

不同辐射功率的微波对红色毛癣菌酶活性的影响

唐明姣 孔繁荣 唐智生 杨少华

桂林医学院附属医院康复医学科, 桂林 541000

通信作者: 杨少华, Email: yjfl66@sina.com

【摘要】 目的 观察不同辐射功率微波对红色毛癣菌 β -(1,3)-D-葡聚糖合成酶及琥珀酸脱氢酶活性的影响, 探讨其抗真菌作用机制。方法 将经过形态学鉴定的红色毛癣菌分为实验组及对照组, 采用 2450 MHz 医用微波进行辐射, 将实验组按照输出功率分为 20 W、40 W、60 W、80 W 4 个亚组, 每个亚组辐射时间均为 15 min, 辐射 9 次。辐射完成后置于 27 °C 恒温箱培养。对照组接种完成后立即置于同一恒温箱, 不进行任何功率的微波辐射。30 d 后提取真菌蛋白酶, 采用 ELISA 法(酶联免疫法)测定标本中 β -(1,3)-D-葡聚糖合成酶及琥珀酸脱氢酶活性水平。**结果** 随着辐射功率的增加, 酶的活性逐渐降低, 当输出功率为 80 W 时, β -(1,3)-D-葡聚糖合成酶及琥珀酸脱氢酶活性分别为 $(0.730 \pm 0.74) \text{ U/ml}$ 、 $(1.828 \pm 1.774) \text{ U/L}$, 与其他 3 个亚组及对照组比较, 80 W 组的酶活性显著降低 ($P < 0.05$)。**结论** 微波对红色毛癣菌酶活性具有抑制作用, 并随着辐射功率增大而增强, 呈剂量依赖性; 微波可在体外诱导红色毛癣菌琥珀酸脱氢酶及 β -(1,3)-葡聚糖合成酶活性减弱, 导致真菌细胞壁完整性及三羧酸循环被破坏, 进而死亡。此外, 测定温度变化可能有助于阐明微波的生物效应。

【关键词】 微波; 红色毛癣菌; 酶联免疫吸附实验

基金项目: 广西自然科学基金(2013GXNSFAA019198)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2019.10.003

Effects of microwave exposure on the enzymatic activity of *Trichophyton rubrum*

Tang Mingjiao, Kong Fanrong, Tang Zhisheng, Yang Shaohua

Department of Rehabilitation Medicine, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541000, China

Corresponding author: Yang Shaohua, Email: yjfl66@sina.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of exposing *Trichophyton rubrum* fungus to microwaves at different intensities in terms of the activity of succinic dehydrogenase and beta-(1,3)-D-glucan synthase. **Methods** *Trichophyton rubrum* organisms were randomly divided into a control group and experimental groups. The experimental groups were incubated at 27 °C after direct radiation with 2450 MHz microwaves at 20, 40, 60 or 80 W for 15 min, repeated 8 times. The control group was incubated without any irradiation. Thirty days later, the beta-(1,3)-D-glucan synthase and succinate dehydrogenase activities were determined using enzyme-linked immunosorbent assays. **Results** The enzymatic activity decreased gradually with increasing radiation intensity. When the output power was 80 W, the beta-(1,3)-glucan-synthase-D activity was $0.730 \pm 0.74 \text{ U/ml}$ and that of the succinate dehydrogenase was $1.828 \pm 1.774 \text{ U/L}$, both significantly lower than in the groups subjected to less powerful irradiation. **Conclusions** Microwave radiation can decrease the enzymatic activity of *Trichophyton rubrum* in a dose-dependent manner. Higher intensity is more effective. Microwave irradiation can decrease the activity of succinate dehydrogenase and beta-(1,3)-glucan synthase from *Trichophyton rubrum* in vitro, resulting in the destruction of fungal cell walls and interfering with the tricarboxylic acid cycle, furthering cell death. Moreover, the temperature change possibly also helps promote the biological effects of microwave radiation.

