DOI:10.12138/j.issn.1671－9638.20262237

·论著·

大肠埃希菌 Δ*tbp*A 突变株抑制念珠菌增殖及机制研究

韩子冰[1],毛嘉怡[1],毛珊珊[2],张　瑜[2],夏　川[1],陈飞鹏[1],崔惠越[1],李　颖[2]
(徐州医科大学 1. 生命科学学院; 2. 医学技术学院,江苏 徐州　221004)

[摘　要] **目的**　本研究旨在评估大肠埃希菌 Δ*tbp*A 突变株的抗真菌效能及作用机制,为其作为新型抗真菌治疗策略提供实验支持。**方法**　培养、收集并过滤大肠埃希菌 Δ*tbp*A 无细胞上清(CFS),通过时间－生长曲线分析 CFS 对念珠菌的影响。采用点板计数法检测该菌与念珠菌共培养时,念珠菌的增殖状况;检测其黏附能力及对人工胃液、肠液的耐受性,探究其作为益生菌的益生性;采用秀丽隐杆线虫－白念珠菌感染模型,评价其体内抗真菌效果;通过 Transwells 小室实验和酶、热处理实验,探究 CFS 中抗真菌活性成分。**结果**　时间－生长曲线及共培养实验结果表明,大肠埃希菌 Δ*tbp*A 可显著抑制念珠菌的增殖;白念珠菌感染线虫经该菌饲喂后存活时间明显延长;该菌能够耐受人工胃肠液环境;Transwells 小室及酶、热处理结果显示,其抗真菌作用依赖于分泌的蛋白酶敏感型且耐热类物质。**结论**　大肠埃希菌 Δ*tbp*A 突变株通过分泌蛋白类活性物质抑制念珠菌增殖,且具有良好黏附能力和人工胃肠液耐受性,有望作为益生菌用于念珠菌感染治疗。

[关　键　词] 白念珠菌; 大肠埃希菌; Δ*tbp*A 突变性; 抗真菌; 黏附
[中图分类号] R378.2⁺1

Inhibition of proliferation of *Candida* by *Escherichia coli* Δ*tbp*A mutant strain and its mechanism

HAN Zibing[1], *MAO Jiayi*[1], *MAO Shanshan*[2], *ZHANG Yu*[2], *XIA Chuan*[1], *CHEN Feipeng*[1], *CUI Huiyue*[1], *LI Ying*[2](1. *School of Life Sciences*; 2. *School of Medical Technology*, *Xuzhou Medical University*, *Xuzhou* 221004, *China*)

[**Abstract**] **Objective**　This study aimed to evaluate the antifungal efficacy and mechanism of *Escherichia coli* (*E. coli*) Δ*tbp*A mutant strain, providing experimental support for its use as a novel antifungal treatment strategy. **Methods**　*E. coli* Δ*tbp*A was cultured, and its cell-free supernatant (CFS) was collected and filtered. Effect of CFS on *Candida* was analyzed through time-growth curve. The proliferation of *Candida* during co-culture with *E. coli* Δ*tbp*A was detected by plate counting. The adhesion ability of *E. coli* Δ*tbp*A and its tolerance to artificial gastric and intestinal fluids were detected, and its probiotic properties were explored. Its *in vivo* antifungal effect was evaluated by *Caenorhabditis elegans-Candida albicans* (*C. albicans*) infection model. The antifungal active ingredients in CFS were explored through Transwell chamber assay as well as enzyme/heat treatment experiments. **Results**　The time-growth curve and co-culture experiment results indicated that *E. coli* Δ*tbp*A could significantly inhibit the proliferation of *Candida*. The survival time of *C. albicans*-infected *Caenorhabditis* prolonged significantly after feeding with *E. coli* Δ*tbp*A. *E. coli* Δ*tbp*A could tolerate artificial gastrointestinal fluid environment. Transwell chamber assay and enzyme/heat treatment results showed that its antifungal effect

[收稿日期]　2025－03－13
[基金项目]　国家自然科学基金资助项目(82572594);2022 年度江苏省大学生创新创业训练计划项目(202210313043Z);徐州市医药卫生面上项目(KC23248);2023 年度江苏省大学生创新创业训练计划项目(202310313004Z)
[作者简介]　韩子冰(2002－),男(汉族),河南省南阳市人,硕士研究生在读,主要从事病原微生物相关研究。
[通信作者]　李颖　　E-mail: liying@xzhmu.edu.cn

depended on the secreted protease-sensitive and heat-resistant substances. **Conclusion** *E. coli* Δ*tbp*A mutant strain inhibits *Candida* proliferation by secreting protein-like active substances, and has good adhesion ability and tolerance to artificial gastrointestinal fluid. It is expected to be used as a probiotic for the treatment of *Candida* infection.

[**Key words**] *Candida albicans*; *Escherichia coli*; Δ*tbp*A mutation; antifungal activity; adhesion

真菌感染是临床常见感染类型，全球有数以亿计的患者，其中侵袭性真菌(IFD)感染在免疫功能低下人群中发病率和病死率均较高。全球每年因侵袭性真菌病导致的死亡人数可达 375 万，严重威胁人类健康[1-2]。念珠菌是临床最常见的条件致病真菌，其中白念珠菌占一半以上。该菌通常定植于人体呼吸道、消化道、生殖道、皮肤黏膜等表面，若机体免疫力降低或菌群失衡，其会大量繁殖且毒力增强，进而引发感染[3]。目前，临床上治疗真菌感染的药物主要包括唑类、多烯类和棘白菌素类等[4]。这些药物分别作用于真菌细胞膜或细胞壁合成过程，发挥抑菌或杀菌作用。然而，随着抗真菌药物的广泛使用，耐药菌株日益增多，导致治疗效果下降。同时，多烯类药物的肝肾毒性，也极大地限制了其临床使用[5]。因此，亟需研发新的抗真菌药物或有效治疗策略，以应对真菌感染的治疗挑战。

