

• 论 著 •

铜绿假单胞菌次生代谢产物对体外白念珠菌抑制效果和机制探究^{*}

王 鹏¹, 罗宇杭², 邱 平¹, 李 齐¹, 刘加伟², 陈凌娟², 陈 璇², 温伟洪², 徐令清^{2△}
广州医科大学附属清远医院(清远市人民医院):1. 皮肤科;2. 检验科, 广东清远 511518

摘 要:目的 探究铜绿假单胞菌(PA)的次生代谢产物对体外白念珠菌(CA)的抑制效果,并探究其部分机制。方法 从该院的临床标本中分离 PA 和 CA 菌株,通过十字划线实验和共孵育实验筛选对 CA 有抑制效果的 PA 菌株,并制备 PA 次生代谢产物粗提物,同绿脓菌素、吩嗪-1-羧酸、1-羟基吩嗪和 3-氧十二烷基-1-高丝氨酸内酯(3-oxo-HSL)共同进行试验,通过最小抑菌浓度实验、最小杀菌浓度实验、时间-杀菌曲线测量、XTT 法活性测定实验,测定各种 PA 次生代谢产物对 CA 的抑制效果,并探究 PA 次生代谢产物抑制 CA 的部分机制。结果 对 CA 抑制作用最强的是 1-羟基吩嗪,在浓度为 6.250 $\mu\text{g/mL}$ 时,CA 相对活性降至 0.00%。其次是绿脓菌素和 PA 粗提物,在其浓度为 200.000、100.000 $\mu\text{g/mL}$ 时,CA 相对活性降至 0.00%。1-羟基吩嗪、绿脓菌素 3-oxo-HSL 和 PA 粗提物都具有抑制 CA 菌丝形成的作用。1-羟基吩嗪、吩嗪-1-羧酸、绿脓菌素和 PA 粗提物处理后的 CA 细胞内均有活性氧(ROS)生成,绿脓菌素和 1-羟基吩嗪诱导产生的 ROS 最多。结论 吩嗪类次生代谢产物 1-羟基吩嗪和绿脓菌素对 CA 的生长和活性有明显的抑制作用,二者诱导产生的 ROS 最多。群体信号分子 3-oxo-HSL 对 CA 生长没有抑制作用,但有明显抑制真菌菌丝形成的作用。

关键词:铜绿假单胞菌; 白念珠菌; 次生代谢产物; 吩嗪; 抑制效果

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2025.17.009

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2025)17-2097-08

文献标志码:A

Inhibition effect of secondary metabolites of *Pseudomonas aeruginosa* on *Candida albicans* and mechanisms explore in vitro^{*}

WANG Peng¹, LUO Yuhang², QIU Ping¹, LI Qi¹, LIU Jiawei², CHEN Linjuan²,
CHEN Xuan², WEN Weihong², XU Lingqing^{2△}

1. Department of Dermatology; 2. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Qingyuan Hospital (Qingyuan People's Hospital), Guangzhou Medical University, Qingyuan, Guangdong 511518, China

Abstract: Objective To study the inhibitory effect of secondary metabolites of *Pseudomonas aeruginosa* (PA) on *Candida albicans* (CA) and to explore some of the mechanisms. **Methods** PA and CA strains were isolated from clinical specimens from the hospital. Then, PA strains with inhibitory effects on CA were screened through cross-line test and co-incubation test, and crude extracts of PA secondary metabolites were prepared, and were tested together with pyocyanin, phenazine-1-carboxylic acid, 1-hydroxyphenazine, and 3-oxododecyl-1-homoserine lactone (3-oxo-HSL). The inhibitory effects of various PA secondary metabolites on CA were determined through minimum inhibitory concentration test, minimum bactericidal concentration test, time-sterilization curve measurement, and XTT method activity measurement test, and some mechanisms by which PA secondary metabolites inhibited CA were explored. **Results** The strongest inhibitory effect on CA was 1-hydroxyphenazine, and at a concentration of 6.250 $\mu\text{g/mL}$, the relative activity of CA decreased to 0.00%. Next were pyocyanin and PA crude extract, and the relative fungal activity of CA decreased to 0.00% at concentrations of 200 and 100 $\mu\text{g/mL}$. 1-hydroxyphenazine, pyocyanin, 3-oxo-HSL and PA crude extract all had inhibitory effects on the formation of CA hyphae. Reactive oxygen species (ROS) were generated in CA cells treated with 1-hydroxyphenazine, phenazine 1-carboxylic acid, pyocyanin, and PA crude extract, and the

^{*} 基金项目:广东省医学科学技术研究基金项目(A2021490);清远市人民医院医学科研基金支持项目(20190209, 202301-201, 202301-318);清远市科技计划项目(230829228721492, 2022808114560471)。

作者简介:王鹏,男,副主任医师,主要从事皮肤真菌感染性疾病机制方向的研究。△ 通信作者, E-mail: lingqing_xu@126.com。

highest levels of ROS were induced by pyocyanin and 1-hydroxyphenazine. **Conclusion** Phenazine secondary metabolites 1-hydroxyphenazine and pyocyanin have significant inhibitory effects on the growth and activity of CA, and both induce the highest amount of ROS. The quorum-sensing signal molecule 3-oxo-HSL have no inhibitory effect on CA growth, but have a significant inhibitory effect on the formation of fungal hyphae.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; *Candida albicans*; secondary metabolites; phenazine; inhibitory effect