【Key words】 Microwaves; *Trichophyton rubrum*

Funding: Guangxi Natural Science Foundation (grant 2013GXNSFAA019198)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2019.10.003

皮肤癣菌是真菌感染最常见的原因, 对全世界范围内人的健康构成威胁, 目前最常见的皮肤真菌为红色毛癣菌。近年来, 红色毛癣菌诱发的疾病在

发达国家及发展中国家呈增加趋势, 常伴随甲真菌病^[1]。既往治疗真菌感染主要依赖药物, 一方面长期用药会对宿主产生一定程度的毒性反应, 主要表

现为肝毒性及肾毒性,另一方面致病真菌耐药性日趋严重^[2]。医用微波是指频率在 300 MHz ~ 300 GHz、波长为 1 mm ~ 1 m 的高频电,通过热效应及非热效应达到消炎抗菌的目的^[3]。有研究报道^[4],微波可显著降低皮肤癣菌的活力,常用来消毒被红色毛癣菌感染的相关物品。

琥珀酸脱氢酶在真核生物中存在于线粒体内膜,是连接电子传递和氧化磷酸化的枢纽之一,为生物体需氧和产能的呼吸链提供电子^[5]。琥珀酸脱氢酶作为线粒体的一种标志性酶,在三羧酸循环中起着至关重要的作用,其活性可反映出三羧酸循环水平^[6]。研究表明,随着真菌的衰亡,琥珀酸脱氢酶的活性也呈下降趋势,可作为真菌的代谢指标之一^[7-8]。 β -(1,3)-葡聚糖是真菌细胞壁的主要成分,占干重的 60%,在保持细胞完整方面起着重要作用,在宿主感染真菌免疫过程中是一种重要的相关物质^[9]。 β -(1,3)-葡聚糖合成酶是合成 β -(1,3)-葡聚糖的关键酶,抑制该酶,可导致真菌细胞壁的 β -(1,3)-葡聚糖成分减少,破坏真菌细胞壁完整性,导致菌体溶解、破裂及死亡^[10]。目前,研究者们已开始从蛋白及基因层面来探讨微波对微生物的作用,但目前很少有研究报道不同功率微波对红色毛癣菌酶活性的影响。为进一步探讨微波对红色毛癣菌的作用机制,为微波治疗皮肤癣菌提供实验依据,本实验使用不同输出功率的微波,着重探讨其对琥珀酸脱氢酶及 β -(1,3)-葡聚糖合成酶活性的影响。

材料与方法

一、试剂与仪器

马铃薯培养基:马铃薯、葡萄糖、琼脂、水各按 200 g、20 g、20 g、1000 ml 比例配制而成。琥珀酸脱氢酶酶联免疫分析试剂盒(上海酶联生物科技有限公司产,批号 10-73-931), β -(1,3)-D-葡聚糖合成酶酶联免疫分析试剂盒(上海酶联生物科技有限公司产,批号 10-73-326),Bio-Rad iMark 型酶标仪(美国伯乐公司产,编号 2015769403),Airstream II 级 A2 型生物安全柜(新加坡艺思高产),旋涡混合器(编号 2014109400),低温超速离心机(Thermo 公司产,编号 2014229700),RETSCH(莱驰)混合冷冻混合球磨仪(上海泱郁科学仪器有限公司产),PYX-DHS-60X75-BS-II 隔水式电热恒温培养箱,ME-7250 型微波治疗仪(日本欧技技研公司产,批号 99258E)。

二、菌株

实验用的红色毛癣菌由桂林医学院附属医院皮肤科真菌室提供,经过真菌学常规鉴定,接种至 PDA 培养基上培养。

三、微波辐射方法及分组

将接种的红色毛癣菌分为实验组及对照组,对照组接种完成后立即置于 27 °C 恒温箱,不进行任何功率的微波辐射。实验组根据输出功率分别分为 20 W、40 W、60 W、80 W 4 个亚组,将不同辐射功率的真菌辐射 9 次,每次 15 min。实验组采用圆形辐射器,按照实验分组行微波辐射,辐射距离 8 cm,同时用数显传感温度计测量相同条件下未接种真菌试管培养基内的温度变化情况。每日 1 次,辐射完成后置于同一恒温箱内培养,30 d 后收集真菌样品行酶活性测定。

四、标本采集及检测指标

1. 收集待测样品:培养 30 d 后用 4 °C 预冷无菌生理盐水冲洗试管斜面,将孢子和菌丝洗落于 15 ml 离心管生理盐水中,再置于漩涡振荡器上震荡,使菌落团块散开混匀,孢子从菌丝上洗脱、散落,用 2 层无菌纱布过滤去除大的菌丝团块及杂质,每组精密移取 1 ml 放至 2 ml 离心管,用浊度仪检测真菌悬液浓度,用比浊管调整菌悬液浓度至一定浓度备用。

2. 裂解孢子、提取酶(珠磨破碎法):在上述离心管中加入 100 μ l 提取液^[11]。室温作用 15 ~ 20 min,在上述裂解液中加入干净的珠子,在混合球磨仪中研磨 6 min 后,在涡旋振荡器中震荡 10 min。放进离心机离心 10 min,速度 10000 r/min,弃沉淀取上清液。

