMSO浓度在0.42 mol/L以上时对白色念珠菌芽管萌发具有一定的抑制作用,抑制率随浓度的增加而上升;浓度达0.99 mol/L时,芽管萌发抑制率为90%;浓度为1.27 mol/L时,芽管萌发抑制率达100%。但浓度在0.14~0.42 mol/L时与阳性对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),菌体生长情况同阴性对照组。

3.5 统计学分析

DMSO浓度为0.14 mol/L时,对白色念珠菌正常生长无显著影响($\chi^2=0.01$, $P>0.05$);浓度达0.42 mol/L时即有抑菌作用,细胞死亡率与阴性对照组比较差异有统计学意义($\chi^2=6.52$, $P<0.05$),虽然芽管萌发抑制率(76.47%)明显高于相应阴性对照组(62.44%),但差异无统计学意义($\chi^2=0.52$, $P>0.05$);浓度 >0.42 mol/L时,细胞死亡率和芽管萌发抑制率与各自的阴性对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$);浓度 >0.99 mol/L时,白色念珠菌的生长、芽管萌发均受到明显抑制,细胞死亡率明显增加,与阴性对照组比较差异均有明显统计学意义($P<0.05$)。

4 讨论

近年来,由于临床抗菌药物的滥用、大量激素和免疫抑制剂使用以及介入治疗的广泛开展,导致真菌性感染率呈明显上升趋势,尤其以白色念珠菌等机会性致病真菌居多,深部白色念珠菌感染病死率达68.9%^[2]。常用抗真菌药物如氟康唑、伊曲康唑、酮康唑、两性霉素B等以及某些中草药成分,因其水溶性各不相同,常选乙醇、吐温80、DMSO等有机溶剂作为助溶剂,由于DMSO较前两者细胞毒性小被广泛利用^[1]。但本研究发现一定浓度的DMSO具有较强的抗白色念珠菌作用。

4.1 DMSO对药物敏感性试验的影响

研究发现,DMSO <0.42 mol/L时对白色念珠菌死亡率和芽管萌发抑制率无影响,与相应的阴性对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),说明DMSO在非水溶性的药物敏感性试验中可作为有机溶剂使用,但浓度应 <0.42 mol/L。芽管萌发抑制试验是通过检测药物对白色念珠菌芽管萌发的抑制作用来反映真菌对药物的敏感性,培养3 h即可观察结果,具有灵敏度高、检测周期短、操作简便、规范操作及与稀释法抑菌试验相关性好等优点,可以考虑作为白色念珠菌药物敏感性试验的方法。

4.2 DMSO的抑菌和杀菌作用

试验表明DMSO具有抑制芽管萌发、降低生长率和增加死亡率的作用,并且DMSO浓度越高,抑菌作用就越强;相同DMSO浓度,作用时间越长,培养基中真菌浓度越低。因此DMSO对白色念珠菌抑制作用的剂量和时间效应明显。其作用机制可能与以下因素有关:(1)能引起真菌细胞膜蛋白质构象的改变,置换出其中的结合水形成疏松的结构,增强了细胞膜的通透性^[9];(2)诱导细胞色素P₄₅₀含量和活性的改变,使其竞争性抑制对乙酰氨基酚而造成细胞的损伤和死亡^[6-7];(3)改变真菌细胞膜表面蛋白通道活性^[8];(4)降低真菌细胞膜电位、增加细胞膜饱和脂肪酸比例和增加细胞膜通透性^[9],从而使真菌的生长受到抑制,死亡率增加。

4.3 DMSO对白色念珠菌致病性的影响

白色念珠菌具有酵母相和菌丝相,当处于酵母相时,该菌能够与宿主共生,不引起疾病;而当宿主的免疫力降低时,可以萌发出芽管转变为菌丝相致宿主感染。因此芽管萌发和假菌丝产生是诊断白色念珠菌感染的重要依据^[10]。首先,芽管具有特异性抗原,能够增强对组织细胞的黏附性和破坏性^[11];其

