

## 苦参碱对耳念珠菌生物膜的抑制作用

王龙海, 王业梅, 吴惠, 吴大强, 汪天明, 汪长中, 李璨\*

安徽中医药大学 中西医结合学院, 安徽 合肥

王龙海, 王业梅, 吴惠, 吴大强, 汪天明, 汪长中, 李璨. 苦参碱对耳念珠菌生物膜的抑制作用[J]. 微生物学报, 2025, 65(10): 4700-4713.

WANG Longhai, WANG Yemei, WU Hui, WU Daqiang, WANG Tianming, WANG Changzhong, LI Can. Inhibition mechanism of matrine against biofilm formation of *Candida auris*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(10): 4700-4713.

**摘要:** 耳念珠菌(*Candida auris*)作为一种多重耐药真菌, 其生物膜形成是导致临床感染难治性的关键因素, 目前针对其生物膜的有效干预手段仍较为匮乏。【目的】探讨中药单体苦参碱(matrine, MT)对 *C. auris* 的抗菌活性及生物膜抑制机制。【方法】采用微量稀释法测定 MT 对 *C. auris* 的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)、最小杀菌浓度(minimum fungicidal concentration, MFC)和最小生物膜抑制浓度(sessile minimum inhibitory concentration, SMIC); 运用平板法观察 MT 干预下 *C. auris* 的时间生长曲线和菌落形态; 利用水解酶法测定 MT 对 *C. auris* 生物膜水解酶活性的变化; 通过水-烃两相法观察 MT 对 *C. auris* 生物膜细胞表面疏水性的变化; 采用 XTT 法、结晶紫法和激光共聚焦扫描显微镜(CLSM)观察 MT 对 *C. auris* 生物膜代谢活力及结构的影响; 使用 DAPI 染色法检测 MT 对生物膜状态下 *C. auris* 细胞核的变化; 借助大蜡螟感染模型观察机体在 *C. auris* 感染时 MT 的潜在保护作用。【结果】MT 对 *C. auris* 的 MIC 为 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , MFC 和 SMIC 均为 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 其作用机制主要是通过降低 *C. auris* 细胞表面疏水性抑制生物膜成熟结构的形成, 同时显著降低 *C. auris* 的代谢活力并诱导细胞核形态异常, 最终抑制 *C. auris* 增殖; 大蜡螟实验进一步证实 MT 可减轻 *C. auris* 的侵袭损伤。【结论】MT 对 *C. auris* 具有显著的抗菌作用, 并能有效抑制其生物膜的形成, 为临床应对多重耐药 *C. auris* 感染提供了新型候选药物及潜在作用靶点。

**关键词:** 耳念珠菌; 苦参碱; 生物膜

资助项目: 国家自然科学基金(82374173, 81774034, 81573725)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82374173, 81774034, 81573725).

\*Corresponding author. E-mail: Ahtcm1c@163.com

Received: 2025-07-22; Accepted: 2025-08-21; Published online: 2025-08-27

# Inhibition mechanism of matrine against biofilm formation of *Candida auris*

WANG Longhai, WANG Yemei, WU Hui, WU Daqiang, WANG Tianming, WANG Changzhong, LI Can\*

School of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui, China

**Abstract:** *Candida auris*, as a multidrug-resistant fungus, pose a challenge to clinical treatment because of biofilm formation. Currently, effective intervention measures against its biofilm remain to be developed. **[Objective]** To explore the antifungal activity and biofilm inhibition mechanism of the Chinese medicine active compound matrine (MT) against *C. auris*. **[Methods]** The minimum inhibitory concentration (MIC), minimum fungicidal concentration (MFC), and sessile minimum inhibitory concentration (SMIC) of MT against *C. auris* were determined by the microdilution method. The time-growth curve and colony morphology of *C. auris* under the intervention of MT were observed by the plate method. The changes in the hydrolytic enzyme activity of the *C. auris* biofilm treated with MT were determined. The changes in cell surface hydrophobicity (CSH) of *C. auris* biofilm treated with MT were observed by the water-hydrocarbon two-phase method. The effects of MT on the metabolic activity and structure of *C. auris* biofilms were observed by the XTT method, crystal violet method, and confocal laser scanning microscopy (CLSM). The changes in the cell nucleus of *C. auris* in the biofilm treated with MT were detected by DAPI staining. The protective effect of MT on the host infected with *C. auris* was observed by the *Galleria mellonella* larvae infection model. **[Results]** The MIC of MT against *C. auris* was 128  $\mu\text{g/mL}$ , while the MFC and SMIC were both 512  $\mu\text{g/mL}$ . The inhibition mechanism of MT against the proliferation of *C. auris* mainly involved reducing the CSH, inhibiting the mature biofilm formation, significantly decreasing the metabolic activity, and inducing abnormal nuclear morphology. The experiments with *G. mellonella* larvae further confirmed that MT could alleviate the invasive damage caused by *C. auris*. **[Conclusion]** MT has a significant antifungal effect on *C. auris* and can effectively inhibit the biofilm formation, providing a new candidate drug and potential target for clinical treatment of multidrug-resistant *C. auris* infections.

**Keywords:** *Candida auris*; matrine; biofilm

致病性真菌引发的感染常与人类多种疾病紧密相关, 其感染范围涵盖皮肤黏膜感染至可危及生命的全身性感染, 全球受其影响的人数超过 10 亿<sup>[1]</sup>。侵袭性真菌感染, 尤其是由念珠菌属、隐球菌属、曲霉菌属以及肺孢子菌属等常见病原体引发的感染堪称“隐形杀手”, 死亡率

常超过 50%。每年此类感染导致约 250 万人死亡, 给全球公共卫生带来巨大威胁<sup>[2]</sup>。

耳念珠菌(*Candida auris*)于 2009 年在日本首次被发现<sup>[3]</sup>, 现已演变成一种广泛传播的多重耐药真菌, 能够引发医院内感染暴发, 其死亡率高且抗真菌耐药性持续攀升<sup>[4]</sup>, 因而被称为“超

级真菌”。在过去 10 年中, *C. auris* 感染已蔓延至全球 50 多个国家和地区, 并呈现出 6 个不同进化谱系的遗传多样性<sup>[5]</sup>。新型冠状病毒感染疫情的暴发也加速了 *C. auris* 的传播<sup>[6]</sup>。2019 年, 美国疾病控制与预防中心(Centers for Disease Control And Prevention, CDC)将其列入抗菌药物耐药性紧急威胁病原体清单。2022 年, 世界卫生组织(World Health Organization, WHO)首次发布威胁人类健康的“真菌重点病原体清单”, 将 *C. auris* 列入紧急优先组真菌病原体<sup>[7]</sup>。

目前, 临床上用于治疗侵袭性真菌感染的抗真菌药物仅有三大类, 即唑类、多烯类和棘白菌素类。然而, *C. auris* 对包括氟康唑、两性霉素 B 和卡泊芬净在内的几种常规抗真菌药物具有显著耐药性。这一情况凸显了这些药物存在的局限性, 包括毒性较高、药物相互作用明显以及药物成本增加等问题<sup>[8]</sup>。此外, *C. auris* 在抗真菌治疗后或其他特定条件下能迅速获得耐药性<sup>[1]</sup>。例如, 从接受卡泊芬净治疗的患者中分离出的菌株已被证实对棘白菌素类药物产生耐药性<sup>[1]</sup>。因此, 对于 *C. auris* 等多重耐药真菌的持续增多需保持警惕, 这进一步强调了探索新型药物及创新疗法以应对顽固真菌感染的重要性。

