

研究报告

高通量测序分析不同浓度的白鲜碱对须癣毛癣菌转录组的影响

吴建美^{#1}, 高璐^{#2}, 刘登宇³, 尉迟邈³, 曲琳^{*1,2}

1 内蒙古综合疾病预防控制中心, 内蒙古 呼和浩特 010031

2 内蒙古医科大学, 内蒙古 呼和浩特 010000

3 内蒙古科技大学包头医学院, 内蒙古 包头 014000

吴建美, 高璐, 刘登宇, 尉迟邈, 曲琳. 高通量测序分析不同浓度的白鲜碱对须癣毛癣菌转录组的影响[J]. 微生物学通报, 2022, 49(2): 702-712

Wu Jianmei, Gao Lu, Liu Dengyu, Yu Chimiao, Qu Lin. Effect of dictamnine at different concentration on *Trichophyton mentagrophytes* transcriptome: based on high-throughput sequencing[J]. Microbiology China, 2022, 49(2): 702-712

摘要:【背景】目前, 由皮肤浅部真菌引起的皮肤病逐年增加, 已经成为影响人类健康的重大问题之一。【目的】探究白鲜碱(dictamnine, DIC)单体对须癣毛癣菌的抑菌作用及作用机制。【方法】通过高通量测序技术对须癣毛癣菌及白鲜碱作用后的须癣毛癣菌进行转录组测序, 对测序序列进行处理和生物信息学分析, 以及测序质量评价和序列注释。通过与对照组比较, 鉴别出差异表达基因, 然后进行 GO 功能显著性分析和 KEGG 代谢途径分析等。【结果】白鲜碱对须癣毛癣菌的 MIC 值为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。DIC 高剂量组与对照组比较, 共 360 个差异基因; 其中上调表达 265 个, 下调表达 95 个。MFS1、KU70、KU80、L2、cpaT、MFS2、VdtG、patC 等基因表达有显著差异。GO 功能富集表明, 差异基因主要集中于核糖体、线粒体膜、抗氧化活性、毒素代谢过程、单一生物代谢过程、次生代谢过程、初级活性跨膜转运蛋白活性和活跃的跨膜转运蛋白活性等。KEGG 代谢途径的改变主要集中在 ABC 转运、膜运输障碍、谷胱甘肽代谢、DNA 的复制与修复变化、减数分裂、氧化磷酸化和丙酮酸代谢障碍等富集通路上, 并且相关基因均有显著性改变 ($P < 0.05$)。【结论】白鲜碱对须癣毛癣菌的抑菌机制可能与影响须癣毛癣菌 DNA 复制表达、能量代谢、DNA 修复、ABC 转运等途径有关。

关键词: 白鲜碱; 须癣毛癣菌; 高通量测序技术; 作用机制

基金项目: 内蒙古科技计划项目(201802117); 内蒙古自治区医疗卫生毒理学重点实验室

[#]对本文贡献相同

Supported by: Inner Mongolia Science and Technology Program (201802117); Inner Mongolia Autonomous Region Key Laboratory of Medical Toxicology

[#]These authors equally contributed to this work

*Corresponding author: E-mail: gaolu962464@163.com

Received: 2021-07-21; Accepted: 2021-09-12; Published online: 2021-10-25

Effect of dictamnine at different concentration on *Trichophyton mentagrophytes* transcriptome: based on high-throughput sequencing

WU Jianmei^{#1}, GAO Lu^{#2}, LIU Dengyu³, YU Chimiao³, QU Lin^{*1,2}

1 Inner Mongolia Autonomous Region Comprehensive Center for Disease Control and Prevention, Hohhot 010031, Inner Mongolia, China

2 Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010000, Inner Mongolia, China

3 Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014000, Inner Mongolia, China

Abstract: [Background] Superficial mycosis cases have been increasing year by year and the pathogenic fungi have become one of the major threats to human health. [Objective] This paper aims to explore the inhibitory effect of dictamnine (DIC) on *Trichophyton mentagrophytes* and the underlying mechanism. [Methods] Transcriptome sequencing was performed on *T. mentagrophytes* and *T. mentagrophytes* after the action of DIC by high-throughput sequencing technology, processing and bioinformatics analysis of the sequencing sequence, sequencing quality evaluation and sequence annotation. By comparing with the control group, differentially expressed genes were identified, and then GO function significance analysis and KEGG metabolic pathway analysis were performed. [Results] The minimum inhibitory concentration (MIC) of DIC on *T. mentagrophytes* was 50 µg/mL. A total of 360 differentially expressed genes (DEGs) were identified between the control group and DIC high-dose group (265 up-regulated and 95 down-regulated), and the expression of *MFS1*, *KU70*, *KU80*, *L2*, *cpaT*, *MFS2*, *VdtG* and *patC* was significantly different. The DEGs were mainly involved in the GO terms of ribosome, mitochondrial membrane, antioxidant activity, toxin metabolic process, single biological metabolic process, secondary metabolic process, primary active transmembrane transporter activity, and active transmembrane transporter activity. The changes in the KEGG metabolic pathway mainly focus on enrichment pathways such as ABC transport, membrane transport barriers, glutathione metabolism, DNA replication and repair changes, meiosis, oxidative phosphorylation and pyruvate metabolism disorders, and related genes are all There is a significant change ($P < 0.05$). [Conclusion] DIC inhibits *T. mentagrophytes* by influencing DNA replication, expression, and repair, energy metabolism, ABC transport, and other pathways of the fungus.

