

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2022.12.008

多吡啶铱配合物在体内外对 白色念珠菌的杀灭作用

付琛, 周伟, 赵梓圳, 付爱玲

西南大学药学院, 重庆 400715

摘要: 白色念珠菌(*Candida albicans*)感染性疾病是一种常见的人畜共患性疾病, 研发具有抗白色念珠菌活性的创新药物将有助于大力推动临床治疗的发展. 该研究将确定一种带有荧光的多吡啶类配合物可进入白色念珠菌细胞中, 在体内外显示出具有较强的杀灭该真菌的效果, 该研究为临床治疗白色念珠菌感染性肾炎提供一个新的方法, 通过荧光观测方法, 检测白色念珠菌可摄取配合物, 然后使用亚甲基蓝染色确定配合物对白色念珠菌的杀灭作用; 通过量效关系和时效关系研究进一步验证配合物的抗菌活性, 测定出配合物杀灭白色念珠菌的最小抑菌质量浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)和最小杀菌质量浓度(minimum fungicidal concentration, MFC); 在白色念珠菌感染的肾炎模型中, 评价配合物在体内的抑菌效果. 结果表明, 配合物具有较强的抗菌作用, 对白色念珠菌的 MIC 和 MFC 分别为 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$, 抗菌活性强于临床药物氟康唑. 此外, 配合物可降低动物模型肾脏中的白色念珠菌负载量, 减轻肾脏炎症损伤, 表现出较好的治疗效果.

关键词: 白色念珠菌; 多吡啶铱配合物; 感染性肾炎;

抗真菌活性

中图分类号: Q936; R978.7

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2022)12-0070-07

Killing Activity of Polypyridine Iridium Complex on *Candida albicans* in vitro and in vivo

FU Chen, ZHOU Wei, ZHAO Zizhen, FU Ailing

School of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: *Candida albicans* infection is a common zoonotic disease. The development of innovative drugs with anti-*Candida albicans* activity will help to vigorously promote the development of clinical treatment.

收稿日期: 2021-10-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82073830); 重庆市基础科学和前沿资助项目(cstc2018jcyjAX0612).

作者简介: 付琛, 副教授, 主要从事药物化学研究.

通信作者: 付爱玲, 教授.

This study will determine that a fluorescent polypyridine complex can enter *Candida albicans* cells, and show a strong effect of killing the fungus *in vivo* and *in vitro*, which will provide a new method for the clinical treatment of *Candida albicans* infectious nephritis. The intracellular uptake of the complex by *Candida albicans* was detected by using fluorescence observation, and then the anti-*Candida albicans* effect of the complex was determined by methylene blue staining. The antifungal activity of the complex was further verified by the study of relationships of dose-effect and time-effect. The minimum inhibitory concentration(MIC) and minimum fungicidal concentration(MFC) of the complex to kill *Candida albicans* also were determined. Moreover, the antifungal effect of the complex *in vivo* was evaluated in the nephritis model of *Candida albicans* infection. The results Showed: The MIC and MFC of the complex against *Candida albicans* were 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The antifungal activity of the complex was stronger than that of fluconazole. In addition, the complex could reduce *Candida albicans* load in the kidney of animal model, and decrease renal inflammatory injury, showing the therapeutic effect.

Key words: *Candida albicans*; polypyridine iridium complex; infectious nephritis; antifungal activity

白色念珠菌(*Candida albicans*)是一种常见的条件致病性真菌,广泛分布于人类和犬、猫、猪等动物的口腔、胃肠道表面与生殖器^[1].在继发感染或者免疫功能低下的动物中,白色念珠菌可传播到血液中,造成危及生命的系统性白色念珠菌病.据报道,系统性白色念珠菌病的死亡率可超过 30%^[2].此外,临床上发现了多种耐药型的白色念珠菌菌株^[3].因此,探索具有新化学结构的新型抗白色念珠菌药物变得愈加紧迫.