传统中药在抗真菌感染方面具有独特优势。苦参为豆科植物苦参(*Sophora flavescens* Aiton)的干燥根, 味苦, 性寒, 归心、肝、胃、大肠、膀胱经, 可清热燥湿、杀虫、利尿, 常用于治疗热痢、便血、黄疸尿闭、赤白带下、阴肿阴痒、湿疹、湿疮、皮肤瘙痒、疥癣麻风, 外治滴虫性阴道炎<sup>[9]</sup>。近年来, 苦参已广泛应用于制备治疗阴道炎等妇科疾病的多种临床药物, 如苦参软膏、妇必舒阴道泡腾片和康妇消炎栓等<sup>[9]</sup>。苦参碱(matrine, MT)是苦参中的主要成分, 具有抗菌、抗炎、抗病毒和抗肿瘤等活性。吴岚等<sup>[10]</sup>研究表明, MT 对体外白念珠菌(*Candida albicans*)生物膜具有抑制作用<sup>[10]</sup>, 可通过抑制 *C. albicans* 细胞膜的 CYP51 酶活性影响麦角固醇生物合成, 从而发挥抗真菌活性<sup>[11]</sup>,

在较高浓度下还可逆转 *C. albicans* 临床分离株对氟康唑的耐药性<sup>[12]</sup>。此外, 近期研究表明 MT 衍生物也可抑制 *C. albicans* 的生长<sup>[13-14]</sup>。

上述这些研究表明 MT 是一种有效的抗真菌药物, 在应对 *C. albicans* 感染方面具有潜在应用价值, 但其对 *C. auris* 的作用尚不明确。因此, 本研究评估 MT 作为抗真菌药物对新多重耐药 *C. auris* 的潜力, 重点探讨其通过抑制生物膜形成的机制, 以期为真菌感染性疾病的治疗方案选择提供重要依据, 具有一定的理论研究价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、动物与药物

耳念珠菌(*Candida auris*) C1、C2、C3、C4 菌株, 由复旦大学黄广华教授惠赠。

大蜡螟幼虫(0.2–0.3 g, 2–3 cm 长, 桂林家成昆虫养殖有限公司)存放于 4 °C 冰箱中。实验前, 将幼虫在室温下复苏 30 min, 剔除虫体发黑、带有褐色斑点以及用镊子触碰后无反应的幼虫。

苦参碱, CAS 519-02-8, HPLC≥98%; 氟康唑(fluconazole, FLZ), CAS 86386-73-4。苦参碱和氟康唑均购自上海源叶生物科技有限公司。

### 1.2 主要试剂和仪器

RPMI-1640 培养基, 赛默飞世尔科技公司; 磷酸盐缓冲液(PBS)、吐温-80、蛋白胨、琼脂、牛血清蛋白(BSA), 北京兰杰柯科技有限公司; 正辛烷, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; XTT 钠盐、甲萘醌、葡萄糖、硫酸镁、磷酸二氢钾、氯化钙、氯化钠, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 结晶紫染色液, 翌圣生物科技(上海)股份有限公司; 哥伦比亚 CNA 血琼脂平板, 广东环凯微生物科技有限公司; YPD 液体培养基、YPD 固体培养基、卵黄琼脂培养基基础、50% 卵黄乳液, 青岛海博生物技术有限公司。

万分之一天平, 常州万泰天平仪器有限公

司; 正置显微镜, 广州市明美光电技术有限公司; 高速离心机, 北京雷勃尔医疗器械有限公司; 医用洁净工作台, 上海博迅实业有限公司; 电热鼓风干燥箱, 合肥达斯卡特生物科技有限公司; 激光共聚焦显微镜, Leica 公司; 恒温水浴锅, 常州市江南实验仪器厂; 超纯水机, 厦门锐思捷水纯化技术有限公司。

### 1.3 菌株活化与培养

将 *C. auris* (C1、C2、C3 和 C4) 在 YPD 固体培养基上培养, 随后挑取单菌落转入 YPD 液体培养基中进行活化, 于 37 °C 下培养 12–14 h, 通过  $OD_{600}$  判断生长状态。以 825×g 离心 5 min 获得菌体沉淀, 并弃去上清液。接着加入 RPMI-1640 培养基, 将浓度分别调整为  $2 \times 10^3$ 、 $2 \times 10^6$  和  $7 \times 10^6$  CFU/mL<sup>[15]</sup>。

### 1.4 最小抑菌浓度

按照美国临床实验室标准化研究所的 CLSI M27 协议指南<sup>[16]</sup>, 采用微量稀释法在 96 孔板中测定 MT 对 4 种 *C. auris* (C1、C2、C3 和 C4) 的最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)。将菌液浓度调整至  $2 \times 10^3$  CFU/mL, 随后对药物进行连续 2 倍比稀释, 其中 MT 的浓度范围为 32–1 024  $\mu\text{g/mL}$ , FLZ 的浓度范围为 32–1 024  $\mu\text{g/mL}$ 。在每个孔中加入 100  $\mu\text{L}$  菌液和 100  $\mu\text{L}$  药物溶液, 将孔板置于 37 °C 下孵育 24 h。通过肉眼观察无菌生长情况来确定药物对 *C. auris* 的 MIC<sup>[15]</sup>。

### 1.5 最小杀菌浓度

对 4 种 *C. auris* (C1、C2、C3 和 C4) 菌株进行

最小杀菌浓度 (minimum fungicidal concentration, MFC) 测定。将菌液浓度调整至  $2 \times 10^3$  CFU/mL, 随后对药物进行连续 2 倍比稀释, MT 的浓度范围为 32–1 024  $\mu\text{g/mL}$ , FLZ 的浓度范围为 32–1 024  $\mu\text{g/mL}$ 。向每个孔中加入 100  $\mu\text{L}$  的菌液和 100  $\mu\text{L}$  的药物溶液, 于 37 °C 下孵育 24 h。孵育结束后, 从大于等于 MIC 值的各孔中取出 100  $\mu\text{L}$ , 转移至 YPD 固体培养基上并均匀涂抹。经过 24 h 孵育后, 观察平板上菌落的生长情况。如未出现任何菌落, 则记录该结果为 MFC<sup>[15]</sup>。

### 1.6 最小生物膜抑制浓度

采用 2,3-二-(2-甲氧基-4-硝基-5-磺苯基)-2H-四氮唑-5-甲酰苯胺 (2,3-di-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazole-5-anilinoyl, XTT) 检测法评估 MT 对 *C. auris* 生物膜的抑制能力。将菌液调整至  $2 \times 10^6$  CFU/mL, 药液通过连续 2 倍比稀释法进行配制, MT 的最终浓度范围为 32–1 024  $\mu\text{g/mL}$ 。在每个孔中加入 100  $\mu\text{L}$  菌液和 100  $\mu\text{L}$  药液, 于 37 °C 下孵育 24 h。孵育结束后弃上清并用 PBS 洗去浮游菌体, 再向每个孔中添加 50  $\mu\text{L}$  的 XTT 和甲萘醌, 在避光条件下继续孵育 2 h。使用酶标仪在 492 nm 处测定每个孔的吸光值<sup>[15]</sup>。与无药物对照组相比, 以  $OD_{492}$  值降低最显著的药物浓度为 SMIC<sup>[17]</sup>。后续实验具体分组见表 1。

### 1.7 斑点实验

将 *C. auris* 以  $2 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^4$ 、 $2 \times 10^3$  和  $2 \times 10^2$  CFU/mL 的浓度与不同浓度的 MT 或 FLZ 混合, 使各组混合液的终浓度分别为: 128、

表1 实验分组及干预方法

Table 1 Experimental groups and intervention methods

Experimental groups	Intervention methods
Group A: Control	<i>C. auris</i> +culture medium
Group B: 128 $\mu\text{g/mL}$ MT	<i>C. auris</i> +256 $\mu\text{g/mL}$ MT (fungal suspension:drug solution=1:1)
Group C: 256 $\mu\text{g/mL}$ MT	<i>C. auris</i> +512 $\mu\text{g/mL}$ MT (fungal suspension:drug solution=1:1)
Group D: 512 $\mu\text{g/mL}$ MT	<i>C. auris</i> +1 024 $\mu\text{g/mL}$ MT (fungal suspension:drug solution=1:1)
Group E: 32 $\mu\text{g/mL}$ FLZ	<i>C. auris</i> +64 $\mu\text{g/mL}$ FLZ (fungal suspension:drug solution=1:1)