Keywords: dictamnine; *Trichophyton mentagrophytes*; high-throughput sequencing technology; mechanism of action

皮肤浅部真菌是一组致病真菌, 专门感染皮肤浅层、甲和发, 从而引起皮肤浅部真菌病。现在, 由皮肤浅部真菌引起的皮肤病逐年增加, 已经成为影响人类健康的重大问题之一^[1]。皮肤癣菌病学名皮肤浅部真菌病, 导致皮肤癣菌病最主要的真菌为红色毛癣菌和须癣毛癣菌。

西医的抗真菌药物如特比萘芬, 其疗效显著、患者接受度高, 但是单纯外用具有疗程较长、易复发、价格高、起效慢和有耐药倾向等缺点。因此, 寻找新的、替代的天然药物就迫在眉睫^[2]。然而中草药具有抗菌谱广、疗效高、价格低廉等优点, 寻找抗菌中药便成为了重中之重。

白鲜碱(dictamnine, DIC)是一种天然生物碱,可从白鲜皮中提取出来^[3]。其具有抗炎、抗真菌、抗血管生成和抗癌等多种生物学功能^[4]。在中药中,白鲜皮常用来治疗皮肤癣菌病^[5]。白鲜皮作为一种草药在世界范围内广泛使用,许多亚洲和欧洲国家也认为白鲜皮具有抗真菌作用^[6]。虽然白鲜皮是公认的治疗皮肤癣菌病疗效较好的中药,但是其抑菌作用机制尚不清楚。因此本实验探究白鲜碱对须癣毛癣菌的抑菌作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物

白鲜碱标准品,北京索莱科技有限公司; DMSO,上海泽叶生物科技有限公司。

1.1.2 菌株

须癣毛癣菌(*Trichophyton mentagrophytes*) BNCC 340405,北京北纳创联生物技术研究院(BNCC),且附有鉴定证书。

1.1.3 培养基

0.5%葡萄糖肉汤培养基,北京路桥技术股份有限公司;马铃薯琼脂培养基、PDA培养基,青岛海博生物技术有限公司。

1.1.4 主要试剂和仪器

Trizol 试剂,赛默飞世尔科技有限公司; Ribo-Zero™ 磁性试剂盒, Epicentre 生物技术公司; QiaQuick PCR 提取试剂盒,凯杰生物技术有限公司。生物安全柜,山东博科生物技术有限公司; 压力蒸汽灭菌锅,ALP 公司; 恒温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司; Illumina NovaSeq 6000,德诺沃生物技术公司; Agilent 2100 生物分析仪,Agilent 生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 药物的配制

取 10 mg 白鲜碱溶于 1 mL DMSO,配成

10 mg/mL 白鲜碱溶液。混匀后置于-20 °C 冰箱备用。

1.2.2 最低抑菌浓度测定

将须癣毛癣菌接种于 PDA 培养基上,28 °C 静置培养 7-14 d。用 0.85% 无菌生理盐水冲洗平板,无菌环轻轻刮取,再用微量移液枪吸取菌悬液放置于灭菌 EP 管中振荡 15 s,然后用肉汤培养基进行稀释,将其浓度控制在 $(0.4-5.0) \times 10^6$ CFU/mL 备用^[7]。

参照 CLSI M38-A2 的丝状真菌的药敏方案^[8],用倍比稀释法将白鲜碱药液浓度稀释为 400、200、100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.563 $\mu\text{g/mL}$,各取 100 μL 加至 96 孔板,再分别加入 100 μL 稀释的菌悬液。同时设一个阴性对照组,即先加 100 μL 肉汤,再加 100 μL 稀释的菌悬液至 96 孔板。放置于 28 °C 恒温培养箱中培养 7 d,观察白鲜碱对须癣毛癣菌的 MIC 值^[9]。

1.2.3 细胞活力测定

采用 CCK-8 法测定细胞活力。将分生孢子悬液接种到 96 孔板中, DIC 的浓度分别为 400-1.563 $\mu\text{g/mL}$,最后一孔为阴性对照。在 28 °C 下培养 3 d 后,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液进行细胞活力测定。培养 4 h 后,在 450 nm 处检测细胞活力。实验重复 4 次。

1.2.4 高通量测序样本的制备

将须癣毛癣菌接种于 PDA 培养基上 28 °C 静置培养 7 d 后用无菌生理盐水冲洗得到菌悬液,用 0.5% 葡萄糖肉汤培养基将菌悬液稀释至 $(0.4-5.0) \times 10^6$ CFU/mL。将白鲜碱药液分别稀释成 25 $\mu\text{g/mL}$ (高剂量组)和 12.5 $\mu\text{g/mL}$ (低剂量组),并且设立对照组,加至 24 孔板中,于 28 °C 恒温培养箱中培养 7 d 收集菌体。