近 10 多年来,多吡啶类的过渡金属配合物是化学生物学与药物化学领域的研究热点.其中,铱和钌的多吡啶类配合物的空间结构、电子性质可以通过其结构配体和辅助配体的修饰而进行分子设计,并且它们还可以与特定的生物分子发生配体交换反应,因而被广泛运用于抗微生物和抗癌药物的研究中^[4].研究发现,多吡啶铱配合物具有较强的抑制金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌等细菌生长的作用^[5-6].然而,鲜有关于多吡啶铱配合物尚有抗白色念珠菌活性的报道.

本研究在以往合成的一系列金属配合物的工作基础上,筛选出了一种新型结构的多吡啶铱配合物,该配合物在激发光下,可显示出黄色荧光(图 1).在抗菌功能检测中,确定了它们对白色念珠菌的最小抑菌质量浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)和最小杀菌质量浓度(minimum fungicide concentration, MFC),并且研究发现该配合物在动物体内对白色念珠菌也有显著的杀灭作用.

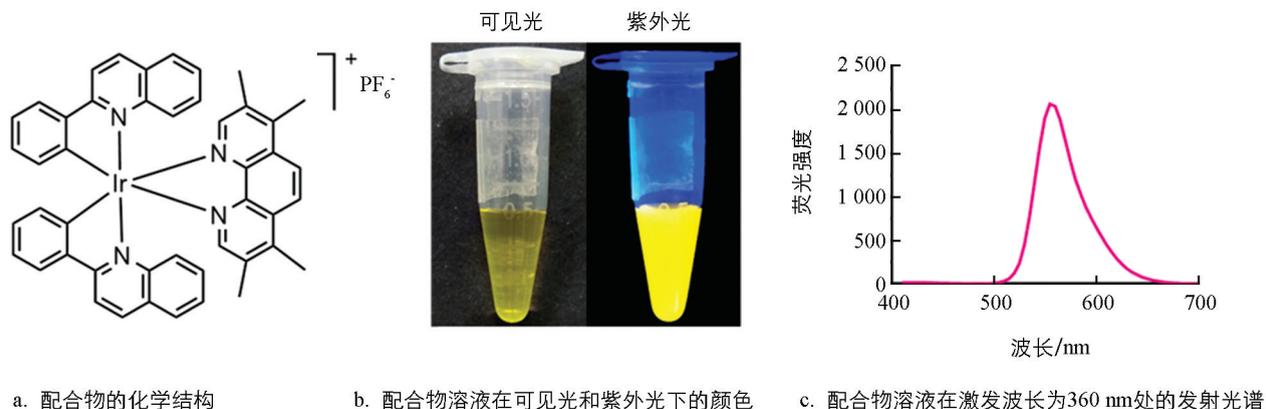


图 1 配合物结构与荧光性质

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 仪器

电子分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司),倒置荧光显微镜(重庆奥特光学仪器有限责任公司),酶标仪(美国 Hercules 公司),恒温箱(湖南湘仪公司),荧光分光光仪(日本 HITACHI 公司),高速台式冷冻离心机(湖南湘仪公司),冷冻切片机(德国得卡公司)。

1.1.2 试剂

本课题组根据文献[7]合成一系列配合物,氟康唑购于北京索莱宝科技有限公司,亚甲基蓝购于上海阿拉丁公司。

1.1.3 菌株与培养条件

白色念珠菌(ATCC 90029)购于北京百欧博伟生物技术有限公司。将购得的白色念珠菌培养于 SDA 琼脂平板(含有 1%蛋白胨、4%葡萄糖、2%琼脂)上,在 28 °C 恒温培养。

1.2 方法

1.2.1 白色念珠菌对配合物的摄取实验

从 SDA 琼脂平板上挑取白色念珠菌单菌落,于培养基中过夜培养。离心收集真菌细胞,用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤 2 次,并于 RPMI 1640 培养基中调整菌落浓度为 1×10^6 CFU/mL,然后加入 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的配合物,在 28 °C 孵育 2 h。使用荧光倒置显微镜观测白色念珠菌对配合物的摄取情况。

