

# 金丝桃素-光动力疗法对白色念珠菌生物膜的杀伤效应

刘焯 李清 黄頔 贺气志<sup>(通讯作者)</sup>

长沙医学院 湖南 长沙 410219

**【摘要】**目的：探讨金丝桃素-光动力疗法对白色念珠菌生物膜的杀伤效果。方法：以白色念珠菌标准株为研究对象，进行体外不同药物浓度（0、2、4、6、8、16、32） $\mu\text{mol/L}$ 的金丝桃素-光动力实验，通过倒置显微镜观察不同功率密度的金丝桃素-光动力疗法对白色念珠菌生物膜的杀伤效果。结果：随着金丝桃素浓度上升，其对白色念珠菌生物膜的杀伤效应相对应增大，当金丝桃素浓度为 $16\mu\text{mol/L}$ ，光照时间为30min时，杀伤效应最大；金丝桃素浓度增加至 $32\mu\text{mol/L}$ 时，杀伤效应降低。结论：（1）金丝桃素-光动力疗法对白色念珠菌生物膜有杀伤作用，金丝桃素浓度为 $16\mu\text{mol/L}$ ，光照时间为30min时，杀伤效应最大（2）在一定浓度范围内金丝桃素-光动力疗法的抗菌活性与光敏剂浓度成正相关。

**【关键词】**：金丝桃素；光动力；白色念珠菌；生物膜

DOI:10.12417/2705-098X.26.06.016

白色念珠菌（*Candida albicans*）是人体口腔、消化道及泌尿生殖道黏膜常见的条件致病性真菌。在宿主免疫力正常时，它通常作为共生菌存在；但当免疫系统受损（如使用广谱抗生素、免疫抑制剂，或患有糖尿病、艾滋病等）时，白色念珠菌可过度增殖并引发感染，从浅表性黏膜炎到威胁生命的侵袭性念珠菌病<sup>[1]</sup>。在口腔医学领域，白色念珠菌感染与多种疾病状态紧密关联。例如，研究表明其在口腔癌患者唾液中的检出率高达74%，且是分离出的最主要念珠菌种类（占84%）。义齿性口炎患者中检出率最高的是白色念珠菌<sup>[2]</sup>。口腔扁平苔藓与念珠菌感染密切相关。白色念珠菌致病的关键在于生物膜的形成，生物膜可使其对药物的抵御能力显著增强，这极大地增加了治疗白色念珠菌病的难度。因此，越来越多地受到研究者注意到破坏白色念珠菌生物膜的重要性。

光动力疗法（photodynamic therapy, PDT）是一种基于光化学反应的治疗方法，其原理是：光敏剂在特定波长光的照射下被激发，将能量转移给周围的基态氧（ $^3\text{O}_2$ ），产生活性氧（Reactive Oxygen Species, ROS），尤其是高反应活性的单线态氧（ $^1\text{O}_2$ ）。这些ROS可无差别地氧化细胞内的脂质、蛋白质和核酸等关键生物大分子，导致微生物快速死亡<sup>[3-4]</sup>。由于ROS的作用具有非特异性、多靶点和短暂局部性的特点，PDT不易诱导微生物产生耐药性，且对宿主组织损伤相对较小，因此在处理局部生物膜感染方面展现出巨大潜力。

金丝桃素（Hypericin, Hyp）是一种从贯叶金丝桃中提取的天然物质。研究表明，金丝桃素具有抗病毒、抗炎症、抗肿瘤和增强免疫力等生物活性，在抗抑郁、抑制神经胶质瘤生长等方面也有较强作用<sup>[5]</sup>。此外，金丝桃素可作为光动力疗法的新型光敏剂，通过与特定波长的光照结合，能够产生高度活性的单态氧，

从而对细胞、真菌等造成损害<sup>[6]</sup>。本研究将探讨金丝桃素介导的PDT抗白色念珠菌作用的最适浓度，为在临床上更有效的杀灭微生物提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料和设备