肠道微生物群落构成复杂的动态生态系统。它们不仅能分解宿主难以直接利用的碳水化合物，还能提供必要的营养素，调控宿主的免疫反应，并通过分泌抗菌活性代谢产物抵御病原体侵袭[6-7]。研究[8]表明，部分肠道常驻菌具有良好的抗真菌作用。如粪肠球菌和葡萄球菌等能有效抑制白念珠菌的增殖及生物膜形成。此外，多项[9-10]文献显示，益生菌可有效减少念珠菌在口腔、阴道和肠道等部位的定植，缓解感染症状，并降低危重患者念珠菌病的发病率。益生菌大多属于人体正常菌群，在体内可大量繁殖，对病原微生物选择压力低，生物安全性高，不易产生耐药性，因而在替代抗菌药物治疗真菌感染领域前景广阔。

本课题组通过筛选大肠埃希菌单基因敲除文库(OEC4988)，以野生型大肠埃希菌 BW25113 为对照，野生型白念珠菌 SC5314 为指示菌株，发现大肠埃希菌 Δ*tbp*A 具有良好的抗真菌活性。本研究对其抗真菌效果及作用机制进行了初步探索，旨在为利用大肠埃希菌工程菌治疗真菌感染提供思路，并为其进一步的临床应用奠定理论和实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 本实验所用菌株见表 1。临床念珠菌分离株由徐州医科大学附属医院微生物室分离鉴定，大肠埃希菌 Δ*tbp*A 来自大肠埃希菌单基因敲除文库(OEC4988，上海优宁维生物)。实验使用的秀丽隐杆线虫购自秀丽隐杆线虫遗传中心(CGC，*Caenorhabditis* Genetics Center)。

表 1 实验菌株编号及名称

Table 1 Numbers and names of experimental strains

菌株编号	菌株名称
CK1	临床分离克柔念珠菌(唑类天然耐药)
CT171221301	临床分离热带念珠菌
CG171122302	临床分离光滑念珠菌
CP18092240	临床分离近平滑念珠菌
SC5314	野生型白念珠菌
Δ*tbp*A	*tbp*A 基因敲除大肠埃希菌

1.1.2 药品与试剂 RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司，LB 肉汤培养基、PBS 缓冲液、甘油购自上海生工，酵母粉、蛋白胨、琼脂粉购自 OXOID 公司，葡萄糖、氢氧化钠、无水乙醇、盐酸购自国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 仪器 −80℃冰箱(Thermo Fisher Scientific 公司)，−20℃和 4℃冰箱(海尔集团公司)，生物安全柜(上海跃进医疗器械有限公司)，高压蒸汽灭菌锅(上海知楚仪器有限公司)，电子称量天平(METTLER TOLEDO 集团公司)，无菌过滤器(Millex 公司)，细菌浊度仪(美国 Bio-Rad 公司)，恒温震荡培养箱(上海知楚仪器有限公司)，恒温水浴锅(上海知楚仪器有限公司)，倒置荧光显微镜(OLYMPUS 公司)，酶标仪(Bio-Rad 公司)，离心机(Thermo Fisher Scientific 公司)，涡旋振荡仪(苏州

安创仪器有限公司),pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基及试剂配制方法 (1)YPD 培养基:称取 1%酵母粉、2%蛋白胨和 2%葡萄糖,使用去离子水溶解。将葡萄糖溶液与酵母粉蛋白胨溶液分开进行高压蒸汽灭菌,121℃,20 min。将灭菌后的两瓶溶液混匀即为 YPD 液体培养基。若需配制 YPD 固体培养基,则在酵母粉蛋白胨溶液中加入 2%琼脂粉,其余步骤不变。待培养基冷却至 60℃,灌注平板。(2)LB 培养基:按照 25 g/L 的浓度称取一定量的 LB 肉汤培养基粉末,用去离子水溶解。若需配置 LB 固体培养基,则需要加入 1.5%琼脂粉。LB 液体和固体培养基都需进行高压蒸汽灭菌,121℃,20 min。(3)NGM 培养基:氯化钠 3.0 g、蛋白胨 2.5 g、琼脂粉 17 g、pH 6.0 的 1 mol/L 磷酸钾缓冲液 25 mL,加去离子水定容至 997 mL,121℃高压灭菌 20 min;冷却至 50～60℃后加入 1 mol/L 硫酸镁、1 mol/L 氯化钙母液及 5 mg/mL 胆固醇无水乙醇母液各 1 mL。配制 NGM 固体培养基时,只需在原有配方基础上加入 2%琼脂粉。(4)M9 缓冲液:含 0.68%磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、0.3%磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、0.5% NaCl、0.025%硫酸镁($MgSO_4$),使用去离子水配制,无菌过滤器过滤备用。(5)BHI 培养基:称取 BHI 粉末 3.7 g,加去离子水溶解并定容至 100 mL,121℃,20 min 高压蒸汽灭菌。

1.2.2 菌悬液及大肠埃希菌 Δ*tbp*A 无细胞上清液(CFS)的制备 实验所用菌株以含 20%甘油的生理盐水保存液悬浮,置于－80℃中保存。实验前,将冻存的念珠菌接种于 3 mL 液体培养基中,30℃、200 r/min 振荡培养 24 h。用接种环蘸取菌液在 YPD 固体培养基表面划线,30℃孵育 24～48 h,待形成单个菌落后,挑取单个菌落再次接种于 3 mL YPD 液体培养基,30℃、200 r/min 振荡培养至对数生长期备用。Δ*tbp*A 大肠埃希菌按相同方法活化,接种于 LB 培养基,37℃培养至对数生长期备用。

制备大肠埃希菌 Δ*tbp*A 的 CFS 时,取该菌单个菌落接种于 5 mL LB 液体培养基,37℃,200 r/min 振荡培养 16 h,于 4℃以 4 000×g 离心 10 min,收集上清并经 0.22 μm 无菌滤膜过滤,即为 CFS。

1.2.3 时间－生长曲线的绘制 为检测大肠埃希菌 Δ*tbp*A CFS 的抗真菌活性随时间变化情况,本研究绘制 CFS 对不同念珠菌的时间－生长曲线。取对数生长期的念珠菌,接种于 YPD 培养基,调节菌悬液浓度至 1×10^5 CFU/mL。实验组将菌悬液按照 1∶9 的比例加入大肠埃希菌 Δ*tbp*A 单基因敲除株的 CFS,对照组使用 LB 培养基,空白对照组采用无菌磷酸盐(PBS)缓冲液。在 0～24 h 内每 2 h 取样 100 μL,检测 600 nm 处吸光度。以时间为横坐标、吸光度为纵坐标绘制生长曲线。