铜绿假单胞菌(PA)是一种革兰阴性杆菌,它是主要的医院感染细菌之一。PA 广泛分布于自然界及人类皮肤、肠道和呼吸道,是临床上较常见的条件致病菌。由于 PA 对抗菌药物的自然耐药性和形成生物膜的能力,PA 感染可导致严重的临床治疗问题^[1]。白念珠菌(CA)是常见的人类感染的病原真菌,CA 广泛存在于环境中,通常存在于机体口腔、上呼吸道、肠道及阴道,与机体处于共生状态,不引起疾病。当某些因素破坏了这种平衡状态,如机体免疫功能下降或正常菌群相互制约作用失调时,CA 由酵母相转为菌丝相,在局部大量生长繁殖,可引起皮肤、黏膜甚至全身性的真菌病^[2-5]。微生物的次生代谢产物一般是有生物活性的分子,是由微生物产生分泌并在环境中有特定功能性的物质,它们本身并非微生物所必需,但有助于细菌与真菌生存、繁殖、竞争及适应环境^[6]。PA 次生代谢产物主要包括吩嗪类物质、铁载体、群体感应信号分子(QSM)、硝吡咯菌素、鼠李糖脂表面活性剂、外毒素 A、磷脂酶 C、脂多糖等。其中一些物质的抑制真菌作用已经被阐明,另一些物质的相关研究仍不完全,或是只针对特定真菌菌种的研究较深入^[7-9]。本研究旨在分析 PA 次生代谢产物,包括 1-羟基吩嗪、吩嗪-1-羧酸、绿脓菌素和 3-氧十二烷基-L-高丝氨酸内酯(3-oxo-HSL),对体外 CA 的抑制效果和部分机制。

1 材料和方法

1.1 菌株来源 收集来自广州医科大学清远市人民医院临床痰液标本中的菌株,选取 4 株耐碳青霉烯 PA 和两株 CA,由美国 BD 公司全自动细菌鉴定药敏系统鉴定;4 株耐碳青霉烯 PA 编号分别为 PA101、PA102、PA105、PA106;两株 CA 编号分别为 CA1、CA2;1 株实验室质控 PA ATCC27853,编号为 PA0;1 株实验室质控 CA ATCC90028,编号为 CA0。所有菌株都保存在-80℃的冰箱中。

1.2 仪器与试剂 培养基(广州迪景微生物有限公司),RPMI 1640 液体培养基、细胞渗透性活性氧(ROS)探针(华中海威科技有限公司);绿脓菌素、3-oxo-HSL、二甲基亚砜(DMSO)、2.2 μm 针式过滤器(上海阿拉丁生化科技有限公司);吩嗪-1-羧酸、1-羟

基吩嗪(上海吉至生化科技有限公司);两性霉素 B(北京欣盛百泰科技有限公司)、碘化丙啶染色试剂(江苏凯基生物技术有限公司)、XTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(上海信裕生物科技有限公司)。全自动细菌鉴定药敏系统(美国 BD 公司)、酶标仪(郑州安图有限公司)、荧光显微镜(德国欧蒙公司)、水浴振荡培养箱(上海江星仪器有限公司)、CO₂ 培养箱(上海精密仪器仪表有限公司)。

1.3 十字划线实验^[10-11] 在接种培养液中将 PA101、PA102、PA105、PA106 分别制成 0.5 Mcf 菌悬液,用无菌棉签蘸取菌液分别在沙堡罗培养基上划线,35℃培养 24 h 后,用玻片刮去铜绿菌苔。用 3 cm×3 cm 滤纸片浸泡三氯甲烷,放置于铁盒中,将平板倒扣在铁盒内盖住滤纸片,熏蒸 20 min。将 CA1、CA2 制成 0.5 Mcf 菌悬液,用无菌棉签蘸取菌液,在三氯甲烷熏蒸后的涂布过 PA101、102、105、106 菌液的沙堡罗培养基平板上划线,CA 菌液与 PA 菌液划痕相垂直,28℃培养 48 h。两组菌液划痕交会处无真菌生长为阳性,有真菌生长为阴性。

1.4 共孵育实验^[11] 在接种培养液中将 PA 菌株与 CA 菌株制备成 0.5 Mcf 的菌悬液。在无菌 EP 管中加入 1 mL RPMI 1640 液体培养基,取受试菌株的菌悬液及 CA 菌悬液各 50 μL 加入上述 EP 管中;另取 50 μL CA0 菌悬液加入 1 mL RPMI 1640 液体培养基中作为对照。35℃孵育 24 h 后,用一次性细胞计数板于显微镜 40 倍镜下观察,200 倍镜下计算真菌孢子数量。

1.5 制备 PA 粗提物 将 PA105 制备成 0.5 Mcf 的菌悬液,取 100 μL 加入肉汤培养基中,35℃培养 24 h。取 2 mL PA 培养液加入 200 mL TSB 培养液中,放入恒温水浴振荡培养箱中,28℃,130 r/min 培养 96 h^[12]。用 2.2 μm 针式过滤器过滤菌液,过滤液在 60℃下烘干备用。配制粗提物溶液时使用 DMSO 作为溶剂。

PA105 菌株经过发酵培养并用针式过滤器过滤菌液后得到澄清发酵液,加热蒸发水分后得到 6 g 粉末,用 DMSO 溶解,配制成 6 mg/mL 的粗提物溶液,再次过滤备用。用血平板鉴定粗提物溶液过滤效果,取 100 μL 过滤后溶液涂布血平板,37℃培养 48 h 后

无菌落生长。

1.6 测定 PA 次生代谢产物的抑菌效果

1.6.1 最小抑菌浓度(MIC)实验 (1)复苏:将保存于 -80°C 冰箱中的 CA1 接种于沙堡罗培养基, 28°C 培养 2 d。复苏的菌株配制成 1×10^5 CFU/mL 菌悬液。(2)加样:在 96 孔板中每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ RPMI 1640 培养基,第 1 孔不加药物和 CA1,作为阴性对照;第 2 孔不加入药物只加入 $10\ \mu\text{L}$ CA1 菌悬液作为阳性对照;第 3 孔加入药物,使终浓度为 400.000 $\mu\text{g/mL}$,总体积为 200 μL ,对后续孔进行倍比稀释,使 3~12 孔终浓度为 400.000、200.000、100.000、50.000……3.125、1.062、0.531 $\mu\text{g/mL}$,各孔均加入 $10\ \mu\text{L}$ 菌悬液,即在 96 孔板中 CA1 终浓度为 1×10^4 CFU/mL。每种药物做 2 个复孔(药物包括绿脓菌素、吩噻-1-羧酸、1-羟基吩噻、PA 粗提物、两性霉素 B),两性霉素 B 为阳性对照。(3)96 孔板 28°C 培养 24 h 之后,肉眼观测各药物组的抑菌作用,溶液澄清没有真菌生长即为药物抑菌阳性,MIC 即没有真菌生长的最小药物浓度。

