

水溶性卟啉对金黄色葡萄球菌、白色念珠菌的杀菌作用研究

章晓联 屈雪菊 周翔*

(湖北医学院微生物学教研室, 武汉 430071)

摘要 首次利用物化性质稳定的水溶性卟啉研究了对细菌和真菌的光敏杀菌作用。其杀灭金黄色葡萄球菌、白色念珠菌的能力随着卟啉浓度增大而增强。杀菌作用强弱与光照时间有关, 光照1小时, 杀菌能力最强。杀菌能力与青霉素相近。

关键词 卟啉; 光敏作用; 自由基; 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*); 白色念珠菌 (*Candida albicans*); 灭活

有关卟啉化合物在医学、生物学上的研究, 尤其是对恶性肿瘤的光动力学治疗已有许多报道^[1-3], 如 Dougherth^[4]等人研究了血卟啉及其衍生物治疗癌症的光动力效应, 发现对结肠癌、乳腺癌等恶性肿瘤能起杀伤作用, 而对正常组织损伤很小。关于水溶性卟啉合成及其对红细胞膜、病毒核酸、人血清中乳酸脱氢酶、肌酸激酶和胆固醇的研究我们也曾做过一些工作^[5-7]。但对卟啉化合物的作用机制还不甚清楚, 卟啉的杀细胞作用还没有很好的解释。卟啉对于细菌、真菌的光动力作用研究, 现在基本上是空白。鉴于细菌、真菌材料来源丰富, 我们试图开展卟啉对细菌、真菌的光敏杀菌作用, 为抗菌药源的开发作一些基础研究工作。

材料与方法

(一) 材料

1. 水溶性卟啉化合物 $[H_2T_{NACN}PyP]$, 中位-四(4-N-氰甲基吡啶基)卟啉按文献[5]的方法合成。2. 金黄色葡萄球菌、白色念珠菌由本室鉴定、保存。

(二) 方法

1. 水溶性卟啉对金黄色葡萄球菌 W46 生长的光动力抑制实验: 参照文献[8], 设置7支小试管, 第1管加5ml肉汤, 2—7管各加3ml肉汤, 再在第1管加1ml 10^{-3} mol/L 卟啉混匀, 从中吸取3ml 加到第2管, 混匀后再吸取3ml

加到第3管, 以此类推进行倍比稀释, 从第6管吸取3ml 弃掉, 第7管不加卟啉作为对照管。取100亿/ml 金黄色葡萄球菌分别加入每管0.05ml, 混匀, 距光源20cm处, 用100W灯泡光照1小时, 然后各管取0.05ml于肉汤琼脂培养基上倾注培养, 37℃24小时后计算各个平皿上的菌落数。同法做青霉素对比实验。

2. 光照不同时间, 卟啉对金黄色葡萄球菌 W46 的抑制作用: 按上述方法将卟啉作用于金黄色葡萄球菌 W46, 光照1和2小时, 每个时间各设置装有不同浓度卟啉的7支试管, 光照后, 分别点种于肉汤琼脂培养基上, 37℃24小时后观察有无细菌生长。

3. 卟啉对白色念珠菌的光动力抑制作用: 取7支装有3ml沙氏液体培养基试管, 第1管加入0.2mol/L 卟啉混匀, 从中吸取1ml至第2管, 混匀, 再从第2管吸取1ml至第3管, 以此类推, 从第6管吸取1ml 弃掉, 第7管不加卟啉作为对照管。各管终体积仍为3ml。再于每管加入新鲜培养的白色念珠菌(100亿/ml)0.1ml, 置距100W灯光8cm处光照, 7支试管分别照射0, 1, 2小时, 然后分别点种于沙氏固体培养基上, 37℃培养24—48小时, 观察细菌生长情况。以上所有实验均是无菌操作。*

结果与讨论

(一) 不同浓度的吡啉杀菌能力 (图 1)