次,芽管能通过抑制单核细胞产生白细胞介素12和表达C3d受体来逃避机体的免疫反应^[12-13];再次,形成的假菌丝不仅能够吸收营养,而且能破坏角质层向组织深部生长。所以芽管萌发率也是菌株侵袭力的表现。因此,如果能够抑制白色念珠菌芽管的萌发就能很大程度地减小其对组织的侵袭力。

试验结果显示,当DMSO浓度达0.42 mol/L时培养3 h,芽管萌发即受影响,抑制率76.47%;0.70 mol/L时抑制率已达92.18%;浓度超过0.99 mol/L时,几乎无正常芽管萌发;在1.27~1.55 mol/L的浓度时,无芽管萌发,但生长抑制率并未达到100%,此时白色念珠菌处于酵母相,仅依靠出芽的方式增殖,说明DMSO达到此浓度时能够使白色念珠菌由菌丝相转变为酵母相,即其致病性和侵袭力降低。

综上所述,DMSO不仅能够直接抑制和杀死白色念珠菌,且随着剂量的增加和时间的延长其作用效果也明显;同时还可以抑制白色念珠菌芽管的萌发,阻止芽管对组织的黏附及向组织深部的侵袭,进而降低白色念珠菌的感染力。但是,DMSO发挥其抑菌作用是通过促使细胞凋亡还是将其阻滞于某个细胞周期,是抑制或是干扰基因的合成,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Klaassen. *Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons*[M]. 7th edition. New York: McGraw-Hill, 2008:167.
- [2] 秦启贤. 临床真菌学[M]. 1版. 上海: 复旦大学出版社, 2001: 58.
- [3] 纪宏宇, 魏华, 刘红梅, 等. 伊曲康唑脂质体体外抗真菌作用研究[J]. 中国药房, 2010, 21(41): 3 869.
- [4] 唐书谦, 廖军, 钟白玉, 等. 白念珠菌芽管法药敏试验新方法[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(9): 82.
- [5] 齐秀兰, 阎浩林, 郭信梅, 等. 二甲基亚砷和吐温80对钝齿棒杆菌产生赖氨酸影响的研究[J]. 生物技术, 1997, 7(5): 21.
- [6] Park Y, Smith RD, Combs AB, et al. Prevention of acetaminophen-induced hepatotoxicity by dimethyl sulfoxide[J]. *Toxicology*, 1988, 52(1/2): 165.
- [7] 刘德立. 真菌一氧化氮还原酶细胞色素P-450nor 2 cDNA序列的测定[J]. 生物工程学报, 1997, 13(1): 108.
- [8] Chen Y, Tang HM, Fan MT. Effect of dimethyl sulfoxide on the activity of tyrosinase[J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2009, 30(6): 1.
- [9] 王永乐, 王敏, 申雁冰, 等. 有机溶剂对大肠杆菌细胞膜的影响[J]. 天津科技大学学报, 2008, 23(4): 40.
- [10] Patrick RM, Ellen JB, Michael AP, et al. *Manual of clinical microbiology*[M]. Washington D.C.: ASM Press, 2005: 1 673.
- [11] 郭宁如, 吕桂霞. 念珠菌体外黏附上皮细胞的观察[J]. 中国医学科学院学报, 1994, 16(4): 312.
- [12] Chiani P, Bromuro C, Torosantucci A. Defective induction of interleukin-12 in human monocytes by germ-tube forms of *Candida albicans*[J]. *Infect Immun*, 2000, 68(10): 5 628.
- [13] Linehan L, Wadsworth E, Calderone R. *Candida albicans* C3d receptor, isolated by using a monoclonal antibody[J]. *Infect Immun*, 1988, 56(8): 1 981.

(收稿日期:2012-04-09 修回日期:2012-09-29)