

· 基础研究 ·

杜仲抗菌肽 EuCHIT1 对白色念珠菌的
抑菌作用及机制研究[△]赵丹^{1,2}, 张湘燕^{1,2}, 罗振华^{2,3}, 董旋⁴, 赵德刚^{4*}

1. 贵州省人民医院 呼吸与危重症医学科/贵州省呼吸疾病研究所, 贵州 贵阳 550002;

2. 肺脏免疫性疾病诊治国家卫健委重点实验室, 贵州 贵阳 550002;

3. 贵州省人民医院 中心实验室, 贵州 贵阳 550002;

4. 贵州大学 生物工程研究院/贵州大学 生命科学学院, 贵州 贵阳 550002

[摘要] 目的: 研究杜仲抗菌肽 EuCHIT1 对白色念珠菌的抗菌活性及机制。方法: 通过聚合酶链式反应(PCR)扩增 EuCHIT1 蛋白的编码区, 构建原核表达质粒并转化到大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3), 经异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导, 采用镍亲和色谱法纯化得到可溶性的 EuCHIT1; 采用二倍最小抑菌浓度(MIC)法稀释 EuCHIT1 并测定其对白色念珠菌的抑菌圈直径; 采用荧光分光光度计和酶标仪分别检测 EuCHIT1 对白色念珠菌细胞膜的去极化作用及对细胞膜通透性的影响; 通过鲎试验动态浊度法和高效液相色谱法分别测定白色念珠菌中(1, 3)- β -D-葡聚糖和麦角甾醇含量; 酶联免疫吸附法(ELISA)检测 EuCHIT1 对白色念珠菌感染的 SD 大鼠肺上皮 WTRL1 细胞中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达的影响。结果: 纯化得到的杜仲抗菌肽 EuCHIT1 相对分子质量为 77 210, 对白色念珠菌 MIC 值为 32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, EuCHIT1 质量浓度与抑菌活性之间具有量效关系; EuCHIT1 可增加白色念珠菌细胞壁的去极化及通透性, 降低白色念珠菌细胞壁(1, 3)- β -D-葡聚糖及麦角甾醇的含量, 同时 EuCHIT1 可降低白色念珠菌感染的 WTRL1 细胞中 IL-6 及 TNF- α 水平($P < 0.05$)。结论: EuCHIT1 对白色念珠菌具有抑菌作用, 主要机制可能是破坏细胞壁, 导致细胞膜去极化、通透性增加, 并降低白色念珠菌感染的肺上皮细胞 IL-6 及 TNF- α 水平。

[关键词] 杜仲; 抗菌肽 EuCHIT1; 白色念珠菌; 抑菌; 机制

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)12-1991-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20191228002

Antibacterial Effect and Mechanism of Antimicrobial Peptides EuCHIT1 from
Eucommia ulmoides on *Candida albicans*ZHAO Dan^{1,2}, ZHANG Xiang-yan^{1,2}, LUO Zhen-hua^{2,3}, DONG Xuan⁴, ZHAO De-gang^{4*}

1. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Guizhou Provincial People's Hospital/

Respiratory Diseases Institute of Guizhou, Guiyang 550002, China;

2. Key Laboratory of Diagnosis and Treatment of Pulmonary Immunological Diseases,

National Health Commission, Guiyang 550002, China;

3. Central Laboratory of Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, China;

4. Bioengineering Institute of Guizhou University/Life Sciences College, Guizhou University, Guiyang 550002, China

[Abstract] **Objective:** To study the antibacterial activity and mechanism of *Eucommia ulmoides* EuCHIT1 against *Candida albicans*. **Methods:** The coding region of EuCHIT1 was amplified by polymerase chain reaction (PCR), the prokaryotic expression plasmid was constructed and transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3). The soluble EuCHIT1 protein was purified by nickel affinity chromatography after isopropyl thiogalactoside (IPTG) induction. EuCHIT1 was diluted

[△] **[基金项目]** 国家自然科学基金项目(31360272); 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究项目(QZYY2017-025); 贵州省特色植物种质资源利用与创新人才基地项目(RCJD2018-14)