1.2.2 亚甲基蓝染色

由于亚甲基蓝不能进入活细胞但可进入死亡的细胞,因此可用亚甲基蓝染色鉴定配合物杀灭真菌细胞的效果。收集对数生长期的白色念珠菌,重悬于 RPMI 1640 培养基中,使其浓度为 5×10^5 CFU/mL。加入 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的配合物,在 28 °C 孵育 24 h,离心收集细胞,用 PBS 洗涤与重悬,取 1 滴于载玻片上用亚甲基蓝染色 3 min,在显微镜下进行观察。使用氟康唑(4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)作为阳性对照。

1.2.3 时效曲线研究

将白色念珠菌分别与不同质量浓度的配合物(0, 2, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)在 28 °C 孵育 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48 h,然后吸取 100 μL 培养液,平铺于 YPD 平板上,在 28 °C 培养 24 h,根据单菌落数来确定活细胞数量,并使用 GraphPad Prism 7.0 绘制出时效曲线。

1.2.4 MIC 和 MFC 的测定

参照 CLSI M27-A3 标准^[8],采用微量肉汤稀释法测量配合物对白色念珠菌的 MIC 和 MFC。离心收集处于对数生长期的真菌细胞,重悬于 RPMI 1640 培养基中,使其终浓度为 1.5×10^3 CFU/mL,然后加入质量浓度为 64~0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的配合物。培养 48 h 后,得到最低药物质量浓度和抑制率大于 50% 的药物质量浓度。

1.2.5 动物感染白色念珠菌模型的制作

雄性健康 Balb/c 小鼠(6~8 周),购于重庆恩斯维尔生物科技有限公司,饲养在 SPF 级实验室中。每只小鼠每天腹腔注射 80 mg/kg 环磷酰胺一次,连续 3 d,以降低机体免疫力^[9]。然后每只小鼠经尾静脉注射给予对数生长期的白色念珠菌(5×10^5 CFU)进行感染^[10-11]。

1.2.6 体内抗菌实验

在白色念珠菌感染 1 d 后,将感染模型小鼠平均分为 3 组(每组 6 只小鼠):模型组、氟康唑阳性药

治疗组和配合物治疗组. 配合物治疗组小鼠经腹腔注射 4 mg/kg 配合物. 阳性药治疗组小鼠腹腔注射 4 mg/kg 氟康唑, 模型组给予同等剂量的生理盐水. 连续给药 3 d 后处死小鼠, 分离出肾脏, 分别进行高碘酸-席夫碱(PAS)和苏木素-伊红(HE)染色^[12], 同时测定肾组织菌落负荷量. 测定菌落负荷量时, 在无菌条件下将肾组织匀浆, 然后涂布于培养板上. 在 28 °C 培养 48 h 后, 得到单菌落数, 计算菌落负荷量(菌落数/肾脏质量).

1.2.7 数据分析

所有数据均采用 GraphPad Prism 7.0 进行统计分析. 两组数据间的比较使用 *t* 检验, ANOVA 用于多组数据的分析. $p < 0.05$ 被认为具有统计学意义.

2 结果与分析

2.1 白色念珠菌对配合物的摄取

为证明配合物能够进入白色念珠菌细胞, 将白色念珠菌与配合物同孵育 2 h, 然后用荧光显微镜观察白色念珠菌对配合物的摄取情况. 由于白色念珠菌自身没有荧光, 而配合物在激发光下可显示出荧光, 若白色念珠菌能够摄取配合物, 那么在激发光下白色念珠菌能够呈现荧光. 结果表明, 在激发波长下白色念珠菌显示出强烈的红色与绿色的荧光(图 2), 当可见光荧光重叠时, 真菌呈现出黄色荧光, 说明白色念珠菌能够有效摄取配合物.