256 和 512  $\mu\text{g/mL}$  MT, 以及 32  $\mu\text{g/mL}$  FLZ。取各组混合液 5  $\mu\text{L}$  点样于 YPD 琼脂平板上, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  下培养 24 h 后观察菌落生长差异<sup>[15]</sup>。

## 1.8 时间生长曲线

将 *C. auris* 的浓度调整至  $2 \times 10^6$  CFU/mL, 具体分组如表 1 所示。在 37  $^{\circ}\text{C}$  下培养, 分别于 0、6、12、18 和 24 h 取样, 以 825 $\times$ g 离心 5 min 收集菌体, 用 PBS 稀释并涂布在 YPD 琼脂平板上, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  下培养 48 h 后计数菌落数目<sup>[15]</sup>。

## 1.9 细胞表面疏水性实验

采用水-烃两相法测定 *C. auris* 的细胞表面疏水性 (cell surface hydrophobicity, CSH)。将 *C. auris* 的浓度调整至  $2 \times 10^6$  CFU/mL, 具体分组如表 1 所示, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  下培养 24 h 后移除上清液, 并使用 PBS 对孔板底部进行反复吹打以收集生物膜中的菌体, 以 825 $\times$ g 离心 5 min, 去除上清液, 再用 PBS 重悬菌体。从每组中收集 1.2 mL 菌液, 并加入 0.3 mL 正辛烷, 振荡后让悬液静置约 15 min 以分离两相。收集下层液体相, 检测  $OD_{600}$  值。以各组不加正辛烷的菌液  $OD_{600}$  值作为空白对照, 并计算 CSH, 如公式(1)所示。

$$\text{CSH} = (\text{OD}_{600\text{对照}} - \text{OD}_{600\text{实验}}) / \text{OD}_{600\text{对照}}^{[15]} \quad (1)$$

## 1.10 水解酶活性实验

### 1.10.1 蛋白酶

制备含有 0.05% 硫酸镁、2% 葡萄糖、0.1% 磷酸二氢钾、1% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 和 2% 琼脂的 BSA 培养基。将 *C. auris* 的浓度调整至  $2 \times 10^6$  CFU/mL, 具体分组如表 1 所示, 将 10  $\mu\text{L}$  菌液滴至 BSA 培养基表面, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  下培养 3–4 d。根据沉淀圈 (zone of precipitation, PZ) 值分析 MT 对 *C. auris* 蛋白酶活性的影响, 其中 PZ 值的计算方法为菌落直径除以沉淀圈直径与菌落直径之和<sup>[15]</sup>。当 PZ 值为 1.0 时表示无蛋白酶活性, 此时未观察到菌落周围存在沉淀圈; 而当 PZ 值小于 1.0 时则表明菌落周围出现沉淀圈, 且沉淀圈越大 *C. auris* 的蛋

白酶活性越高。

### 1.10.2 磷脂酶

制备含 10% 无菌蛋液的卵黄琼脂培养基。将 *C. auris* 的浓度调整至  $2 \times 10^6$  CFU/mL, 具体分组如表 1 所示, 将 10  $\mu\text{L}$  菌液滴至卵黄琼脂培养基表面, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  下培养 2–4 d<sup>[15]</sup>。根据 PZ 值评估 MT 对磷脂酶分泌的影响, PZ 值的计算采用 1.10.1 节的方法。

### 1.10.3 酯酶

制备含 1% 蛋白胨、0.055% 氯化钙、5% 氯化钠、1.5% 琼脂和 0.5% 吐温-80 的脂酶培养基。将 *C. auris* 的浓度调整至  $2 \times 10^6$  CFU/mL, 具体分组如表 1 所示, 将 10  $\mu\text{L}$  菌液滴至脂酶培养基表面, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  下培养 3–4 d<sup>[15]</sup>。根据 PZ 值评估 MT 对酯酶分泌的影响, PZ 值的计算采用 1.10.1 节的方法。

### 1.10.4 溶血素

将 *C. auris* 的浓度调整至  $2 \times 10^6$  CFU/mL, 具体分组如表 1 所示, 将 10  $\mu\text{L}$  菌液滴至哥伦比亚 CNA 血琼脂平板表面, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  下培养 3–4 d。通过溶血活性区 (zone of hemolytic activity, HZ) 值分析 MT 对溶血素分泌的影响, 其中 HZ 值的计算方法为菌落直径除以溶血活性区直径与菌落直径之和<sup>[15]</sup>。HZ 值为 1.0 表示无溶血活性, 此时未观察到菌落周围存在溶血活性区; 而 HZ 值小于 1.0 则表明菌落周围存在溶血活性区。HZ 值越小表明溶血活性区越大, 这意味着 *C. auris* 分泌溶血素的活性越强。

## 1.11 代谢活力实验

采用 XTT 法检测 *C. auris* 的代谢活力。具体步骤如 1.6 节所述。

## 1.12 结晶紫实验

将 *C. auris* 的浓度调整至  $2 \times 10^6$  CFU/mL, 具体分组如表 1 所示, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 24 h 后, 用 PBS 冲洗 1 次, 接着用结晶紫染色液染色 45 min, 再用 PBS 冲洗 2–3 次, 最后使用酶标仪测量  $OD_{560}$  值<sup>[15]</sup>。

### 1.13 生物膜形成实验

将 *C. auris* 的浓度调整至  $2 \times 10^6$  CFU/mL, 具体分组如表 1 所示, 将各组菌液加入共聚焦小皿中, 在 37 °C 下孵育 24 h 后, 用 PBS 冲洗 1–2 次<sup>[18]</sup>。通过 DMi8 显微镜观察生物膜状态。

### 1.14 核固缩实验

将 *C. auris* 的浓度调整至  $2 \times 10^6$  CFU/mL, 具体分组如表 1 所示。孵育结束后用 PBS 清洗 2–3 次, 然后在室温避光的条件下用浓度为 10  $\mu$ g/mL 的 DAPI 染色 10 min<sup>[18]</sup>。通过 DMi8 显微镜观察荧光, 随后利用 ImageJ 软件对拍摄的图像进行平均荧光强度的分析与量化。

### 1.15 大蜡螟幼虫感染模型

每组随机选取 10 只幼虫, 向右后侧腹足注入 10  $\mu$ L 浓度为  $7 \times 10^6$  CFU/mL 的 *C. auris*, 2 h 后向左后侧腹足分别注射 10  $\mu$ L PBS、MT (128、256 和 512  $\mu$ g/mL) 和 FLZ (32  $\mu$ g/mL)。处理后的幼虫在 37 °C 黑暗环境中培养 5 d, 每天记录死亡数量<sup>[15]</sup>。

### 1.16 统计学分析

用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析, 并以 GraphPad Prism 9.5 软件作图。所有实验均独立重复 3 次, 数值变量资料以平均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示, 多组数值变量间的差异比较分析采用单因素方差分析, 再使用 LSD 法或 Games-Howell 法进行多重比较分析, 以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 MT 对 *C. auris* 的 MIC 和 MFC

通过测定 4 种 *C. auris* 菌株 (C1、C2、C3 和 C4) 的 MIC 和 MFC, 评估 MT 对 *C. auris* 的抑制及杀菌效果。结果显示, 所有菌株的 MIC 值范围为 128–512  $\mu$ g/mL, MFC 值为 512–1 024  $\mu$ g/mL 左右 (表 2)。这表明 MT 对所有测试菌株均具有一定的生长抑制和杀灭活性, 因此选择 MIC 值最低的 *C. auris* C1 进行后续生物膜实验。