吸取 1 mL 培养 7 d 的菌液至 1.5 mL 离心管中,4 °C、7 000 r/min 离心 5 min; 再加入 1 mL PBS 缓冲液,上下轻柔颠倒使菌体散开,

7 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 重复 2-3 次; 弃上清, 迅速液氮速冻 15 min 以上, 随后保存于-80 °C 冰箱中。

1.2.5 总 RNA 抽提、cDNA 文库构建和转录组测序

使用 Trizol 试剂盒提取总 RNA, 通过 Ribo-Zero™ 磁性试剂盒去除 rRNA, 用 Oligo(dT) 将 mRNA 富集。然后用片段缓冲液将富集的 mRNA 片段化为短片段, 用随机引物将其逆转录为 cDNA。用 DNA 聚合酶 I、RNA 酶 H、dNTP 和缓冲液合成第二链 cDNA。然后用 QiaQuick PCR 提取试剂盒纯化 cDNA 片段, 末端修复, 添加碱基, 连接到 Illumina 测序适配器进行操作。连接产物经琼脂糖凝胶电泳、PCR 筛选后由广州基迪奥生物科技有限公司使用 Illumina NovaSeq 6000 进行扩增和测序。

1.2.6 测序结果统计分析

由广州基迪奥生物科技有限公司对测序序列进行处理和生物信息学分析, 评价测序质量并进行序列注释。通过与对照组比较, 鉴别出差异表达基因(differentially expressed gene, DEG), 以及进行 GO 功能显著性分析和 KEGG 代谢途径分析等。用 DESeq2^[10]软件对 2 组进行 RNA 差异表达分析: 差异基因的筛选标准为 $|\log_2(\text{fold change})| > 1$, $P < 0.05$ 。利用 GO 数据库对所有差异基因进行注释, 采用 KEGG 数据库对差异基因进行通路分析。采用超几何分布计算差异基因显著富集的 GO 条目和 KEGG 通路, $P < 0.05$ 为显著富集。

2 结果与分析

2.1 白鲜碱对须癣毛癣菌的 MIC 值

真菌培养 7 d 后, 从恒温培养箱中取出 96 孔板, 综合结果可知白鲜碱对须癣毛癣菌的 MIC 值为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。其中浓度 $\geq 50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的孔

板中无真菌生长, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为最低抑菌浓度, 即 DIC 对须癣毛癣菌的 MIC 值。

2.2 白鲜碱药液对须癣毛癣菌的细胞活性测定

采用 CCK-8 法测定细胞活力。得出对照组 OD_{450} 值为 1.411。处理组与对照组均做 4 组平行实验, 得出平均 OD_{450} 值。真菌生长抑制率的测定公式如下: 生长抑制率($\%$) = $(A_c - A_t) / A_c \times 100$, 其中 A_c 为空白对照组的平均 OD_{450} 值, A_t 为处理组的平均 OD_{450} 值。采用 CCK-8 法测定不同浓度 DIC 对须癣毛癣菌的 OD_{450} 值及抑制率, 如表 1 所示。

2.3 白鲜碱药液对须癣毛癣菌高通量测序结果

测序样本分为 3 个组, 分别是高剂量组 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (hx)、低剂量组 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (lx) 和对照组(cx)。每组均有 3 个生物学重复。

2.3.1 测序质量及序列比对统计结果

为了保证数据质量, 需在信息分析前对原始数据进行数据过滤, 以减少无效数据所带来的分析干扰。首先, 对总 reads 利用 FASTQ^[11]

表 1 不同浓度 DIC 对须癣毛癣菌的 OD_{450} 值及抑制率

Table 1 Determines OD_{450} value and the inhibition rate of different concentrations of DIC on *Trichophyton mentagrophytes*

Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	OD_{450}	Inhibition rate (%)
400	0.042	97.02
200	0.051	96.39
100	0.201	85.75
50	0.191	86.46
25	0.522	63.00
12.5	1.022	27.57
6.25	1.209	14.32
3.125	1.289	8.65
1.563	1.315	6.80

进行质控, 过滤低质量数据得到 clean reads, 并对 clean reads 的碱基含量分布和碱基质量分布进行统计(表 2)。总体来看, 各样品获得的 clean reads 百分比均大于 99%, 测序数据质量良好, 满足后续分析的要求。

2.3.2 白鲜碱药液作用后须癣毛癣菌的差异基因整体统计

对 3 组样品的基因利用 RSEM^[12]计算每个样本中所有基因的表达量, 根据计算的基因表达量(fragments per kilobase million, FPKM)计算该基因在不同样本间的差异表达倍数。按照 $P \leq 0.05$ 且差异表达倍数不低于 2 倍($|\log_2(\text{fold change})| > 1$)的条件对基因进行差异表达筛选。本研究有 3 组样本, 两两比较进行基因差异表达统计分析, 红色为上调表达量的基因数, 蓝色为下调表达量的基因数。测序结果分析表明, cx 组与 hx 组之间显著差异表达的基因总数为 360 个, 其中有 265 个基因上调表达, 95 个基因下调表达; cx 组与 lx 组之间显著差异表达的基因总数为 186 个, 有 111 个基因上调表达, 75 个基因下调表达。结果如图 1 所示。