1.6.2 最小杀菌浓度(MBC)实验 在上述 MIC 实验各浓度孔中取 $10\ \mu\text{L}$ 菌液,涂布沙堡罗培养基, 28°C 培养 48 h 后观察是否有菌落生长,出现菌落对应的最小浓度即某一药物组的 MBC。若无 MIC 的即认为无 MBC,不做这一实验。

1.6.3 XTT 法活性测定实验 XTT 和 CCK-8 都是新合成的四唑氮衍生物,与 MTT 属于同类物质,它们都能被活细胞中线粒体内的脱氢酶降解而产生棕黄色水溶性的甲臞,能直接通过光谱吸收测定吸光度(A)值,进而推测细胞的增殖情况。当与电子耦合剂 PMS 联用时,还能增强其还原反应,提高反应的灵敏度。PA 菌株复苏与加样的方法与 1.6.1 中 MIC 实验一致,阴性对照(第 1 孔)、阳性对照(第 2 孔);药物组:绿脓菌素、吩噻-1-羧酸、1-羟基吩噻、PA105 的粗提物。从第 3 孔开始对每组药物进行倍比稀释,由 200.000 $\mu\text{g/mL}$ 稀释至 1.063 $\mu\text{g/mL}$,共 8 孔,每 1 组药物每 1 个浓度都做 3 个复孔。96 孔板经过 28°C 培养 24 h 之后,每孔加入 $10\ \mu\text{L}$ XTT 检测试剂, 37°C 避光孵育 1 h,培养基颜色变为棕黄色,在 450 nm 波长测量 A 值。依据试剂盒的细胞活性公式换算:细胞活性 = $(A_{\text{加药}} - A_{\text{阴性对照}}) / (A_{\text{阳性对照}} - A_{\text{阴性对照}}) \times 100\%$, $A_{\text{加药}} < A_{\text{阴性对照}}$ 即表示 CA 活性过低(被杀灭或极度抑制),记为 0.00%^[13-15]。记录 A 平均值和 CA 相对活性值,并绘制直方图。

1.6.4 时间-杀菌曲线^[16] (1)在 RPMI 1640 培养基中以 28°C , 130 r/min, 振荡培养 CA1 细胞 24 h,用

血球计数板计算细胞密度,再用 RPMI 1640 培养基将真菌细胞稀释至 $2\times 10^6\sim 3\times 10^6$ CFU/mL。(2)将上述 CA1 细胞稀释液加入无菌的摇菌管中,分别加入药物,以达到不同的处理浓度;摇菌管中的细胞在 28°C , 130 r/min 下培养;加入药物为绿脓菌素、吩噻-1-羧酸、1-羟基吩噻、3-oxo-HSL、PA 粗提物,浓度为 100、50 和 25 $\mu\text{g/mL}$ 。(3)在加入药物处理后 4、8、12、16、20、24 h 时,从每个摇菌管中取出菌液进行系列稀释 1 000 倍后,取 $10\ \mu\text{L}$ 菌液涂布到沙堡罗培养基平板上, 28°C 孵育 24 h,记录每块平板上 CA 的菌落数目,最终菌落数单位为 10^5 CFU/mL,初始菌落数(即 0 h 时)计数为 25×10^5 CFU/mL。(4)将真菌菌落数目作为纵坐标,时间作为横坐标,绘制时间-杀菌曲线进行分析。

1.6.5 观察 PA 次生代谢产物对 CA 形态的作用 在 RPMI 1640 培养基中 28°C , 130 r/min, 过夜培养的 CA1 细胞,用各组药物 50 $\mu\text{g/mL}$ 处理 24 h 后取 $10\ \mu\text{L}$ 滴在载玻片上,另设一组无药物处理作为对照组,加入 $10\ \mu\text{L}$ 真菌荧光染料,加盖盖玻片,在荧光显微镜下观察各组处理后的 CA 形态。

1.7 检测 CA 细胞内生成 ROS $2',7'$ -二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)能被细胞酯酶脱乙酰化为非荧光化合物,随后被 ROS 氧化为 $2'-7'$ -二氯荧光素(DCF)。DCF 是一种荧光化合物,可通过荧光计、流式细胞仪或荧光显微镜检测,其最大激发光谱和发射光谱分别为 495 nm 和 529 nm。荧光的强度可提示细胞内 ROS 水平。CA 在 RPMI 1640 培养基中 28°C , 130 r/min, 过夜培养,稀释至约 10^6 CFU/mL,用 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 PA 粗提物、绿脓菌素、1-羟基吩噻、吩噻-1-羧酸处理 4 h 后,用 DCFH-DA(终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$)染色,避光孵育 30 min,用荧光显微镜检测细胞内 ROS 的产生^[17]。

1.8 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行数据处理及统计分析。计数资料以频数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。