酵母浸出粉胨葡萄糖培养基（YPD，中国）；RPMI1640（Gibco，美国）；金丝桃素（Hypericin, HPLC纯度 $\geq 95\%$ ）购自上海源叶生物科技有限公司；黑色6孔板（Corning，中国）；酶标仪（550型，日本）；倒置显微镜（XD-101型，日本）。

### 1.2 菌株、光敏剂和光源

实验所用白色念珠菌为标准菌株 ATCC 90028，由长沙医学院惠赠。菌株于 $-80^\circ\text{C}$ 甘油冻存管中保存。光源为定制的橙色发光二极管（LED）阵列光源。经光谱仪测定，其主发射波长为（ $570 \pm 10$ ）nm。使用辐照计校准样品平面的光功率密度，以确保每次照射的能量密度准确为 $40 \text{ J/cm}^2$ 。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 培养白色念珠菌生物膜

将冻存菌株于YPD固体培养基上划线， $32^\circ\text{C}$ 培养48小时活化。挑取单菌落接种于5 mL YPD液体培养基中， $32^\circ\text{C}$ 、170 rpm振荡培养过夜至对数生长期。收集菌液，3000 rpm离心5分钟，PBS洗涤两次。用含10%FBS的RPMI-1640培养基重悬菌体，并通过血球计数板将菌悬液浓度调整至 $1 \times 10^6 \text{ CFU/mL}$ 。将2 mL菌悬液接种于6孔板中，置于 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 培养箱中静置培养48小时以形成成熟生物膜。培养期间，每24小时轻柔更换一次等体积的新鲜培养基（含10%FBS的RPMI-1640）。

作者简介：刘焯（2004年9月—），性别：女，民族：汉族，籍贯：湖南邵东，学历：本科在读，研究方向为：口腔基础医学。

通讯作者：贺气志（1985年4月—），性别：女，民族：汉族，籍贯：湖南娄底，职务/职称：副教授，学历：硕士研究生，研究方向为：基础医学。

课题：2024年度湖南省教育厅大学生创新创业训练项目“新型光敏剂Ru化合物介导的光动力对白色念珠菌的杀伤效应”（编号：湘教通【2024】191号-5213）。

## 1.4 不同金丝桃素浓度的光动力抗生物膜实验

用 DMSO 配制 10mmol/L 的金丝桃素储备液，避光-20. C 保存。实验当天，用含 10%FBS 的 RPMI-1640 培养基将储备液稀释至所需工作浓度，确保各实验组中 DMSO 的最终浓度均 $\leq$ 1%。预实验表明此浓度的 DMSO 对生物膜生长无影响。

将培养 48 h 的白色念珠菌生物膜，吸弃上清，用 PBS 轻柔漂洗一次，将金丝桃素溶于 DMSO 中，根据金丝桃素浓度的不同分为 0 $\mu$ mol/L 组（对照组）、2 $\mu$ mol/L 组、4 $\mu$ mol/L 组、8 $\mu$ mol/L 组、16 $\mu$ mol/L 组、32 $\mu$ mol/L 组 6 个组，分别加入白色念珠菌生物膜中，用铝箔纸包裹孔板，于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中避光孵育 30 分钟，吸弃药液，用 PBS 漂洗两次以去除未结合的光敏剂。每孔加入 2mL 新鲜培养基后，置于波长 570nm 的橙色 LED 光源下垂直照射 30 分钟，总能量密度为 40 J/cm $^2$ ，实验重复 3 次，用倒置显微镜观察并拍照，酶标仪检测 570nm 波长处的吸光度 (A) 值。

## 1.5 统计学方法

采用 SPSS22.0 统计软件进行数据处理，计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示，所有数据结果运用单因素方差分析和 LSD-t 检验， $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度金丝桃素介导的 PDT 对白色念珠菌的杀伤作用