表 2 测序数据质量控制

Table 2 Sequencing data quality control

Sample	Reads	Clean reads ^a	Q30 ^b
c1	40 023 764	39 856 336 (99.58)	93.31
c2	39 178 284	39 025 060 (99.61)	93.73
c3	37 678 352	37 538 600 (99.63)	93.67
h1	38 896 462	38 748 432 (99.62)	93.63
h2	41 771 676	41 621 542 (99.64)	93.92
h3	49 603 828	49 425 814 (99.64)	93.74
l1	42 182 260	42 033 026 (99.65)	93.71
l2	44 186 796	44 015 500 (99.61)	93.77
l3	44 953 852	44 789 922 (99.64)	93.87

注: a: Clean reads 数据占 reads 的百分比; b: 测序碱基质量值达到 Q30 以上水平的碱基数目及占 reads (或 clean reads)的百分比

Note: a: Clean reads data as a percentage of reads; b: The number of bases with a quality value of Q30 or higher for sequencing bases and the percentage of reads (or clean reads).

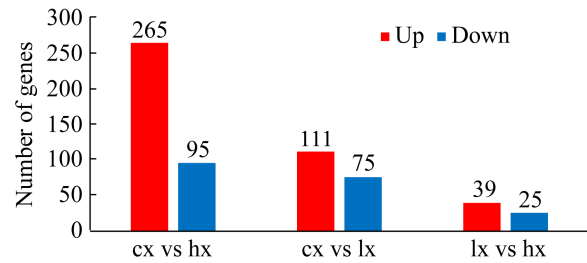


图 1 两组对比的差异表达基因统计

Figure 1 Statistics of differentially expressed genes between the two groups.

按照 P 值大小筛选排名前 10 的差异表达基因, 再根据差异倍数从大到小进行排序^[13-14], 结果如表 3 所示。与对照组相比, hx 组的差异基因最多。说明高剂量的 DIC 作用的基因位点最多, 可以引起更多基因表达差异。然而 cx vs hx 与 cx vs lx 组的下调基因差异变化不大, 说明高剂量的 DIC 会上调基因功能。

其中 *MFS1*、*SPBC146.06c*、*FUS7*、*YHR112C*、*KU70*、*KU80*、*gedE*、*gliA*、*cpaT*、*MDR5*、*MFS2* 为主要上调的基因。*L2*、*amdhd2*、*ARB_05178*、*MCR1*、*cdhR*、*VdtG*、*ycdJ*、*cta3*、*acuE*、*SCP2*、*CTB5*、*patC* 为下调的基因。这些基因可能是抑制须癣毛癣菌生长有关的位点(表 3, 表 4)。

2.3.3 差异表达基因的 GO 富集分析

GO 是一个国际化的基因功能分类体系, 总共有 3 个本体, 分别描述基因的分子功能、细胞组分和参与的生物过程。基于 GO 数据库, 对测序获得的差异表达基因进行 GO 功能显著性富集分析, 各功能分类下差异前 10 位的 GO 条目如表 5 所示。在 cx vs hx 中有 16 个 GO 条目显著富集($P < 0.05$), 其中包括催化活性、过氧化物酶活性、毒素代谢过程、次生代谢过程等。在 cx vs lx 中有 9 个 GO 条目显著富集($P < 0.05$), 并且只有分子功能有所差异, 说明低剂量 DIC 仅仅可以使分子功能改变有所差异, 包括膜转运蛋白、抗氧化活性及一些酶的变化等, 低剂量

表 3 不同药物浓度作用须癣毛癣菌排名前 10 位的差异表达基因

Table 3 Different drug concentration effects of the top 10 differentially expressed genes of *Trichophyton mentagrophytes*

Group	Gene	Log ₂ (fold change)	Group	Gene	Log ₂ (fold change)	Group	Gene	Log ₂ (fold change)
cx vs hx	<i>MFS1</i>	2.89	cx vs lx	<i>gedE</i>	2.79	lx vs hx	<i>cdhR</i>	-1.71
	<i>SPBC146.06c</i>	2.24		<i>MFS1</i>	2.60		<i>L2</i>	-1.64
	<i>FUS7</i>	2.08		<i>gliA</i>	2.59		<i>VdtG</i>	-1.55
	<i>YHR112C</i>	1.90		<i>cpaT</i>	2.56		<i>MFS2</i>	-1.50
	<i>KU70</i>	1.71		<i>YHR112C</i>	1.99		<i>ydcJ</i>	-1.43
	<i>KU80</i>	1.63		<i>MDR5</i>	1.99		<i>cta3</i>	-1.32
	<i>L2</i>	-2.54		<i>MFS2</i>	1.73		<i>acuE</i>	-1.18
	<i>amdhd2</i>	-1.88		<i>KU70</i>	1.71		<i>SCP2</i>	-1.13
	<i>ARB_05178</i>	-1.16		<i>FUS7</i>	1.57		<i>CTB5</i>	-1.06
	<i>MCR1</i>	-1.02		<i>ARB_05178</i>	-1.48		<i>patC</i>	-1.06

