

## 昆仑雪菊挥发油化学成分及对新生隐球菌抗菌作用

张艳梅 丰子凯 曾红\*

(新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室 塔里木大学生命科学学院

新疆 阿拉尔 843300)

**摘 要:**【目的】探究昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌抗菌活性及细胞膜的影响。【方法】采用水蒸气蒸馏法提取昆仑雪菊挥发油并用 GC-MS 分析挥发油中的化学成分,采用微量稀释法测定昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌的最低抑菌浓度(MIC),研究昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌生物量和芽管萌发的影响,以及昆仑雪菊挥发油对细胞膜中麦角固醇合成和细胞膜渗透性的作用。【结果】昆仑雪菊挥发油对隐球菌的最小抑菌浓度为 0.781  $\mu\text{L/mL}$ ,昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌的生物量和芽管萌发都有一定的抑制作用,其抑制作用与浓度呈正相关的趋势。昆仑雪菊挥发油能减少新生隐球菌细胞膜中麦角固醇的合成,并使新生隐球菌细胞膜的渗透性发生改变。【结论】昆仑雪菊挥发油通过破坏新生隐球菌细胞膜而对其达到抑制作用。

**关键词:** 昆仑雪菊,挥发油,化学成分,新生隐球菌,抗菌活性,细胞膜

## Essential oil composition of *Coreopsis tinctoria* Nutt. and anti-*Cryptococcus* activity

ZHANG Yan-Mei FENG Zi-Kai ZENG Hong\*

(Xinjiang Production & Construction Corps, Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin, College of Life Sciences, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300, China)

**Abstract:** [Objective] Essential oil (EO) composition of *Coreopsis tinctoria* Nutt., together with The their anti-*Cryptococcus* activity and influence on the cell membrane of *Cryptococcus neoformans* present study were evaluated in this study. [Methods] EO from *Coreopsis tinctoria* Nutt. was extracted team distillation and the main chemical components of it was identified by GC-MS. The micro-dilution method was used in acquiring the minimal inhibitory concentration (MIC). The cell weight of *C. neoformans* and germ tube germination of *C. neoformans* were also determined to evaluate the anti-*C. neoformans* activity *in vitro*. The effect on membrane permeabilization was measured by monitoring the influx of Propidium iodide (PI) using flow cytometry and further verified through the inhibition of ergosterol synthesis in the cell membrane. [Results] The MIC value of EO against *C. neoformans* was 0.781  $\mu\text{L/mL}$ . Cell weight and germ tube germination of *C. neoformans* were inhibited in a dose-dependent manner. As shown in the results ergosterol production was reduced and propidium

**Foundation item:** College Students' Innovative Projects of Tarim University (No. 2014015)

\*Corresponding author: E-mail: zenghong0705@163.com

**Received:** July 01, 2015; **Accepted:** December 15, 2015; **Published online** (www.cnki.net): January 04, 2016

**基金项目:** 塔里木大学生命科学学院大学生创新项目(No. 2014015)

\*通讯作者: E-mail: zenghong0705@163.com

**收稿日期:** 2015-07-01; **接受日期:** 2015-12-15; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-01-04

iodide penetrated *C. neoformans* through a lesion in its cell membrane upon treatment with EO.

**[Conclusion]** Inhibitory effect of EO against *C. neoformans* relying on the cell membrane lesion.

**Keywords:** *Coreopsis tinctoria* Nutt., Essential oil, Chemical composition, *Cryptococcus neoformans*, Anti-*Cryptococcus* activity, Cell membrane

近年来,随着癌症放疗、化疗和器官移植治疗患者人数的增加,临床上抗生素、免疫抑制剂和皮质激素的广泛使用<sup>[1]</sup>,以及艾滋病的迅速蔓延,使临床深部真菌感染病例急剧增加<sup>[2]</sup>。真菌感染中以假丝酵母菌属<sup>[3]</sup>感染最高,其次为曲霉菌属<sup>[4]</sup>、毛霉菌属<sup>[5]</sup>和新型隐球菌属<sup>[6]</sup>。目前,全球范围内的真菌感染发病率呈逐年上升的趋势<sup>[7]</sup>。

新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)是临床上常见的条件致病真菌之一<sup>[8]</sup>,易发生于免疫功能低下的人群,尤其是 AIDS 病人;其可侵犯人或动物诸多组织器官,引起严重的隐球菌病,如脑膜炎<sup>[9]</sup>,病死率高达 30%。目前,临床上常用氟康唑和两性霉素 B 治疗新生隐球菌病<sup>[10]</sup>,但由于现有抗真菌药物的毒副作用、耐药菌株的不断出现,使得寻找新的抗真菌药物成为微生物学领域的一个研究热点。挥发油是植物体内次生代谢物之一,现代药理学研究表明,挥发油具有清热解毒、化瘀活血、抗炎、降血压、降血脂、抗病毒、抗氧化等独特功效<sup>[11]</sup>。近年来,不同研究学者发现天然植物源挥发油具有较强抗真菌作用<sup>[12]</sup>。

昆仑雪菊(*Coreopsis tinctoria* Nutt.),系菊科(Compositae)金鸡菊属(*Coreopsis*),其主要分布在海拔 3 000 m 的新疆和田昆仑山北麓,研究报道昆仑雪菊具有降血压、降血糖、降血脂、抑制  $\alpha$ -糖苷酶活性和抗肿瘤等多种生物活性<sup>[13]</sup>。近年来,国内外关于昆仑雪菊研究多集中于栽培技术、药理活性和化学成分等方面<sup>[14-17]</sup>,针对昆仑雪菊挥发油抗菌活性<sup>[18]</sup>有零星报道。本文通过研究昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌的抗菌活性及细胞膜的作用,为进一步将昆仑雪菊挥发油开发为临床抗新生隐球菌药物奠定理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料及菌株

野生昆仑雪菊(*Coreopsis tinctoria* Nutt.)于 2013 年 6 月采自新疆和田地区皮山(海拔 2 000 m—3 000 m),由塔里木大学胡建伟教授鉴定,并保存于塔里木大学生物研发中心野生植物资源库。

