

## 白念珠菌生物被膜治疗研究进展

姜佳玉<sup>1</sup> 王汐文<sup>2</sup> 唐希远<sup>2</sup> 陈丽华<sup>2\*</sup>

(1 中南大学湘雅医学院检验系, 长沙 410013; 2 中南大学湘雅医学院麻醉系, 长沙 410013)

**摘要:** 白念珠菌是一种临床常见的条件致病菌, 当其形成生物被膜后可以形成保护膜, 抵抗抗真菌药物的作用和避免宿主免疫系统攻击, 将会造成难治性感染, 给人类健康带来严重的威胁。因此, 探究白念珠菌生物被膜的治疗方法具有重要的意义。本文从多种药物治疗, 生物医学材料的改进等方面综述了白念珠菌生物被膜治疗的最新进展, 旨在为白念珠菌感染的临床防治提供参考。

**关键词:** 白念珠菌; 生物被膜; 治疗; 抗真菌药物; 生物材料的改良

**中图分类号:** R379.4 **文献标志码:** A

## Research progress of the treatment of biofilms of *Candida albicans*

Jiang Jia-yu<sup>1</sup>, Wang Xi-wen<sup>2</sup>, Tang Xi-yuan<sup>2</sup> and Chen Li-hua<sup>2</sup>

(1 Department of Examination, Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410013; 2 Department of Anesthesiology, Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410013)

**Abstract** *Candida albicans* is a common clinical opportunistic pathogen. When it forms a biofilm, it can form a protective film to resist the activity of antifungal drugs and avoid the attack of host immune system, which causes refractory infections and poses a serious threat to human health. Therefore, it is of great significance to explore the treatment of *Candida albicans* biofilm. This article reviews the latest progress in biological coating treatment of *Candida albicans* from various drug treatments and improvement of biomedical materials, which may be useful for clinical prevention and treatments of *Candida albicans* infections.

**Key words** *Candida albicans*; Biofilm; Treatment; Antifungal drug; Improvement of biomaterials

白念珠菌 (*Canidia albicans*) 是一种条件致病性真菌, 存在于正常人口腔、上呼吸道、阴道及皮肤黏膜表面, 于正常人群无害, 易导致癌症、艾滋病和器官移植等免疫功能严重低下的患者发生口腔念珠菌病、念珠菌性阴道炎等真菌感染。近年来, 由于抗菌药物的广泛使用, 免疫性疾病的逐渐增加, 器官移植的发展, 各种植入性医学材料的使用以及医务人员对真菌感染诊断技术的提高, 临床上的真菌感染愈发增多<sup>[1]</sup>。全球每年约有 4000 万例念珠菌

感染患者, 其中白念珠菌是最主要的病原体约占总病例的 50%~70%<sup>[2-4]</sup>, 给人类健康带来极大威胁。形成生物被膜的白念珠菌对抗菌药物和生物杀伤剂的耐受性更是显著提高, 对常用的唑类药物如氟康唑、伊曲康唑、酮康唑等的耐药性显著增加<sup>[5]</sup>。而且, 生物被膜状态下的白念珠菌能逃避宿主的免疫攻击<sup>[6]</sup>。这些特性使得感染持续存在, 这对于白念珠菌的治疗是一个极大的挑战。因此, 探索白念珠菌生物被膜治疗方法对临床白念珠菌感染治疗大有裨益。

收稿日期: 2018-09-25

基金项目: 湖南省卫生健康委科研计划课题项目 (No. C2019167); 中南大学研究性学习和创新性实验计划 (No. YC20180673)

作者简介: 姜佳玉, 女, 生于 1996 年, 主要研究方向为临床微生物检验, E-mail: jiayu\_j96@163.com

\* 通讯作者, E-mail: 39673368@qq.com

## 1 白念珠菌生物被膜的形成

生物被膜又称生物膜 (biofilm), 是指微生物黏附在组织表面时, 由自身产生的大量胞外基质包裹有特定功能和结构的菌细胞所形成的结构。生成生物膜是菌细胞在长期进化过程中为适应环境变化而形成的一种生存方式<sup>[7]</sup>。典型的白念珠菌生物被膜结构大致由 3 部分组成, 即物体表面的数层酵母相细胞黏附形成基底部, 内部的菌丝形成中间层, 最外层由大量胞外基质覆盖<sup>[8]</sup>。