表 4 基因表达产物

Table 4 Gene expression products

基因 Gene	表达产物 Expression products
<i>MFS1</i>	耐药蛋白 Resistance protein
<i>SPBC146.06c</i>	与范可尼相关的核酸酶同源物 Nuclease homologs related to fanconi
<i>FUS7</i>	醛脱氢酶 Aldehyde dehydrogenase
<i>YHR112C</i>	反硫酸化酶 Desulfatase
<i>KU70</i>	ATP 依赖性 DNA 解旋酶 II 亚基 1 ATP-dependent DNA helicase II subunit 1
<i>KU80</i>	ATP 依赖性 DNA 解旋酶 II 亚基 2 ATP-dependent DNA helicase II subunit 2
<i>L2</i>	外排泵 Efflux pump
<i>amdhd2</i>	N-乙酰氨基葡萄糖-6-磷酸脱乙酰酶 N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase
<i>ARB_05178</i>	富含脯氨酸的蛋白质 6 Proline-rich protein 6
<i>MCR1</i>	NADH-细胞色素 b5 还原酶 NADH-cytochrome b5 reductase
<i>gedE</i>	谷胱甘肽 S-转移酶样蛋白 Glutathione S-transferase-like protein
<i>gliA</i>	MFS 胶毒素外排转运蛋白 GliA MFS glutoxin efflux transporter GliA
<i>cpaT</i>	外排泵 Efflux pump
<i>MDR5</i>	瘦霉素 B 抵抗蛋白 Leptin B resistance protein
<i>MFS2</i>	外排泵 Efflux pump
<i>cdhR</i>	异腈水合酶 Isonitrile hydratase
<i>VdtG</i>	外排泵 Efflux pump
<i>ydcJ</i>	含 DUF1338 域的蛋白 DUF1338 domain containing protein
<i>cta3</i>	钙转运 ATP 酶 Calcium transport ATPase
<i>acuE</i>	苹果酸合酶, 乙醛酸 Malate synthase, glyoxylate
<i>SCP2</i>	非特异性脂质转移蛋白 Non-specific lipid transfer protein
<i>CTB5</i>	FAD 依赖性单加氧酶 FAD-dependent monooxygenase
<i>patC</i>	外排泵 Efflux pump

表 5 3 组部分差异表达基因的 GO 功能分类

Table 5 GO functional classification of three groups of partial differentially expressed genes

Group	Ontology	GO term	Count	<i>P</i>	
cx vs hx	Molecular function	Catalytic activity	162	0.000 1	
		Peroxidase activity	6	0.000 3	
		Oxidoreductase activity, acting on peroxide as a receptor	6	0.000 3	
		Tetrapyrrole binding	16	0.000 8	
		Primary active transmembrane transporter activity	11	0.001 5	
		P-P bond hydrolysis-driven transmembrane transporter activity	11	0.001 5	
		Antioxidant activity	6	0.003 1	
		Transferase activity, transfer alkyl or aryl (except methyl)	8	0.004 8	
		Active transmembrane transporter activity	12	0.011 0	
		Oxidoreductase activity	35	0.021 4	
		Biological process	Toxin biosynthesis process	9	0.001 2
			Toxin metabolism process	9	0.001 2
			Single biological metabolic process	89	0.004 4
			Secondary metabolic process	11	0.006 0
			The biosynthetic process of secondary metabolites	9	0.007 0
			DNA repair	15	0.019 2
cx vs lx	Molecular function	Primary active transmembrane transporter activity	7	0.016 4	
		P-P bond hydrolysis-driven transmembrane transporter activity	7	0.016 4	
		Tetrapyrrole binding	9	0.016 4	
		Antioxidant activity	4	0.016 4	
		Active transmembrane transporter activity	8	0.016 4	
		Nucleoside triphosphatase activity	16	0.017 7	
		Pyrophosphatase activity	16	0.031 8	
		Hydrolase activity that acts on acid anhydride in containing phosphoric anhydride	16	0.031 8	
		Hydrolase activity, acting on acid anhydride	16	0.031 8	

可能对须癣毛癣菌作用不强烈。通过以上分析可以看出,低剂量 DIC 主要作用于分子功能,引起了一些分子功能的变化,增加剂量可以引起生物学过程的变化。高剂量的 DIC 作用须癣毛癣菌的效果更加显著,作用位点更加丰富。

2.3.4 差异表达基因的 KEGG 富集分析

基于 KEGG 数据库的通路富集分析,与对照组比较,高剂量组差异表达基因涉及 57 条通路,显著富集的通路有 6 条($P < 0.05$): ABC 转

运、谷胱甘肽代谢、类胡萝卜素的生物合成、非同源末端连接、核苷酸切除修复和同源重组。与对照组比较,低剂量组差异表达基因涉及 35 条通路,显著富集的通路有 6 条($P < 0.05$): ABC 转运、同源重组、非同源末端连接、谷胱甘肽代谢、硫代谢、抗坏血酸和醛酸代谢(表 6)。其中 ABC 转运、同源重组、非同源末端连接、谷胱甘肽代谢在低剂量组时就可引起通路的改变,因此 DIC 对这几条通路高度敏感。