栽培昆仑雪菊(*Coreopsis tinctoria* Nutt.)由农十四师一牧场提供,昆仑雪菊,于 60 °C 烘干,粉碎,过 40 目筛,备用。

标准菌株:新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans* CGMCC 2.3160)购买于中国科学院微生物研究所菌种保藏中心。

临床分离菌株:*C. neoformans* 49997、*C. neoformans* 09-305 和 *C. neoformans* 09-1681 这 3 株菌分离于血液,由华中科技大学同济医学院协和医院皮肤科郑岳臣教授鉴定和惠赠。

### 1.2 培养基

SDB 培养基(g/L):葡萄糖 20,蛋白胨 10。

SDA 培养基(g/L):葡萄糖 20,蛋白胨 10,琼脂 18。

### 1.3 主要试剂和仪器

两性霉素 B (AmB)、制霉菌素(Nys),Sigma 公司。气相色谱-质谱联用仪 GC-MS (Agilent 7890A-5975C),美国安捷伦公司;流式细胞仪 (FACSCalibur),美国 BD 公司。

### 1.4 昆仑雪菊挥发油的提取及成分分析

采用水蒸气蒸馏法提取昆仑雪菊挥发油,昆仑雪菊粉碎,称取 500 g,使料液比为 1:20,浸泡过夜,使用挥发油提取器提取,蒸馏,微沸 4 h,冷却读数,收集挥发油,并用 0.1%的无菌吐温 20 配制成体积分数为 25  $\mu$ L/mL 的储备液,于 4 °C 密封避光保存。用 GC-MS 进行成分分析,其条件为

HP-5MS 毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm), 程序升温(起始温度为 50 °C, 保持 2 min; 以 5 °C/min 的速率程序升温至 200 °C; 保持 2 min 以 10 °C/min 的速率程序升温至 300 °C, 保持 5 min), 进样量为 0.5 μL; 分流比为 20:1, 载气为氦气, 进样口温度为 300 °C。质谱条件: 离子源为 EI 源; 电子能量 70 eV; 接口温度 280 °C; 离子源温度 230 °C; 溶质量范围 30–600 AMU。根据保留时间, 同时对各化合物质谱在图谱经质谱数据系统(NIST)数据库进行相似检索, 各峰的鉴定主要通过质谱数据库检索并与有关标准图谱资料并参考文献[17]进行比较鉴定, 其相对含量采用面积归一化法进行计算。

### 1.5 昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌的 MIC、MFC 的测定

采用美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)制定的真菌敏感性测定方案(M27-A3)微量稀释法测定雪菊挥发油对新生隐球菌的最小抑菌浓度(MIC)<sup>[19]</sup>。96 孔板第 1 孔中加入 100 μL 昆仑雪菊挥发油储备液, 第 2 孔至第 10 孔中分别加入 100 μL 的 SDB 培养基, 第 2 孔再加入 100 μL 挥发油储备液, 混匀, 吸取 100 μL 至第 3 孔, 依次进行二倍稀释至第 10 孔, 第 10 孔弃去 100 μL。1–10 孔每孔接种 100 μL 浓度为  $1 \times 10^7$  CFU/mL 的 *C. neoformans* 菌悬浮液。第 11 孔只加入 200 μL 的 SDB 培养基, 作为培养基对照孔, 第 12 孔加入 100 μL 的 SDB 培养基和接种 100 μL 的菌悬液作为生长对照孔, 最终使每孔终体积为 200 μL。25 °C 静置培养 48 h。肉眼观察无菌生长孔所含最低药物浓度即为最小抑菌浓度(MIC), 实验独立重复 3 次。MFC 的判定: 从每个无菌生长的孔内取 100 μL 接种于 SDA 培养基, 再次 25 °C 静置培养 3 d, 无菌落形成的孔所对应的最低药物浓度为其 MFC 值。两性霉素 B (AmB)和制霉菌素(Nys)为阳性对照, 其储备液浓度分别为 20 mg/L 和 100 mg/L, MIC 和 MFC 的判定同上。

### 1.6 昆仑雪菊挥发油对隐球菌生物量的影响

将 *C. neoformans* 2.3160 接种于 SDB 培养基中,

25 °C、180 r/min 培养 2 d, 调整菌悬液浓度为  $1 \times 10^7$  CFU/mL。取 15 个 5 mL 离心管, 分别加入 1.6 mL SDB 培养基、100 μL 菌悬液、100 μL 不同体积分数的昆仑雪菊挥发油, 混匀, 使昆仑雪菊挥发油终体积分数分别为 0.391、0.781、1.562 μL/mL, 阳性对照组为 AmB (3.906 mg/L)和 Nys (12.500 mg/L), 不加挥发油组为生长对照组。25 °C、160 r/min 振荡培养 3 d, 过滤收集菌体, 蒸馏水冲洗 3 次。用分析天平准确称量菌体质量, 平行 3 次重复。

### 1.7 昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌芽管萌发的影响

将 *C. neoformans* 2.3160 接种至 SDB 培养基中, 25 °C 培养 2 d, 调整菌悬液浓度为  $1 \times 10^7$  CFU/mL。取 6 个 5 mL 离心管, 分别加入 1.6 mL SDB 培养基、100 μL 菌悬液、100 μL 不同体积分数昆仑雪菊挥发油, 混匀, 使其终体积分数分别为 0.391、0.781、1.562 μL/mL, 阳性对照组为 AmB (3.906 mg/L)和 Nys (12.500 mg/L), 不加挥发油组为生长对照组。将制备完毕的培养体系于恒温振荡培养箱中, 25 °C、160 r/min 振荡培养 8 h, 以每个样品 100 个细胞为单位, 用血球计数板计数, 并按如下公式计算芽管萌发率。孢子萌发率(%)=发芽孢子数/检查孢子总数×100。

### 1.8 昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌甾醇含量降低的影响

将 *C. neoformans* 2.3160 接种于 SDB 培养基中, 25 °C、160 r/min 培养 2 d, 调整菌悬液浓度为  $1 \times 10^7$  CFU/mL。50 mL 离心管中, 加入 8 mL SDB 培养基和 1 mL 不同体积分数的昆仑雪菊挥发油, 混匀, 使昆仑雪菊挥发油终体积分数分别为 0.391、0.781、1.562 μL/mL。AmB 浓度为 3.906 mg/L, Nys 浓度为 12.500 mg/L, 不加挥发油的组为空白对照组。麦角固醇含量计算参阅文献[20]。

