

一种抗真菌的中药单体及检测方法

技术领域

本发明属于中药技术领域，尤其涉及一种抗真菌的中药单体及检测方法。

背景技术

近年来，由于 HIV 感染、遗传性免疫缺陷、术后患者等抗菌药和免疫抑制剂的广泛使用；肿瘤放化疗及侵入性诊断和治疗技术的运用，真菌感染率和死亡率明显升高。真菌感染包括浅部真菌感染和深部真菌感染，其致病菌包括念珠菌属、曲霉菌属、隐球菌属等。浅部真菌感染被认为是困扰过 25% 世界人口的问题；而深部真菌感染，如念珠菌血症和播散性念珠菌病，是极其严重的疾病。据统计，侵入性念珠菌病的死亡率为 30%~40%。

目前临床上经典抗真菌药主要有棘白菌素类、多烯类、唑类。伴随着种类相对稀少的抗真菌药的广泛大量使用，尤其是不科学的预防性使用，甚至滥用，使得大量的真菌的耐药菌出现。临床真菌病原菌往往进化出一种以上的耐药机制，呈现多药耐药，使得临床的抗真菌药物失去治疗效用。由于真菌病原菌是真核生物，与人类基因组、细胞构造和信号转导途径具有显著的相似性，传统筛选的药物毒性和副作用较大且容易产生耐药。因此研发新型安全、高效广谱的抗真菌药物成了当务之急。

芦荟作为我国传统的中药具有抗炎、抗肿瘤、抗病毒、降血糖和降血脂等多种药理作用。中医典籍《本草纲目》记载“芦荟其功专于杀虫清热”。芦荟安全性高，已被国际上将芦荟从单纯草药原料扩展为食品添加剂、非处方药、保健品、护肤品及化工等原料，广泛应用于医药、保健和日常生活中。但是，现有技术中存在抗真菌药物匮乏、抗真菌药物毒副作用大等问题。

通过上述分析，现有技术存在的问题及缺陷为：现有抗真菌药物匮乏，且药物毒性和副作用较大，现有抗真菌药物主要通过直接杀菌或抑菌产生作用，

容易产生耐药，抗真菌新药靶点缺乏。

解决以上问题及缺陷的难度为：传统直接杀菌或抑菌的抗真菌药物容易引起真菌耐药，且难以发现新的药物靶点。目前临床应用的抗真菌药物仅仅是对以前药物的简单修饰，还没有一种新类型（新作用机制）的抗真菌药物上市。真菌主要通过靶点突变和药物外排的增加，使得临床的抗真菌药物失去治疗效用。而且由于真菌和人体都为真核生物，具有相似的细胞结构、信号传导通路，许多抗真菌药物对人类细胞也具有一定作用，如一线唑类抗真菌药物可与人体细胞色素 P450 蛋白血红素辅基结合，因此具有一定的肝毒性。耐药菌株的出现和新药的缺乏，为了获得良好的治疗效果，在临床治疗过程中不得不提高抗真菌药物使用量和应用强度，这也增加了抗真菌药物的人体的损害，大大限制了部分药物的使用。

解决以上问题及缺陷的意义为：发现新类型抗真菌药物，减少抗真菌药物的毒副作用，改善真菌耐药问题，扩大现有抗真菌药物储备池和抗真菌药物靶点，具有广阔的临床应用前景。

发明内容

针对现有技术存在的问题，本发明提供了一种抗真菌的中药单体及检测方法，旨在解决现有技术存在的抗真菌药物匮乏、抗真菌药物毒副作用大等问题。

本发明是这样实现的，一种抗真菌的中药单体，所述抗真菌的中药单体，包括抗真菌性的芦荟液汁主要活性成分蒽醌类化合物；其中，所述蒽醌类化合物包括芦荟苷和芦荟大黄素。

进一步，所述抗真菌的中药单体包括芦荟来源的单体、芦荟单体类似物、芦荟单体异构体、芦荟单体衍生物、芦荟单体代谢物和/或芦荟单体活性盐、芦荟单体的提取物和/或组合物。

进一步，所述真菌包括对机体危害较轻的浅部真菌和危害严重的深部真菌；其中，所述真菌优选白色念珠菌。

本发明的另一目的在于提供一种应用所述的抗真菌的中药单体的芦荟苷和芦荟大黄素抑制真菌菌丝发育的检测方法，所述芦荟苷和芦荟大黄素抑制真菌菌丝发育的检测方法包括以下步骤：