表 6 cx、hx 和 lx 差异表达基因的 KEGG 代谢通路

Table 6 KEGG metabolic pathways of cx, hx, and lx differentially expressed genes

Group	KEGG A class	KEGG B class	Pathway	P value
cx vs hx	Environmental information processing metabolism	Membrane transport	ABC transfer	0.000 1
		Other amino acid metabolism	Glutathione metabolism	0.000 2
		Metabolism of terpenoids and polyketides	Biosynthesis of carotenoids	0.005 7
	Genetic information processing	Copy and repair	Non-homologous end joining	0.002 2
			Nucleotide excision repair	0.006 0
			Homologous recombination	0.000 0
cx vs lx	Environmental information processing	Membrane transport	ABC transfer	0.000 0
			Homologous recombination	0.000 2
	Genetic information processing	Copy and repair	Non-homologous end joining	0.000 3
			Glutathione metabolism	0.010 4
	metabolism	Other amino acid metabolism	Sulfur metabolism	0.026 1
		Energy metabolism	Ascorbic acid and aldehyde	0.047 0
		Carbohydrate metabolism		

3 讨论

现在, 由于广谱抗生素、激素、化疗和免疫抑制剂的广泛应用, 真菌感染的发病率也逐年增长^[15]。越来越多的研究从中药或植物中寻找有效的抗菌成分, 这些药物的抑菌机制也有待挖掘^[15]。须癣毛癣菌是皮肤浅部真菌病的常见致病菌, 可引起头癣、体股癣、手足癣等浅部感染及脓癣、肉芽肿等深部感染, 临床上较顽固且容易复发^[16]。近些年, 抗菌药物不断发展, 常见的抗真菌药物可以分为: 抑制真菌细胞膜的合成; 影响真菌细胞壁的成分; 抑制真菌细胞核的作用; 影响真菌的能量代谢^[17-19]。大量实验研究表明, 白鲜皮具有强的抗真菌作用, 但是白鲜皮中提取出的白鲜碱是否对须癣毛癣菌有抑菌作用及其抑菌作用机制均需进行深入研究。

最低抑菌浓度结果表明, 白鲜碱对须癣毛癣菌具有良好的杀菌作用, 其 MIC 值为 50 $\mu\text{g/mL}$ 。许玲玲等^[20]的研究表明, 白鲜皮的有效成分白鲜碱对皮肤癣菌的活性具有抑制作用, 与本实

验结果一致。

本研究采用高通量测序技术, 首次对低剂量(lx)、高剂量(hx)白鲜碱作用后的须癣毛癣菌及未经过任何处理的须癣毛癣菌(cx)的 mRNA 表达量进行研究。结果表明, cx、lx、hx 这 3 组基因表达量不同, 可能是白鲜碱作用须癣毛癣菌时对基因产生了改变。

通过差异基因分析, 筛选出对须癣毛癣菌有抑菌效果的基因, 其中 *MFS1* 主要表达耐药蛋白, 可能与耐药机制有关。*KU70*、*KU80* 表达的解旋酶上调, 可能是白鲜碱破坏了菌体的 DNA 结构, 导致菌体抑制生长。*L2*、*cpaT*、*MFS2*、*VdtG*、*patC* 为外排泵, 这些基因的表达有上调也有下调, 外排泵的作用可以使进入菌体的白鲜碱从菌体内排出增加, 使抗菌药物作用不到菌体, 这些基因的改变可能是白鲜碱抑制须癣毛癣菌生长的作用位点。醛脱氢酶、反硫酸化酶、解旋酶等的表达均增加, 说明这些酶的增加与白鲜碱的抑菌作用有关。然而 N-乙酰氨基葡萄糖-6-磷酸脱乙酰酶、NADH-细胞色素 b5 还原酶的基因表达则下调, 说明白鲜碱抑

制须癣毛癣菌此类基因的表达。

进一步对差异基因进行 GO 分析发现, 在高剂量 DIC 作用下, 差异基因主要集中在分子功能和生物学过程的改变, 包括催化活性、抗氧化活性、毒素代谢过程、DNA 修复等。低剂量的 DIC 可能主要引起分子功能的变化, 初级活性跨膜转运蛋白活性、P-P 键水解驱动的跨膜转运蛋白活性、四吡咯结合、抗氧化活性、活跃的跨膜转运蛋白活性等在低剂量作用下就可引起改变, 说明这些条目对低剂量 DIC 比较敏感。从低剂量到高剂量转变的过程中, 主要是生物学过程的变化。

对差异基因进行 KEGG 分析发现, 高剂量 DIC 可以引起 ABC 转运、谷胱甘肽代谢、非同源末端连接、核苷酸切除修复、同源重组等。低剂量 DIC 可以引起膜运输障碍、能量代谢、同源重组、非同源末端连接。说明低剂量 DIC 引起了遗传、氨基酸代谢和膜转运通路的改变。白鲜碱的抑菌机制可能主要作用于基因层面的改变、膜运输中的 ABC 转运的变化及谷胱甘肽代谢等的变化。