### 1.9 昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌细胞膜渗透性的影响

将 *C. neoformans* 2.3160 接种于 SDB 培养基中, 25 °C、160 r/min 培养 2 d, 调整菌悬液浓度

为  $1 \times 10^7$  孢子/mL, 取 6 个 5 mL 离心管, 分别加入 1.8 mL PBS-2%葡萄糖、100  $\mu$ L 菌悬液、100  $\mu$ L 不同体积分数挥发油, 混匀, 使昆仑雪菊挥发油终体积分数分别为 0.391、0.781、1.562  $\mu$ L/mL, 阳性对照组为 AmB (3.906  $\mu$ g/mL) 和 Nys (12.500 mg/L), 不加挥发油组为生长对照组。25  $^{\circ}$ C、160 r/min 振荡培养 48 h, 5 000  $\times$ g 离心 5 min, 收集沉淀, 用 PBS 洗 2 次, 细胞重悬于 1 mL PBS 中, 加入 10  $\mu$ L PI, 使 PI 终浓度为 1 mg/L, 避光 30  $^{\circ}$ C、160 r/min 培养 30 min, 用 PBS 洗 3 次, 重新悬于 500  $\mu$ L PBS 中, 于流式细胞仪检测, 激发波长 488 nm, 发射波长为 620 nm<sup>[21]</sup>。

### 1.10 昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌细胞膜内容物的影响

将 *C. neoformans* 2.3160 接种至 SDB 培养基中, 25  $^{\circ}$ C 培养 2 d, 调整菌悬液浓度为  $1 \times 10^7$  CFU/mL。于 5 mL 离心管中加入 100  $\mu$ L 昆仑雪菊挥发油, 使挥发油终体积分数分别为 0.391、0.781、1.562  $\mu$ L/mL。不加挥发油组为对照组, 阳性对照组为 AmB (3.906 mg/L) 和 Nys (12.500 mg/L)。再向试管中加入 1.8 mL PBS 和 100  $\mu$ L 菌悬液, 25  $^{\circ}$ C、160 r/min 振荡培养, 分别于 3、6、9 h 取样, 5 000  $\times$ g 离心 3 min, 测定上清液  $OD_{260}$  值(上清液用 PBS 稀释)。

## 2 结果与分析

### 2.1 昆仑雪菊挥发油成分分析

昆仑雪菊挥发油, 颜色微黄, 是具有芳香气味的油状液体。昆仑雪菊挥发油通过 GC-MS 分析, 结果由表 1 可知, 野生种和栽培种昆仑雪菊挥发油中有 22 个主要化合物, 这 22 个化合物占总挥发油成分相对含量的 97%。其中野生种昆仑雪菊挥发油中柠檬烯、 $\alpha$ -蒎烯和姜烯 3 种成分为雪菊挥发油的主要成分, 含量分别为 52.56%、11.70%和 7.63%; 栽培种昆仑雪菊挥发油中这 3 种主要成分含量分别为 40.21%、8.30%和 2.42%。

### 2.2 昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌 MIC、MFC 的测定

野生和栽培种昆仑雪菊挥发油及其主要成分

柠檬烯、 $\alpha$ -蒎烯对隐球菌的 MIC、MFC 如表 2 所示。野生种昆仑雪菊挥发油和柠檬烯对新生隐球菌标准菌株和临床菌株 MIC 均为 0.781  $\mu$ L/mL; 栽培种昆仑雪菊挥发油和  $\alpha$ -蒎烯对新生隐球菌的最小抑菌浓度均为 1.562  $\mu$ L/mL; 野生种昆仑雪菊挥发油抗菌效果强于栽培种昆仑雪菊挥发油; 实验以 AmB 和 Nys 为阳性对照, Nys 对测试新生隐球菌的 MIC 为 12.500–100.000 mg/L, 其中对一株临床分离新生隐球菌耐药菌株的 MIC 为 100.000 mg/L; 而 AmB 对所测试的新生隐球菌的 MIC 均为 3.906 mg/L, 说明野生种和栽培种昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌效果优于 Nys 和 AmB 阳性对照, 且昆仑雪菊对新生隐球菌抑制作用取决于主要成分柠檬烯和  $\alpha$ -蒎烯, 因为野生种昆仑雪菊挥发油抗新生隐球菌效果优于栽培种昆仑雪菊挥发油, 后续抗菌实验用野生种昆仑雪菊挥发油。

### 2.3 昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌生物量的影响

昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌生物量的影响由图 1 可知, 药物组与空白对照相比能使新生隐球菌的生物量有所降低。随着昆仑雪菊挥发油体积分数的增大, 其对新生隐球菌生物量形成抑制率与挥发油体积分数呈正相关趋势。当昆仑雪菊挥发油浓度为 0.391、0.781、1.562  $\mu$ L/mL 时, 其对新生隐球菌的生物量抑制率为 28.59%、65.45%、94.04%。阳性对照 AmB (3.906 mg/L) 和 Nys (12.500 mg/L) 对新生隐球菌生物量形成抑制率与昆仑雪菊挥发油中体积分数为 0.781  $\mu$ L/mL 时生物量抑制率相当。因此, 昆仑雪菊挥发油在一定程度上抑制了隐球菌生物量的形成, 且当昆仑雪菊挥发油与阳性药物生物量抑制率相当时, 其浓度远小于阳性药物的浓度。

### 2.4 昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌芽管萌发率的影响

昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌芽管萌发率的影响如图 2 所示。由图 2 可知, 加药物组与空白对照相比能使隐球菌的芽管萌发受到一定的抑制。随

表 1 昆仑雪菊挥发油主要成分分析  
Table 1 Composition of the essential oil from *Coreopsis tinctoria*