表2 MT和FLZ对*Candida auris*的MIC和MFC

Table 2 MIC and MFC of MT and FLZ against *Candida auris*

Strain	MT		FLZ	
	MIC ( $\mu$ g/mL)	MFC ( $\mu$ g/mL)	MIC ( $\mu$ g/mL)	MFC ( $\mu$ g/mL)
C1	128	512	>1 024	>1 024
C2	256	1 024	>1 024	>1 024
C3	512	>1 024	>1 024	>1 024
C4	256	1 024	>1 024	>1 024

### 2.2 MT 对 *C. auris* 菌落生长形态的影响

采用斑点试验检测不同浓度 MT 对 *C. auris* 菌落生长的影响。研究表明, 当浓度为  $2 \times 10^5$  CFU/mL 和  $2 \times 10^4$  CFU/mL 时 *C. auris* 菌落生长无明显差异。随着稀释倍数增加, 与对照组相比 MT 组 *C. auris* 菌落生长随药物浓度升高而受到抑制, 而 FLZ 组的菌落生长情况则无明显变化 (图 1)。

### 2.3 MT 对 *C. auris* 生长的抑制作用

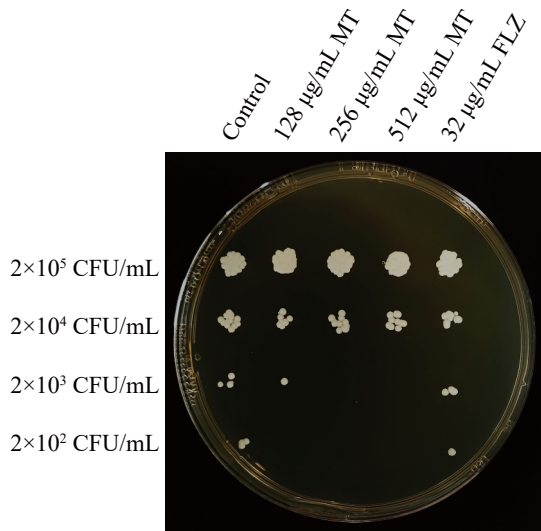
本研究探讨了 MT 在不同时间段对 *C. auris* 的生长抑制效果。结果显示, 256  $\mu$ g/mL 和 512  $\mu$ g/mL 的 MT 对 *C. auris* 生长具有显著抑制作用, 且表现出一定程度的药物浓度依赖性, 而 FLZ 组与对照组相比无显著差异 (图 2)。

### 2.4 MT 对 *C. auris* 细胞表面疏水性的影响

CSH 与菌株的黏附和生物膜形成能力密切相关。研究表明, MT 组中 CSH 显著降低, 且在 512  $\mu$ g/mL 组中效果最为明显, 而 FLZ 组中未观察到此现象 (图 3)。

### 2.5 MT 对 *C. auris* 水解酶活性的影响

本研究检测了 *C. auris* 的水解酶活性。结果表明, 该菌株未表现出蛋白酶或溶血素活性, 磷脂酶活性和酯酶活性则相对较强。*C. auris* 的磷脂酶活性在 MT 浓度为 512  $\mu$ g/mL 时受到显著抑制, 而 FLZ 组与对照组相比无显著差异。同样地, *C. auris* 的酯酶活性仅在 MT 浓度为



**图1** MT对*Candida auris*菌落生长形态的影响。将*C. auris*浓度调整为 $2 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^4$ 、 $2 \times 10^3$ 和 $2 \times 10^2$  CFU/mL，分别与MT或FLZ混合，MT组终浓度为128、256和512  $\mu\text{g/mL}$ ，FLZ组终浓度为32  $\mu\text{g/mL}$ ；取各组混合液5  $\mu\text{L}$ ，点样于YPD琼脂平板上，并在37  $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h。

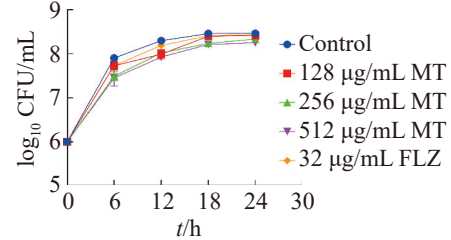
Figure 1 The impact of MT on the colony growth morphology of *Candida auris*. The concentration of *C. auris* was set to  $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^3$ , and  $2 \times 10^2$  CFU/mL, and mixed with MT or FLZ, respectively; The final concentrations were 128, 256, and 512  $\mu\text{g/mL}$  for MT groups, and 32  $\mu\text{g/mL}$  for FLZ group; 5  $\mu\text{L}$  of each group's mixture was spotted onto YPD agar plates and incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 24 h.

512  $\mu\text{g/mL}$  时受到抑制，FLZ组与对照组相比也无显著差异(图4)。

## 2.6 MT对*C. auris*代谢活力的影响及MT对*C. auris*的SMIC

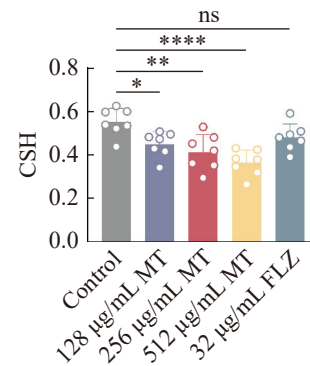
采用XTT法测定*C. auris*的代谢活力及SMIC。研究发现，MT组中随着药物浓度升高，与对照组相比*C. auris*的代谢活力显著降低，在512  $\mu\text{g/mL}$ 浓度下其代谢活力达到最低，MT对*C. auris*的SMIC也为512  $\mu\text{g/mL}$ ；相反，FLZ组的代谢活力与对照组相比无显著差异(图5)。

128 $\mu\text{g/mL}$ MT	ns	ns	ns	ns
256 $\mu\text{g/mL}$ MT	*	*	*	*
512 $\mu\text{g/mL}$ MT	ns	**	**	**
32 $\mu\text{g/mL}$ FLZ	ns	ns	ns	ns