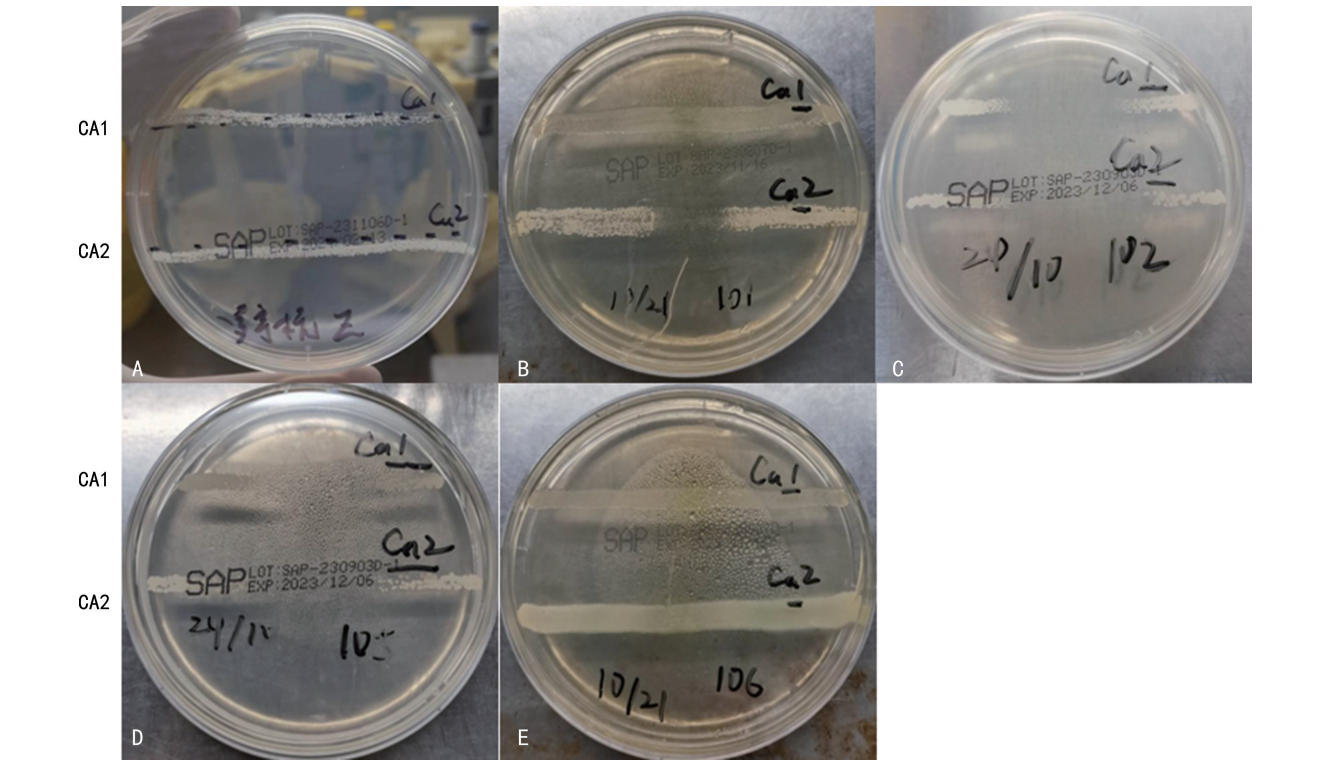
2 结 果

2.1 十字划线实验和共孵育实验筛选合适的 PA 菌株 4 株 PA 中有两株表现为阳性,分别为 PA102 和 PA105;PA101 只对 CA2 表现为阳性;PA0 和 PA106 表现为阴性。后续提取 PA 粗提物和关于次生代谢产物抑制作用的实验都将使用 PA105 菌株。见图 1。PA105 和 ATCC900283 共孵育后用一次性细胞计数板计数,CA 数量为 2.3×10^8 CFU/mL;作为对照单独培养的 ATCC900283 中 CA 数量为 1.01×10^9 CFU/mL,PA105 有显著抑制 CA 的作用。

2.2 PA 次生代谢产物对 CA 的抑制效果

2.2.1 PA 次生代谢产物不同处理浓度的抑制作用 有 MIC 的次生代谢产物为 PA 粗提物、1-羟基吩嗪、吩嗪-1-羧酸和绿脓菌素,分别为 25.000、25.000、50.000、1.063 $\mu\text{g/mL}$,MIC 最低的为绿脓菌素,且只有绿脓菌素有 MBC,为 200 $\mu\text{g/mL}$ 。两性霉素 B 为阳性对照, $\text{MIC} < 0.531 \mu\text{g/mL}$, $\text{MBC} = 1.063 \mu\text{g/mL}$ 。见表 1。XTT 法活性测定实验结果显示,对

CA 抑制作用最强的是 1-羟基吩嗪,在 100.000、50.000、25.000、12.500、6.250 $\mu\text{g/mL}$ 时 CA 相对活性降至 0.00%。其次是绿脓菌素和 PA 粗提物,在 200.000 和 100.000 $\mu\text{g/mL}$ 时 CA 相对活性降至 0.00%。吩嗪-1-羧酸和 PA 粗提物在浓度低于 12.500 $\mu\text{g/mL}$ 时有不同程度的促进 CA 活性的作用(CA 相对活性 $> 100.00\%$),1-羟基吩嗪在浓度为 3.125 $\mu\text{g/mL}$ 时也表现出促进 CA 活性的作用。见表 2、图 2。



注:A 为 PA0 和 CA1、CA2,B 为 PA101 和 CA1、CA2,C 为 PA102 和 CA1、CA2,D 为 PA105 和 CA1、CA2,E 为 PA106 和 CA1、CA2;C、D 中划痕交会处无真菌生长,为阳性。

图 1 十字划线实验结果

表 1 PA 次生代谢产物的 MIC 和 MBC($\mu\text{g/mL}$)

项目	PA 粗提物	1-羟基吩嗪	吩嗪-1-羧酸	绿脓菌素	3-oxo-HSL	两性霉素 B
MIC	25	25	50	1.063	>400	0.531
MBC	>400	>400	>400	200	>400	1.063

注:在浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ 孔观察到培养基浑浊记为 $\text{MIC} > 400 \mu\text{g/mL}$ 。