3. 酶活性的测定:将包被板置于冰槽上,每组精密移取 50 μ l 上清液,各 3 份,严格按照试剂盒说明书行琥珀酸脱氢酶及 β -(1,3)-葡聚糖合成酶活性测定。

五、统计学分析

采用 SPSS 24 版统计学软件进行数据分析,测定结果以($\bar{x} \pm s$)形式表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结果

一、不同功率的微波辐射对红色毛癣菌生长情况的影响

对照组红色毛癣菌在接种后第 2 天或第 3 天开始生长,30 d 后对照组均生长旺盛,数个菌落,最大的菌落 > 2 cm,见图 1。实验组中除 20 W 组,其余各组均有杀抑菌效应。当输出功率为 80 W 时,红色毛癣菌在接种后第 3 天或第 4 天开始生长,30 d 后极微量生长或无菌生长,见图 2。

二、不同功率的微波辐射对红色毛癣菌悬浊液浓度的影响

30 d 后,用预冷无菌生理盐水采集标本,将杂质

去除,用漩涡震荡器震荡后采用比浊仪测量悬浊液的浓度,见表 1。



图 1 对照组 30 d 后红色毛癣菌生长情况 图 2 80 W 组 30 d 后红色毛癣菌生长情况

表 1 不同功率的微波辐射对红色毛癣菌悬浊液浓度的影响 (MCF)

组别	试管 1	试管 2	试管 3
对照组	5.86	5.06	5.68
20 W 组	5.39	5.86	5.50
40 W 组	4.67	4.80	4.60
60 W 组	4.36	4.53	4.50
80 W 组	1.06	1.18	1.55

三、不同功率的微波辐射对温度的影响

采用 MC128101 型数显传感温度仪测量相同条件下未接种真菌试管培养基内的温度变化,间接反映同条件同辐射功率受试菌的温度,结果发现温度随输出功率的增大而升高,对照组 (28.000±0.500)℃,20 W 组 (32.592±0.296)℃,40 W 组 (45.002±0.896)℃,60 W 组 (53.516±0.957)℃,80 W 组 (65.664±0.702)℃。见图 3。

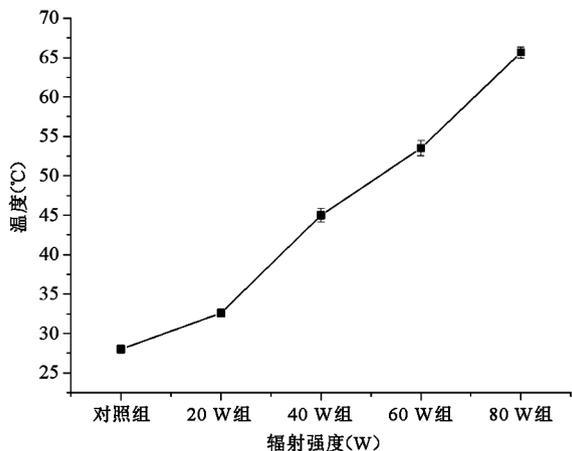


图 3 不同功率的微波辐射对温度的影响

四、不同功率的微波辐射对红色毛癣菌酶的影响

实验中,微波对 β-(1,3)-葡聚糖合成酶活性的影响随辐射功率的增加而增大。辐射功率越大,β-(1,3)-葡聚糖合成酶的生物活性所受到影响越明显,见图 4。微波对琥珀酸脱氢酶活性的影响也随辐射功率的增加而增强,辐射剂量越大,琥珀酸脱氢酶的生物活性越低,见图 5。