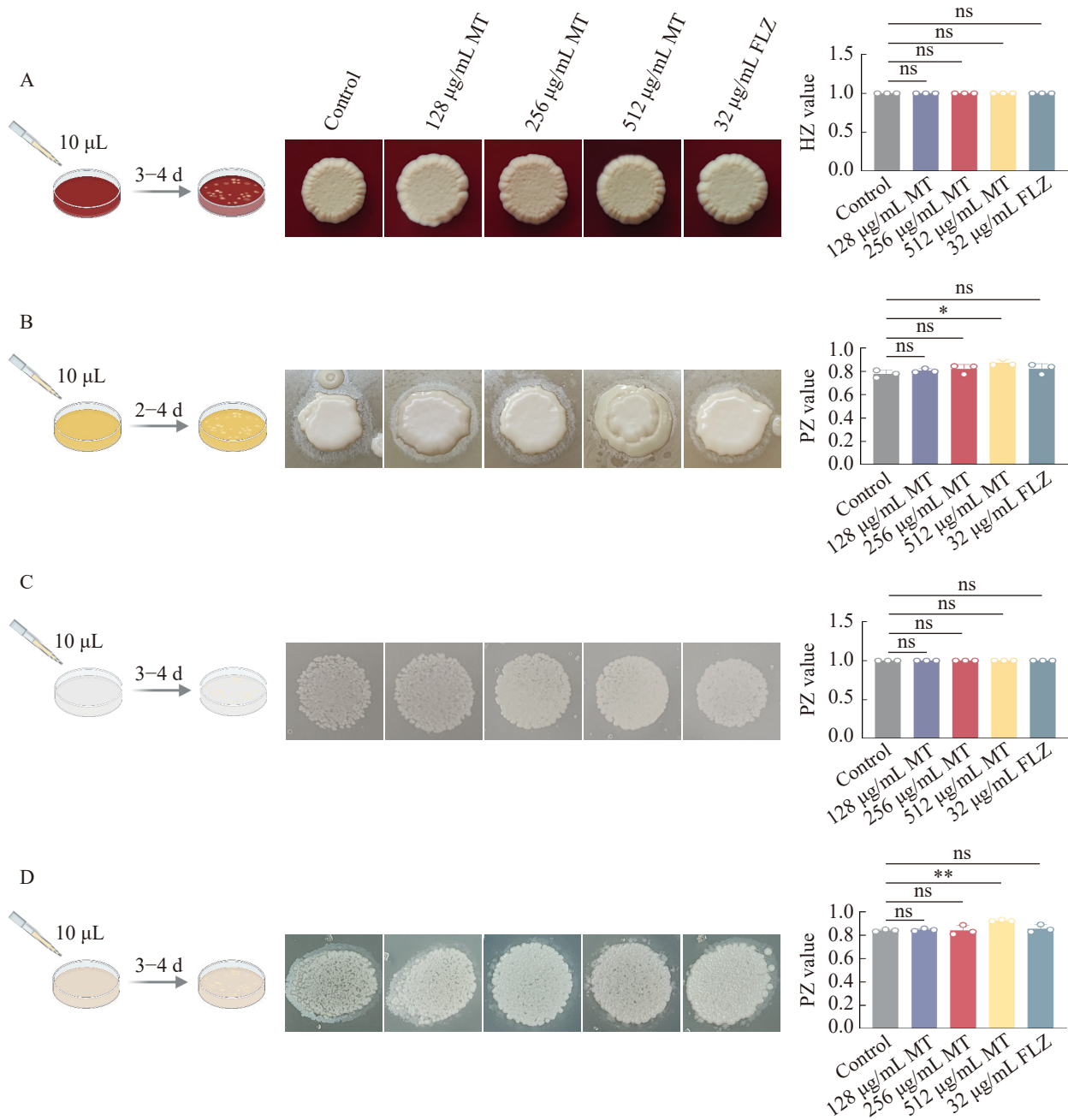
**图2** MT对*Candida auris*生长的抑制作用( $n=3$ )。将*C. auris*浓度调整至 $2 \times 10^6$  CFU/mL，分组见表1。在37  $^{\circ}\text{C}$ 下，于第0、6、12、18和24 h通过平板法计数菌落。

Figure 2 The inhibitory effect of MT on the growth of *Candida auris* ( $n=3$ ). The concentration of *C. auris* was adjusted to  $2 \times 10^6$  CFU/mL, and the grouping is shown in Table 1. At 37  $^{\circ}\text{C}$ , the colony counts were determined by the plate method at 0, 6, 12, 18 and 24 h. ns: Not significant; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .



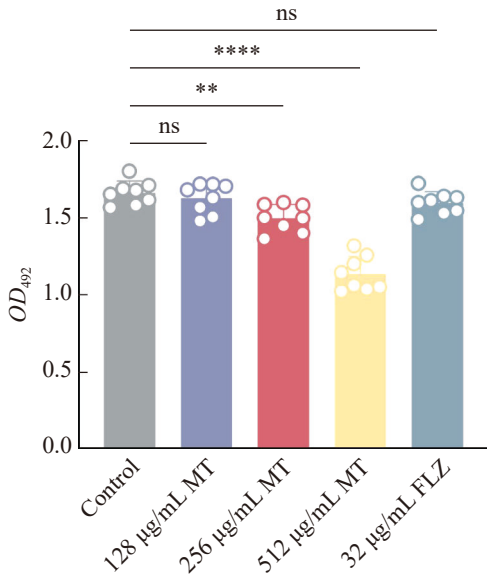
**图3** MT对*Candida auris* CSH的影响( $n=7$ )。将*C. auris*的浓度调整至 $2 \times 10^6$  CFU/mL，分组见表1。于37  $^{\circ}\text{C}$ 下培养24 h后，采用水-烃两相法测量 $OD_{600}$ 值并计算CSH。

Figure 3 The impact of MT on the *Candida auris* CSH ( $n=7$ ). The concentration of *C. auris* was set to  $2 \times 10^6$  CFU/mL, as shown in Table 1. After culturing for 24 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ , the  $OD_{600}$  value was measured using the water-hydrocarbon two-phase method, and the CSH was calculated. ns: Not significant; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .



**图4** MT对*Candida auris*水解酶活性的影响( $n=3$ )。将*C. auris*的浓度调整至 $2 \times 10^6$  CFU/mL, 分组见表1。将10  $\mu$ L混合液滴于各培养基表面, 于37  $^{\circ}$ C培养2-4 d, 通过沉淀圈和菌落直径判断水解酶活性。A: 溶血素; B: 磷脂酶; C: 蛋白酶; D: 酯酶。

Figure 4 The impact of MT on the hydrolase activity in *Candida auris* ( $n=3$ ). The concentration of *C. auris* was adjusted to  $2 \times 10^6$  CFU/mL, and the grouping is shown in Table 1. 10  $\mu$ L of the mixed solution was dropped onto the surface of the culture medium, and it was cultured at 37  $^{\circ}$ C for 2-4 days. The activity of the hydrolase was judged by the precipitation circle and the diameter of the colony. A: Hemolysin; B: Phospholipase; C: Protease; D: Esterase. ns: Not significant; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .



**图5** MT对*Candida auris*代谢活力的影响( $n=8$ )。将*C. auris*的浓度调整至 $2 \times 10^6$  CFU/mL, 分组见表1。于37 °C下培养24 h后, 通过XXT法检测 $OD_{492}$ 值并判断*C. auris*代谢活力的变化。

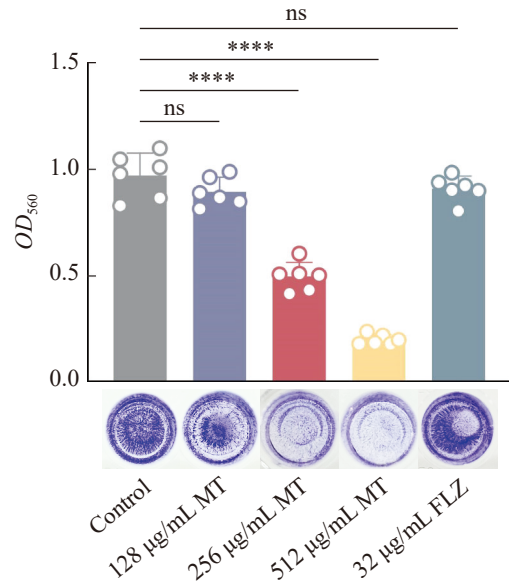
Figure 5 The impact of MT on the metabolic activity of *Candida auris* ( $n=8$ ). The concentration of *C. auris* was set to  $2 \times 10^6$  CFU/mL, with groupings shown in Table 1. After culturing for 24 h at 37 °C, the  $OD_{492}$  value was measured using the XXT method to assess changes in the metabolic activity of *C. auris*. ns: Not significant; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

## 2.7 MT对*C. auris*生物膜生物量的影响

采用结晶紫染色法检测*C. auris*生物膜生物量。结晶紫染色显示,*C. auris*生物膜以96孔板底部紫色残留物的形式存在。对照组和FLZ处理组在孔板底部均呈现完整的结晶紫染色,表明*C. auris*生物膜生长旺盛。相反,MT组中结晶紫染色减少,且呈浓度依赖性。使用酶标仪在560 nm处测量的吸光度值,也进一步证实了MT对*C. auris*生物膜生长及其生物量的抑制作用(图6)。

## 2.8 MT对*C. auris*生物膜结构的影响

本研究使用CLSM观察MT干预下*C. auris*



**图6** MT对*Candida auris*生物膜生物量的影响( $n=6$ )。将*C. auris*的浓度调整至 $2 \times 10^6$  CFU/mL, 分组见表1。于37 °C下培养24 h后, 通过结晶紫法检测 $OD_{560}$ 值, 观察*C. auris*生物膜生物量的变化。