出峰编号 Peak No.	保留时间 Retention time	中文名称 Chinese name	英文名称 English names	野生种 相对含量 Wild species relative content (%)	栽培种 相对含量 Cultivated species relative content (%)
1	6.711	$\alpha$ -蒎烯	1R-alpha-Pinene	11.70	8.30
2	7.786	$\beta$ -水芹烯	Beta-Phellandrene	0.51	2.51
3	8.288	$\beta$ -月桂烯	Beta-Myrcene	1.86	2.83
4	8.661	$\alpha$ -水芹烯	Alpha-Phellandrene	1.92	3.05
5	9.260	1-甲基-2-异丙基苯	1-Methyl-2-(1-methylethyl)benzene	1.09	2.21
6	9.414	柠檬烯	Limonene	52.56	40.21
7	9.672	3-萜烯	3-carene	1.44	2.55
8	12.298	烯烴	(4E,6Z)-2,6-Dimethyl-2,4,6-octatriene	0.59	1.32
9	12.761	马鞭烯醇	Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol,4,6,6-trimethyl	0.83	1.54
10	13.405	1,3-环庚二烯	1,3-Cycloheptadiene	0.61	2.03
11	18.290	长叶烯	Longifolene-(V4)	3.67	4.03
12	20.266	石竹烯	Caryophyllene	1.45	2.56
13	20.653	三环烯	Tricyclene	1.22	4.02
14	21.129	桉烯	Sabinene	0.61	1.36
15	21.824	姜烯	Zingiberene	7.63	5.21
16	22.082	龙脑烯	Campholenic aldehyde	1.79	2.59
17	24.251	石竹烯氧化物	Caryophyllene oxide	0.59	2.03
18	24.354	芹菜脑	Apiole	0.39	1.25
19	24.495	莰烯	Camphene	0.78	1.06
20	26.626	9-芴甲醇	9-Fluorenemethanol	4.28	4.23
21	27.829	3-亚甲基-环己烯	3-Methylcyclohexene	0.76	1.32
22	27.829	2-氨基-6-甲基苯并噻唑	2-Amino-6-methylbenzothiazole	1.20	1.25
Total				99.40	97.46

着昆仑雪菊挥发油浓度的增大,其芽管萌发率与浓度呈负相关的趋势。当昆仑雪菊挥发油浓度为0.391、0.781、1.562  $\mu\text{L/mL}$  时,其对新生隐球菌的芽管萌发率分别为56.33%、20.33%、5.67%,昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌的抑制作用很明显。阳性对照 AmB (3.906 mg/L)、NyS (12.500 mg/L)和挥发油中体积分数(0.781  $\mu\text{L/mL}$ )对新生隐球菌芽管萌

发率的影响差异不显著。

## 2.5 昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌甾醇合成的影响

昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌甾醇合成的影响如图3所示,加药物组与空白对照相比对细胞膜甾醇降低率的影响较为显著。随着昆仑雪菊挥发油浓度的增大,其甾醇降低率与浓度呈正相关

表 2 药物对新生隐球菌的最小抑菌浓度 MIC 和最小杀菌浓度 MFC  
Table 2 The MIC and MFC values of against *C. neoformans* of EO

样品 Samples	<i>C. neoformans</i> 2.3160		<i>C. neoformans</i> 49997		<i>C. neoformans</i> 09-305		<i>C. neoformans</i> 09-1681	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
两性霉素 B AmB (mg/L)	3.906	7.812	3.906	7.812	3.906	7.812	3.906	7.812
制霉菌素 Nys (mg/L)	12.500	25.000	100.000	>100.000	12.500	25.000	12.500	25.000
野生昆仑雪菊挥发油 EO1 (μL/mL)	0.781	1.562	0.781	1.562	0.781	1.562	0.781	1.562
栽培昆仑雪菊挥发油 EO2 (μL/mL)	1.562	3.124	1.562	3.124	1.562	3.124	1.562	3.124
柠檬烯 Limonene (μL/mL)	0.781	1.562	0.781	1.562	0.781	1.562	0.781	1.562
α-蒎烯 Pinene (μL/mL)	1.562	3.124	1.562	3.124	1.562	3.124	1.562	3.124

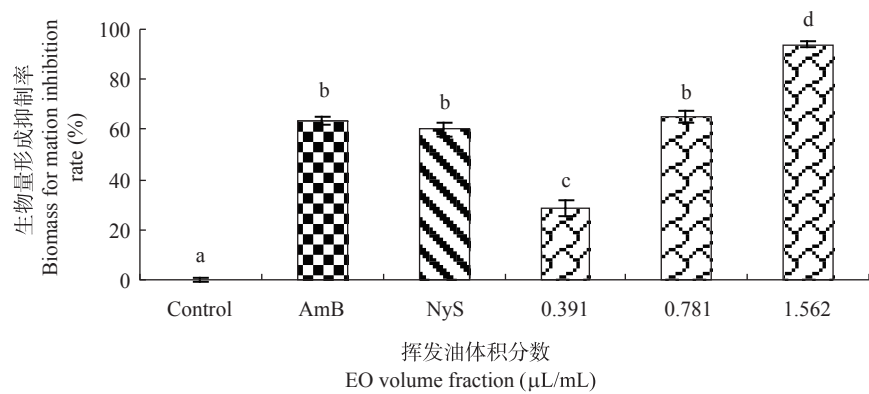


图 1 昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌生物量的影响

Figure 1 Effect of EO on biomass of *C. neoformans* 2.3160

注：不同字母(a-d)表示差异显著( $P<0.05$ )；相同字母表示差异不显著( $P<0.05$ )。

Note: Bars with different superscripts (a–d) differ significantly ( $P<0.05$ ). Bars with same superscripts (a–d) not significant difference ( $P<0.05$ ).