白念珠菌生物被膜的形成过程可分为以下 4 步: 首先, 白念珠菌通过可逆的疏水作用和静电力来进行黏附, 其分泌孢子黏附在物体表面, 对非生物表面的黏附主要由疏水相互作用介导, 而对生物表面的黏附则由黏附素如凝集素控制; 其次是微菌落的形成, 细胞自身分泌的胞外聚合物具有黏结锚定作用, 可使单个真菌细胞形成真菌团, 多个真菌团块形成肉眼可见的菌落; 然后是以聚合物的产生和分泌为特征的时期, 分泌的胞外基质逐渐增多, 形成由孢子、菌丝体和假菌丝组成的高度结构化的三维网状系统; 最后, 白念珠菌可以从物体表面分离 (作为单细胞或聚集体), 成为浮游生物, 并在新的表面定居进而形成新的生物膜<sup>[9]</sup> (生物膜的扩散)。生物被膜状态的白念珠菌在各种表型如形态结构、理化性质、致病性、毒力大小、药物敏感性等及基因型上均与浮游状态菌有显著差异<sup>[10]</sup>, 故其治疗难度也更高, 所以需要探究不同的治疗方法。

## 2 白念珠菌生物被膜的治疗

### 2.1 药物治疗

#### 2.1.1 抗真菌药物

多项研究结果显示, 由于白念珠菌生物被膜形成后产生耐药性, 大多数目前使用的抗真菌药物对白念珠菌形成的生物膜的治疗效果都不明显。因此, 需要开发治疗耐药生物膜的新策略。抗白念珠菌生物被膜的新型抗菌药物——两性霉素 B 脂质体具有脂溶性, 稳定性强, 能穿透白念珠菌等真菌形成的生物被膜, 与真菌细胞膜上的麦角固醇结合, 改变细胞膜的通透性, 使细胞内容物流出, 细胞死亡, 表现出良好的治疗效果<sup>[11]</sup>。临床研究表明, 两性霉素 B 脂质体治疗白念珠菌感染的总有效率为 77.78%<sup>[12]</sup>。另有棘白菌素类药物逐渐被应用于白念珠菌生物被膜状态的感染, 主要有卡泊芬净、米卡芬净和阿尼芬净, 此类药物能够阻碍白念珠菌与上

皮细胞之间的黏附, 抑制白念珠菌生物和非生物的黏附, 阻止芽管的形成<sup>[13]</sup>, 并从而抑制生物被膜的形成, 是一类极具前景的新型抗真菌药。

#### 2.1.2 中药有效成分

我国在天然植物及其提取物的药用方向上具有悠久的历史, 且在不断的发展和探索中药在感染性疾病方面的应用, 目前中药已经成为抗真菌药物开发的新方向。壳聚糖 (chitosan) 又称脱乙酰甲壳素, 是由虾蟹等壳类生物的壳经过脱乙酰作用得到的聚合物, 其可以抑制白念珠菌生物被膜的形成并且通过对抗生素的修饰增强对生物被膜的破坏效果<sup>[14]</sup>。复方百肤青已经成为治疗阴道念珠菌病的辅助药物, 研究显示 250g/L 的百肤青能明显破坏白念珠菌的生物被膜, 达到治疗的效果<sup>[15]</sup>。中药穿心莲中的穿心莲内酯可以通过线粒体途径诱导白念珠菌生物膜的凋亡, 促进 ROS 生成诱导凋亡, 并且可以促进生物膜的分散<sup>[16]</sup>。赤芍的主要成分芍药苷<sup>[17]</sup>和厚朴冷浸液<sup>[18]</sup>均可以破坏生物膜结构的稳定性, 抑制牙管和菌丝的形成, 抑制白念珠菌的黏附继而抑制生物膜的形成。

#### 2.1.3 益生菌

益生菌 (probiotics), 指可维持宿主肠道微生物均衡并对宿主有益的活性微生物, 如乳酸菌、双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、酵母菌等, 其对人体健康有极大的保护作用, 在预防生殖系统感染、增强人体免疫力、帮助消化吸收、增强新陈代谢等方面已有广泛的应用。益生菌已成为近年来抑制生物被膜治疗的研究热点。

研究发现益生菌可以抑制生物被膜的形成, 其中乳酸杆菌应用得到了极大认可。Krzysciak 等<sup>[19]</sup>报道唾液乳杆菌可以抑制致龋齿的变异链球菌和白念珠菌混合菌的生物被膜的形成, 通过抑制白念珠菌形成假菌丝和牙管来降低白念珠菌的致病性。Wasfi 等<sup>[20]</sup>报道干酪乳杆菌、罗氏乳杆菌、植物乳杆菌和唾液乳杆菌通过降低胞外多糖, 酸耐受和群体感应相关的基因抑制致龋齿的变异链球菌的生物膜形成。Rossoni 等<sup>[21]</sup>检测了 30 株分离自无龋齿人群的乳酸杆菌对白念珠菌生物被膜形成的抑制作用, 发现其可通过下调 *ALS3*、*HWPI*、*CPHI* 和 *EFG1* 基因的表达来抑制生物被膜的形成。临床上已有用抗菌药物联合乳酸杆菌治疗念珠菌感染的病例报告。有报告显示, 临床上分别使用益康唑<sup>[22]</sup>和甲硝唑<sup>[23]</sup>联合