Figure 6 The effect of MT on the biomass of *Candida auris* biofilms ( $n=6$ ). The concentration of *C. auris* was set to  $2 \times 10^6$  CFU/mL, with groupings shown in Table 1. After culturing for 24 h at 37 °C, the  $OD_{560}$  value was measured using the crystal violet method to observe changes in the biomass of *C. auris* biofilm. ns: Not significant; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

的生物膜结构。结果显示,对照组及FLZ组的生物膜结构完整,细胞状态良好且生长旺盛。然而在MT组中生物膜完整性降低,细胞数量也有所下降,这表明生物膜结构遭到一定程度的破坏(图7)。

## 2.9 MT对*C. auris*细胞核的影响

与对照组及FLZ组的正常细胞核相比,经不同浓度MT干预的*C. auris*细胞核显示出明显的蓝色荧光,且浓缩程度显著增加。这表明MT能够有效诱导*C. auris*细胞核浓缩(图8)。

## 2.10 MT对*C. auris*侵袭力的影响

本研究通过评估大蜡螟感染模型的存活率

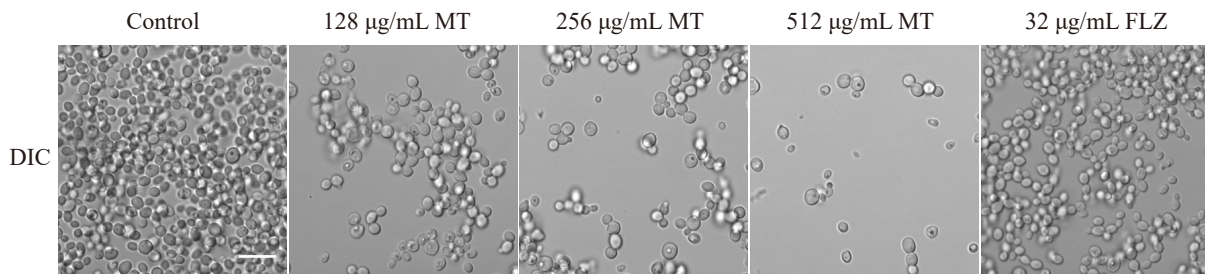


图7 MT对*Candida auris*生物膜结构的影响(比例尺=20 µm)。将*C. auris*的浓度调整至 $2 \times 10^6$  CFU/mL, 分组见表1。于37 °C下培养24 h后, 通过DIC观察*C. auris*生物膜结构的变化。

Figure 7 The influence of MT on the biofilm structure of *Candida auris* (scale=20 µm). The concentration of *C. auris* was set to  $2 \times 10^6$  CFU/mL, as shown in Table 1. After culturing at 37 °C for 24 h, changes in the structure of the *C. auris* biofilm were observed using DIC.

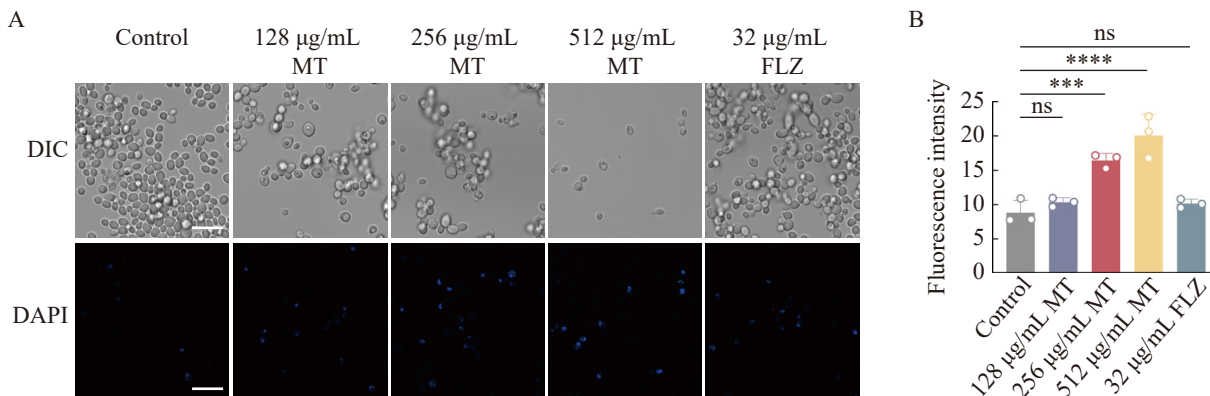


图8 MT对*Candida auris*细胞核的影响( $n=3$ ) (比例尺=20 µm)。将*C. auris*的浓度调整至 $2 \times 10^6$  CFU/mL, 分组见表1。于37 °C下培养24 h后, 通过荧光显微镜观察*C. auris*细胞核荧光强度的变化。A: DIC和DAPI荧光图; B: 平均荧光强度量化。

Figure 8 The effect of MT on nucleus of *Candida auris* ( $n=3$ ) (scale=20 µm). The concentration of *C. auris* was set to  $2 \times 10^6$  CFU/mL, as shown in Table 1. After culturing at 37 °C for 24 h, changes in the fluorescence intensity of the *C. auris* cell nucleus were observed using a fluorescence microscope. A: DIC and DAPI fluorescence image; B: Average fluorescence intensity quantification. ns: Not significant; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

探讨了 MT 对 *C. auris* 侵袭力的影响。结果表明, 到第 5 天结束时对照组中所有感染 *C. auris* 的幼虫均已死亡。在 MT 浓度分别为 128 µg/mL 和 256 µg/mL 时幼虫的存活率分别为 20% 和 30%, FLZ 组幼虫的存活率仅为 10%。512 µg/mL MT 则将幼虫的存活率提高到 50%, 这表明 MT 可抑制 *C. auris* 侵袭力, 从而对机体产生一定程度的保护作用(图 9)。

### 3 讨论与结论

近年来, 非白念珠菌感染的发生率呈逐年上升趋势<sup>[19]</sup>。其中, *C. auris* 作为一种新出现的念珠菌引起了广泛关注。*C. auris* 是首个已知对现有抗真菌药物类别(包括唑类、两性霉素 B 和棘白菌素类)在某些情况下表现出难以治疗的耐药性的真菌病原体<sup>[19]</sup>。在过去 10 年中, 该病原体在全球范围内迅速传播, 并引发多起医院内暴发感



染事件,对人类健康构成重大威胁。因此,为克服现有抗真菌药物效果有限、毒性较高及耐药性问题,研发新型抗真菌药物显得尤为重要。

*C. auris* 最显著的特征是其耐药性或多重耐药性,这使治疗过程面临失败风险,也给控制其传播带来挑战<sup>[20]</sup>。2019年,CDC在抗生素耐药性威胁报告中将病原微生物分为4个威胁等级:紧急威胁、严重威胁、可控威胁和观察名单威胁。*C. auris* 被列为紧急威胁,这更凸显了研究其耐药性及机制的重要性。CDC通过监测过去10年中常用抗真菌药物的MIC数据,发现90%的*C. auris* 菌株对FLZ表现出高度耐药性,其耐药折点为MIC $\geq$ 32  $\mu$ g/mL,30%的菌株对多烯类药物两性霉素B耐药,耐药折点为MIC $\geq$ 2  $\mu$ g/mL,少数菌株(<5%)对棘白菌素类药物卡泊芬净耐药,耐药折点为MIC $\geq$ 2  $\mu$ g/mL<sup>[21]</sup>。在本研究中,MT对所有测定的*C. auris* 的MIC值在128–512  $\mu$ g/mL之间,MFC在512–1 024  $\mu$ g/mL左右,且对*C. auris* 生长抑制呈现出一定效果。鉴于目前使用的抗真菌药物存在诸多弊端,MT在治疗*C. auris* 感染方面展现出良好的应用前景。