经过不同浓度金丝桃素的光动力处理后，不同浓度金丝桃素介导的光动力实验，孔板中，如图 1 所示。倒置显微镜观察，结果如图 2 所示。



图1 孔板中不同浓度金丝桃素介导的光动力实验

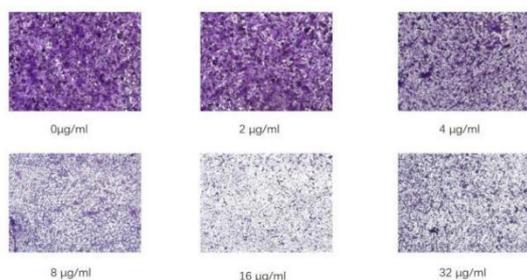


图2 倒置显微镜下不同浓度金丝桃素介导的光动力实验

倒置显微镜观察结果（图 2）直观地展示了 Hyp-PDT 的剂

量依赖性杀伤效果。与结构完整的空白对照组相比，经 Hyp-PDT 处理的生物膜出现了渐进性破坏。在低浓度组（2，4，8 $\mu$ mol/L），生物膜开始出现局部疏松和孔洞，部分菌体形态异常。在中高浓度组（16 $\mu$ mol/L），破坏效应极为显著：生物膜整体结构崩解，大片区域菌体脱落，视野中可见大量细胞碎片和残留的胞外基质网状结构，完整菌体所剩无几。在最高浓度组（32 $\mu$ mol/L），尽管生物膜损伤依然严重，但与 16 $\mu$ mol/L 组相比，视野中残留的菌体聚集物似乎略有增多，破坏的彻底性有所下降。由此可见，随着金丝桃素浓度上升，其对白色念珠菌生物膜的杀伤效应相对应增大，当金丝桃素浓度为 16 $\mu$ mol/L，光照时间为 30min 时，杀伤效应最大；金丝桃素浓度增加至 32 $\mu$ mol/L 时，杀伤效应降低。

## 3 讨论

唑类药物常用于念珠菌感染的治疗，然而，随着该类药物的广泛应用及监管措施的相对滞后，念珠菌对唑类药物的耐药率呈上升趋势，且多药交叉耐药现象日益凸显。其耐药机制复杂，主要涉及药物靶点 ERG11 基因的突变或过表达、外排泵活性增强、生物膜形成、代谢途径改变以及适应性应激反应的激活等。其中，ERG11 基因的改变可导致靶酶结构或表达量变化，从而降低唑类药物结合效率，是介导耐药的关键分子机制之一。尽管唑类药物在临床广泛应用，但耐药性的产生限制了其疗效，并常导致感染复发。值得注意的是，PDT 对唑类药物耐药的念珠菌菌株仍表现出良好的抗菌活性，且可用于治疗耐药菌引起的复发性感染，这成为 PDT 相较于传统唑类药物的一个潜在优势。由于部分菌株对制霉菌素等抗真菌药物也存在耐药现象，当前口腔念珠菌病的临床疗效仍有提升空间。PDT 具有广谱抗菌、作用时间短、靶向性强等特点，其可通过光化学反应破坏念珠菌细胞膜结构与功能，导致细胞死亡。制霉菌素属于多烯类抗真菌药，其作用机制是与真菌细胞膜中的麦角固醇结合，形成跨膜孔道，增加膜通透性，导致细胞内容物外漏而死亡。PDT 是通过光敏剂在特定波长光照下产生活性氧（ROS），ROS 可氧化损伤真菌细胞的蛋白质、脂质及核酸等多种生物分子，从而引起细胞失活。因此，将 PDT 与传统抗真菌药物联合应用，可能产生协同作用，提升治疗效果，具有重要的临床研究价值。

金丝桃素介导的光动力疗法（PDT）对细菌和真菌病原体表现出广泛疗效，包括念珠菌等多重耐药菌株，显示其作为传统抗菌药物的强大替代方案潜力。金丝桃素在特定光波长激发下可产生 ROS，引起微生物细胞的氧化损伤、凋亡及膜结构破坏，而对哺乳动物细胞毒性较低<sup>[8]</sup>。该作用机制不依赖于传统的药物靶点，因此对唑类药物敏感及耐药的白色念珠菌均有效<sup>[9]</sup>。通过纳米颗粒或聚合物载体递送金丝桃素，可改善其水溶性、促进细胞摄取、提高光动力效率，并产生协同增强效应。进一步联合化学动力学疗法（CDT）或光热疗法（PTT），可