真菌的生命活动、致病性和毒力离不开能量供应^[21]。线粒体是真菌主要产能的细胞器, 线粒体受损会使真菌的生长受到抑制^[22]。通过以上分析, 白鲜碱对须癣毛癣菌的能量代谢影响较大。有研究报道, 白鲜碱有抑制酵母菌属生物膜和细胞周期的作用^[23]。白鲜碱对须癣毛癣菌的作用机制也表现在对细胞周期的影响上, 对 DNA 链伸长、复制、双链断裂等均有较大的影响。杨祚明等^[24]研究表明, 药物作用真菌后对一些外排泵的活性有一定影响。本研究发现白鲜碱作用后, *L2*、*cpaT*、*MFS2*、*VdtG*、*patC* 的表达受到强烈影响, 这些基因均是外排泵的关键基因。

但是, 本研究主要是针对白鲜碱单体做的一系列抑菌实验, 若应用到临床中, 则还需要进一步的体内动物实验, 观察其抑菌效果、毒性及副作用等。

4 结论

高剂量的白鲜碱对须癣毛癣菌的抑菌作用机制主要表现在影响 ABC 转运、谷胱甘肽代谢、类胡萝卜素的生物合成、非同源末端连接、核苷酸切除修复和同源重组等过程。低剂量的白鲜碱对须癣毛癣菌的抑菌作用机制主要表现在影响 ABC 转运、同源重组、非同源末端连接、谷胱甘肽代谢、硫代谢、抗坏血酸和醛酸代谢等过程。本研究表明被不同浓度的白鲜碱作用过的须癣毛癣菌在基因层面均有一定的变化且有统计学意义; 其代谢过程也有一定的改变。随着剂量的升高, 细胞组分、毒素代谢过程、脂肪酸代谢过程等发生改变。这些可能是白鲜碱作用于须癣毛癣菌的作用位点, 研究结果为白鲜碱治疗皮肤浅部真菌病提供了理论依据。

REFERENCES

- [1] 吴继华, 朱善军, 马春芳, 郝天波, 张肖, 陆静芬, 徐震. 2014–2016 年住院患者真菌感染的流行病学特点及相关因素分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(1): 79-82
Wu JH, Zhu SJ, Ma CF, Hao TB, ZHANG X, LU JF, XU Z. The epidemiological characteristics of fungal infections in inpatients from 2014–2016 and an analysis of related factors[J]. Journal of Pathogen Biology, 2018, 13(1): 79-82 (in Chinese)
- [2] 段妍, 李睿亚, 王剑, 阿苏瑞, 刘芳芳, 林敏霞. 基于高通量测序探究中药合剂对皮肤浅部真菌病作用机制的研究现状[J]. 内蒙古医学杂志, 2019, 51(8): 938-940
Duan Y, Li RY, Wang J, A SR, Liu FF, Lin MX. Research status on the mechanism of action of traditional Chinese medicine mixture on superficial skin mycoses based on high-throughput sequencing[J]. Inner Mongolia Medical Journal, 2019, 51(8): 938-940