表 2 XTT 法活性测定实验结果

项目	200.000 $\mu\text{g/mL}$	100.000 $\mu\text{g/mL}$	50.000 $\mu\text{g/mL}$	25.000 $\mu\text{g/mL}$	12.500 $\mu\text{g/mL}$	6.250 $\mu\text{g/mL}$	3.125 $\mu\text{g/mL}$	1.063 $\mu\text{g/mL}$	阴性对照	阳性对照
1-羟基吩嗪										
A 平均值	1.137	0.795	0.79	0.761	0.762	0.712	1.311	1.43	1.232	0.948
相对活性(%)	66.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	128.00	169.70	—	—
吩嗪-1-羧酸										
A 平均值	1.834	2.081	2.266	2.280	2.335	2.300	2.408	2.379	1.834	2.081
相对活性(%)	11.30	60.30	97.00	99.80	110.70	103.80	125.20	119.40	—	—

续表 2 XTT 法活性测定实验结果

项目	200.000	100.000	50.000	25.000	12.500	6.250	3.125	1.063	阴性对照	阳性对照
	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL		
绿脓菌素										
A 平均值	1.282	1.742	1.951	2.239	2.167	2.162	2.226	2.235	2.146	1.748
相对活性(%)	0.00	0.00	25.50	61.60	52.65	61.45	66.70	69.15	—	—
PA 粗提物										
A 平均值	1.196	1.355	1.456	1.960	2.763	2.700	2.519	2.927	2.619	1.791
相对活性(%)	0.00	0.00	0.00	20.40	117.40	109.80	87.90	137.20	—	—

注：—表示无数据。

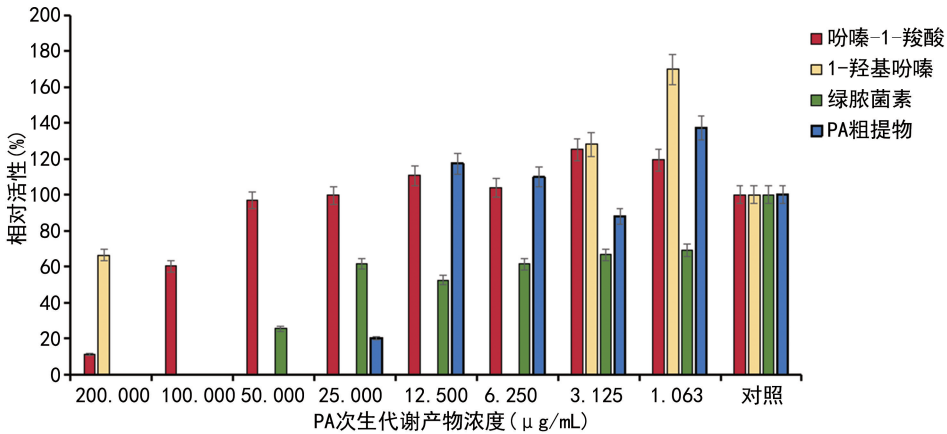


图 2 XTT 法活性测定实验结果柱状图

2.2.2 PA 次生代谢产物不同处理时间的抑制作用 1-羟基吩噻处理组和绿脓菌素处理组展现出对 CA 生长的抑制作用,其中 1-羟基吩噻抑制作用最强,在 100、50、25 μg/mL 3 个浓度下 24 h 内菌落数均低于 25×10⁵ CFU/mL,即比初始浓度更低,这个结果与 XTT 法活性测定实验结果相吻合。绿脓菌素 24 h 内对 CA 生长有一定抑制作用,但抑制效果随处理浓度降低而降低。吩噻-1-羧酸和 PA 粗提物对 CA 生长抑制作用不明显;而 3-oxo-HSL 对 CA 生长无抑制作用,且在 25、50 μg/mL 浓度下有明显促进 CA 生长的作用。见表 3、图 3。

表 3 时间-杀菌曲线菌落计数(×10⁵ CFU/mL)

药物和浓度	4 h	8 h	12 h	16 h	20 h	24 h
1-羟基吩噻(μg/mL)						
100	8	5	8	7	9	6
50	4	5	9	9	15	13
25	10	16	13	14	19	9
吩噻-1-羧酸(μg/mL)						
100	13	49	87	156	244	202
50	29	84	211	216	312	296
25	20	116	285	252	298	302

续表 3 时间-杀菌曲线菌落计数(×10⁵ CFU/mL)

药物和浓度	4 h	8 h	12 h	16 h	20 h	24 h
绿脓菌素(μg/mL)						
100	16	46	101	55	17	25
50	8	35	142	109	163	211
25	17	120	70	188	196	139
PA 粗提物(μg/mL)						
100	14	28	243	270	260	258
50	5	5	231	232	230	216
25	10	18	212	226	322	332
3-oxo-HSL(μg/mL)						
100	30	15	110	230	520	410
50	5	70	230	410	690	540
25	5	40	350	450	320	620
无药物	28	54	206	240	223	270

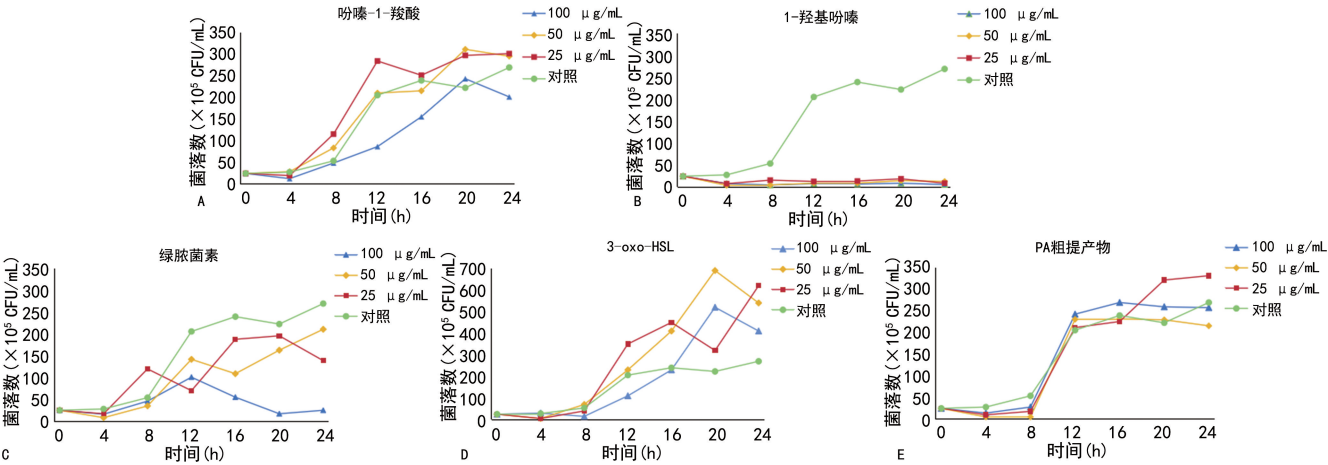
2.2.3 PA 次生代谢产物对于 CA 形态的作用 对照组中,不经过药物处理培养的 CA 在荧光下呈密集分布并产生大量分枝状菌丝;吩噻-1-羧酸处理组中 CA 细胞数量多,菌丝比较短小;3-oxo-HSL 处理组中 CA 细胞数量多,且无菌丝产生;PA 粗提物处理组中