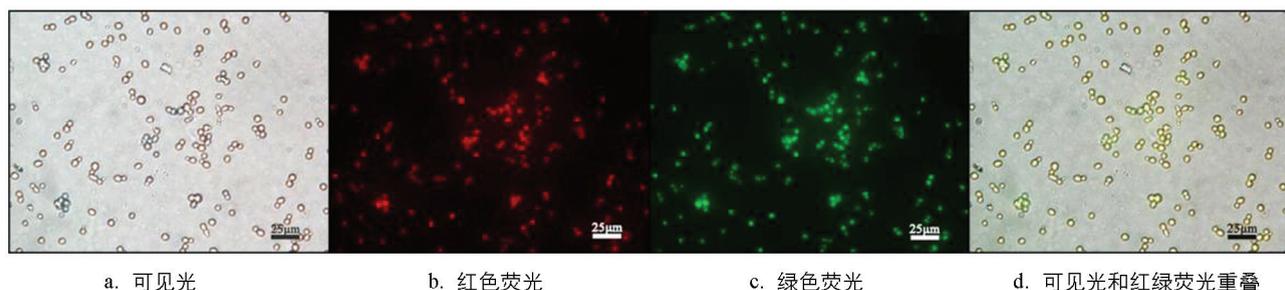


图 2 配合物可进入白色念珠菌细胞

2.2 亚甲基蓝染色

亚甲基蓝是一种生物染料, 能够鉴别活细胞与死亡细胞, 因此本实验通过亚甲基蓝染色鉴别白色念珠菌的活菌和死菌. 将白色念珠菌分别与不同质量浓度的配合物(4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、氟康唑(4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)共同孵育 24 h 后, 用亚甲基蓝染色观察 Ir-5 配合物的杀菌活性. 结果显示, 未加药物的空白对照组细胞存活良好, 氟康唑处理组出现了少量的蓝色死菌, 而配合物处理组出现了大量的蓝色死菌, 并且随着质量浓度增高, 死亡细菌越多(图 3), 说明配合物具有杀菌作用, 并且在同等质量浓度下其杀菌能力高于氟康唑.

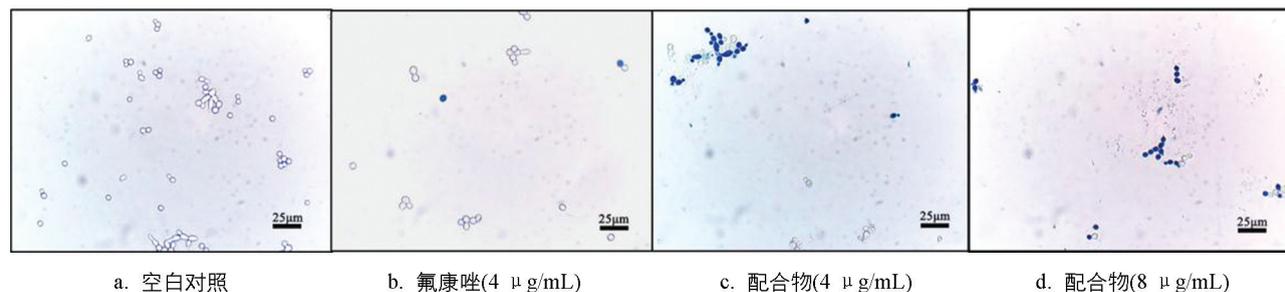
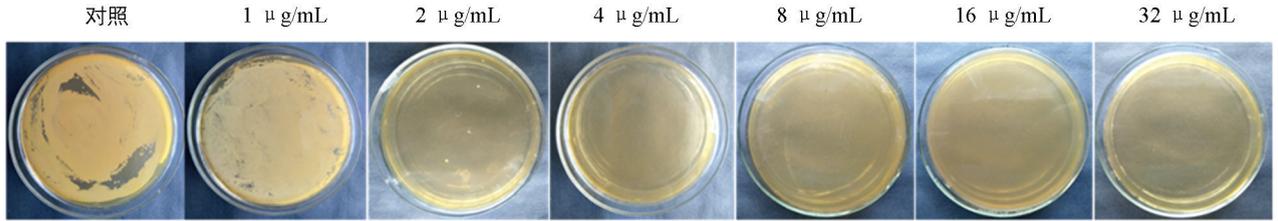