图 1 说明, 光照 1 小时, 随着吡啉浓度的增大, 其杀灭金黄色葡萄球菌的能力逐渐增强, 最小抑菌浓度为 $1.0 \times 10^{-5} \text{mol/L}$, 青霉素最小抑菌浓度为 $0.5 \times 10^{-5} \text{mol/L}$, 二者杀菌能力相近。

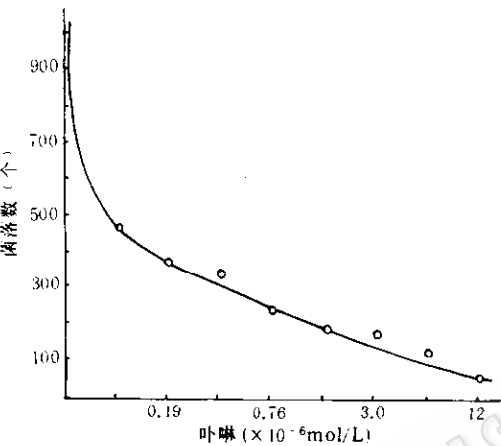


图 1 吡啉浓度与杀菌能力的关系

(二) 不同光照时间吡啉的杀菌能力 (表 1)

表 1 结果说明, 光照不同时间吡啉灭菌的能力不同, 当吡啉浓度较大时, 如浓度为 $1.6 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ 时, 不光照也能杀灭细菌, 因不光照时吡啉不释放自由基^[6], 这说明细菌的灭活是由于较高浓度吡啉本身对细菌具有毒性作用。而光照 1 小时吡啉能以较小浓度如 $1.0 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ 灭活细菌。大于 $1.0 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ 浓度的吡啉, 光照 1 小时后细菌均被灭活, 而不加吡啉的对照管光照 1 小时后和加 $1.0 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ 吡啉不光照的试管细菌都能大量生长, 而吡啉在光照下能够不断释放一些自由基如单重态氧 ($^1\text{O}_2$) 和羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$)^[6], 由此说明细菌的灭活与吡啉光照后释放的自由基有关, 自由基有一定灭活细菌的能力。但光照 2 小时后, 灭菌能力减弱, 我们推测是光照时间过长, 发生光复活作用, 使细菌复活。

表 1 光照时间与吡啉灭菌能力的关系

管 号		1	2	3	4	5	6	7
吡 啉 (mol/L)		1.6×10^{-4}	8×10^{-5}	4×10^{-5}	2×10^{-5}	1×10^{-5}	5×10^{-6}	0
光照 时间 (h)	1	—	—	—	—	—	+	+++
	2	—	—	干	+	+	++	+++
	0	—	+	+	+	++	+++	+++

“—”表示细菌不生长; “+”表示细菌生长; “+”愈多, 表示细菌增殖得愈多

(三) 吡啉对白色念珠菌的杀灭作用

表 2 结果说明, 吡啉对白色念珠菌具有较好的灭菌作用。随着吡啉浓度增大, 杀灭真菌的能力增强。且光照时间不同, 灭菌能力不同, 光照 1 小时灭菌能力最强。由于真菌对 $^1\text{O}_2$ 和 $\cdot\text{OH}$ 自由基敏感, 而吡啉在光照下不断释放 $^1\text{O}_2$ 和 $\cdot\text{OH}$, 所以 $^1\text{O}_2$ 和 $\cdot\text{OH}$ 作用于白色念珠菌, 使光照后吡啉的灭菌能力增强, 在不光照

时其灭菌能力减弱, 所以需要较高浓度的吡啉才能灭活真菌。而光照 2 小时后, 由于光复活作用, 反而使其灭菌能力减弱(如 5 号管和 6 号管细菌生长), 并且高浓度吡啉(如 $5 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ 、 $1.25 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ 时)易形成二聚吡啉^[6], 因此光照后释放的自由基降低, 与光复活作用有协同作用, 减小了吡啉的灭菌能力(如 1 号管和 2 号管细菌生长)。