CA 细胞数量较多,有少量菌丝产生;1-羟基吩嗪处理组和绿脓菌素处理组中 CA 细胞数量很少且大小不一,染色不均,形态不规则,CA 细胞膜和细胞结构不稳定。见图 4。同浓度下对 CA 形态影响最大的次生代谢产物依次为绿脓菌素、1-羟基吩嗪、PA 粗提物、3-oxo-HSL。吩嗪-1-羧酸对 CA 形态影响不明显,仍有菌丝产生。3-oxo-HSL 对 CA 细胞无抑制作用,促进菌丝相转化为酵母相的作用最为明显。

2.3 检测 CA 细胞内 ROS 生成情况

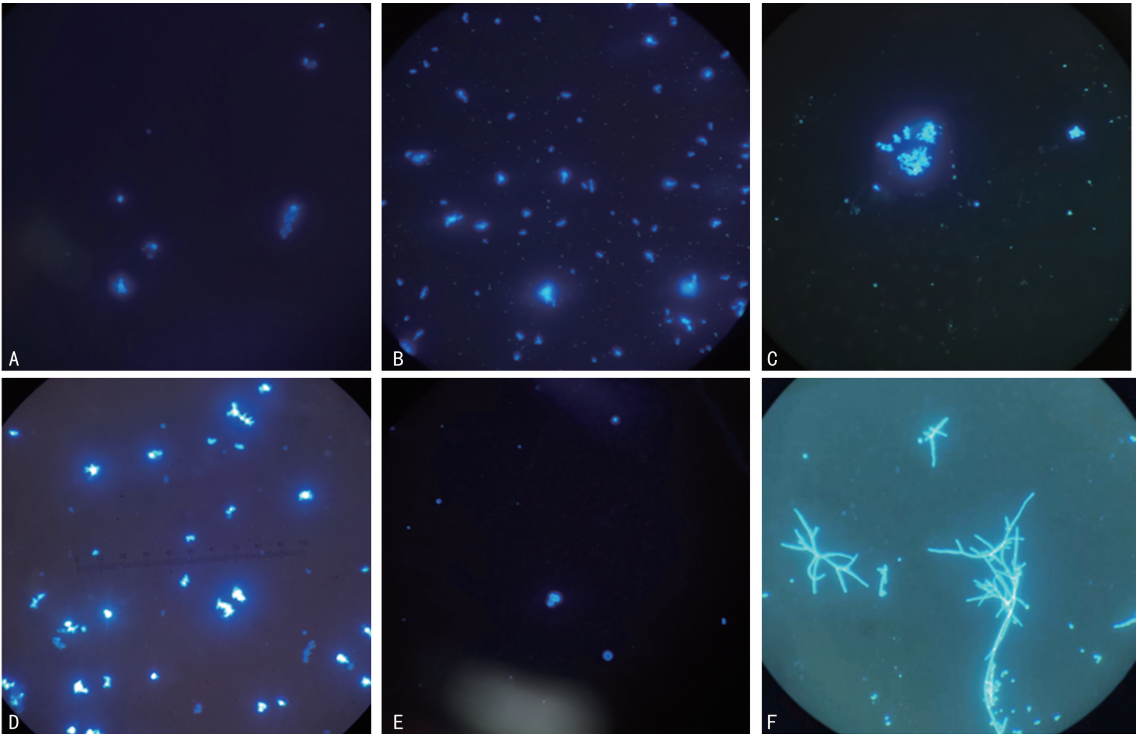
结果显示,25 $\mu\text{g/mL}$ 1-羟基吩嗪、吩嗪-1-羧酸、绿脓菌素和 PA 粗

提物处理 4 h 后 CA 细胞中均有荧光产生,这些次生代谢产物抑制 CA 的原理是诱导细胞内 ROS 生成。绿脓菌素处理后 CA 细胞产生的荧光最多;其次是 1-羟基吩嗪处理组,它们的荧光强度强于吩嗪-1-羧酸和 PA 粗提物处理组。见图 5。绿脓菌素和 1-羟基吩嗪诱导产生了更多的 ROS,造成的细胞毒性更强。因此在生长曲线和 XTT 活性测定中 1-羟基吩嗪绿脓菌素表现出远强于吩嗪-1-羧酸和 PA 粗提物的抑制作用。符合 MIC、MBC、时间杀菌曲线和 XTT 活性测定中得到的数据结果。