* **[通信作者]** 赵德刚, 教授, 研究方向: 植物基因工程; Tel: (0851)83761872, E-mail: degangzhao@yahoo.com

with double minimum inhibitory concentration (MIC). The inhibition zone diameter of EuCHIT1 at different concentration against *C. albicans* was determined. The depolarization effect of EuCHIT1 on the cell membrane of *C. albicans* and its influence on the membrane permeability were determined by fluorescence spectrophotometer and microplate reader respectively. The contents of (1, 3)- β -D-glucan and ergosterol in *C. albicans* were determined by limulus limulus kinetic turbidimetry and high performance liquid chromatography respectively. The effects of EuCHIT1 on the expression of interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in WTRL1 cells of SD rats infected with *C. albicans* were detected by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** The molecular weight of purification of *E. ulmoides* antimicrobial peptides EuCHIT1 was 77 210, the MIC value against *C. albicans* was 32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. There was a dose-activity relationship between EuCHIT1 concentration and antibacterial activity. *E. ulmoides* antimicrobial peptides EuCHIT1 increased depolarization and permeability of *C. albicans* cell walls, and decreased contents of (1, 3)- β -D-glucan and ergosterol in *C. albicans* cell walls, and decreased the levels of IL-6 and TNF- α in lung epithelial cells of SD rats infected with *C. albicans* ($P < 0.05$). **Conclusion:** EuCHIT1 has antibacterial effect on *C. albicans*. The main mechanism may be the destruction of cell wall, resulting in depolarization and increase permeability of cell membrane, and the reduction of IL-6 and TNF- α levels in SD rat lung epithelial cells.

[**Keywords**] *Eucommia ulmoides* Oliv.; antimicrobial peptides EuCHIT1; *Candida albicans*; bacteriostatic; mechanism

杜仲为杜仲科杜仲属植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮, 味甘、微辛, 性温, 可以降压, 利尿, 缓解头晕、失眠等症状, 对各种细菌、真菌具有抑制作用, 但具体机制尚不明确。抗菌肽 (antimicrobial peptides, AMPs), 又称抗微生物肽或肽抗生素, 是一类小分子的多肽类物质, 一般由 10 ~ 60 个氨基酸残基组成, 相对分子质量在 3000 ~ 6000^[1]。抗菌肽广泛分布于动物、植物等生物体内, 构成了机体防御病原体快速而高效的屏障。本课题组前期研究证实, 转杜仲几丁质酶基因 *EuCHIT1* 的番茄可提高对灰霉病的抗性^[2]。因此, 推断多肽 EuCHIT1 是杜仲中的抗菌肽之一。本研究在前期工作的基础上, 利用原核表达、镍亲和和色谱法纯化得到抗菌肽 EuCHIT1, 体外检测其对白色念珠菌的抑菌作用, 并探讨其抑菌机制, 为其进一步的临床应用提供参考。

1 材料

1.1 菌株及细胞

白色念珠菌 *Canidia albicans* ATCC 10231, 由贵州省人民医院中心实验室罗振华主任惠赠; SD 大鼠肺组织 WTRL1 细胞购于美国模式菌种收集中心 (ATCC) 细胞库。

1.2 试剂

沙堡氏 (4%) 葡萄糖琼脂培养基 (广州市齐云生物技术有限公司); 氟康唑注射液 (批号: 2003070512) 由辰星药业有限公司生产; 邻硝基苯 β -D-半乳糖苷 (ONPG) 购自上海仁捷生物科技有限公司; 细胞膜荧光探针 DiSC3 (5) 购自美国 AAT Bioquest Inc

公司; Triton X-100 购自北京雷根生物公司; 白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 酶联免疫吸附法 (ELISA) 试剂盒购自武汉华美生物工程公司。

1.3 仪器

F-380 型荧光分光光度计 (天津港东科技股份有限公司); Multiskan FC 型酶标仪 (美国赛默飞公司)。

2 方法

2.1 菌株培养及多肽制备

白色念珠菌接种于沙堡氏 (4%) 葡萄糖琼脂培养基, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 36 h 后用于实验。参照本课题组前期实验方法^[3], 通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增 EuCHIT1 蛋白的编码区, 构建原核表达质粒并转化到大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3), 经异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导, 采用镍亲和和色谱法纯化得到可溶性的抗菌肽 EuCHIT1。将其溶解在无菌注射液用水中, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.2 抑菌圈检测