步骤一，将白色念珠菌置于 RPMI 1640 培养基中孵育，并通过向培养基内加入 10%胎牛血清的方法诱导白色念珠菌菌丝形成；

步骤二，将芦荟苷和芦荟大黄素分别溶于 DMSO 中，至浓度为 100mg/mL，于-20℃冰箱中贮存待用；

步骤三，分别进行菌丝发育检测以及细胞损伤检测。

进一步，所述步骤一中的白色念珠菌为 *Candida albicans* SC5314。

进一步，所述步骤一中的孵育条件为 37℃，5% CO₂。

进一步，所述步骤三中的菌丝发育检测方法包括：

(1) 用含 10%胎牛血清的液体培养基将贮存的 100mg/mL 的芦荟苷或芦荟大黄素溶液分别配制成一系列稀释浓度的芦荟苷或芦荟大黄素药液。

(2) 将白色念珠菌细胞接种到 96 孔板中，每孔 99μL，1×10⁴ 个细胞，分别加入 1μL 芦荟苷或芦荟大黄素药液；记录每一个孔的芦荟苷或芦荟大黄素的浓度，同时设置不加任何药物的空白对照组，做三个平行的 96 孔板，结果取平均值；将 96 孔板置于 CYTATION5 活细胞成像仪中，设置培养条件为 37℃，5% CO₂，动态成像 20~24h 观察菌丝的形成情况并检测菌丝直径。

进一步，所述步骤(1)中的液体培养基为 RPMI 1640 培养基。

进一步，所述步骤三中的细胞损伤检测方法包括：

(1) 将复苏好的人体细胞加入 96 孔板中，每孔 100μL，1×10⁴ 个细胞，于 37℃，5% CO₂ 的环境下培养 24h。

(2) 取白色念珠菌细胞于 DMEM 培养基中制备菌悬液，血球计数板计数后，于 20mL DMEM 培养基中将真菌浓度稀释为 10⁵ CFU/mL；加入菌液及不同浓度的芦荟苷或芦荟大黄素，于 37℃，5% CO₂ 的环境下培养 20~24h；参照 LDH 试剂盒方法测试细胞释放到培养液中的 LDH 活性；在高对照孔中加入 10μL

Triton-100 裂解细胞，在低对照和背景 Blank 孔中加入 10 μ L DMEM 培养基，在 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 的环境下培养 30min；96 孔板离心 2min，250g，从每个孔中吸取 50 μ L 上清液至新的 96 孔板中；在每个孔中加入 50 μ L 反应混合液后，在避光、室温条件下培养 30min；在每孔中加入 25 μ L 终止液后，立即用酶标仪测定 490nm 的吸光度，并计算细胞损伤率。

(3) 使用 SPSS19.0 软件进行统计分析；采用独立样本 t 检验、单因素方差分析 ANOVA 方法对组间差异进行检验和比较；P<0.05 有统计学意义。

进一步，所述步骤 (2) 中的细胞损伤率的计算公式为：

$$\text{细胞损伤率(\%)}=[(A-C)/(B-C)]\times 100;$$

其中，A 为样品的吸光度，即样品孔-样品 Blank 孔；B 为高对照的吸光度，即高对照孔-高对照 Blank 孔；C 为低对照的吸光度，即低对照孔-背景 Blank 孔。

结合上述的所有技术方案，本发明所具备的优点及积极效果为：本发明提供的抗真菌的中药单体，通过对一系列芦荟单体进行筛选，发现芦荟苷与芦荟大黄素影响白色念珠菌的菌丝形成，使其变成低毒或无毒的菌丝，可降低白色念珠菌对人体细胞的毒性作用。芦荟单体不直接抑制真菌生长，却能显著降低真菌对人体细胞的损伤，这样的新型中药打破了传统药物的抑菌杀菌作用，有利于维护菌群平衡、降低耐药及交叉感染的发生，同时降低抗真菌药物的副作用。这对于发现新的抗真菌药物靶位、缓解真菌耐药现状具有重要意义。本发明通过这一研究，可将芦荟推广于更多作用领域，从而充分发挥传统中药的价值，为研发更多具有抗真菌作用的新药及解决临床难治性真菌疾病提供新思路，同时也为拓展中医药在不同领域的应用转化。