1.2.4 细菌－念珠菌共培养模型的构建 为探讨活的大肠埃希菌 Δ*tbp*A 对念珠菌增殖的抑制作用,本研究构建细菌－念珠菌共培养模型。将大肠埃希菌单基因敲除株 Δ*tbp*A 分别与多种念珠菌共培养,包括白念珠菌野生菌株 SC5314 及临床分离的克柔念珠菌 CK1、热带念珠菌 CT171221301、光滑念珠菌 CG171122302、近平滑念珠菌 CP18092240。

采用 PBS 洗涤过夜培养的大肠埃希菌 Δ*tbp*A 及念珠菌两次,再分别以 LB 和 YPD 培养基稀释至 1×10^7 CFU/mL 与 1×10^5 CFU/mL。取大肠埃希菌和念珠菌培养物各 1 mL,按 1∶1 比例混合共培养;另取念珠菌培养物与 LB 肉汤各 1 mL 混合作为白念珠菌单培养组,无菌水与念珠菌培养物各 1 mL 混合作空白对照组。于 30℃、200 r/min 振荡培养,收集 8、12、16 h 的培养物,在含 200 μg/mL 氯霉素的 YPD 平板上进行菌落计数,以测定存活念珠菌数量。

1.2.5 大肠埃希菌 Δ*tbp*A 的黏附能力变化的测定 选用大肠埃希菌 Δ*tbp*A 及其母体菌株 BW25113 作为研究对象,将过夜培养的菌液使用 LB 培养基稀释至 1×10^6 CFU/mL,移入玻璃管中倾斜 30°于 37℃孵育 24 h。去除浮游细菌后,采用无菌 PBS 洗涤,收集黏附于管壁的细菌并重悬,测定其在 600 nm 处的吸光度($OD_{黏附}$)。将浮游与黏附细菌混合重悬,测定混合细胞群在 600 nm 处的吸光度($OD_{混合}$),按以下公式计算黏附率:($OD_{黏附}/OD_{混合}$)×100%。

1.2.6 大肠埃希菌 Δ*tbp*A 对人工模拟胃肠液耐受性的检测 将 3 mg/mL 胃蛋白酶溶解于 PBS,调节 pH 至 3.0 后,经 0.22 μm 的无菌滤膜过滤,作为人工胃液备用。将 1 mg/mL 胰蛋白酶与 0.3%牛胆盐混合于 PBS 中,调整 pH 至 8.0,过滤后作为人工肠液备用[11]。收集培养至指数期的 Δ*tbp*A 大肠埃希菌,使用 PBS 洗涤后,分别重悬于上述人工胃

液和肠液中，于 37 ℃、200 r/min 孵育。通过稀释涂布平板法，测定人工胃液中孵育 1、3 h 及在人工肠液中孵育 2、4 h 后的活菌数量。

1.2.7 秀丽隐杆线虫－白念珠菌感染模型的构建 以大肠埃希菌 Δ*tbp*A 和 OP50（常规线虫饲料）分别喂养野生型秀丽隐杆线虫 N2，连续观察 2 d，记录其存活率。取 200 μL 培养至指数期的野生型白念珠菌 SC5314 菌液涂布于 YPD 平板，30 ℃培养 24 h 备用。将 N2 线虫虫卵分别置于含大肠埃希菌 Δ*tbp*A 和 OP50 的 NGM 平板，待线虫生长至 L4 时期后，使用 M9 缓冲液收集并洗涤 3 次，转移至涂布有 SC5314 的 YPD 平板，25 ℃感染 2 h，确保线虫吞食并感染白念珠菌。随后采用 M9 缓冲液将感染后的线虫从 NGM 平板洗下，再次洗涤 3 次。将线虫分别接种至含 80% M9、20% BHI 及 45 μg/mL 卡那霉素的 96 孔板，每孔约 30 条，25℃培养，连续观察 6 d，记录线虫存活率。

1.2.8 小室实验 采用 Transwells 小室实验研究大肠埃希菌 Δ*tbp*A 是否通过分泌活性物质发挥抗念珠菌作用。实验设置：下室加入 1 mL、1×10^5 CFU/mL 的白念珠菌；上室加入 200 μL、5×10^7 CFU/mL 的大肠埃希菌 Δ*tbp*A 菌液作为分隔组。混合组则将等体积与浓度的大肠埃希菌及白念珠菌菌液直接加入下室；对照组上室加 200 μL LB 培养基，下室加等量白念珠菌菌液。各组于 30℃、90 r/min 振荡培养 24 h 后，混匀上下室菌液，用涂布平板法计数白念珠菌菌落数。