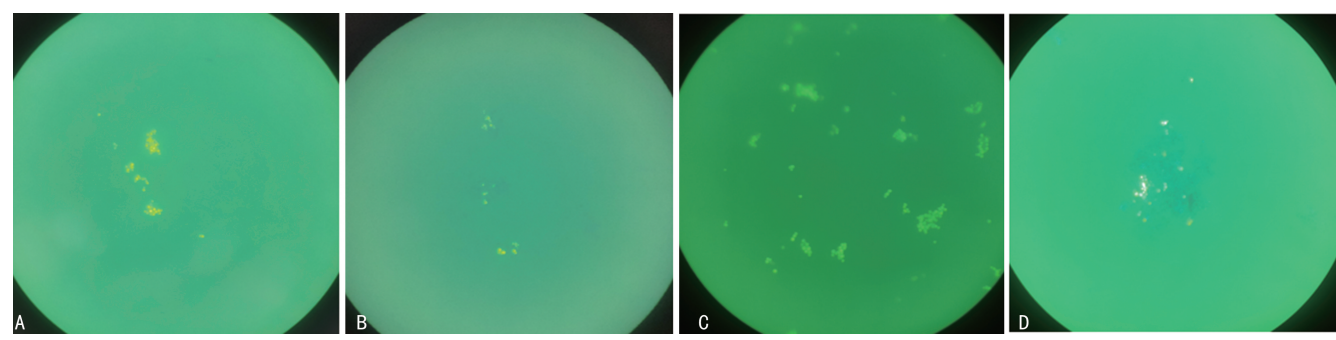
注:A为吩嗪-1-羧酸处理组,B为1-羟基吩嗪处理组,C为绿脓菌素处理组,D为3-oxo-HSL处理组,E为PA粗提物处理组;以上5组中无药物处理的对照均为同一组。

图3 时间-杀菌曲线



注:A为1-羟基吩嗪处理组,B为吩嗪-1-羧酸处理组,C为3-oxo-HSL处理组,D为PA粗提物处理组,E为绿脓菌素处理组,F为对照组。

图4 PA次生代谢产物影响下的CA形态观察(×400)



注:A 为 1-羟基吩嗪处理组,B 为吩嗪-1-羧酸处理组,C 为绿脓菌素处理组,D 为 PA 粗提物处理组。

图 5 荧光显微镜下观察 ROS 生成($\times 400$)

3 讨 论

PA 和 CA 都是医院临床感染的常见菌种,近年来 PA 及 CA 耐药菌株数量的上升成为临床治疗的一大挑战。从青霉素诞生开始,到金霉素、氯霉素、红霉素等,抗菌药物的最大来源就是微生物的代谢产物,因此为应对临床耐药菌感染需要更深入地研究具有抑菌作用的微生物次生代谢产物。人们对 PA 次生代谢产物早有研究,在农业领域,以 PA 的吩嗪类物质、鼠李糖脂或藤黄绿脓菌素为基础研发的真菌抗菌药物已有大规模的应用^[18-19],PA 对于一些病原真菌有抑制作用也已明确,比如曲霉菌、CA 和热带念珠菌。本研究拟对几种 PA 次生代谢产物对于 CA 的抑制效果作更详细的研究并探究部分抑制机制,其中 3 种为吩嗪类物质(绿脓菌素、1-羟基吩嗪、吩嗪-1-羧酸),1 种为 QSM(3-oxo-HSL),另外还实验了自制 PA 粗提物的抑菌效果。

笔者通过 MIC 实验、共孵育实验、XTT 法测量 PA 次生代谢产物影响下 CA 活性和时间-杀菌曲线的测量,确认了 PA 次生代谢产物绿脓菌素、1-羟基吩嗪和吩嗪-1-羧酸对 CA 的抑制作用,并且抑制强度与其浓度呈正相关,抑制作用最强的是 1-羟基吩嗪,在浓度为 $6.250\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时 CA 相对活性降至 0.00% ,在 $200.000\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,CA 相对活性不为 0.00% 的可能原因是高浓度下 1-羟基吩嗪溶液自身的颜色干扰了 A 值的测定。因为 XTT 法检测的是生成的棕黄色甲臌,1-羟基吩嗪溶液呈金黄色, $200.000\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 1-羟基吩嗪溶液与粉红色的 RMPI 1640 培养基混合时呈明显的棕黄色。PA 次生代谢产物对时间-杀菌曲线的影响集中在 CA 的对数生长期及之前,吩嗪-1-羧酸需要相对更高浓度才能发挥抑制作用,在 MIC 中是 $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$,在时间-杀菌曲线中是 $100.000\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 。另外吩嗪-1-羧酸、1-羟基吩嗪和 PA 粗提物在低浓度下($<3.125\ \mu\text{g}/\text{mL}$)具有增强 CA 活性的效果。1-羟基吩嗪、绿脓菌素和 3-oxo-HSL 都观察到具有抑制 CA 菌丝生成的作用,这可能与低浓度的 PA

次生代谢产物刺激了 CA 的 QSM 合成分泌,进而改变 CA 代谢活性和菌丝状态有关^[20-21]。相较于吩嗪-1-羧酸、1-羟基吩嗪和 PA 粗提物,同浓度下的吩嗪-1-羧酸对 CA 形态影响不明显,CA 仍有菌丝产生,而在 MIC 试验中吩嗪-1-羧酸展现出对 CA 的抑制作用, MIC 浓度为 $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$,这说明吩嗪-1-羧酸对于 CA 的抑制作用不是通过抑制 CA 的菌丝实现的。

通过 DCFH-DA 荧光探针检测 ROS,笔者观察到这些吩嗪类物质处理后的 CA 细胞内的 ROS 生成,说明吩嗪类代谢产物抑菌机制至少包括细胞内 ROS 积累,诱导过氧化物如 H_2O_2 的产生,破坏细胞器和细胞膜进而杀死细胞。绿脓菌素和 1-羟基吩嗪诱导产生了更多的 ROS,造成的细胞毒性更强。因此在生长曲线和 XTT 活性测定中 1-羟基吩嗪绿脓菌素表现出远强于吩嗪-1-羧酸和 PA 粗提物的抑制作用。符合 MIC 实验、MBC 实验、时间-杀菌曲线和 XTT 法活性测定实验中得到的数据结果。在快速荧光染色中,笔者除了观察到 CA 菌丝的变化,在绿脓菌素和 1-羟基吩嗪处理组中还观察到 CA 细胞形态大小不一和染色不均,说明细胞膜的不稳定和细胞结构被破坏。相比于 1-羟基吩嗪和绿脓菌素,吩嗪-1-羧酸的抑制菌丝生成作用更弱,并且 ROS 的生成也不如 1-羟基吩嗪和绿脓菌素,它在 MIC 中表现出对 CA 的抑制作用可能是通过其他机制实现的^[22]。