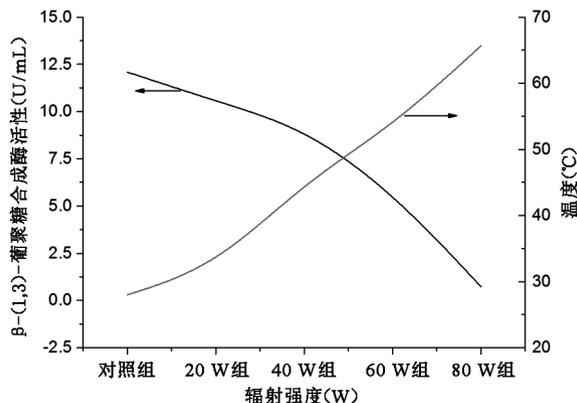


图 4 微波辐射剂量与温度变化对红色毛癣菌 β-(1,3)-葡聚糖合成酶活性的影响

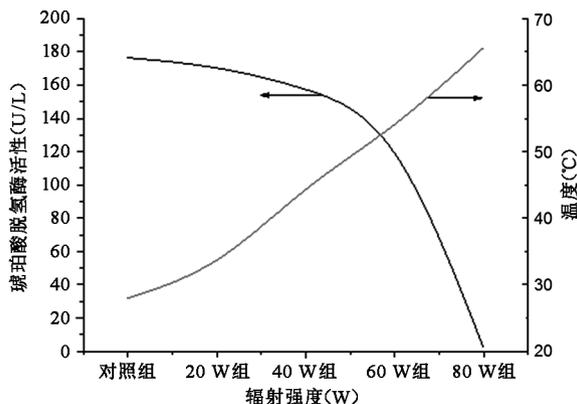


图 5 微波辐射剂量与温度变化对红色毛癣菌琥珀酸脱氢酶活性的影响

与对照组比较,40 W 组、60 W 组及 80 W 组 β-(1,3)-葡聚糖合成酶活性显著减弱 ($P < 0.05$);与 20 W 组比较,60 W 组及 80 W 组 β-(1,3)-葡聚糖合成酶活性明显减弱 ($P < 0.05$);与 40 W 组比较,60 W 组及 80 W 组 β-(1,3)-葡聚糖合成酶活性显著减弱 ($P < 0.05$);与 60 W 组比较,80 W 组 β-(1,3)-葡聚糖合成酶活性明显减弱 ($P < 0.05$)。与对照组比较,40 W 组、60 W 组及 80 W 组琥珀酸脱氢酶活性显著减弱 ($P < 0.05$);与 20 W 组比较,40 W 组、60 W 组及 80 W 组琥珀酸脱氢酶活性明显减弱 ($P < 0.05$);与 40 W 组比较,60 W 及 80 W 组琥珀酸脱氢酶活性显著减弱 ($P < 0.05$);与 60 W 组比较,80 W 组琥珀酸脱氢酶活性明显减弱 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 微波辐射对红色毛癣菌 β -(1,3)-葡聚糖合成酶及琥珀酸脱氢酶的影响 (U/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	β -(1,3)-葡聚糖合成酶 (U/ml)	琥珀酸脱氢酶 (U/L)
对照组	12.086 \pm 1.404	176.545 \pm 4.234
20 W 组	10.553 \pm 1.218	171.783 \pm 2.409
40 W 组	9.140 \pm 1.205 ^a	158.564 \pm 4.347 ^{ab}
60 W 组	5.720 \pm 0.485 ^{abc}	138.367 \pm 5.262 ^{abc}
80 W 组	0.730 \pm 0.742 ^{abcd}	1.828 \pm 1.774 ^{abcd}

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 20 W 组比较,^b $P < 0.05$;与 40 W 组比较,^c $P < 0.05$;与 60 W 组比较,^d $P < 0.05$

讨 论

本研究探讨了不同辐射功率微波对红色毛癣菌的作用。结果发现,不同辐射功率的微波均可降低红色毛癣菌 β -(1,3)-葡聚糖合成酶及琥珀酸脱氢酶的活性,且随着输出功率的增加呈现出能量和剂量依赖性。本研究结果与课题组前期研究结果一致,输出功率为 20 W 的微波对红色毛癣菌无明显杀抑效应,功率为 40 W、60 W 的微波具有杀抑效应,且 80 W 的微波灭菌效果显著^[12]。有研究报道,皮肤癣菌的最适宜温度为 28~30 °C^[13]。刁有江等^[14]在不同温度下培养红色毛癣菌时,发现受试菌随着温度的升高出现衰老现象。这与传统的观点一致,即微波对微生物的主要作用机制是热效应^[15]。有研究则对这一观点提出质疑,认为其致死作用可能是电磁波产生的离子及偶极子相互作用,进而导致细胞破坏(非热效应)^[16]。同时该研究对非热效应进行了一种可能性的解释,认为生物体的某些必需成分,如核酸、脂多糖、蛋白质等会选择性地吸收微波,从而影响微生物的活力。

红色毛癣菌是具有两个不同生长阶段的丝状真菌。有研究表明,琥珀酰介导琥珀酸参与这两个生长阶段的三羧酸循环代谢途径^[17]。琥珀酰化修饰是一种几乎参与所有生命活动的新的蛋白翻译后修饰,包括代谢调控、信号通路调控及转录调控等生理过程^[18-19]。因此,本研究推测微波对红色毛癣菌琥珀酸脱氢酶活性的影响可能与琥珀酰化蛋白翻译修饰有一定的关系。

综上所述,不同辐射功率的微波可降低真菌酶的活性,并随辐射剂量的增加呈剂量依赖关系,但过度治疗可能会对机体产生损伤效应。临床工作中,合理选择输出功率对于治疗红色毛癣菌至关重要。微波辐射方法可有效治疗皮肤癣菌,有一定的优势,但其具体作用机制尚待进一步明确。

参 考 文 献

[1] Seebacher C, Bouchara JP, Mignon B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections[J]. Mycopathologia, 2008, 166(5-6):

335.DOI: 10.1007/s11046-008-9100-9.