*C. auris* 的耐药性与其生物膜密切相关。生物膜是指在非生物或生物表面形成的具有结构特征的微生物群落,这些群落嵌入于细胞外基质中,其主要成分包括糖蛋白、碳水化合物和多糖等<sup>[22–23]</sup>。*C. auris* 形成的生物膜不仅依赖于酵母相细胞的积累,还包含一定量的细胞外基质<sup>[24]</sup>,最终构建出紧密的群落结构,使*C. auris* 能够在环境表面长期存活,并有效躲避宿主免疫系统。因此,本研究重点探讨了MT对*C. auris* 生物膜形成的作用机制。

细胞表面特性在生存和致病性中发挥着至关重要的作用,其中包括CSH和黏附力<sup>[25]</sup>。CSH决定细胞之间的相互作用,从而影响菌体的黏附与定殖,最终导致生物膜的形成<sup>[25]</sup>。研究表明CSH与黏附性呈正相关,即CSH增加时黏附性也随之增强<sup>[25]</sup>。此外,其形成生物膜的能力也随之提升。结果显示,MT可降低*C. auris* 的

CSH,但FLZ未展现出任何效果,这表明MT能够通过降低*C. auris* 的CSH减少*C. auris* 的黏附能力,进而导致其生物膜形成能力下降。

研究表明,生物膜的细胞外基质中已鉴定出500多种蛋白质,其中大多数是酶类<sup>[26]</sup>。生物膜状态下的念珠菌能够分泌多种水解酶,包括蛋白酶、磷脂酶、酯酶和溶血素,这些酶在其致病机制中发挥着重要作用<sup>[24,27–28]</sup>。这些水解酶不仅有助于念珠菌附着于宿主组织,还能破坏宿主细胞膜。磷脂酶以细胞膜中的磷脂为靶点,酯酶则负责降解其中的酯键。溶血素通过分解血红蛋白获取铁元素,从而增强其致病性。这些水解酶使念珠菌能够有效侵入机体的黏膜和血管,同时逃避宿主免疫系统的监测。

已有研究表明,不同菌株表现出不同的水解酶活性。Larkin等<sup>[24]</sup>研究显示,测试菌株均显示出蛋白酶活性,但只有部分菌株展现磷脂酶活性和溶血素活性。Shaban等<sup>[29]</sup>研究表明,测试菌株具有蛋白酶活性,但未检测到磷脂酶活性。本研究表明,所测试的菌株均未表现出蛋白酶或溶血素活性。然而,它们显示出一定程度的磷脂酶和酯酶活性。其中,MT对磷脂酶和酯酶的活性具有较弱抑制作用,而FLZ则未表现出任何抑制效果。Oyardi等<sup>[28]</sup>多项研究观察到不同来源的*C. auris* 毒力特征存在显著差异,认为这可归因于来自不同地理谱系的分离株所具备的独特性质。

形成生物膜的*C. auris* 对抗真菌药物的抵抗能力显著高于处于浮游状态的*C. auris*。Oyardi等<sup>[28]</sup>研究发现,针对生物膜的最小生物膜清除浓度(MBEC)明显高于针对浮游细胞的MIC。本研究也表明,*C. auris* 的SMIC值(512  $\mu$ g/mL)也高于MIC值(128  $\mu$ g/mL)。通过XTT法和结晶紫法测定观察到MT可有效抑制*C. auris* 生物膜的代谢活性和生物量,而FLZ则未表现出抑制作用。此外,CLSM的图像显示*C. auris* 生物膜中的细胞密集排列且呈椭圆形结构。MT可使*C. auris* 生物膜在其生物量和细胞密度方面呈现出浓度依赖性的降低,而FLZ对其生物膜形成并未产生明

显抑制作用。

本研究还探讨了 MT 是否能够诱导生物膜状态下的 *C. auris* 发生凋亡。核固缩(染色质浓缩)和核碎裂是细胞凋亡的标志之一<sup>[30]</sup>。结果显示, 在 256  $\mu\text{g/mL}$  和 512  $\mu\text{g/mL}$  MT 浓度下, *C. auris* 表现出明显的核收缩和碎裂现象; 相比之下, FLZ 对 *C. auris* 几乎无影响, 这表明 MT 可能引起 *C. auris* 的凋亡。

*C. auris* 具有显著的定殖能力, 能够在人体、医疗设备及医疗环境中有效定殖并形成生物膜, 从而实现高效传播<sup>[31]</sup>。这种特性常导致 *C. auris* 的交叉感染, 并可能引发侵袭性感染, 尤其是在重症监护病房患者中血液感染的风险更为显著<sup>[32]</sup>。本研究的大蜡螟幼虫感染模型显示, MT 能够抑制 *C. auris* 对宿主生物体的侵袭能力, 而 FLZ 则未表现出类似的效果。

总之, 本研究表明 MT 可作为一种新型的抗真菌及抗生物膜药物, 并通过一系列体外实验分析证实了 MT 对多重耐药 *C. auris* 的抑制作用。然而, 仍需进一步研究以阐明 MT 对 *C. auris* 的深层作用机制, 并评估其在制药行业中的潜在临床应用。

## 作者贡献声明

王龙海: 数据收集和处理; 王业梅: 提供技术支持; 吴惠: 协助实验操作; 吴大强: 参与论文讨论; 汪天明: 数据分析; 汪长中: 研究构思和设计; 李璨: 论文撰写和修改。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

[1] ZHANG YP, ZENG LB, HUANG XH, WANG YY, CHEN GS, MOSES M, ZOU Y, XIONG SC, XUE WW, DONG YM, TIAN YR, GUAN M, HU LF, YIN Z, ZHOU DS, HUANG XT, CHEN CB. Targeting epigenetic regulators to overcome drug resistance in the emerging human fungal pathogen *Candida auris*[J].

Nature Communications, 2025, 16: 4668.

- [2] ILIEV ID, BROWN GD, BACHER P, GAFFEN SL, HEITMAN J, KLEIN BS, LIONAKIS MS. Focus on fungi[J]. Cell, 2024, 187(19): 5121-5127.
- [3] SATOH K, MAKIMURA K, HASUMI Y, NISHIYAMA Y, UCHIDA K, YAMAGUCHI H. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital[J]. Microbiology and Immunology, 2009, 53(1): 41-44.
- [4] AHMAD S, KHAN Z, AL-SWEIH N, ALFOUZAN W, JOSEPH L. *Candida auris* in various hospitals across Kuwait and their susceptibility and molecular basis of resistance to antifungal drugs[J]. Mycoses, 2020, 63(1): 104-112.
- [5] KHAN T, FAYSAL NI, HOSSAIN MM, MAH-E-MUNEER S, HAIDER A, MOON SB, SEN D, AHMED D, PARNELL LA, JUBAIR M, CHOW NA, CHOWDHURY F, RAHMAN M. Emergence of the novel sixth *Candida auris* clade VI in Bangladesh[J]. Microbiology Spectrum, 2024, 12(7): e0354023.
- [6] BEN ABID F, SALAH H, SUNDARARAJU S, DALIL L, ABDELWAHAB AH, SALAMEH S, IBRAHIM EB, ALMASLMANI MA, TANG P, PEREZ-LOPEZ A, TSUI CKM. Molecular characterization of *Candida auris* outbreak isolates in Qatar from patients with COVID-19 reveals the emergence of isolates resistant to three classes of antifungal drugs[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2023, 29(8): 1083.e1-1081083.e7.
- [7] 全国医疗机构感染监测网, 中华预防医学会医院感染控制分会, 全国医院感染监控管理培训基地, 黄勋, 孙树梅, 刘思娣. 耳念珠菌医院感染预防与控制专家共识[J]. 中华医学杂志, 2025, 105(23): 1907-1917. National Medical Institution Infection Surveillance System of China, Healthcare-associated Infection Control Branch of Chinese Preventive Medicine Association, National Training Center of Hospital Infection in China, HUANG X, SUN SM, LIU SD. Consensus of experts on healthcare-associated infection prevention and control of *Candida auris*[J]. National Medical Journal of China, 2025, 105(23): 1907-1917 (in Chinese).
- [8] VELEZ N, ARGEL A, KISSMANN A, ALPÍZAR-PEDRAZA D, ESCANDON P, ROSENAU F, STAENDKER L, FIRACATIVE C. Pore-forming peptide C14R exhibits potent antifungal activity against clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida auris*[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2024, 14: 1389020.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部 2020 年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020. National Medical Products Administration Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Volume II[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020 (in Chinese).
- [10] 吴岚, 周曾同, 周永梅, 王海燕, 施琳俊. 苦参碱对白色念珠菌生物膜的体外抑制作用[J]. 上海口腔医学, 2009, 18(4): 415-418. WU L, ZHOU ZT, ZHOU YM, WANG HY, SHI LJ. *In vitro* activity of matrine against *Candida albicans*