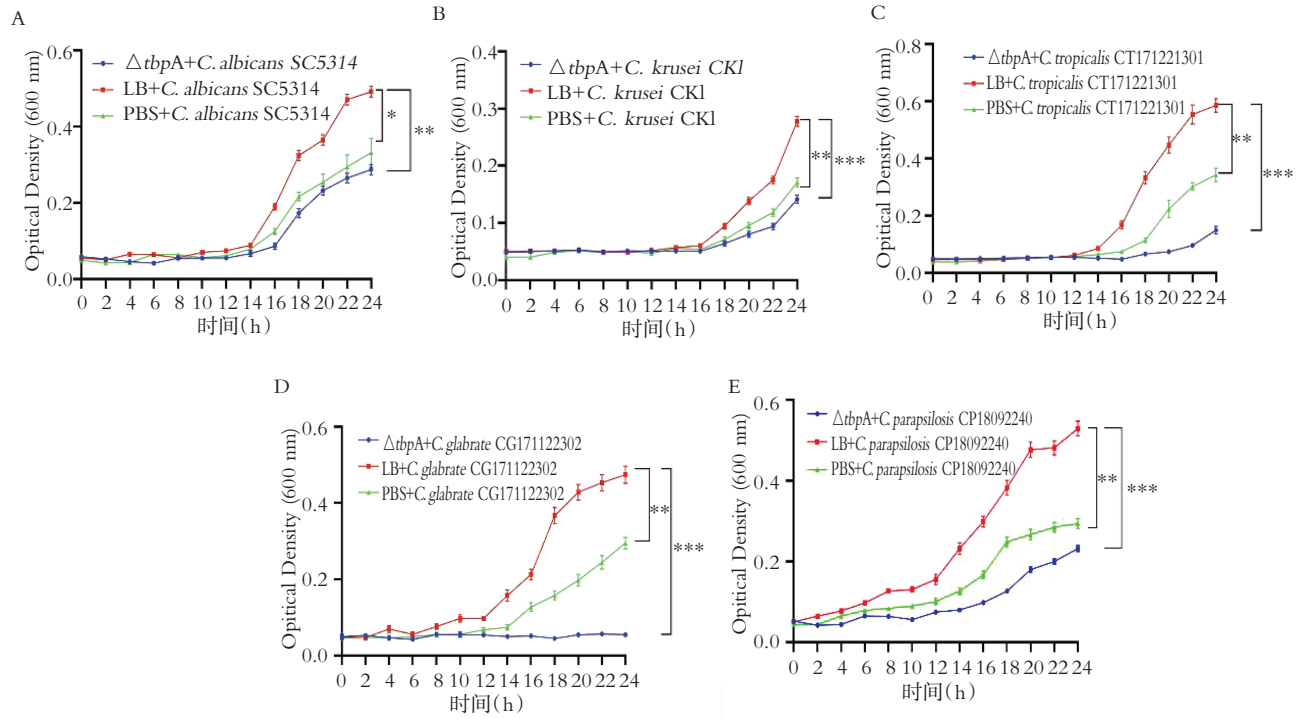
1.2.9 酶、热处理实验 将大肠埃希菌 Δ*tbp*A 的 CFS 分别与胃蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K 和木瓜蛋白酶混合，于 37 ℃条件下反应 2 h，检测酶处理前后抗念珠菌活性变化，以判断其抗真菌活性物质是否为蛋白质。同时，将 CFS 分别置于 60、80、100℃处理 1 h，检测热处理前后抗念珠菌活性变化，以评估活性物质的热稳定性。

1.3 统计学分析 所有实验均设置实验组、对照组及空白组（如适用），每组含 3 个平行样本，并于 3 个不同时间点独立开展，共完成 3 次生物学重复。统计分析与图表绘制采用 GraphPad Prism 软件。时间－生长曲线通过重复测量方差分析比较；细菌－真菌共培养实验中，不同处理对真菌生长的影响在各时间点单独进行统计分析。Δ*tbp*A 组和 PBS 组与 LB 对照组的比较采用非配对双侧 Welch *t* 检验（unpaired two-tailed Welch's *t*-test），其余实验数据则用 *t* 检验或 one-way ANOVA 检验。以 $P\leqslant0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大肠埃希菌 Δ*tbp*A CFS 对念珠菌增殖的影响 时间－生长曲线结果显示，与对照组（LB 组及 PBS 组）相比，大肠埃希菌 Δ*tbp*A CFS 可有效抑制野生型白念珠菌 SC5314 的生长。尤其在培养 10 h 后，经大肠埃希菌 Δ*tbp*A CFS 处理的白念珠菌增殖受到显著抑制，其吸光度值显著低于对照组（图 1A）。此外，对于非白念珠菌，如临床分离的克柔念珠菌（图 1B）、热带念珠菌（图 1C）、光滑念珠菌（图 1D）及近平滑念珠菌（图 1E），在培养 12 h 后，大肠埃希菌 Δ*tbp*A CFS 组的生长速率明显降低，吸光度值低于对照组；其中 PBS 组增殖速率慢于 LB 组，但快于 CFS 组。在不同念珠菌的生长曲线中，PBS 处理组的生长速率介于 LB 组与 Δ*tbp*A 组之间，表明 Δ*tbp*A CFS 对念珠菌生长的抑制并非单纯因前期培养 Δ*tbp*A 导致营养耗竭所致。综上所述，大肠埃希菌 Δ*tbp*A CFS 对白念珠菌及非白念珠菌的增殖均有显著抑制作用。

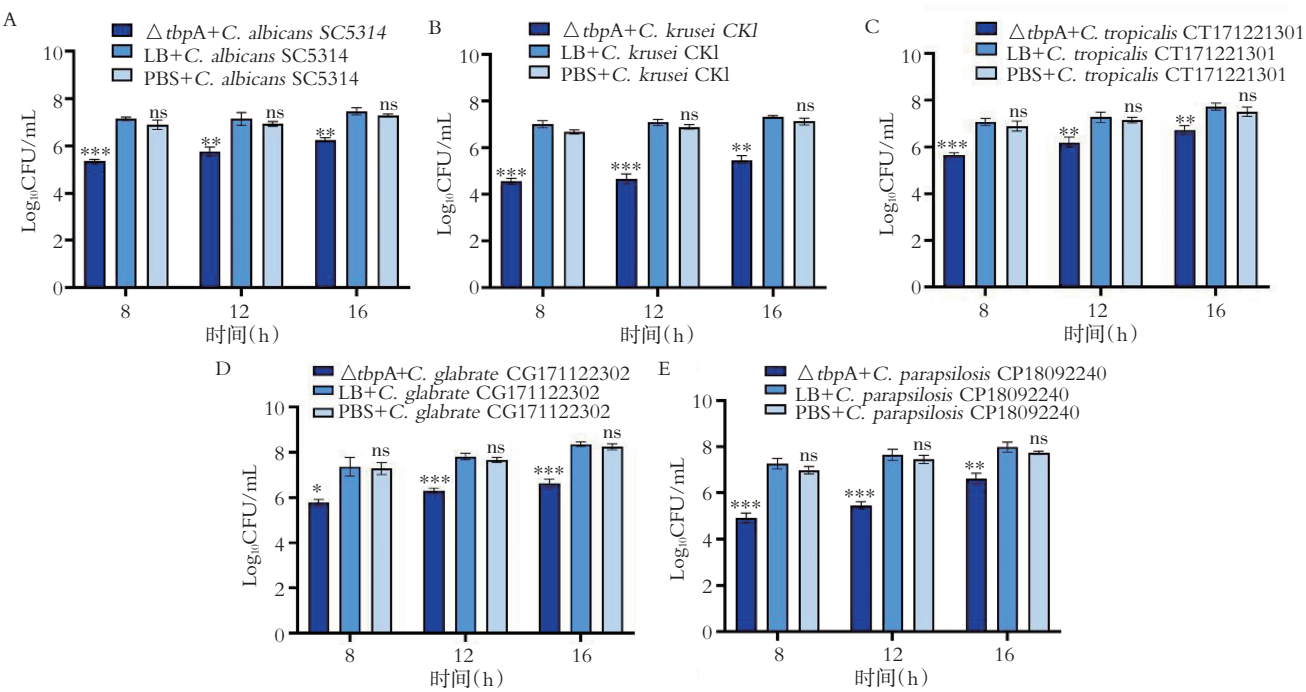
2.2 大肠埃希菌 Δ*tbp*A 对念珠菌增殖的影响 细菌－真菌共培养实验结果见图 2，与念珠菌的 LB 及 PBS 单培养组相比，大肠埃希菌 Δ*tbp*A 与 5 种常见念珠菌共培养时，念珠菌在 8、12、16 h 的细胞数量均有显著降低。尽管随着培养时间延长，念珠菌数量呈现缓慢上升趋势，但始终远低于 LB 组和 PBS 单培养组。这表明共培养体系中存活的大肠埃希菌 Δ*tbp*A 可有效抑制多种念珠菌的生长繁殖。