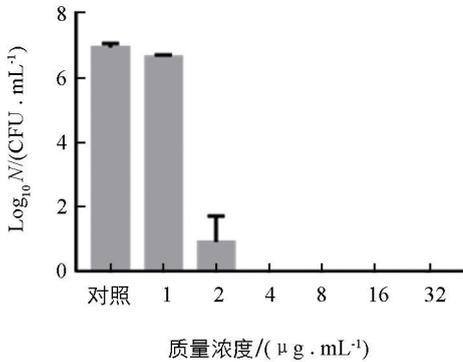
图 3 亚甲基蓝染色显示配合物具有杀灭白色念珠菌的活性

2.3 配合物杀灭白色念珠菌的时效和量效关系

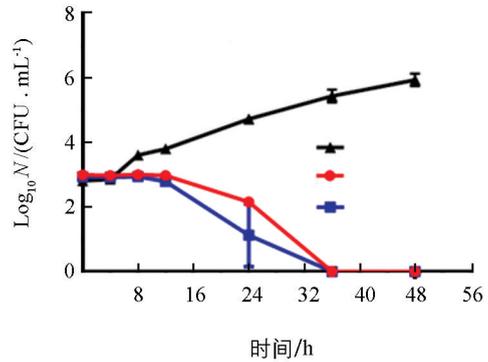
为了进一步验证配合物的杀菌活性,进行了时效和量效关系的研究.将真菌分别与不同质量浓度的配合物(0,1,2,4,8,16,32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 等)在 RPMI 1640 培养基中孵育,在不同时间点(0,4,8,12,24,36,48 h)分别取 100 μL 培养液涂布于平板上,培养 48 h 后,根据菌落形成单位计算出活菌数 N .结果见图 4,真菌与配合物共同孵育后,活菌数逐渐降低,在孵育 36 h 后能完全杀死白色念珠菌;此外,剂量为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的配合物的杀菌效率明显高于 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的配合物,呈现出量效关系.



a. 琼脂稀释法测定配合物的抗白色念珠菌作用



b. 量效关系



c. 时效关系

图 4 配合物抑制白色念珠菌生长的量效和时效关系

2.4 MIC 和 MFC 的测定

根据 CLSI M27-A3 标准,测定的配合物抗白色念珠菌的 MIC 值为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.而相同条件下氟康唑的 MIC 为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,说明配合物对白色念珠菌的抑制作用要优于氟康唑.此外,配合物对白色念珠菌的 MFC 为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,明显低于氟康唑的 MFC(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

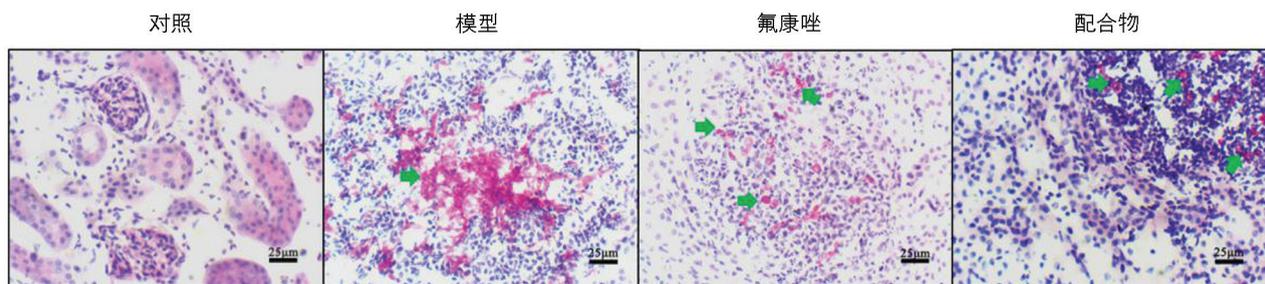
2.5 配合物体内抗菌实验

未经药物处理的小鼠在全身感染白色念珠菌 4 d 后,身体蜷缩,活动减少,肾脏出现水肿和明显肉芽(图 5).而经过配合物连续 3 d 的治疗后,小鼠活动增多,行为基本恢复正常,肾脏没有明显的肉芽肿,表明配合物对白色念珠菌引起的感染具有良好的治疗效果.