表 2 卟啉对白色念珠菌的杀灭作用

管 号			1	2	3	4	5	6	7
卟啉(mol/L)			5×10^{-2}	1.25×10^{-2}	0.31×10^{-2}	0.8×10^{-3}	0.2×10^{-2}	0.5×10^{-4}	0
37℃培养 24h	光照时间(h)	1		—	—	—	—	—	+++
		2	—	—	—	—	—	—	+++
		0	—	—	+	+	++	+++	+++
37℃培养 48h	光照时间(h)	1	—	—	—	—	—		+++
		2	++	+	—	—	+	—	+++
		0	—	+	+++	+++	++	+++	+++

同时我们还初步实验了卟啉作用于金黄色葡萄球菌后,细菌的钾离子渗出量发生改变,钾离子的渗出量增大,说明卟啉使细菌的细胞膜通透性发生改变。还发现卟啉对一些 G⁻菌如大肠杆菌、痢疾杆菌和绿脓杆菌等的灭菌作用很弱。

总结上述结果,水溶性卟啉是金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的很好杀菌物质。随着卟啉浓度增大,其灭菌能力增强。其灭菌能力与青霉素相近。光照一定时间(1小时)杀菌能力增强,这是由于卟啉在光照下释放的自由基(如[•]O₂和[•]OH)作用于细菌,增强了其灭菌能力,[•]O₂和[•]OH自由基具有一定灭活细菌的能力。初步实验还表明卟啉作用后细菌的钾离子通透性发生改变,钾离子渗出量增大,故达到杀菌的目的。目前临床上普遍出现细菌对抗生素的耐药性增强,真菌的抗菌药缺乏,对金黄色葡萄球菌引起的各种皮肤感染、化脓性感染,对白色念珠菌引起的皮肤念珠菌病等多种疾病有

效的药物不甚多的状况,由于水溶性卟啉对金黄色葡萄球菌和白色念珠菌有较强的灭菌能力,并且具有性质稳定,有效浓度低,对机体毒性小等优点。我们认为卟啉作为一种抗菌药物还是有一定应用价值的。本实验对卟啉在临床上杀伤肿瘤细胞的机制还可提供一些线索。

参 考 文 献

1. Kinsey G H et al. : *Cancer Res.* , **41** : 5020, 1981.
2. 哈献文: 肿瘤防治研究, **2** : 98, 1983.
3. 袁履冰等: 化学通报, **8** : 25, 1984.
4. Dougherty T J et al. : *J. Camcer. Imsti.* , **62** (2) : 231—238, 1979.
5. 吴贇阶等: 有机化学, **10** : 50, 1990.
6. 章晓联等: 湖北医学院学报, **12** (4) : 321—324, 1991.
7. 周翔等: 武汉大学学报(自然科学版), 化学专刊, 47—51, 1989.
8. 杨延彬等主编: 临床微生物学检验, 高等临床检验专业试用教材, 上册, 第 487—510 页, 下册, 第 998—999 页, 吉林医学院出版, 1983.

(1992-05-18 收稿)

THE STUDY OF A WATER-SOLUBLE PORPHYRIN PHOTOSENSITIZATION TO THE STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND CANDIDA ALBICANS

Zhang Xiaolian Qu Xueju Zhou Xiang

(Department of Microbiology, Hubei Medical College, Wuhan, 430071)

We first study the photosensitization to bacteria and fungi with a definite structure, water-soluble porphyrin. We found that the porphyrin had strong sterilization on the *Staphylococcus au-*

reus and *Candida albicans*. When the porphyrin concentrations increased, its sterilization strengthened. The sterilization was related to the photoradiating time. When photoradiating time was one hour, its sterilizing ability was the greatest. Its sterilizing ability was similar to the penicillin's.

Key words Porphyrin; Photosensitization Free radical; *Staphylococcus aureus*; *Candida albicans*; sterilization