的趋势。昆仑雪菊挥发油浓度为 0.391、0.781、1.562  $\mu\text{L/mL}$ ，降低麦角固醇合成百分率分别为 32.78%、46.74%、73.26%，实验以 AmB 和 Nys 为阳性对照，AmB (3.906 mg/L)和 NyS (12.500 mg/L)对新生隐球菌甾醇降低率相当。由实验结果可知，不同浓度的昆仑雪菊挥发油和阳性药物都能降低麦角固醇的含量，从而破坏细胞膜的完整性，继而导致细胞死亡。

2.6 昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌细胞膜渗透性的影响

碘化吡啶(PI)是一种与细胞核结合的染色剂，当细胞膜遭到严重的破坏时，PI 可以进入细胞，与细胞核内物质结合发出荧光，可用流式细胞仪、荧光显微镜和荧光分光光度计检测荧光强度，根据荧光强度可以判断细胞膜破坏程度。本实验用流式细胞仪检测荧光强度实验结果见图 4。实验结果表明：

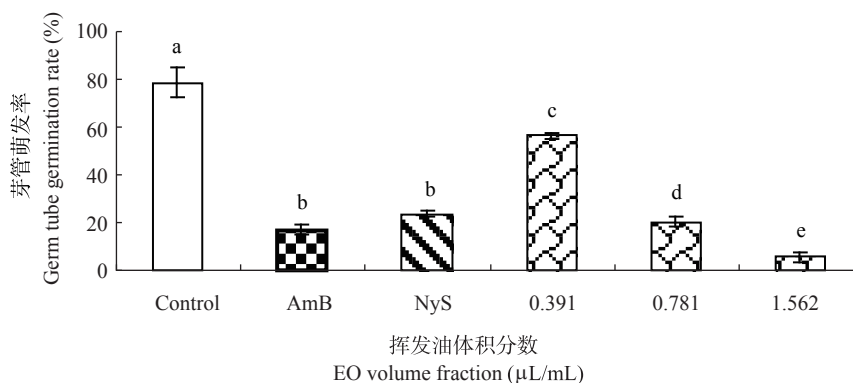


图2 昆仑雪菊挥发油新生隐球菌芽管萌发的影响

Figure 2 Effect of EO on Germ tube germination rate of *C. neoformans* 2.3160

注: 不同字母(a-e)表示差异显著( $P<0.05$ ); 相同字母表示差异不显著( $P>0.05$ ).

Note: Bars with different superscripts (a-e) differ significantly ( $P<0.05$ ). Bars with same superscripts (a-e) not significant difference ( $P>0.05$ ).

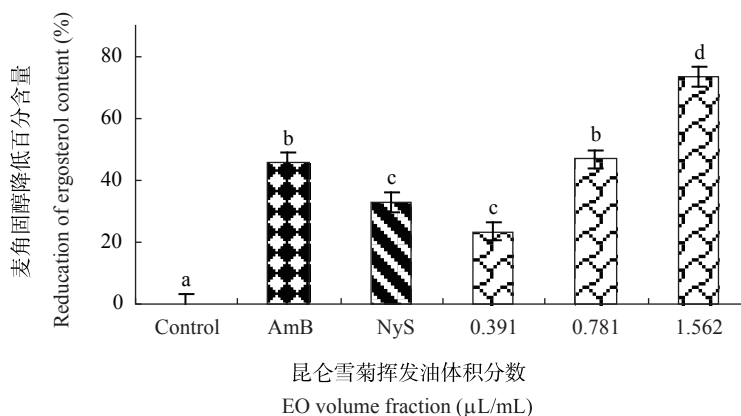


图3 昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌细胞膜麦角固醇含量的影响

Figure 3 Inhibition of ergosterol biosynthesis in *C. neoformans* 2.3160 by EO

注: 不同字母(a-d)表示差异显著( $P<0.05$ ); 相同字母表示差异不显著( $P>0.05$ ).

Note: Bars with different superscripts (a-d) differ significantly ( $P<0.05$ ). Bars with same superscripts (a-d) not significant difference ( $P>0.05$ ).

与空白对照组相比, 药物组能够破坏新生隐球菌, 从而使阳性细胞显著增加, 荧光强度明显变强。随着昆仑雪菊挥发油浓度的增大, 其对新生隐球菌的破坏程度越大。当昆仑雪菊挥发油体积分数为 0.391、0.781、1.562  $\mu\text{L/mL}$  时, 被着色的新生隐球菌的数量为  $24.33\%\pm 3.12\%$ 、 $59.79\%\pm 3.46\%$ 、 $95.75\%\pm 5.41\%$  (图4散点图), Nys 和 AmB 为阳性对照分别为  $0.71\%\pm 0.04\%$  和  $5.36\%\pm 1.23\%$ 。由荧光强度电压值也可知昆仑雪菊挥发油体积分数 0.391、0.781、1.562  $\mu\text{L/mL}$  处理组分别是空白对照组的

19.39、37.14 和 50.22 倍(图4柱形图), 着色细胞和荧光强度数据都能说明昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌细胞膜损坏严重。

## 2.7 昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌细胞膜通透性的影响

昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌细胞通透性的影响如图5所示。由图5可知, 用不同体积分数的昆仑雪菊挥发油(0.391、0.781、1.562  $\mu\text{L/mL}$ )、阳性对照 AmB (3.906 mg/L) 和 NyS (12.500 mg/L) 分别处理新生隐球菌。处理 3-9 h 后, 挥发油体积