3-oxo-HSL 作为 PA 的 QSM,虽然没有直接抑制 CA 的作用,但具有强大的抑制菌丝生成的作用,其他吩嗪类物质和 PA 粗提物也有抑制菌丝生长的作用,但不如 3-oxo-HSL 明显,3-oxo-HSL 在促进 CA 生长的同时将 CA 转化为酵母态。PA 粗提物也表现出了吩嗪类和 QSM 所具有的抑制真菌的效果及低浓度下促进真菌生长的作用,说明 PA 粗提物中存在对应的次生代谢产物与类似作用机制。

随着人们对细菌与真菌之间相互作用研究的不断深入,其复杂性也被人们所认识,一种微生物的次生代谢产物可能对其他微生物同时有抑制与促进作

用。如 PA 次生代谢产物可能对 CA 有拮抗或协同作用,这取决于环境、宿主、生物膜、菌群基因型、次级代谢产物间的相互作用。对 PA 单一代谢产物与其他病原真菌的作用机制作更深入的研究,并逐步建立起 PA 与其他致病真菌的相互作用模型,将帮助学者更好地理解细菌与真菌之间复杂的相互作用,探索新型抗菌药物的研发,更全面地应对复杂的细菌和真菌感染。

参考文献

[1] 任艳,蒋文强.耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌耐药机制的研究进展[J].吉林医学,2020,41(9):2236-2239.

[2] LAPIERE A,RICHARD M L. Bacterial-fungal metabolic interactions within the microbiota and their potential relevance in human health and disease;a short review[J]. Gut Microbes,2022,14(1):2105610.

[3] 程阔.铜绿假单胞菌对白念珠菌体外抑菌活性的研究[D].石家庄:河北医科大学,2018.

[4] GHSSEIN G,EZZEDDINE Z. A Review of pseudomonas aeruginosa metallophores: pyoverdine, pyochelinand pseudopaline[J]. Biology (Basel),2022,11(12):1711.

[5] FOURIE R,POHL C H. Beyond antagonism: the interaction between candida species and pseudomonas aeruginosa [J]. J Fungi (Basel),2019,5(2):34.

[6] 张亚,蒋程,易龙,等.铜绿假单胞菌次生代谢产物的研究进展[J].化学与生物工程,2015,32(1):8-11.

[7] KERR J R,TAYLOR G W,RUTMAN A,et al. Pseudomonas aeruginosa pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth[J]. J Clin Pathol,1999,52(5):385-387.

[8] SEN S,BORAH S N,BORA A,et al. Rhamnolipid exhibits anti-biofilm activity against the dermatophytic fungi Trichophyton rubrum and Trichophyton mentagrophytes [J]. Biotechnol Rep,2020,27:e00516.

[9] 万璐,吴小军.铜绿假单胞菌Ⅲ型分泌系统效应蛋白的作用及机制研究进展[J].新乡医学院学报,2022,39(11):1092-1095.

[10] KERR J R. Suppression of fungal growth exhibited by Pseudomonas aeruginosa[J]. J Clin Microbiol,1994,32

(2):525-527.

[11] XU L,WANG F,SHEN Y,et al. Pseudomonas aeruginosa inhibits the growth of pathogenic fungi:in vitro and in vivo studies[J]. Exp Ther Med,2014,7(6):1516-1520.

[12] 韩志雪,程泓森,倪孟祥.铜绿假单胞菌产抗菌代谢产物发酵条件的优化[J].化学与生物工程,2019,36(3):41-46.

[13] SASS G,NAZIK H,PENNER J,et al. Studies of pseudomonas aeruginosa mutants indicate pyoverdine as the central factor in inhibition of aspergillus fumigatus biofilm [J]. J Bacteriol,2018,200(1):345-347.

[14] 吴楠,崔恒,温凯辉,等. XTT 比色法测定细胞生长曲线[J].华北国防医药,2007,18(4):7-8.

[15] LOURES F V,LEVITZ S M. XTT Assay of antifungal activity[J]. Bio Protoc,2015,5(15):1543.

[16] 欧阳小方,曹永兵,孙青葵,等.一种三唑醇类化合物的体内外抗真菌活性研究[J].第二军医大学学报,2008,29(7):813-816.

[17] GLOYNE L S,GRANT G D,PERKINS A V,et al. Pyocyanin-induced toxicity in A549 respiratory cells is causally linked to oxidative stress[J]. Toxicol In Vitro,2011,25(7):1353-1358.

[18] 唐蒙,程曦.铜绿假单胞菌生物制剂的研究进展[J].微生物学免疫学进展,2021,49(5):90-95.

[19] 蒋海霞,周莲,何亚文.铜绿假单胞菌生防菌株抑菌代谢产物及其生防应用研究进展[J].微生物学通报,2015,42(7):1338-1349.

[20] HOGAN D A,VIK A,KOLTER R. A Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing molecule influences Candida albicans morphology [J]. Mol Microbiol,2004,54(5):1212-1223.

[21] 高雅婷,李晓霞,段金菊.铜绿假单胞菌的群体感应系统及其抑制剂研究进展[J].中国抗生素杂志,2018,43(11):1338-1343.

[22] MORALES D K,JACOBS N J,RAJAMANI S,et al. Antifungal mechanisms by which a novel Pseudomonas aeruginosa phenazine toxin kills Candida albicans in biofilms[J]. Mol Microbiol,2010,78(6):1379-1392.

(收稿日期:2024-10-25 修回日期:2025-03-16)