在缺氧的微环境（如深部感染或生物膜内）中增强疗效<sup>[9]</sup>。体内模型显示，该疗法能显著降低感染部位的微生物负荷、促进伤口愈合，且生物相容性良好，具有临床转化前景。值得注意的是，金丝桃素介导的 PDT 在无光条件下几乎无暗毒性，并对感染组织具有较高选择性，进一步印证了其安全性<sup>[9]</sup>。综合来看，这些证据支持金丝桃素介导的 PDT 作为一种多功能、有潜力的抗感染策略，尤其适用于耐药性日益严峻的临床背景。

#### 局限性

尽管有新的发现，金丝桃素介导的 PDT 整体证据基础仍受若干显著局限。

首先，纳入的研究在光敏剂浓度、光参数（如波长、通量、照射时间）和结局指标上表现出显著异质性，使得直接比较和最佳治疗方案的共识更加复杂。其次，大量数据来自体外实验，导致高水平临床证据存在空白，无法确认其真实世界疗效和安全性。许多研究还采用小样本量，限制了统计学效力和长期结

果评估能力。此外，虽然大多数报告关注基本的细胞毒性效应和 ROS 机制，但系统性研究潜在不良事件或非靶点效应，尤其是在复杂生理环境中，却很少有研究。最后，本实验可以继续优化，利用纳米载体或者石墨烯与金丝桃素结合或许能发挥更大的药效，但缺乏标准化的协同效应和临床可行性评估方法，限制了其转化潜力的明确结论。因此，这些不足凸显了需要更严谨、设计良好的临床试验，结合标准化干预参数和健全的安全性数据报告，以全面验证金丝桃素介导的 PDT 作为可靠的抗菌策略。

为了促进临床转化，必须解决若干关键挑战。首先，光激活疗法的监管途径仍然复杂，需要严格证明安全性、有效性和器械与药物的兼容性。其次，配方标准化至关重要；不同研究中光敏剂制备、光剂量和递送系统的差异阻碍了复现性和临床可扩展性。第三，患者接受度——尤其是光敏感性、治疗时间和光照传递方式方面——需要在早期试验中进行全面评估。通过设计良好的转化研究和跨学科合作来解决这些障碍，对于推动基于金丝桃素的 PDT 进入常规临床实践至关重要。

#### 参考文献：

- [1] 杨欣,孙欣.白色念珠菌的致病和耐药机制研究进展[J].中国现代应用药学,2021,38(08):1021-1024.
- [2] 周羽洁,任彪,程磊,等.白假丝酵母菌在义齿性口炎中的相关研究[J].国际口腔医学杂志,2017,44(04):477-483.
- [3] 李步洪,陈天龙,林立,等.光动力疗法基础研究与临床应用的新进展[J].中国激光,2022,49(05):9-25.
- [4] 靳维维,吕丹亚,樊陈莉,等.光动力疗法中光敏剂的研究进展[J].广东化工,2022,49(18):76-77.
- [5] 盛可心,王昊冉,徐凌川,等.贯叶连翘药理作用及其机制研究新进展[J].中药药理与临床,2023,39(03):117-122.
- [6] 邵文丽,姚佳,张雪青,等.金丝桃素介导的光动力学疗法在肿瘤治疗中的应用研究[J].安徽农业科学,2016,44(31):122-124+134.
- [7] 杜梅霞.光动力治疗艾滋病患者口腔白色念珠菌感染的临床应用研究[D].广西医科大学,2021.
- [8] 张欠欠,封小川,张凯玄,等.白念珠菌对临床常用抗真菌药物耐药机制研究进展[J].中国真菌学杂志,2022,17(03):251-254.
- [9] 李鸿波,曹春晖,苏晓菲,等.光动力疗法联合氟康唑对获得性免疫缺陷综合征合并口腔念珠菌病患者的影响[J].慢性病学杂志,2025,26(10):1497-1500.