图 5 各组的肾脏形态

为进一步检测各组小鼠肾脏的菌落负荷量, 采用了组织切片高碘酸-席夫碱(PAS)染色法和平板计数法. 由于白色念珠菌的细胞壁中含有大量的葡聚糖和甘露聚糖, PAS 能够使多糖着红色, 组织中的白色念珠菌将会被染成红色. 肾组织经 PAS 染色后, 模型组与正常小鼠肾脏(空白对照)相比, 出现了明显的白色念珠菌菌落, 但经过配合物治疗后, 菌落明显减少(图 6). 在肾组织菌落负荷量测定中, 配合物治疗组能显著降低肾组织的菌落负荷量(图 7).

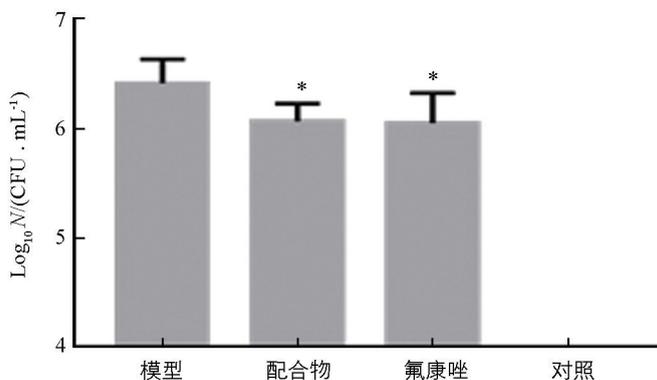


绿色箭头指向白色念珠菌.

图 6 PAS 染色显示肾组织的菌团数量

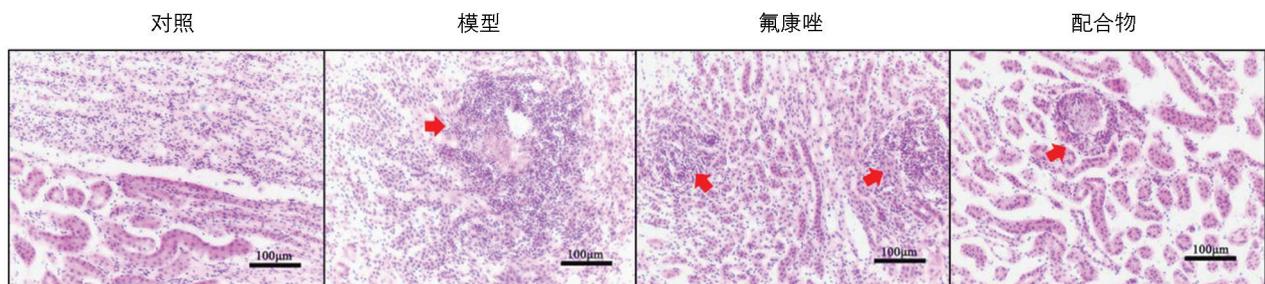
2.6 配合物减轻肾组织炎症损伤

在 HE 染色中, 模型组小鼠的肾脏出现了明显的炎症区域, 说明白色念珠菌感染可引起肾组织的炎症损伤. 但经配合物治疗后, 肾组织的炎症区域有明显的减少(图 8), 表明配合物在体内能通过其在体内杀灭白色念珠菌、降低肾组织的菌落数, 以减少由白色念珠菌感染引起的炎症, 从而起到治疗的作用.



* 表示与模型组相比, $p < 0.05$.

图 7 连续给药 3 d 后肾组织菌落负荷量



红色箭头指向炎症区域.