本发明能够有效扩大现有抗真菌药物储备池，拓展芦荟在微生物领域的应用。芦荟单体能阻断“真菌-宿主”相互作用，这样的新型中药打破了传统药物的抑菌杀菌作用，而是阻断菌丝发育以及感染毒力，使得有效治疗真菌感染的同时，真菌不易进化出新的耐药机制。

菌丝发育结果显示：100 μ g/mL 芦荟苷处理白色念珠菌后真菌菌丝形成分叉

更少，直径较细；而 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的芦荟大黄素处理后白色念珠菌不能形成正常的菌丝，真菌以更多酵母相的形式存在。

细胞损伤检测结果显示：12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芦荟苷或 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芦荟大黄素均能够显著抑制真菌白色念珠菌对细胞的破坏，降低了对细胞的毒性作用，减轻了对人体细胞的损伤 ($P<0.05$)。

芦荟单体可使用芦荟单体类似物、衍生物、代谢物和药物活性盐替代。本发明药物所能抑制的真菌来源广泛，包括当不限于对机体危害较轻的浅部真菌和危害严重的深部真菌。本发明通过筛选首次发现芦荟苷及芦荟大黄素虽然不能直接抑制真菌生长，却能显著降低真菌对人体细胞的损伤。这是首次揭示芦荟来源的单体抑制真菌菌丝发育以及阻断真菌-宿主相互作用，可为临床治疗白色念珠菌感染提供新的候选药物。

附图说明

为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案，下面将对本发明实施例中所需要使用的附图做简单的介绍，显而易见地，下面所描述的附图仅仅是本发明的一些实施例，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下还可以根据这些附图获得其他的附图。

图 1 是本发明实施例提供的芦荟苷和芦荟大黄素抑制真菌菌丝发育的检测方法流程图。

图 2 是本发明实施例提供的芦荟单体抑制白色念珠菌菌丝发育示意图。

图 2A 是本发明实施例提供的无药物的野生型白色念珠菌菌丝发育示意图。

图 2B 是本发明实施例提供的芦荟苷 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理的白色念珠菌形成的菌丝分叉少，直径较细示意图。

图 2C 是本发明实施例提供的芦荟大黄素 (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理的白色念珠菌菌丝形成受到抑制或阻断示意图。

图 3 是本发明实施例提供的芦荟素及芦荟大黄素降低白色念珠菌对细胞的

损伤作用示意图。

具体实施方式

为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白，以下结合实施例，对本发明进行进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。

针对现有技术存在的问题，本发明提供了一种抗真菌的中药单体，下面结合附图对本发明作详细的描述。

如图 1 所示，本发明实施例提供的芦荟苷和芦荟大黄素抑制真菌菌丝发育的检测方法包括以下步骤：

S101，将白色念珠菌置于 RPMI 1640 培养基中孵育，并通过向培养基内加入 10%胎牛血清的方法诱导白色念珠菌菌丝形成；

S102，将芦荟苷和芦荟大黄素分别溶于 DMSO 中，至浓度为 100mg/mL，于-20℃冰箱中贮存待用；

S103，分别进行菌丝发育检测以及细胞损伤检测。

下面结合具体实施例对本发明的技术方案作进一步描述。

应当明确的是，实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法，下述实施例中所使用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

白色念珠菌 *Candida albicans* SC5314 购自美国标准生物品收藏中心（American Type Culture Collection），保藏号为 ATCC MYA-2876。

正常人细胞系 HOK 购自美国 ScienCell 公司（产品目录号#2610）；

芦荟苷购自 Solarbio 公司（产品目录号 SA8220）；

芦荟大黄素购自 Solarbio 公司（产品目录号 SA8200）。

一、芦荟苷和芦荟大黄素抑制真菌菌丝发育检测

1、将白色念珠菌 *Candida albicans* SC5314 在 RPMI 1640 培养基中，37℃，5% CO₂ 的条件下孵育。通过向培养基内加入 10%胎牛血清的方法诱导白色念珠

菌菌丝形成。

2、将芦荟苷和芦荟大黄素分别溶于 DMSO 中,至浓度为 100mg/mL,于-20℃冰箱中贮存待用。

3、菌丝发育检测

(1) 用含 10%胎牛血清的液体培养基 (RPMI 1640 培养基) 将贮存的 100mg/mL 的芦荟苷或芦荟大黄素溶液分别配制成一系列稀释浓度的芦荟苷或芦荟大黄素药液。