- [2] 唐辉,朱驹,周有骏.抗真菌药物研究现状及发展趋势[J].药学进展,2006,30(12):529-535.
- [3] 李明,卢向丽,杨玉霞.结核性胸腔积液患者微波治疗的护理[J].中华全科医学,2008,6(1):107.
- [4] Budihardja D, Maysar P. The effect of microwave irradiation on the vitality of various dermatophytes[J]. Mycoses, 2014, 57(4):209-213. DOI:10.1111/myc.12144.
- [5] Mason D. T-cell-mediated control of autoimmunity[J]. Arthritis Res, 2001, 3(3):133-135.
- [6] 古力娜·达吾提,安惠霞,斯拉甫·艾白,等.地锦草有效部位对真菌琥珀酸脱氢酶活性的影响[J].中国中医药信息杂志,2010,17(11):34-35.DOI: 10.3969/j.issn.1005-5304.2010.11.014.
- [7] 范洁群,冯固,李晓林.有机磷杀虫剂-灭克磷对丛枝菌根真菌 Glomus mosseae 生长的效应[J].菌物学报,2006,25(1):125-130.
- [8] 孙丹丹,郑锦龙,郭绍霞,等.农业技术与 AM 真菌协同防治作物土传病害的效应与机制[J].山东农业科学,2016,48(7):158-163.DOI: 10.14083/j.issn.1001-4942.2016.07.035.
- [9] Gastebois A, Mouyna I, Simenel C, et al. Characterization of a new (β)-(1-3)-glucan branching activity of aspergillus fumigatus [J]. J Biol Chem, 2010, 285(4):2386-2396.DOI: 10.1074/jbc.M109.077545.
- [10] 安惠霞,李治建,古力娜·达吾提,等.地锦草提取物对红色毛癣菌酶活性的影响[J].时珍国医国药,2010,21(4):787-788.
- [11] 胡彬彬,林连兵,魏云林,等.一种高效的真菌总蛋白质提取方法[J].中国生物工程杂志,2013,33(9):53-58.
- [12] 杨少华,程培华,陈德华,等.微波辐射对几种常见表皮癣菌杀灭或抑制效应的实验研究[J].中华物理医学与康复杂志,2005,27(10):605-608.
- [13] Jessup CJ, Warner J, Isham N, et al. Antifungal susceptibility testing of dermatophytes: establishing a medium for inducing conidial growth and evaluation of susceptibility of clinical isolates[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(1):341-344.
- [14] 刁有江,邓旭明.皮肤癣菌微量液基稀释法抗真菌先导化合物敏感性试验方法的建立[J].中国农学通报,2008,24(5):1-7.
- [15] Yeo CB, Watson IA, Stewart-Tull DE, et al. Heat transfer analysis of staphylococcus aureus on stainless steel with microwave radiation[J]. J Appl Microbiol, 2010, 87(3):396-401.
- [16] Watanabe K, Kakita Y, Kashige N, et al. Effect of ionic strength on the inactivation of micro-organisms by microwave irradiation[J]. Lett Appl Microbiol, 2000, 31(1):52-56.
- [17] Xu X, Liu T, Yang J, et al. The first succinylome profile of Trichophyton rubrum reveals lysine succinylation on proteins involved in various key cellular processes[J]. BMC Genomics, 2017, 18(1):577. DOI: 10.1186/s12864-017-3977-y.
- [18] Papanicolaou KN, O'Rourke B, Foster DB. Metabolism leaves its mark on the powerhouse: recent progress in post-translational modifications of lysine in mitochondria[J]. Front Physiol, 2014, 5(5):301. DOI: 10.3389/fphys.2014.00301.
- [19] Bochmann SM, Spieß T, Kötter P, et al. Synthesis and succinylation of subtilin-like lantibiotics are strongly influenced by glucose and transition state regulator AbrB[J]. Appl Environ Microbiol, 2015, 81(2):614-622.DOI: 10.1128/AEM.02579-14.

(修回日期:2019-07-12)

(本文编辑:凌 琛)