注：A 为野生型白念珠菌(SC5314)，B 为临床分离克柔念珠菌(CK1)，C 为临床分离热带念珠菌(CT171221301)，D 为临床分离光滑念珠菌(CG171122302)，E 为临床分离近平滑念珠菌(CP18092240)。* 表示 $P<0.05$，** 表示 $P<0.01$，*** 表示 $P<0.001$。

图 1　大肠埃希菌 Δ*tbp*A CFS 对白念珠菌和非白念珠菌的时间－生长曲线。

Figure 1　Time-growth curves of *E. coli* Δ*tbp*A CFS against *C. albicans* and non-*C. albicans*

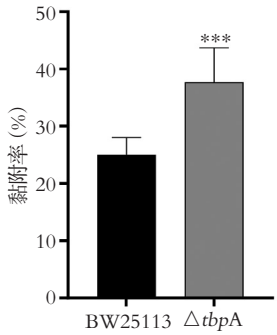


注：A 为野生型白念珠菌(SC5314)，B 为临床分离克柔念珠菌(CK1)，C 为临床分离热带念珠菌(CT171221301)，D 为临床分离光滑念珠菌(CG171122302)，E 为临床分离近平滑念珠菌(CP18092240)。ns 表示差异无统计学意义，* 表示 $P<0.05$，** 表示 $P<0.01$，*** 表示 $P<0.001$。

图 2　大肠埃希菌 Δ*tbp*A 与白念珠菌、非白念珠菌共培养结果

Figure 2　Co-culture results of *E. coli* Δ*tbp*A with *C. albicans* and non-*C. albicans*

2.3　Δ*tbp*A 大肠埃希菌的黏附能力测定结果　Δ*tbp*A 大肠埃希菌对玻璃试管的黏附率为 37%，而其母体菌株 BW25113 的黏附率为 24%，表明敲除 *tbp*A 基因后，该菌的黏附能力显著提升。见图 3。

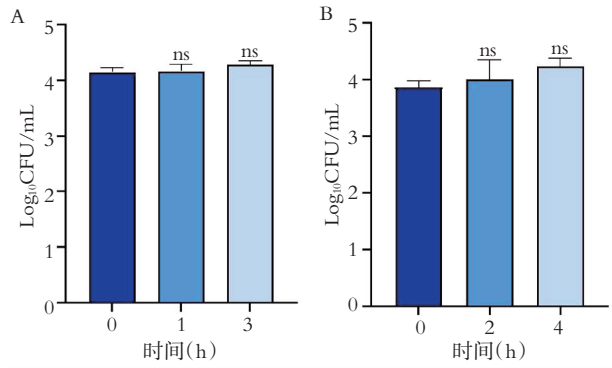


注：*** 表示 $P<0.001$。

图 3　大肠埃希菌 Δ*tbp*A 与大肠埃希菌 BW25113 的黏附能力比较

Figure 3　Comparison in adhesion ability between *E. coli* Δ*tbp*A and *E. coli* BW25113

2.4　大肠埃希菌 Δ*tbp*A 对人工模拟胃肠液的耐受性测定结果　大肠埃希菌 Δ*tbp*A 经模拟胃液处理 1、3 h 及模拟肠液处理用 2、4 h 后，活菌数与初加入时相比，差异无统计学意义，未发生减少。这表明大肠埃希菌 Δ*tbp*A 在人工模拟胃肠液中仍能保持较高的活性，具有良好的耐受性。见图 4。

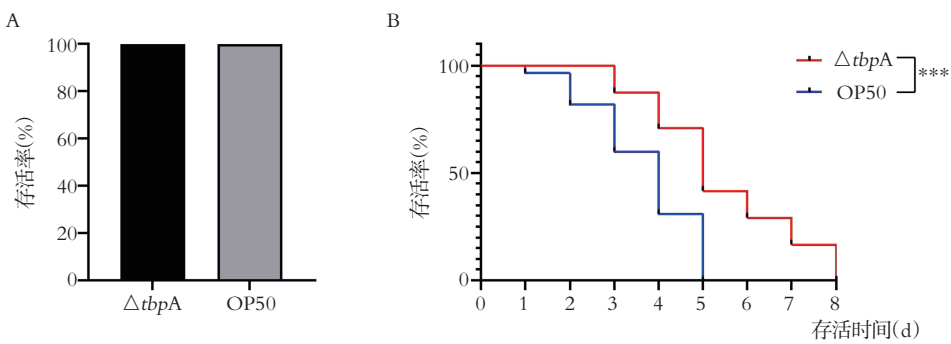


注：A 为模拟胃液，B 为模拟肠液。ns 表示差异无统计学意义。

图 4　大肠埃希菌 Δ*tbp*A 经模拟胃肠液处理不同时间的耐受性测定结果

Figure 4　Tolerance detection results of *E. coli* Δ*tbp*A treated with simulated gastrointestinal fluid at different times