采用二倍最小抑菌浓度 (MIC) 法, 配制质量浓度分别为 32、64、128、256、512 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的抗菌肽 EuCHIT1 溶液, 各取 10 μL 依次点在含有细菌的培养基上。对照组加入等体积灭菌注射用水, 阳性对照组加入注射用氟康唑 (8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 临床治疗中可达到的药物浓度)^[4], 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。培养后取出培养基, 用钢尺测量每个培养基上的抑菌圈直径。实验重复 3 次, 取平均值。

2.3 细胞膜去极化作用测定

取对数生长期白色念珠菌菌液(1×10^5 CFU·mL⁻¹) 200 μ L, 4000 r·min⁻¹离心5 min(离心半径为10 cm), 收集菌体, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次后, 重悬菌液至吸光度(A)值为0.05。分别加入2.2项下5种质量浓度EuCHIT1溶液100 μ L, 以灭菌注射用水作为对照, 注射用氟康唑($8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)作为阳性对照, 28 $^{\circ}\text{C}$ 处理60 min后向每组中加入终浓度为 $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的DiSC3(5), 室温振荡避光孵育15~30 min, 取2 mL细菌悬浮液于石英比色皿中, 利用荧光分光光度计, 在激发波长为622 nm、发射波长为670 nm条件下测定荧光强度^[5]。实验重复3次。

2.4 细胞膜通透性测定

取对数生长期白色念珠菌菌液(1×10^5 CFU·mL⁻¹) 200 μ L, 4000 r·min⁻¹离心5 min(离心半径为10 cm), 收集菌体, PBS洗涤3次后, 重悬菌液至A值为0.05。加入质量浓度为 $32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的抗菌肽EuCHIT1溶液100 μ L, 以灭菌注射用水作为对照, 0.2% Triton X-100作为阳性对照, 28 $^{\circ}\text{C}$ 处理60 min后向每组中加入 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的ONPG溶液100 μ L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育60 min后每间隔10 min于酶标仪测定420 nm处A值^[6]。实验重复3次。

2.5 (1, 3)- β -D-葡聚糖及麦角甾醇含量测定

取对数生长期白色念珠菌菌液(1×10^5 CFU·mL⁻¹) 200 μ L, 4000 r·min⁻¹离心5 min(离心半径为10 cm), 收集菌体, PBS洗涤3次后, 重悬菌液至A值为0.05。加入质量浓度为 $32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的抗菌肽EuCHIT1溶液100 μ L, 以灭菌注射用水作为对照, 以注射用氟康唑($8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)作为阳性对照, 室温振荡孵育15~30 min。通过鲎试验动态浊度法测定白色念珠菌中(1, 3)- β -D-葡聚糖含量^[7]; 高效液相色谱法检测麦角甾醇含量^[8]。实验重复3次。

2.6 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 测定

取对数生长期白色念珠菌菌液(1×10^5 CFU·mL⁻¹) 200 μ L, 4000 r·min⁻¹离心5 min, 收集菌体, PBS洗涤3次后, 重悬菌液至A值为0.05。在WTRL1细胞中加入含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基, 置于含5% CO₂的37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养。取对数生长期WTRL1细胞, 在96孔板内加入密度为 1×10^5 个/mL的WTRL1细胞, 每孔100 μ L, 细胞贴壁后, 每孔加入 $32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的抗菌肽EuCHIT1溶液100 μ L, 终质

量浓度为 $16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。以灭菌注射用水作为对照, 以注射用氟康唑($8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)作为阳性对照。5% CO₂细胞培养箱37 $^{\circ}\text{C}$ 培养180 min后, 裂解液裂解细胞, 按ELISA试剂盒步骤, 于酶标仪420 nm处测定A值, 计算IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量。实验重复3次。

2.7 统计学处理

采用SPSS 16.0软析。数据采用($\bar{x} \pm s$)表示, 符合正态分布的两组间比较采用独立样本 t 检验, 3组及以上的比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用Tukey HSD检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 抗菌肽EuCHIT1的原核表达与纯化

原核表达、镍亲和色谱法纯化得到多肽EuCHIT1, 采用Bradford法定量, 纯度约80%, 收率约 $0.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)定性图谱显示EuCHIT1总相对分子质量为77 210。