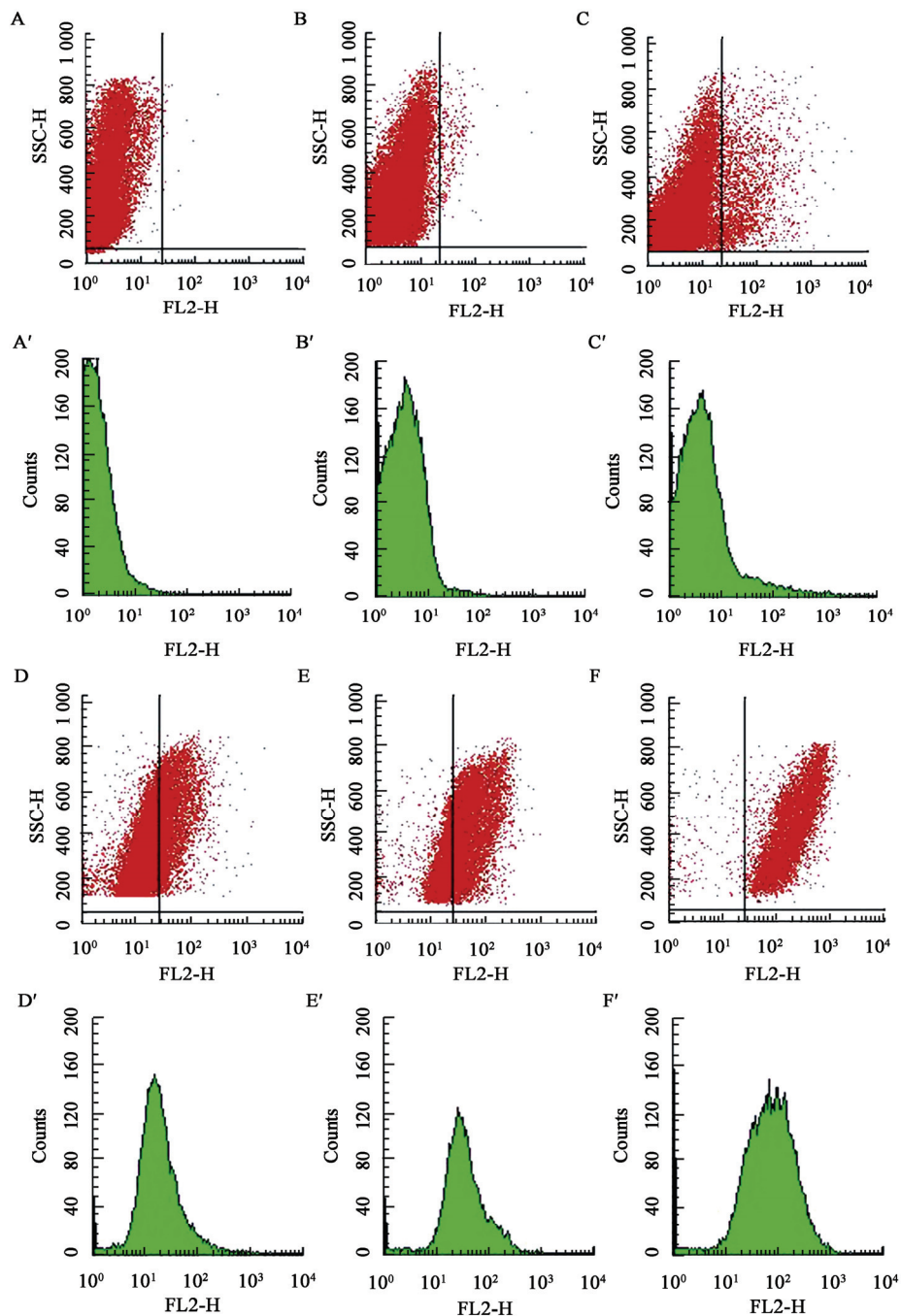


图 4 昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌细胞膜损伤的影响

Figure 4 Effect of EO on the lesion of cell membrane of *C. neoformans* 2.3160

注：A 和 A'：空白对照组；B 和 B'：Nys 12.500 mg/L；C 和 C'：Amb 3.906 mg/L；D 和 D'：挥发油体积分数为 0.391  $\mu\text{L/mL}$ ；E 和 E'：挥发油体积分数为 0.781  $\mu\text{L/mL}$ ；F 和 F'：挥发油体积分数为 1.562  $\mu\text{L/mL}$  第一和第三行为散点图；第二和四行为柱形图。A-F：PI 着色细胞分别为 0.06% $\pm$ 0.01%、0.71% $\pm$ 0.04%、5.36% $\pm$ 0.01%、24.33% $\pm$ 3.12%、59.79% $\pm$ 0.01% 和 95.75% $\pm$ 0.01%。A'-F'：电压值分别为 27.7 $\pm$ 2.14、250 $\pm$ 5.16、1 928 $\pm$ 2.45、5 357 $\pm$ 5.78、10 288 $\pm$ 4.76 和 13 913 $\pm$ 6.31。

Note: A and A': Control; B and B': Nys 12.500 mg/L; C and C': Amb 3.906 mg/L; D and D': EO at 0.391  $\mu\text{L/mL}$ ; E and E': EO at 0.781  $\mu\text{L/mL}$ ; F and F': EO at 1.562  $\mu\text{L/mL}$ , respectively. The first and third row was scatter diagram; The second and fourth row was bar chart. A-F: PI-stained cells was 0.06% $\pm$ 0.01%, 0.71% $\pm$ 0.04%, 5.36% $\pm$ 0.01%, 24.33% $\pm$ 3.12%, 59.79% $\pm$ 0.01% and 95.75% $\pm$ 0.01%, respectively. A'-F': Voltage value was 27.7 $\pm$ 2.14, 250 $\pm$ 5.16, 1 928 $\pm$ 2.45, 5 357 $\pm$ 5.78, 10 288 $\pm$ 4.76 and 13 913 $\pm$ 6.31, respectively.



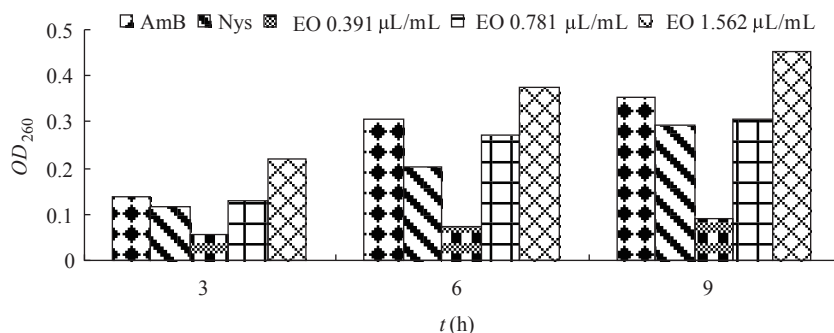


图 5 昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌细胞内容物的影响  
Figure 5 Effect of EO on cellular content of *C. neoformans* 2.3160

分数(1.562  $\mu\text{L/mL}$ )处理新生隐球菌上清液的  $OD_{260}$  值分别是阳性对照 AmB、Nys 的 1.21–1.61 倍和 1.52–1.91 倍。可见, 昆仑雪菊挥发油活性成分导致  $OD_{260}$  特征吸收值物质的泄露, 且与时间和浓度呈正相关性, 说明昆仑雪菊挥发油能使新生隐球菌重要物质核酸或核酸合成相关物质泄漏, 从而导致新生隐球菌细胞活力降低, 甚至死亡。