2.5　大肠埃希菌 Δ*tbp*A 对秀丽隐杆线虫－念珠菌感染模型的影响　如图 5A 所示，与饲喂 OP50 相比，饲喂大肠埃希菌 Δ*tbp*A 对健康线虫的生长无显著影响，提示其对线虫细胞毒性较低。在线虫－白念珠菌感染模型中，饲喂 OP50 的白念珠菌感染线虫于 5 d 内全部死亡；而饲喂 Δ*tbp*A 大肠埃希菌的感染线虫，5 d 时存活率约为 45%，直至 8 d 后才全部死亡，表明该菌株可显著延长白念珠菌感染线虫的存活时间（图 5B）。

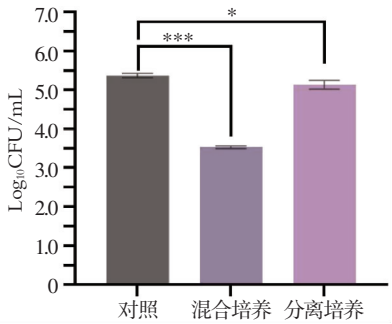


注：A 为秀丽隐杆线虫存活情况，B 为白念珠菌感染秀丽隐杆线虫的生存曲线。*** 表示 $P<0.001$。

图 5　大肠埃希菌 Δ*tbp*A 及 OP50 饲喂对秀丽隐杆线虫、秀丽隐杆线虫－念珠菌感染模型的影响

Figure 5　Effect of *E. coli* Δ*tbp*A and OP50 feeding on *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis elegans*-*C. albicans* infection model

2.6　小室实验结果　如图 6 所示，与对照组 LB 培养相比，Δ*tbp*A 菌株无论与白念珠菌混合还是分隔培养，均能显著抑制野生型白念珠菌 SC5314 的生长，说明该菌株可通过直接接触及分泌活性物质两种途径抑制白念珠菌增殖。

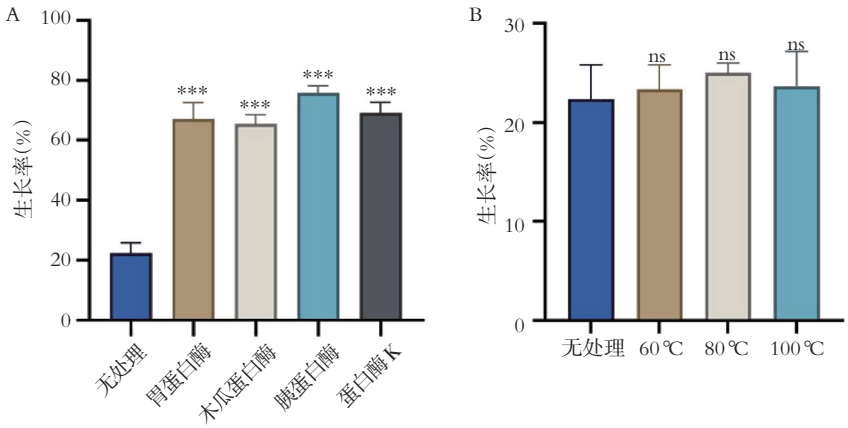


注：* 表示 $P<0.05$，*** 表示 $P<0.001$。

图 6　大肠埃希菌 Δ*tbp*A 与白念珠菌分离或混合培养时白念珠菌的增殖情况

Figure 6　Proliferation of *C. albicans* during isolation or co-culture of *E. coli* Δ*tbp*A with *C. albicans*

2.7　大肠埃希菌 Δ*tbp*A CFS 对酶、热稳定性检测结果　如图 7A 所示，以 LB 培养基处理组为对照（100%），白念珠菌在未处理的大肠埃希菌 Δ*tbp*A CFS 中生长率为 22%；经胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶及蛋白酶 K 处理后，其生长率分别升至 67%、65%、75%、69%。这表明 Δ*tbp*A CFS 中的抗真菌成分可能属于蛋白质类，因其蛋白酶处理后对白念珠菌增殖的抑制作用显著减弱。如图 7B 所示，将 Δ*tbp*A CFS 置于 60、80、100℃ 高温处理后，其对白念珠菌增殖的抑制效果无明显改变，提示该抗真菌物质具有热稳定性。综合以上结果，Δ*tbp*A 大肠埃希菌 CFS 中的抗真菌活性成分为蛋白酶敏感型且耐热。



注：A 为酶处理后；B 为热处理后。ns 表示差异无统计学意义，*** 表示 $P<0.001$。

图 7　大肠埃希菌 Δ*tbp*A CFS 经酶、热处理对白念珠菌的抑制结果

Figure 7　Inhibition results of enzyme and heat treated *E. coli* Δ*tbp*A CFS on *C. albicans*

3　讨论

近年来，随着抗菌药物的广泛应用及器官移植、免疫抑制和导管插管等治疗方法的开展，加之艾滋病患者增多，真菌感染发病率不断上升。然而，目前临床抗真菌药物种类有限，且耐药性和不良反应严重制约了真菌感染的治疗[12]。传统抗真菌药物主要通过抑制或杀灭真菌发挥治疗作用，易因药物选择压力诱导耐药菌产生。目前，“以菌抑菌”已发展为新型感染治疗策略。

本研究显示，大肠埃希菌 Δ*tbp*A 的培养上清及活菌细胞均能显著抑制多种念珠菌的增殖。体内实验结果表明，该菌株对秀丽隐杆线虫无明显细胞毒性；在线虫－白念珠菌感染模型中，饲喂 Δ*tbp*A 大肠埃希菌可显著延长白念珠菌感染线虫的存活时间，对真菌感染具有一定的治疗效果。

益生菌是在适量摄入时可对宿主产生有益影响的活性微生物，其益处主要通过调节宿主肠道微生态实现。这类微生物具有高安全性、良好稳定性和低成本优势，在替代抗菌药物治疗细菌感染领域前景广阔[13]。口服益生菌需经受胃酸及胆汁盐的考验，方能抵达肠道并黏附于上皮细胞。进入肠道后，益生菌通过利用宿主能量抑制病原菌增殖，构建抗菌生物屏障[14]。因此，本研究进一步检测了大肠埃希菌 Δ*tbp*A 在人工胃肠液环境下的耐受能力。实验结果表明，该菌株在模拟胃液中经 1、3 h 处理，以及在模拟肠液中经 2、4 h 处理后，活菌数量与初始值相比无显著变化，未出现活性降低。这说明大肠埃希菌 Δ*tbp*A 在人工胃肠液中能维持较高活性，具备良好的耐受性，临床应用潜力较大。