3.2 抑菌圈测定

结果显示, 随着抗菌肽EuCHIT1质量浓度的增加, 对白色念珠菌的抑菌圈宽度逐渐增大, EuCHIT1 32、64、128、256、512 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对白色念珠菌的抑菌圈直径分别为12.0、16.5、18.0、22.0、25.0 mm。阴性对照灭菌注射用水抑菌圈直径为0 mm, 阳性对照氟康唑抑菌圈直径为25 mm。

3.3 抗菌肽EuCHIT1对白色念珠菌细胞膜的去极化作用

与对照组比较, 阳性对照氟康唑对细胞膜去极化作用增强; 随着EuCHIT1质量浓度的增加, 其对细胞膜的去极化作用逐渐增强($P < 0.05$), 见表1。

表1 抗菌肽EuCHIT1对白色念珠菌细胞膜的去极化作用($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	$\rho / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	相对荧光强度
对照		0.53 ± 0.35
氟康唑	8	1.04 ± 0.33
EuCHIT1	32	0.89 ± 0.76
	64	$0.98 \pm 0.12^*$
	128	$1.16 \pm 0.15^*$
	256	$1.34 \pm 0.12^*$
	512	$1.58 \pm 0.25^{* \#}$

注: 与对照组比较, $^* P < 0.05$; 与氟康唑组比较, $^{\#} P < 0.05$ 。

3.4 抗菌肽 EuCHIT1 对白色念珠菌细胞膜通透性影响

与对照组比较,随着抗菌肽 EuCHIT1 与白色念珠菌菌液作用时间延长,细菌细胞膜通透性逐渐增加, $P < 0.05$ 。至 60 min 时,细胞膜通透性与阳性对照 0.2% Triton X-100 组比较无统计学差异。结果见表 2。

3.5 抗菌肽 EuCHIT1 对白色念珠菌(1,3)- β -D-葡聚糖及麦角甾醇含量的影响

与对照组比较,抗菌肽 EuCHIT1 $32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 可显著降低白色念珠菌中(1,3)- β -D-葡聚糖及麦角甾醇含量($P < 0.05$),作用与氟康唑 $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 相当(见表 3)。

3.6 抗菌肽 EuCHIT1 对感染白色念珠菌的 WTRL1 细胞中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 水平的影响

与模型组比较,抗菌肽 EuCHIT1 $16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 可显著降低 WTRL1 细胞 IL-6 及 TNF- α 水平($P < 0.05$),作用与氟康唑 $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 相当,与对照组比较差异无统计学意义(见表 4)。

4 讨论

侵袭性真菌感染是临床常见的感染性疾病之一,但是由于广谱抗真菌药物的滥用,导致临床中真菌耐药状况日益加重^[9-10]。因此,需要寻找适合临床

使用的新的抗真菌药物。抗菌肽广泛存在于动物、植物等生物体中,是宿主对抗外界病原微生物感染而产生的一系列免疫应答反应产物,研究表明,抗菌肽在感染性疾病的治疗中具有重要的应用价值^[11-12]。杜仲含有木脂素类、环烯醚萜类、苯丙素类、黄酮类、多糖类等成分及多种抗真菌蛋白^[13-15]。由于抗菌肽具有广谱抗菌、抗被膜病毒、抗寄生虫、抗肿瘤等作用,且不破坏人体正常细胞、不易产生耐药性。因此,抗菌肽在临床医学、食品加工、日化、农业及饲料添加剂和动物药品等领域具有广阔的开发应用前景^[16]。

本研究在前期实验的基础上,在杜仲中纯化得到可溶性的抗菌肽 EuCHIT1。在抑菌实验中,随着抗菌肽 EuCHIT1 质量浓度升高,抑菌效果增强,表明抗菌肽 EuCHIT1 的抗真菌作用具有明显的量效关系。目前研究表明^[17],动植物来源的抗菌肽能起到有效的抗真菌作用,其机制可能是抗菌肽可以诱导白色念珠菌胞内活性氧(ROS)积聚、线粒体膜电位去极化,进而引起白色念珠菌线粒体氧化损伤,而线粒体氧化损伤可能与白色念珠菌细胞的凋亡与坏死相关。抗菌肽 EuCHIT1 可导致白色念珠菌细胞膜的去极化及通透性增加,从而起到抗真菌作用。抗菌肽的抗菌机制主要是在细菌质膜上形成离子通道,破坏膜势,引起胞内物质外泄;同时可与膜吸附结