### 3 结论与讨论

临床常用抗真菌药物有多烯类抗生素、咪唑类、三唑类、丙烯胺类等, 其中以多烯类抗生素中 AmB 和 Nys 应用最为广泛, 本文实验结果表明野生种和栽培种昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌抑制作用优于 AmB 和 Nys 阳性对照, 从 GC-MS 分析挥发油化学成分的结果来看, 野生种昆仑雪菊挥发油主要成分为柠檬烯(52.56%)、 $\alpha$ -蒎烯(11.70%)和姜烯(7.63%); 栽培种昆仑雪菊挥发油主要成分为柠檬烯(40.21%)、 $\alpha$ -蒎烯(8.30%)和姜烯(5.21%), 野生种昆仑雪菊挥发油和栽培种昆仑雪菊挥发油主要成分一致, 但野生种昆仑雪菊挥发油主要成分含量高于栽培种昆仑雪菊挥发油主要成分, 可能是因为海拔因素导致两者主要成分含量有所差异。而张彦丽等<sup>[22]</sup>报道昆仑雪菊挥发油主要成分为柠檬烯(63.50%)、3-蒎烯(7.05%)、 $\beta$ -对繖花烃(5.23%); Gaspar 等<sup>[23]</sup>报道其主要成分为  $\alpha$ -蒎烯(45.2%), 与本文报道昆仑雪菊挥发油成分有所不同, 其差异的原因可能是不同地域、采收期、微环境、提取方法

等都可能造成所提取挥发油的成分种类与含量有所差异。野生种和栽培种昆仑雪菊挥发油抗菌活性有所差异, 可能与其主要成分含量差异有关。昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌生物量形成和芽管萌发有影响, 可见其作用效果与昆仑雪菊挥发油剂量成依赖性关系, 从而表现出一定的抗真菌活性, 这可能与昆仑雪菊挥发油中的柠檬烯、 $\alpha$ -蒎烯、姜烯有关<sup>[24-25]</sup>。昆仑雪菊是一种药食两用植物, 民间常用作花茶, 长期饮用可降低三高症, 本文实验结果表明昆仑雪菊的次生代谢产物挥发油具有抗真菌作用, 且抗菌效果优于阳性对照, 这为进一步开发其作为天然、无毒、无副作用的抗真菌药物奠定了基础。

不同类型抗真菌药物作用靶点也有所不同, 而作用于真菌细胞膜的药物最多, 且使用最为广泛, 因为细胞膜是细胞保证胞内各种生化反应有序进行、防止胞内物质外流的重要屏障。本文用流式细胞仪检测经昆仑雪菊挥发油处理的新生隐球菌细胞膜是否有损伤, 实验结果可知, PI 着色新生隐球菌随挥发油体积分数增大而增多, 说明昆仑雪菊挥发油能严重破坏新生隐球菌细胞膜。一些相关文献<sup>[26-27]</sup>报道, 不同种类植物源挥发油通过损坏病原菌细胞膜而达到抗菌作用, 可能是因为病原菌经挥发油处理后, 细胞发生膨胀导致细胞膜结构不完整, 胞内内容物泄漏。例如丁香油对念珠菌、癣菌、曲霉菌, 小茴香挥发油对癣菌细胞膜损坏而达到

抗菌作用。

麦角固醇是真菌细胞质膜组成成分之一, 其在维持细胞膜结构完整性、降低细胞流动性等方面起重要作用。临床多烯类(AmB)抗菌药物主要是其大环内酯部分与麦角固醇结合, 形成固醇-多烯复合物, 使麦角固醇含量降低, 破坏细胞膜结构而达到抗菌作用<sup>[28-29]</sup>, 当然也可以通过抑制或阻止合成麦角固醇途径中的某个环节或某几个环节, 使麦角固醇合成受阻, 以至破坏病原菌细胞膜结构, 抑制真菌生长, 达到抗菌作用。本文考察昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌细胞质膜麦角固醇合成的影响, 由实验结果可证实, 不同体积分数昆仑雪菊挥发油通过抑制新生隐球菌细胞质膜麦角固醇合成而达到抗菌作用, 与已报道的其他植物源挥发油通过抑制真菌细胞质膜中麦角固醇合成而达到抗菌作用的结果相一致<sup>[30-31]</sup>。本文只是研究了昆仑雪菊挥发油对新生隐球菌的抗菌活性及对细胞膜的作用, 表明其抗菌作用的靶点可能是细胞膜。