由于大肠埃希菌 Δ*tbp*A 的 CFS 可抑制念珠菌

生长，推测其可能通过分泌抗真菌物质发挥作用。Transwell 实验证实，当大肠埃希菌 Δ*tbp*A 与白念珠菌分隔培养时，仍表现出抗真菌活性，说明该菌株确能通过分泌活性物质发挥抑菌作用。同时观察到，混合培养组的抑菌效果显著优于分隔培养组，提示细菌与真菌的直接接触在抗真菌过程中亦发挥了重要作用，此现象与细菌－真菌共培养实验中念珠菌增殖被显著抑制的结果相符。此外，黏附能力是益生菌发挥生物学功能的重要基础。在一定程度上，强的黏附能力使益生菌能够对肠道微生物群落产生拮抗作用，从而抑制有害菌的生长，并调节肠道菌群的平衡，在 *tbp*A 基因敲除后，大肠埃希菌的黏附能力较母体菌株提高约 50%，导致更多细菌黏附于念珠菌表面以限制其生长，这可能是其发挥抗真菌作用的机制之一[15]。

本研究表明，Δ*tbp*A 可能通过分泌“耐热且对蛋白酶敏感”的蛋白质类物质发挥抗真菌作用。尽管这看似与多数蛋白质的热不稳定性相悖，却与一类被称为细菌素（bacteriocin）的抗菌肽核心特性高度一致。近期实验证据进一步支持了此点：源自乳酸菌的细菌素常具有显著耐热性，如植物乳杆菌 ZFM9 产生的 Plantaricin ZFM9 在 120℃下处理 30 min 后仍保持 95.6%活性[16]，而植物乳杆菌 SL47 所产细菌素 SL47 甚至可耐受 121℃高压灭菌 30 min[17]。

本研究中 100℃处理后高活性保留的现象与这些特性高度一致。同时，相关研究亦证实此类细菌素对多种蛋白酶敏感，这与其蛋白质属性相符[16-17]。更重要的是，已有直接证据显示大肠埃希菌能分泌抑制念珠菌的活性物质。如益生大肠埃希菌 Nissle 1917 的无细胞上清液已被证实可拮抗白念珠菌生长[18]，Bose 等[19]研究进一步发现，大肠埃希菌 BL21(DE3)的无细胞上清液对白念珠菌有显著抑制作用。该研究特别指出，其主要作用机制类似金属离子螯合剂（如 EDTA），提示该活性成分可能通过剥夺真菌生长所需的金属离子发挥作用。由此推断，Δ*tbp*A 分泌的耐热且蛋白酶敏感的蛋白类抗真菌物质很可能是细菌素或具有类似特性的抗菌肽。具体细菌素或抗菌肽的种类及鉴定，需通过色谱纯化、质谱测序等方法进一步研究。

本研究探讨大肠埃希菌 Δ*tbp*A 对念珠菌的抗真菌作用及其机制，旨在阐明 *tbp*A 基因敲除后大肠埃希菌代谢改变并分泌抗真菌物质的机制。已有研究[20]表明，*tbp*A 基因是硫胺素（维生素 B1）结合蛋白基因，其表达在转录与翻译层面受硫胺素焦磷酸（TPP）核糖开关的精密协同调控。

大肠埃希菌 *tbp*A 基因敲除可能干扰细菌对硫胺素的正常摄取，导致细胞内参与能量及氨基酸代谢核心酶系辅因子的稳态失衡，进而影响正常代谢功能。微生物中存在通过调控硫胺素进行竞争的现象。如近期研究[21]发现，黏细菌可分泌硫胺素酶至环境，主动清除硫胺素，从而有效抑制依赖外源硫胺素的卵菌病原体生长。由此推测，大肠埃希菌 Δ*tbp*A 可能处于“自身硫胺素代谢受限”的应激状态，可能通过改变代谢通路，分泌抗性物质，增强菌群竞争优势[22]。结合本研究结果推断，Δ*tbp*A 可能通过分泌细菌素类抗菌肽等次级代谢产物抑制其他菌群，并通过改变细菌表面特性提高黏附能力，两者协同作用以提升其在生态位中的竞争能力。

综上所述，大肠埃希菌 Δ*tbp*A 的发现为抗真菌研究领域带来了新的希望。该菌株不仅具备潜在抗真菌活性，更为揭示微生物相互作用及抗菌机制提供了实验基础。后续研究将聚焦于其分泌的特异性抗真菌成分及其作用机制，并评估其在各类感染模型中的治疗效果与安全性，旨在为临床应用奠定坚实的理论与实验基础。

本研究显示，大肠埃希菌 Δ*tbp*A 对念珠菌有显著抑制效果，并初步证明其通过分泌蛋白类活性物质及与真菌直接接触两种方式抑制增殖。然而，本研究仍存在一定局限性。首先，热处理和酶解实验提示该活性物质为一种耐热蛋白，但其具体分子特性、作用靶点及信号通路尚未阐明，需进一步结合组学与代谢通量分析予以解析。其次，尽管本研究在秀丽隐杆线虫模型中证实 Δ*tbp*A 菌株能有效延长感染线虫存活时间，但该模型无法完全模拟哺乳动物免疫系统对微生物的应答过程。后续研究可采用更具临床相关性的哺乳动物模型如小鼠模型，以评估 Δ*tbp*A 菌株在更复杂生理环境下的安全性与有效性。此外，本研究发现，Δ*tbp*A 菌株的黏附能力显著提高，可能有助于其在肠道内定植，并竞争性抑制真菌。然而，其黏附分子基础及在复杂菌群背景下的稳定性尚不清楚。未来可借助基因工程技术对其进行定向优化，以进一步增强其益生功能。

总体而言，本研究虽初步证实了大肠埃希菌 Δ*tbp*A 的抗真菌潜力，但其活性成分特性、作用机制、宿主体内效应及长期稳定性仍有待进一步系统研究。借助先前研究构建的模型体系与工程菌策略，可为后续机制阐明与临床转化提供重要借鉴。

利益冲突：所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明：韩子冰：实验设计、实施及论文撰写；毛嘉怡：实验实施、数据统计分析、作图；张瑜、毛珊珊：数据收集与整理；夏川、陈飞鹏、崔惠越：实验实施；李颖：研究指导、论文审阅、经费支持。

致谢：感谢本次科研及论文写作过程中导师及项目成员的指导和大力支持。

[参 考 文 献]

[1] Denning DW. Global incidence and mortality of severe fungal disease[J]. Lancet Infect Dis, 2024, 24(7): e428－e438.