表 2 不同浓度 EuCHIT1 对白色念珠菌细胞膜通透性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	体积分数或质量浓度	A 值					
		10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
对照		0.039 $\pm$ 0.014	0.036 $\pm$ 0.012	0.034 $\pm$ 0.025	0.034 $\pm$ 0.018	0.034 $\pm$ 0.026	0.034 $\pm$ 0.017
Triton X-100	0.2%	0.133 $\pm$ 0.021 *	0.287 $\pm$ 0.011 *	0.348 $\pm$ 0.023 *	0.489 $\pm$ 0.019 *	0.534 $\pm$ 0.025 *	0.635 $\pm$ 0.012 *
EuCHIT1	32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.097 $\pm$ 0.008	0.168 $\pm$ 0.016 *	0.293 $\pm$ 0.024 *	0.275 $\pm$ 0.018 **	0.383 $\pm$ 0.016 **	0.549 $\pm$ 0.022 *

注:与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 0.2% Triton X-100 组比较, ** $P < 0.05$ 。

表 3 EuCHIT1 对白色念珠菌(1,3)- β -D-葡聚糖及麦角甾醇含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	$\rho / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	(1,3)- β -D-葡聚糖/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	麦角甾醇/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
对照		0.156 $\pm$ 0.23	75 587.33 $\pm$ 406.56
氟康唑	8	0.063 $\pm$ 0.97 *	54 320.00 $\pm$ 587.97 *
EuCHIT1	32	0.056 $\pm$ 0.35 *	60 234.00 $\pm$ 329.97 *

注:与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

表 4 EuCHIT1 对感染白色念珠菌的 WTRL1 细胞中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	$\rho / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	IL-1 β / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	IL-6/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	TNF- α / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
对照		8.75 $\pm$ 1.01	7.01 $\pm$ 0.88	20.81 $\pm$ 2.12
模型		10.72 $\pm$ 1.75	9.16 $\pm$ 0.84	29.54 $\pm$ 3.97
氟康唑	8	6.63 $\pm$ 0.93	5.31 $\pm$ 0.56 *	11.08 $\pm$ 1.66 *
EuCHIT1	16	7.16 $\pm$ 0.57	5.92 $\pm$ 0.94 *	12.65 $\pm$ 1.69 *

注:与模型组比较, * $P < 0.05$ 。

合、破坏外膜渗透性,从而导致细菌死亡的研究结果相似^[18-19]。(1-3)- β -D-葡聚糖作为真菌细胞壁成分之一,其结构和功能破坏可导致胞内物质泄漏,生理代谢受阻等,进而致菌体死亡。因此,(1,3)- β -D-葡聚糖含量已被用作检测是否存在深部真菌感染的指标^[20]。麦角甾醇是酵母细胞中的主要甾醇,主要在内质网(ER)和脂滴中合成,作为各种膜的基本组成成分,其减少改变了白色念珠菌正常细胞膜的特性^[21]。文献报道,苦参碱可通过抑制白色念珠菌细胞膜上真菌甾醇合成过程中的一个关键酶羊毛甾醇14 α -去甲基化酶(CYP51)的活性,影响麦角甾醇生物合成而发挥其抗真菌活性^[8]。本研究表明,抗菌肽EuCHIT1可降低白色念珠菌(1-3)- β -D-葡聚糖及麦角甾醇含量,作用与氟康唑8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 相当。

白色念珠菌感染可导致机体炎性反应,IL-1 β 、IL-6及TNF- α 水平能够反映机体的炎性程度。研究表明,氟康唑胶囊可降低患者真菌性外耳道炎的血清中IL-6、C-反应蛋白(CRP)和TNF- α 水平^[22]。本研究结果提示,抗菌肽EuCHIT1能降低感染了白色念珠菌的SD大鼠WTRL1细胞中IL-6及TNF- α 水平,其与氟康唑在抗真菌感染时能有效改善炎性因子水平结果相似。

综上,抗菌肽EuCHIT1对白色念珠菌具有抑菌作用,由于抗菌肽与传统的抗生素相比,其抗菌机制不同,细菌难以对其产生耐药性,有望成为新一代绿色环保的抗真菌新药,具有较好的临床应用前景,但其临床应用疗效和具体抑菌机制尚需进一步研究明确。