- biofilms[J]. Shanghai Journal of Stomatology, 2009, 18(4): 415-418 (in Chinese).
- [11] 李治建, 周凡, 窦勤, 曹春雨, 斯拉甫·艾白. 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.  
LI ZJ, ZHOU F, DOU Q, CAO CY, Silafu-Aibai. Antifungal activity of matrine *in vitro* and its effect on membrane biosynthesis in *Candida albicans*[J]. Xinjiang Medical Journal, 2018, 48(6): 603-606 (in Chinese).
- [12] SHAO J, WANG T, YAN Y, SHI G, CHENG H, WU D, WANG C. Matrine reduces yeast-to-hypha transition and resistance of a fluconazole-resistant strain of *Candida albicans*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2014, 117(3): 618-626.
- [13] 胡心语, 龚频, 方文静, 柯瀛瀛, 龙辉, 吴先容, 谢建武. 苦参碱衍生物体外抑制白色念珠菌生长及其作用机制[J]. 陕西科技大学学报, 2025, 43(3): 87-94.  
HU XY, GONG P, FANG WJ, KE YY, LONG H, WU XR, XIE JW. Inhibition of the growth of *Candida albicans in vitro* by matrine derivatives and its mechanism of action[J]. Journal of Shaanxi University of Science & Technology, 2025, 43(3): 87-94 (in Chinese).
- [14] YAN SZ, KOWAH JAH, LONG QF, LIU Q, ZHANG HQ, LU SY, WANG LS, YU HX. Design, synthesis and antifungal activity of novel matrine-hydroxamic acid derivatives containing benzene sulfonamide[J]. RSC Advances, 2025, 15(21): 16510-16524.
- [15] LI C, WANG J, LI H, WANG YM, WU H, WEI WF, WU DQ, SHAO J, WANG TM, WANG CZ. Suppressing the virulence factors of *Candida auris* with baicalein through multifaceted mechanisms[J]. Archives of Microbiology, 2024, 206(8): 349.
- [16] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 4th ed. CLSI standard M27[M]. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.
- [17] 潘敏. 丹皮酚联合氟康唑/两性霉素B对白念珠菌毒力因子及口咽念珠菌病小鼠中HIF-1 $\alpha$ 相关的IL-17信号通路的影响[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2022.  
PAN M. Effect of paeonol combined with fluconazole/amphotericin B on virulence factors of *Candida albicans* and HIF-1 $\alpha$  related IL-17 signaling in oropharyngeal candidiasis mice[D]. Hefei: Anhui university of Chinese medicine, 2022 (in Chinese).
- [18] LI C, WANG J, WU H, ZANG L, QIU W, WEI WF, WANG TM, WANG CZ. Baicalein induces apoptosis by targeting ribosomes in *Candida auris*[J]. Archives of Microbiology, 2024, 206(10): 404.
- [19] CHOWDHARY A, JAIN K, CHAUHAN N. *Candida auris* genetics and emergence[J]. Annual Review of Microbiology, 2023, 77: 583-602.
- [20] 邴健. 耳念珠菌耐药机制研究进展[J]. 菌物学报, 2020, 39(11): 2120-2130.  
BING J. Progress in the study of drug resistance mechanism of *Candida auris*[J]. Mycosystema, 2020, 39(11): 2120-2130 (in Chinese).
- [21] CHAABANE F, GRAF A, JEQUIER L, COSTE AT. Review on antifungal resistance mechanisms in the emerging pathogen *Candida auris*[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2788.
- [22] PRASAD R, NAIR R, BANERJEE A. Emerging mechanisms of drug resistance in *Candida albicans*[M]// Yeasts in Biotechnology and Human Health: Physiological Genomic Approaches. Cham: Springer International Publishing, 2019: 135-153.
- [23] AMANN V, KISSMANN AK, FIRACATIVE C, ROSENAU F. Biofilm-associated candidiasis: pathogenesis, prevalence, challenges and therapeutic options[J]. Pharmaceuticals, 2025, 18(4): 460.
- [24] LARKIN E, HAGER C, CHANDRA J, MUKHERJEE PK, RETUERTO M, SALEM I, LONG LS, ISHAM N, KOVANDA L, BORROTO-ESODA K, WRING S, ANGULO D, GHANNOUM M. The emerging pathogen *Candida auris*: growth phenotype, virulence factors, activity of antifungals, and effect of SCY-078, a novel glucan synthesis inhibitor, on growth morphology and biofilm formation[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2017, 61(5): e02396-16.
- [25] SHIRADHONE AB, INGLE SS, ZORE GB. Microenvironment responsive modulations in the fatty acid content, cell surface hydrophobicity, and adhesion of *Candida albicans* cells[J]. Journal of Fungi, 2018, 4(2): 47.
- [26] 陈婷, 李璇, 黄孝天, 张陆兵. 白念珠菌生物膜的形成过程及其抗真菌耐药性[J]. 实用临床医学, 2024, 25(1): 130-135, 139.  
CHEN T, LI X, HUANG XT, ZHANG LB. The formation of biofilm in *Candida albicans* and its antifungal resistance: an overview[J]. Practical Clinical Medicine, 2024, 25(1): 130-135, 139 (in Chinese).
- [27] KUMAR D, BANERJEE T, PRATAP CB, TILAK R. Itraconazole-resistant *Candida auris* with phospholipase, proteinase and hemolysin activity from a case of vulvovaginitis[J]. Journal of Infection in Developing Countries, 2015, 9(4): 435-437.
- [28] OYARDI O, DEMIR ES, ALKAN B, KOMEK S, GENÇ GE, AYGUN G, TEKE L, TURAN D, ERTURAN Z, SAVAGE PB, GUZEL CB. Phenotypic investigation of virulence factors, susceptibility to ceragenins, and the impact of biofilm formation on drug efficacy in *Candida auris* isolates from Türkiye[J]. Journal of Fungi, 2023, 9(10): 1026.
- [29] SHABAN S, PATEL M, AHMAD A. Improved efficacy of antifungal drugs in combination with monoterpene phenols against *Candida auris*[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 1162.
- [30] MAJTNEROVÁ P, ROUŠAR T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation[J]. Molecular Biology Reports, 2018, 45(5): 1469-1478.
- [31] DU H, BING J, HU TR, ENNIS CL, NOBILE CJ, HUANG GH. *Candida auris*: epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence[J]. PLoS Pathogens, 2020, 16(10): e1008921.
- [32] CHOUDHURY S, MAJHI K, JENA P, MOHANTY S, NARAYAN YN, PARAMITA JENA P, MISHRA SB, PANDA S. *Candida auris* infections in ICU patients: risk factors, outcomes, and antifungal resistance patterns[J]. Critical Care, 2025, 29(1): 332.