[2] Fisher MC, Denning DW. The WHO fungal priority pathogens list as a game-changer[J]. Nat Rev Microbiol, 2023, 21(4): 211－212.

[3] 中国成人念珠菌病诊断与治疗专家共识组. 中国成人念珠菌病诊断与治疗专家共识[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2020, 12(1): 35－50.
Chinese adult Candidiasis Diagnosis and Management Expert Consensus Group. Chinese consensus on the diagnosis and management of adult candidiasis[J]. Chinese Journal of the Frontiers of Medical Science(Electronic Version), 2020, 12(1): 35－50.

[4] Roy M, Karhana S, Shamsuzzaman M, et al. Recent drug development and treatments for fungal infections[J]. Braz J Microbiol, 2023, 54(3): 1695－1716.

[5] 韩晓燕, 宋亚丽, 白埔, 等. 抗真菌药物的系统分类、耐药机制及新药研发进展[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(11): 1430－1436.
Han XY, Song YL, Bai B, et al. Systematic classification of antifungal drugs, resistance mechanisms and development of new drugs[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2019, 36(11): 1430－1436.

[6] Rakoff-Nahoum S, Foster KR, Comstock LE. The evolution of cooperation within the gut microbiota[J]. Nature, 2016, 533(7602): 255－259.

[7] Vatanen T, Kostic AD, d'Hennezel E, et al. Variation in microbiome LPS immunogenicity contributes to autoimmunity in humans[J]. Cell, 2016, 165(4): 842－853.

[8] Jiang QS, Jing Q, Ren B, et al. Culture supernatant of *Enterococcus faecalis* promotes the hyphal morphogenesis and biofilm formation of *Candida albicans*[J]. Pathogens, 2022, 11(10): 1177.

[9] Matsubara VH, Bandara HMHN, Mayer MPA, et al. Probiotics as antifungals in mucosal candidiasis[J]. Clin Infect Dis, 2016, 62(9): 1143－1153.

[10] Archambault LS, Dongari-Bagtzoglou A. Probiotics for oral candidiasis: critical appraisal of the evidence and a path forward[J]. Front Oral Health, 2022, 3: 880746.

[11] Cong L, Zhou Y, Zhang Y, et al. BTS1-knockout *Saccharomyces cerevisiae* with broad-spectrum antimicrobial activity through lactic acid accumulation[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2025, 15: 1494149.

[12] Zhang M, Yan HY, Lu MJ, et al. Antifungal activity of ribavirin used alone or in combination with fluconazole against *Candida albicans* is mediated by reduced virulence[J]. Int J Antimicrob Agents, 2020, 55(1): 105804.

[13] Oniszczuk A, Oniszczuk T, Gancarz M, et al. Role of gut microbiota, probiotics and prebiotics in the cardiovascular diseases[J]. Molecules, 2021, 26(4): 1172.

[14] Jiang JY, Li K, Wang YL, et al. Screening, identification and physiological characteristics of *Lactobacillus rhamnosus* M3 (1) against intestinal inflammation[J]. Foods, 2023, 12(8): 1628.

[15] 张炼辉. 微生物群体感应系统的研究进展[J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(5): 50－58.
Zhang LH. Research progress of microbial quorum sensing systems[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(5): 50－58.

[16] Ye ZD, Shentu HF, Zhou QQ, et al. A novel bacteriocin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, purified from *Lactiplantibacillus plantarum* ZFM9[J]. Food Chem, 2024, 451: 139344.

[17] Li HB, Yang YQ, Li LX, et al. Genome-based identification and characterization of bacteriocins selectively inhibiting *Staphylococcus aureus* in fermented sausages[J]. Probiotics Antimicrob Proteins, 2025, 17(5): 2878－2893.

[18] Rebai Y, Wagner L, Gnaien M, et al. *Escherichia coli* nissle 1917 antagonizes *Candida albicans* growth and protects intestinal cells from C. *albicans*-mediated damage[J]. Microorganisms, 2023, 11(8): 1929.

[19] Bose S, Singh DV, Adhya TK, et al. *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus*, functions as a chelating agent that exhibits antifungal activity against the pathogenic yeast *Candida albicans*[J]. J Fungi (Basel), 2023, 9(3): 286.

[20] Grondin JP, Geffroy M, Simoneau-Roy M, et al. Insights into the cotranscriptional and translational control mechanisms of the *Escherichia coli tbp*A thiamin pyrophosphate riboswitch[J]. Commun Biol, 2024, 7(1): 1345.

[21] Xia CY, Zhao YQ, Zhang L, et al. Myxobacteria restrain *Phytophthora* invasion by scavenging thiamine in soybean rhizosphere via outer membrane vesicle-secreted thiaminase I[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 5646.

[22] Poole K. Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance[J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67(9): 2069－2089.

(本文编辑：文细毛)

本文引用格式：韩子冰，毛嘉怡，毛珊珊，等. 大肠埃希菌 Δ*tbp*A 突变株抑制念珠菌增殖及机制研究[J]. 中国感染控制杂志，2026，25(5)：691－699. DOI：10.12138/j.issn.1671－9638.20262237.

Cite this article as: HAN Zibing, MAO Jiayi, MAO Shanshan, et al. Inhibition of proliferation of *Candida* by *Escherichia coli* Δ*tbp*A mutant strain and its mechanism [J]. Chin J Infect Control, 2026, 25(5): 691－699. DOI: 10.12138/j.issn.1671－9638.20262237.