乳酸菌阴道胶囊治疗念珠菌阴道炎时,发现加用乳酸菌辅助后治疗总有效率提高了,复发率降低了。这显示了乳酸杆菌在白念珠菌治疗中的作用已被承认,未来将有更大的研究空间。

#### 2.1.4 新型抗菌膜剂

目前,研究人员已经开发出大量具有独特结构的潜在抗菌膜剂,它可以促进预先形成的生物膜的分散或者抑制体内新生物膜的形成,在分散现有生物膜或防止细菌在体外形成生物膜方面显示出巨大的前景。Bendaoud 等<sup>[24]</sup>研究出一种可以抑制其自身生物膜形成的多糖,调控生物膜结构,介导细胞在扩散阶段的释放,抑制如金黄色葡萄球菌,表皮葡萄球菌和白念珠菌的生物膜形成。既能使已形成的生物膜的分散又能杀死生物膜细菌的抗菌膜剂还可以与有效的抗微生物药物组合以增强其活性来治疗生物被膜。另有研究发现,(1)-N-2-甲氧基苄基-1,10-菲咯啉溴化物或可作为抗白念珠菌的新型抗菌膜剂。其作为螯合剂破坏生物膜中细胞的结构,抑制蛋白酶的功能,干扰了多种生物系统的功能,发挥出抗菌作用。在实验中用扫描电子显微镜(SEM)图像证实了其能导致白念珠菌生物膜基质破坏<sup>[25]</sup>。

#### 2.1.5 作用于生物被膜基质的药物

生物被膜丰富的胞外基质具有保护其内部的真菌,避免抗菌药物破坏真菌细胞的作用,故在治疗时常表现出一定的耐药性。生物膜细胞的耐药性增加已经被解释为抗菌剂通过生物膜基质的延迟渗透。抗菌剂必须通过水通道扩散通过细胞外基质才能到达细胞。当目标细胞位于生物膜中时,基质可以作为抗微生物化合物的屏障。此外,基质成分也可以直接结合抗微生物剂导致耐药。因此可以开发作用于被膜基质的药物,加速生物被膜的裂解,减弱被膜的阻隔作用;或者通过改变被膜基质的通透性或厚度加速药物的渗透,使进入被膜内的药物达到抑菌浓度,使药物发挥应有的作用。理论上治疗白念珠菌被膜感染的关键在于破坏被膜后直接杀菌。有研究人员决定运用酶消化生物被膜基质的方法来观察被膜基质的保护作用,由于胞外基质中含有DNA且与生物被膜结构的维持和保护其三维立体结构的稳定性有关,故实验中比较用传统抗生素治疗及加用DNA酶联合治疗的效果,发现由于DNA酶破坏了被膜基质的结构,抗菌的效果非常显著<sup>[26]</sup>。另有研究发现,细菌自身可以产生一种降解生物被膜多

糖的水解酶。实验中将该糖苷水解酶加入到已形成生物被膜的菌落,可以直接破坏生物被膜结构的稳定性,使其裂解消亡<sup>[27]</sup>。对真菌生物被膜基质结构,形成方式,形成特点的研究有助于找到突破其基质的方法,发现治疗生物被膜的新方法。

#### 2.2 生物医学材料的改良

生物被膜常常形成于植入的医学生物材料表面。它会导致植入失败,造成大量的经济损失,给患者身体带来极大负担,造成很多不良后果。大多数真菌细胞都能够黏附与定植于常用生物医学材料表面,从而形成生物被膜继而产生耐药性。如果可以对现有的植入材料进行改进,阻止病原菌的附着,即可以避免生物被膜的形成。生物医学材料改良的主要策略是表面覆盖涂层隔绝真菌和材料表面的接触或者是缓慢释放抗菌药物持续阻止被膜的形成。超高分子量聚乙烯(UHMWPE)用低压氮等离子体处理可以提高抗生物污损性。用该材料进行大肠埃希菌生物膜形成的研究,并使用光学显微镜和原子力显微镜(AFM)对其成像。与未处理的聚合物相比,等离子体处理显著减少了表面上的细菌附着。这可归因于表面疏水性降低阻止了细菌与表面的相互作用<sup>[28]</sup>。研究证明纳米银粒子具有广谱快速强效的杀菌作用且无耐药性,具有抵抗真菌生物被膜的活性,可以抑制植入导管上生物被膜的形成,目前已投入临床使用<sup>[29]</sup>。研究人员将镀银缝合袖套植入了一只人工感染的豚鼠体内,其产生的炎症比未涂覆的织物少<sup>[30]</sup>。这些研究成果揭示了可以对生物医学材料进行改进和完善,以达到防止植入材料上的白念珠菌生物被膜感染的目的。