(2) 将白色念珠菌细胞接种到 96 孔板中,每孔 99 μ L (约 1×10^4 个细胞),分别加入 1 μ L 芦荟苷或芦荟大黄素药液。记录每一个孔的芦荟苷或芦荟大黄素的浓度,同时设置不加任何药物的空白对照组,做三个平行的 96 孔板,结果取平均值。将 96 孔板置于 CYTATION5 活细胞成像仪中,设置培养条件为 37℃, 5% CO₂, 动态成像 20~24h 观察菌丝的形成情况并检测菌丝直径。

菌丝发育结果显示: 100 μ g/mL 芦荟苷处理白色念珠菌后真菌菌丝形成分叉更少,直径较细;而 12.5 μ g/mL 的芦荟大黄素处理后白色念珠菌不能形成正常的菌丝,真菌以更多酵母相的形式存在(见图 2)。

4、细胞损伤检测

(1) 将复苏好的人体细胞加入 96 孔板中,每孔 100 μ L (约 1×10^4 个细胞),于 37℃, 5% CO₂ 的环境下培养 24h。

(2) 取白色念珠菌细胞于 DMEM 培养基中制备菌悬液,血球计数板计数后,于 20mL DMEM 培养基中将真菌浓度稀释为 10^5 CFU/mL。按表 1 加入菌液及不同浓度的芦荟苷或芦荟大黄素,于 37℃, 5% CO₂ 的环境下培养 20~24h。参照 Roche Cytotoxicity Detection Kit (LDH) 试剂盒方法测试细胞释放到培养液中的 LDH 活性。在高对照孔中加入 10 μ L Triton-100 裂解细胞,在低对照和背景 Blank 孔中加入 10 μ L DMEM 培养基,在 37℃, 5% CO₂ 的环境下培养 30min。96 孔板离心 2min (250g),从每个孔中吸取 50 μ L 上清液至新的 96 孔板中。在每个孔中加入 50 μ L 反应混合液后,在避光、室温条件下培养 30min。在每孔中

说明书

加入 25 μ L 终止液后，立即用酶标仪测定 490nm 的吸光度，并计算细胞损伤率。
细胞损伤率(%)=[(A-C)/(B-C)] \times 100。

A：样品的吸光度（样品孔-样品 Blank 孔）；

B：高对照的吸光度（高对照孔-高对照 Blank 孔）；

C：低对照的吸光度（低对照孔-背景 Blank 孔）。

表 1 各孔的溶液量

	样品	样品Blank	高对照	高对照Blank	低对照	背景Blank
培养基	10 μ L	60 μ L	50 μ L	100 μ L	60 μ L	110 μ L
细胞悬液	50 μ L	-	50 μ L	-	50 μ L	-
真菌及药物	50 μ L	50 μ L	-	-	-	-
Triton-100	-	-	10 μ L	10 μ L	-	-
	样品	样品Blank	高对照	高对照Blank	低对照	背景Blank

（3）使用SPSS19.0软件进行统计分析。采用独立样本t检验、单因素方差分析（ANOVA）方法对组间差异进行检验和比较。P<0.05有统计学意义。

结果显示：12.5 μ g/mL~100 μ g/mL芦荟苷或6.25 μ g/mL~100 μ g/mL芦荟大黄素均能够显著抑制真菌白色念珠菌对细胞的破坏，降低了对细胞的毒性作用，减轻了对人体细胞的损伤（P<0.05）（见图3）。

芦荟单体可使用芦荟单体类似物、衍生物、代谢物和药物活性盐替代。本发明药物所能抑制的真菌来源广泛，包括当不限于对机体危害较轻的浅部真菌和危害严重的深部真菌。

本发明通过筛选首次发现芦荟苷及芦荟大黄素虽然不能直接抑制真菌生长，却能显著降低真菌对人体细胞的损伤。这是首次揭示芦荟来源的单体抑制真菌菌丝发育以及阻断真菌-宿主相互作用，可为临床治疗白色念珠菌感染提供新的候选药物。

以上所述，仅为本发明的具体实施方式，但本发明的保护范围并不局限于此，任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内，凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等，都应涵盖在本发明的保护范围之内。