## 参考文献

- [1] Zeng H. Antifungal activity and mechanism of essential oil from the seed of *Anethum graveolens* L.[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2011 (in Chinese)  
曾红. 蒈萝子挥发油抗真菌活性及其作用机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2011
- [2] Yin SH. Retrospective analysis of 110 cases of deep fungal infections[D]. Shenyang: Master's Thesis of China Pharmaceutical University, 2010 (in Chinese)  
尹淑红. 110例深部真菌感染回顾性分析[D]. 沈阳: 中国医科大学硕士学位论文, 2010
- [3] Jiang YL. Study on fluconazole resistance mechanism of *Candida tropicalis*[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Medical University, 2014 (in Chinese)  
江雨璐. 热带假丝酵母菌对氟康唑耐药机制的研究[D]. 合肥: 安徽医科大学硕士学位论文, 2014
- [4] Zuo XH. The study of laboratory diagnosis for invasive aspergillosis in patient with hematologic diseases and malignant tumour and clinical application[D]. Beijing: Master's Thesis of Academy of Military Medical Sciences, 2010 (in Chinese)  
左向华. 血液病和恶性肿瘤患者曲霉菌感染的实验诊断和临床应用研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院硕士学位论文, 2010
- [5] Liu YY. Screening mucor of high-yielding protease and fermentation technology research on direct fermented bean curd[D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin University of Commerce, 2010 (in Chinese)  
刘莹莹. 高产蛋白酶毛霉菌株的筛选及直装腐乳发酵技术的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学硕士学位论文, 2014
- [6] Lin LN. 80 *Cryptococcus neoformans* environmental strains of phenotypic and molecular characteristics of the initial research from mainland China[D]. Shanghai: Master's Thesis of the Second Military Medical University, 2013 (in Chinese)  
林丽娜. 80株中国大陆新生隐球菌环境株表型和分子特征的初步研究[D]. 上海: 第二军医大学硕士学位论文, 2013
- [7] Yao ZR. Basic and clinical study on *Cryptococcosis*[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of the Second Military Medical University, 2003 (in Chinese)  
姚智荣. 隐球菌病的基础与临床研究[D]. 上海: 第二军医大学博士学位论文, 2003
- [8] Wang XT. Mechanism of the *Cryptococcus neoformans* penetrating the brain microvascular endothelial cell of blood-brain barrier and its effect to the central nervous system[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of the Second Military Medical University, 2006 (in Chinese)  
王溪涛. 新生隐球菌穿越血脑屏障脑微血管内皮细胞机制及其对中枢神经系统的影响[D]. 上海: 第二军医大学博士学位论文, 2006
- [9] Gu JL. Clinical and experimental study of Cryptococcal meningitis[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of the Second Military Medical University, 2002 (in Chinese)  
顾菊林. 隐球菌性脑膜炎的临床和实验研究[D]. 上海: 第二军医大学博士学位论文, 2002
- [10] Ling R. comparative safety evaluation on continuous and conventional intrathecal amphotericin B in rabbits[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Southern Medical University, 2014 (in Chinese)  
凌容. 两性霉素B椎管内持续给药和鞘内注射安全性对照研究[D]. 广州: 南方医科大学硕士学位论文, 2014
- [11] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, et al. Biological effects of essential oils-a review[J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(2): 446-475
- [12] Khan A, Ahmad F, Akhtar S, et al. Ocimum sanctum essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity[J]. Research in Microbiology, 2010, 161(10): 816-823
- [13] Dias T, Liu B, Jones P, et al. Cytoprotective effect of *Coreopsis tinctoria* extracts and flavonoids on tBHP and cytokine-induced cell injury in pancreatic MIN6 cells[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2012, 139(2): 485-492
- [14] Sha AL, Wu Y, Sheng HY, et al. Effects of *Coreopsis tinctoria* flavonoids on cerebral index and viscera index in the aging model mice[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2013, 34(7): 66-68 (in Chinese)  
沙爱龙, 吴瑛, 盛海燕, 等. 昆仑雪菊黄酮对衰老模型小鼠脑及脏器指数的影响[J]. 动物医学进展, 2013, 34(7): 66-68
- [15] Yang Q, Sun YH, Zhang L, et al. Antihypertensive effects of extract from flower buds of *Coreopsis tinctoria* on spontaneously hypertensive rats[J]. Chinese Herbal Medicines, 2014, 6(2): 103-109
- [16] Zhang Y, Shi SP, Zhao MB, et al. Coreosides A-D, C<sub>14</sub>-polyacetylene glycosides from the capitula of *Coreopsis tinctoria* and its anti-inflammatory activity against Cox-2[J]. Fitoterapia, 2013, 87: 93-97
- [17] Guo LM, Zhang WS, Li SM, et al. Chemical and nutraceutical properties of *Coreopsis tinctoria*[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 13: 11-20
- [18] Yao XC, Wang XB, Gu CZ, et al. Chemical composition, N-nitrosamine inhibition and antioxidant and antimicrobial properties of essential oil from *Coreopsis tinctoria* flowering tops[J]. Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters, 2015. DOI: 10.1080/14786419.2015.1041943
- [19] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing Eighteenth

- informational supplement[A]//CLSI Publication M100-S18[M]. Wayne, Pa, USA: CLSI, 2008
- [20] Arthington-Skaggs BA, Jradi H, Desai T, et al. Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37(10): 3332-3337
- [21] Pinto E, Gonçalves MJ, Hrimpeng K, et al. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus villosus* subsp. *lusitanicus* against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and *dermatophyte* species[J]. Industrial Crops and Products, 2013, 51: 93-99
- [22] Zhang YL, Han CY, Simayil A. Analysis of essential oil from Kunlun Chrysanthemum by GC-MS[J]. Journal of Xinjiang medical University, 2010, 33(11): 1299-1300 (in Chinese)  
张彦丽, 韩艳春, 阿依吐伦·斯马义. GC-MS 对昆仑雪菊挥发油成分的研究[J]. 新疆医科大学学报, 2010, 33(11): 1299-1300
- [23] Gaspar L, Oliveira AP, Silva LR, et al. Metabolic and biological prospecting of *Coreopsis tinctoria*[J]. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2012, 22(2): 350-358
- [24] Sieniawska E, Los R, Baj T, et al. Antimicrobial efficacy of *Mutellina purpurea* essential oil and  $\alpha$ -pinene against *Staphylococcus epidermidis* grown in planktonic and biofilm cultures[J]. Industrial Crops and Products, 2013, 51: 152-157
- [25] Al-Jabri N N, Hossain MA. Comparative chemical composition and antimicrobial activity study of essential oils from two imported lemon fruits samples against pathogenic bacteria[J]. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, 2014, 3(4): 247-253
- [26] Cox SD, Mann CM, Markham JL, et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil)[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 88(1): 170-175
- [27] Zeng H, Chen XP, Liang JN. In vitro antifungal activity and mechanism of essential oil from fennel (*Foeniculum vulgare* L.) on dermatophyte species[J]. Journal of Medical Microbiology, 2015, 64(1): 93-103
- [28] Brajtburg J, Powderly WG, Kobayashi CS, et al. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1990, 34(2): 183-188
- [29] Ryder NS, Leitner I. Synergistic interaction of terbinafine with triazoles or amphotericin B against *Aspergillus* species[J]. Medical Mycology, 2001, 39(1): 91-95
- [30] Pinto E, Vale-Silva L, Cavaleiro C, et al. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and *dermatophyte* species[J]. Journal of Medical Microbiology, 2009, 58(11): 1454-1462
- [31] Chen YX, Zeng H, Tian J, et al. Antifungal mechanism of essential oil from *Anethum graveolens* seeds against *Candida albicans*[J]. Journal of Medical Microbiology, 2013, 62(8): 1175-1183