- (in Chinese)
- [3] 王晶莹. 白鲜碱通过下调 HIF-1 α 和 slug 信号通路抑制细胞上皮间质转化作用机制研究[D]. 延吉: 延边大学硕士学位论文, 2019
Wang JY. Mechanism of dictamnine inhibiting cell epithelial-mesenchymal transition by down-regulating HIF-1 α and slug signaling pathway[D]. Yanji: Master's Thesis of Yanbian University, 2019 (in Chinese)
- [4] Wang JY, Wang Z, Li MY, Zhang ZH, Mi CL, Zuo HX, Xing Y, Wu YL, Lian LH, Xu GH, et al. Dictamnine promotes apoptosis and inhibits epithelial-mesenchymal transition, migration, invasion and proliferation by downregulating the HIF-1 α and Slug signaling pathways[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2018, 296: 134-144
- [5] 郭静, 张毅. 白鲜皮复方临床应用集萃[J]. *中医药学刊*, 2005, 23(3): 513-514
Guo J, Zhang Y. Collection of clinical application of cortex dictamni compound prescription[J]. *Study Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2005, 23(3): 513-514 (in Chinese)
- [6] Li ZQ, Jiang LL, Zhao DS, Zhou J, Wang LL, Wu ZT, Zheng X, Shi ZQ, Li P, Li HJ. The modulatory role of CYP3A4 in dictamnine-induced hepatotoxicity[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9: 1033
- [7] 黄奕曦, 沈志滨, 江涛, 陈艳芬, 刘家媛, 张莉莉, 唐春萍. 香鳞毛蕨有效部位对红色毛癣菌体外抗真菌的作用[J]. *广东药学院学报*, 2016, 32(1): 78-82
Huang YX, Shen ZB, Jiang T, Chen YF, Liu JY, Zhang LL, Tang CP. Antifungal effect of the active fraction of *Dryopteris fragrans* on *Trichophyton rubrum* in vitro[J]. *Journal of Guangdong Pharmaceutical University*, 2016, 32(1): 78-82 (in Chinese)
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard-Second edition: CLSI document M38-A2[S]. Wayne, PA: CLSI, 2008: 1-35
- [9] 李斌, 郭鑫, 裴贵珍. 黄连萃取物体外抗红色毛癣菌活性初步研究[J]. *新疆中医药*, 2019, 37(2): 39-41
Li B, Guo X, Pei GZ. Preliminary study on the anti-*Trichophyton rubrum* activity of Coptidis extract in vitro[J]. *Xinjiang Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2019, 37(2): 39-41 (in Chinese)
- [10] Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550
- [11] Chen SF, Zhou YQ, Chen YR, Gu J. Fastq: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. *Bioinformatics*: Oxford, England, 2018, 34(17): i884-i890
- [12] Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12(1): 323
- [13] Qian Y, Mao ZD, Shi YJ, Liu ZG, Cao Q, Zhang Q. Comprehensive analysis of miRNA-mRNA-lncRNA networks in non-smoking and smoking patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 50(3): 1140-1153
- [14] Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles[J]. *PNAS*, 2005, 102(43): 15545-15550
- [15] 刘登宇, 吴建美, 曲琳. 中药合剂对皮肤浅部真菌病致病菌作用的现况[J]. *医学动物防制*, 2020, 36(12): 1161-1163
Liu DY, Wu JM, Qu L. Present situation of the effects of traditional Chinese medicine mixture on the pathogenic bacteria of superficial dermatomycosis[J]. *Journal of Medical Pest Control*, 2020, 36(12): 1161-1163 (in Chinese)
- [16] 王静, 杨国玲. 须癣毛癣菌肉芽肿株与体癣株形态学、致病性及比较蛋白质组学的差异性研究[J]. *中华皮肤科杂志*, 2012, 45(4): 238-242
Wang J, Yang GL. Comparison of morphology, pathogenicity and proteomics of granuloma- and *Tinea corporis*-derived *Trichophyton mentagrophytes*[J]. *Chinese Journal of Dermatology*, 2012, 45(4): 238-242 (in Chinese)
- [17] 林楚怡, 张春荣, 沈志滨. 基于转录组分析香鳞毛蕨乙醇提取物抑制红色毛癣菌的机制研究[J]. *广东药科大学学报*, 2019, 35(2): 246-251
Lin CY, Zhang CR, Shen ZB. Inhibition mechanism of alcohol extracts from *Dryopteris fragrans* (L.) Schott on *Trichophyton rubrum* based on transcriptome analysis[J]. *Journal of Guangdong Pharmaceutical University*, 2019, 35(2): 246-251 (in Chinese)
- [18] 吕婧, 王万能, 张潇骏, 张家亮, 周林生, 余有平. 抗红色毛癣菌药物靶标研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2014, 23(24): 2886-2891
Lü J, Wang WN, Zhang XJ, Zhang JL, Zhou LS, Yu YP. Progress in research of targets for anti-*Trichophyton rubrum* drugs[J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2014, 23(24): 2886-2891 (in Chinese)

- [19] Joseph S, Karnik S, Nilawe P, Jayaraman VK, Idicula-Thomas S. ClassAMP: a prediction tool for classification of antimicrobial peptides[J]. IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics, 2012, 9(5): 1535-1538
- [20] 许玲玲, 杨晓东, 李群力, 高素华, 马秋萍. 白鲜皮提取物抑制皮肤癣菌活性研究[J]. 现代中药研究与实践, 2014, 28(1): 31-34
Xu LL, Yang XD, Li QL, Gao SH, Ma QP. Research on antifungal activity of the extraction from *Dictamnus dasycarpus*[J]. Research and Practice on Chinese Medicines, 2014, 28(1): 31-34 (in Chinese)
- [21] 王胜强. 基于转录组与真菌病毒侵染解析皮落青霉咪鲜胺抗机制[D]. 武汉: 华中师范大学博士学位论文, 2020
Wang SQ. Based on transcriptome and mycovirus infection to analyze *Penicillium crustosum* prochloraz-resistance mechanisms[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Central China Normal University, 2020 (in Chinese)
- [22] Prasad R, Shah AH, Rawal MK. Antifungals: mechanism of action and drug resistance[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2016, 892: 327-349
- [23] Liu H, Wang YC. The function and regulation of budding yeast Swe1 in response to interrupted DNA synthesis[J]. Molecular Biology of the Cell, 2006, 17(6): 2746-2756
- [24] 杨祚明, 谭孟源, 符春花, 李永超. 多重耐药铜绿假单胞菌外排泵基因表达与耐药表型和耐药程度的关系[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2016, 30(1): 86-88
Yang ZM, Tan MY, Fu CH, Li YC. Correlation of efflux pumps expression of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with phenotypes and degrees of antibiotic resistance[J]. Journal of Chinese Practical Diagnosis and Therapy, 2016, 30(1): 86-88 (in Chinese)