#### 2.3 其他疗法

光动力治疗(photodynamic therapy, PDT)是目前常用于治疗尖锐湿疣,眼底病变和肿瘤等疾病的方法。由于其操作安全简单、非特异、不易产生耐药现象,具有治疗耐药菌株的作用,所以也逐渐用于抗菌治疗中。有研究以白念珠菌生物膜为模型,在不同波长的红光下,照射不同时间,探究光敏剂对生物膜的杀伤作用,用菌落计数法比较杀菌率。发现光敏剂TBO在633nm红光下对白念珠菌生物膜具有显著杀伤效果<sup>[31]</sup>。另有研究是用激光共聚焦扫描显微镜探究在5-氨基酮戊酸光动力疗法(ALA-PDT)过程中不同光照剂量对白念珠菌生物被膜活性的抑制作用,定量分析ALA-PDT对白念生物膜的杀伤作

用。最终发现 ALA-PDT 能够对生物膜内的细胞产生破坏作用并且可以直接作用于生物膜<sup>[32]</sup>。目前光动力疗法在抗白念珠菌生物被膜方面已有一定的研究成果,并且已经应用于临床具有重要的临床意义,相信它会在抗被膜方向成为一个研究热点。

### 3 结语

临床治疗生物被膜形成状态的白念珠菌感染非常困难,给患者的身心健康带来极大的挑战,因此亟需寻求一个合适有效的方法。目前在抗真菌药物领域两性霉素 $\beta$ -脂质体和棘白菌素类药物均广泛应用,中药运用方面,肉桂、赤芍、穿心莲等药物有一定的辅助作用,生物被膜结构和形成方面及生物医学材料的改良等领域也均有一定的研究成果,但在治疗生物被膜状态的白念珠菌感染时常遇到耐药的瓶颈,研究人员对生物被膜形成机制的研究和抗被膜药物的开发将有助于解决其治疗过程中的耐药问题,促进患者的康复,保护人类的健康。