图 8 配合物降低肾组织的炎症反应

3 结论

在目前真菌感染引起的发病率和死亡率均上升的趋势下, 研制新型抗真菌药物是一个重要的课题. 本实验研究了八面体型的铈(III)配合物的抗白色念珠菌活性, 发现这类金属配合物可能具有研究价值和空间. 从中筛选得到的配合物对于白色念珠菌具有良好的杀菌活性, 其 MIC 和 MFC 分别为 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$, 活性高于临床抗真菌药物氟康唑. 在系统性白色念珠菌感染的动物模型

中, 配合物也表现出一定的治疗效果. 本研究可为合成新型的多吡啶铱配合物抗菌药物提供有效结构, 也可用于开发新型金属抗菌剂提供参考.

参考文献:

- [1] MOHAMED H A, RADWAN R R, RAAFAT A I, et al. Antifungal Activity of Oral (Tragacanth/Acrylic Acid) Amphotericin B Carrier for Systemic Candidiasis: In Vitro and in Vivo Study [J]. *Drug Delivery and Translational Research*, 2018, 8(1): 191-203.
- [2] ZHANG S Q, ZOU Z, SHEN H, et al. Mnn10 Maintains Pathogenicity in *Candida Albicans* by Extending A-1, 6-Mannose Backbone to Evade Host Dectin-1 Mediated Antifungal Immunity [J]. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(5): e1005617-1-e1005617-30.
- [3] FISHER M C, HAWKINS N J, SANGLARD D, et al. Worldwide Emergence of Resistance to Antifungal Drugs Challenges Human Health and Food Security [J]. *Science*, 2018, 360(6390): 739-742.
- [4] LU L H, LIU L J, CHAO W C, et al. Identification of an Iridium(III) Complex with Anti-Bacterial and Anti-Cancer Activity [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 14544-1-14544-9.
- [5] SAUVAGEOT E, ELIE M, GAILLARD S, et al. Antipseudomonal Activity Enhancement of Luminescent Iridium(III) Dipyridylamine Complexes under Visible Blue Light [J]. *Metallomics*, 2017, 9(12): 1820-1827.
- [6] YI Q Y, ZHANG W Y, HE M, et al. Anticancer and Antibacterial Activity in Vitro Evaluation of Iridium(III) Polypyridyl Complexes [J]. *Journal of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: a Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 2019, 24(2): 151-169.
- [7] ZHANG L, FU C, LI J, et al. Discovery of a Ruthenium Complex for the Theranosis of Glioma through Targeting the Mitochondrial DNA with Bioinformatic Methods [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(18): 4643-1-4643-16.
- [8] ESPINEL-INGROFF A, CHOWDHARY A, GONZALEZ G M, et al. Multicenter Study of Isavuconazole MIC Distributions and Epidemiological Cutoff Values for the *Cryptococcus Neoformans-Cryptococcus Gattii* Species Complex Using the CLSI M27-A3 Broth Microdilution Method [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, 59(1): 666-668.
- [9] TAKEMOTO K, YAMAMOTO Y, UEDA Y. Evaluation of Antifungal Pharmacodynamic Characteristics of AmBisome Against *Candida Albicans* [J]. *Microbiology and Immunology*, 2006, 50(8): 579-586.
- [10] LI L F, NASEEM S, SHARMA S, et al. Flavodoxin-Like Proteins Protect *Candida Albicans* from Oxidative Stress and Promote Virulence [J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(9): e1005147-1-e1005147-24.
- [11] LIU N N, UPPULURI P, BROGGI A, et al. Intersection of Phosphate Transport, Oxidative Stress and TOR Signalling in *Candida Albicans* Virulence [J]. *PLoS Pathogens*, 2018, 14(7): e1007076-1-e1007076-23.
- [12] DING Y J, LI Y Y, LI Z Y, et al. Alteramide B is a Microtubule Antagonist of Inhibiting *Candida Albicans* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2016, 1860(10): 2097-2106.

责任编辑 潘春燕