参考文献

- [1] REDDY K V, YEDERY R D, ARANHA C. Antimicrobial peptides: Premises and promises [J]. Int J Antimicrob Agents, 2004, 24(6): 536-547.
- [2] 郭林霞,董旋,赵德刚. 转杜仲几丁质酶基因EuCHIT1番茄提高对灰霉病的抗性[J]. 植物生理学报, 2016, 52(5): 703-714.
- [3] 董旋,丁延庆,冉昕,等. 杜仲EuCHIT1基因表达载体构建及在大肠杆菌中的表达[J]. 山地农业生物学报, 2016, 35(5): 9-12.
- [4] 丁秀荣,苏建荣. 氟康唑对近平滑念珠菌生物膜的影响[J]. 首都医科大学学报, 2014, 35(4): 433-437.
- [5] 丁晓燕,方廖琼,张弘,等. 电压敏感染料DiBAC4(3)用于检测胚胎细胞膜电位变化的研究[J]. 中国应用生理学杂志, 2012, 28(1): 32-33.
- [6] 井长勤,刘振华,李文锦,等. 离子液体氯化1-辛基-3-甲基咪唑对酵母细胞增殖生长和细胞膜通透性的影响[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(5): 799-804.
- [7] 李治建,周凡,窦勤,等. 苦参碱体外抗念珠菌活性及对白色念珠菌细胞膜生物合成的影响[J]. 新疆医学, 2018, 48(6): 603-606.
- [8] ALBAATINEH M T, SUTTON D A, FOTHERGILL A W, et al. Update from the laboratory: Clinical identification and susceptibility testing of fungi and trends in antifungal resistance [J]. Infect Dis Clin North Am, 2016, 30(1): 13-35.
- [9] PERLIN D S, RAUTEMAA-RICHARDSON R, ALASTRUEY-LZQUIERDO A. The global problem of antifungal resistance: Prevalence, mechanisms, and management [J]. Lancet Infect Dis, 2017, 17(12): e383-e392.
- [10] TONK M, VILCINSKAS A. The medical potential of antimicrobial peptides from insects [J]. Curr Top Med Chem, 2016, 17(5): 554-575.
- [11] SIERRA J M, FUSTE E, RABANAL F, et al. An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development [J]. Expert Opin Biol Ther, 2017, 17(6): 663-676.
- [12] 胡媛媛,姚波. 鱼类抗菌肽的研究进展[J]. 武汉工程大学学报, 2020, 42(1): 8-17.
- [13] 黄世文,王玲,王全永,等. 纹枯病菌对不同水稻品种叶片中抗病性相关酶活性的影响[J]. 中国水稻科学, 2008, 22(2): 219-222.
- [14] 刘小烛,胡忠,李英,等. 杜仲皮中抗真菌蛋白的分离和特性研究[J]. 云南植物研究, 1994, 16(4): 385-391.
- [15] 吴金梅,胡迎利. 抗菌肽的生产方法与产业化分析[J]. 现代牧业, 2018, 38(1): 22-26.
- [16] 马慧玲. 家蝇抗菌肽AMP-17抗白色念珠菌机制研究[D]. 贵阳: 贵州医科大学, 2019.
- [17] 单安山,田昊天,邵长轩,等. 抗菌肽抗细菌机理研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2018, 49(3): 84-94.
- [18] OBAYSHI T, YOSHIDA M, TAMURA H, et al. Determination of plasma (1-3)- β -D-glucan: A new diagnostic aid to deep mycosis [J]. Med Mycol, 1992, 30(4): 275-280.
- [19] 乔媛媛,曹卫友,张玉梅,等. 电子显微镜观察抗菌肽抗细菌机理[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2010, 3(44): 460-462.
- [20] 尚元元,喻楠,董灵娣,等. 血浆(1-3)- β -D-葡聚糖对院内侵袭性真菌感染诊断的临床价值[J]. 中国真菌学杂志, 2018, 13(3): 168-172.
- [21] 韩叙,廖国建. 白色念珠菌麦角甾醇的储存、调节和功能[J]. 国外医药抗生素分册, 2018, 39(5): 424-429.
- [22] 侯寿尧,朱红梅,汪志平,等. 氟康唑胶囊与复方酮康唑乳剂对真菌性外耳道炎的疗效及其对炎性因子水平改善的影响[J]. 抗感染药学, 2019, 16(4): 664-666.

(收稿日期: 2019-12-28 编辑: 田苗)