### 参考文献

- [1] Williams C, Ramage G. Fungal biofilms in human disease[J]. *Adv Exp Med Bio*, 2015, 831(9): 11-27.
- [2] Hassan I, Powell G, Sidhu M, *et al*. Excess mortality, length of stay and cost attributable to candidaemia[J]. *J Infect*, 2009, 59(5): 360-365.
- [3] Naglik J R, Richardson J P, Moyes D L. *Candida albicans* pathogenicity and epithelial immunity[J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(8): e1004257.
- [4] Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: Mechanisms and clinical impact[J]. *Mycoses*, 2015, 58(Suppl 2): 2-13.
- [5] Chandra J, Mukherjee P K, Leidich S D, *et al*. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro*[J]. *J Dent Res*, 2001, 80(3): 903-908.
- [6] Katragkou A, Kruhlak M J, Simitsopoulou M, *et al*. Interactions between human phagocytes and *Candida albicans* biofilms alone and in combination with antifungal agents[J]. *Emerg Infect Dis*, 2010, 201(12): 1941-1949.
- [7] 伍勇, 陈丽华. 重视细菌生物被膜导致的细菌耐药及其解决方案[J]. *中华检验医学杂志*, 2014, 37(10): 725-727.
- [8] 李瑞莲, 王倬, 杜昱光. 白念珠菌生物被膜研究进展[J]. *微生物学报*, 2017, 57(8): 1206-1218.
- [9] Chandra J, Mukherjee P K. *Candida* biofilms: Development, architecture, and resistance[J]. *Microbiol Spectr*, 2015, 3(4), MB-0020-2015.
- [10] Wang C Z, Shao J, Wang T M, *et al*. Advances in the matrix of *Candida albicans* biofilms[J]. *Chin J Mycol*, 2012, 7(3), 178-183.
- [11] Schinabeck M K, Long L A, Hossain M A, *et al*. Rabbit model of *Candida albicans* biofilm infection: Liposomal amphotericin B antifungal lock therapy[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(5): 1727-1732.
- [12] 侯幸赞, 刘震, 缪海均, 等. 两性霉素 B 脂质体治疗侵袭性真菌感染的疗效观察[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2016, 16(7): 878-879.
- [13] Ellepola A N, Chandy R, Khan Z U, *et al*. Caspofungin-induced *in-vitro* post-antifungal effect and its impact on adhesion related traits of oral *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates[J]. *Microbiol Immunol*, 2016, 60(3): 160-167.
- [14] Martinez L R, Mihiu M R, Tar M, *et al*. Demonstration of antibiofilm and antifungal efficacy of chitosan against candidal biofilms, using an *in vivo* central venous catheter model[J]. *Emerg Infect Dis*, 2010, 201(9): 1436-1440.
- [15] 解光艳, 汪长中, 李露天, 等. 复方百肤青抗外阴阴道念珠菌病混合菌生物被膜的作用[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(9): 2126-2128.
- [16] 汪长中, 韩宁, 徐振华, 等. 穿心莲内酯诱导白念珠菌生物膜分散细胞凋亡的研究[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(3): 362-365.
- [17] 王殿明, 王健平, 杨景云, 等. 芍药苷对白念珠菌生物膜的作用[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(25): 4038-4042.
- [18] 向晓波, 周艳萌, 冯琳颖, 等. 厚朴冷浸液对白念珠菌生物膜作用的体外研究[J]. *遵义医学院学报*, 2016, 39(1): 51-53.
- [19] Krzysciak W, Koscielniak D, Papiez M, *et al*. Effect of a *Lactobacillus salivarius* probiotic on a double-species *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* caries biofilm[J]. *Nutrients*, 2017, 9(11): e1242.
- [20] Wasfi R, Abd El-Rahman O A, Zafer M M, *et al*. Probiotic *Lactobacillus* sp. inhibit growth, biofilm formation and gene expression of caries-inducing *Streptococcus mutans*[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(3): 1972-1983.
- [21] Rossoni R D, de Barros P P, de Alvarenga J A, *et al*. Antifungal activity of clinical *Lactobacillus* strains against *Candida albicans* biofilms: Identification of potential probiotic candidates to prevent oral candidiasis[J]. *Biofouling*, 2018, 34(2): 212-225.
- [22] 贾永翠. 益康唑联合乳酸菌阴道胶囊治疗复发性念珠菌性阴道炎的临床观察[J]. *医学理论与实践*, 2016, 29(9): 1208-1209.
- [23] 苏倩, 卫兵. 乳酸菌阴道胶囊在阴道炎治疗中的临床运用[J]. *安徽医药*, 2013, 17(6): 1041-1043.
- [24] Bendaoud M, Vinogradov E, Balashova N V, *et al*. Broad-spectrum biofilm inhibition by *Kingella kingae* exopolysaccharide[J]. *J Bacteriol*, 2011, 193(15): 3879-3886.

- [25] Setiawati S, Nuryastuti T, Ngatidjan N, *et al.* *In vitro* antifungal activity of (1)-N-2-methoxybenzyl-1,10-phenanthroline bromide against *Candida albicans* and its effects on membrane integrity[J]. *Mycobiology*, 2017, 45(1): 25-30.
- [26] Martins M, Uppuluri P, Thomas D P, *et al.* Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms[J]. *Mycopathologia*, 2010, 169(5): 323-331.
- [27] Yu S, Su T, Wu H, *et al.* PslG, a self-produced glycosyl hydrolase, triggers biofilm disassembly by disrupting exopolysaccharide matrix[J]. *Cell Res*, 2015, 25(12): 1352-1367.
- [28] Thakur S, Pal D, Neogi S. Prevention biofilm attachment by plasma treatment of polyethylene[J]. *Surface Innovations*, 2016, 4(1): 33-38.
- [29] Monteiro D R, Silva S, Negri M, *et al.* Antifungal activity of silver nanoparticles in combination with nystatin and chlorhexidine digluconate against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms[J]. *Mycoses*, 2013, 56(6): 672-680.
- [30] Donlan R M. Biofilms and device-associated infections[J]. *Emerg Infect Dis*, 2001, 7(2): 277-281.
- [31] 李苇. 光动力体外杀灭白念珠菌的效果评价 [D]. 重庆: 重庆大学, 2017.
- [32] 史航. 5-氨基酮戊酸光动力疗法 (ALA-PDT) 对白念珠菌生物膜的影响 [D]. 上海: 复旦大学, 2014.