四川大学学报（医学版） 2026，57（1）：73－81
J Sichuan Univ（Med Sci） doi: 10.12182/20260160502

在线全文

氯己定与保丽净诱导白色念珠菌形成持留菌的机制初探*

林祎璠[1]，程 磊[1,2]，周学东[1]，廖 生[1]，朱卓立[1,3]，任 彪[1△]

1. 口腔疾病防治全国重点实验室 国家口腔医学中心 口腔疾病国家临床医学研究中心 四川大学华西口腔医院（成都 610041）；
2. 四川大学华西口腔医院 牙体牙髓科（成都 610041）；3. 四川大学华西口腔医院 老年口腔科（成都 610041）

【摘要】 **目的** 探究常用义齿清洁剂氯己定、保丽净诱发义齿性口炎主要致病真菌白色念珠菌形成持留菌的机制。**方法** 形成白色念珠菌生物膜，加入0～40 000 μg/mL氯己定和保丽净处理，计数存活菌落并绘制剂量与时间依赖曲线。通过细胞死活染色观察持留菌分布，并挑取存活菌落进行持留验证。对氯己定处理2 h、6 h的菌株进行转录组学分析，探索持留菌形成机制。采用MTT法检测持留菌代谢变化。外源添加葡萄糖，验证义齿清洁剂调节持留菌代谢的作用。氯己定、保丽净处理白色念珠菌生物膜后，活菌的剂量和时间依赖曲线均呈双相杀菌形式，白色念珠菌形成持留菌。镜下可见生物膜结构被破坏，持留菌多分布于中上层。转录组显示持留菌三羧酸循环和有氧呼吸等能量代谢通路下调，糖酵解增强。MTT检测证明氯己定、保丽净降低持留菌代谢。添加外源葡萄糖激活代谢后持留菌数量减少，相较对照组其结果差异具有统计学意义（$P<0.05$）。**结论** 高浓度氯己定和保丽净处理可诱发白色念珠菌生物膜形成持留菌，其在义齿清洁剂移除后可复苏增加复发感染风险。白色念珠菌主要通过下调三羧酸循环和有氧呼吸，转入糖酵解途径，维持低代谢水平，进入持留休眠状态。外源补充葡萄糖激活代谢后，降低持留菌数量。

【关键词】 义齿性口炎 白色念珠菌 持留菌 氯己定 保丽净

Chlorhexidine and Polident Induce the Formation of *Candida albicans* Persistence

LIN Yifan[1], *CHENG Lei*[1,2], *ZHOU Xuedong*[1], *LIAO Ga*[1], *ZHU Zhuoli*[1,3], *REN Biao*[1△]. 1. *State Key Laboratory of Oral Diseases & National Center for Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China*; 2. *Department of Cariology and Endodontics, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China*; 3. *Department of Geriatric Dentistry, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China*

△ Corresponding author, E-mail: renbiao@scu.edu.cn

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 32470205).

[**Abstract**] **Objective** To investigate the mechanism by which chlorhexidine and Polident, commonly used denture cleansers, induce the formation of persistence in *Candida albicans* (*C.a.*), which is the causative agent of denture stomatitis. **Methods** *C.a.* biofilms were formed and treated with 0-40 000 μg/mL chlorhexidine and Polident. Surviving colonies were counted, and dose- and time-dependent curves were plotted. The distribution of persisters was observed via vital staining, and retention was verified by isolating surviving colonies. Transcriptomic analysis was performed on strains treated with chlorhexidine for 2 and 6 hours to explore the mechanisms of persister formation. Metabolic changes in persisters were assessed using the MTT assay. Exogenous glucose was added to validate the role of denture cleansers in regulating persister metabolism. **Results** After treating *C.a.* biofilms with chlorhexidine and Polident, the dose- and time-response curves of viable cells both exhibited a biphasic bactericidal pattern, indicating the formation of *C.a.* persisters. The biofilm structure was disrupted, and persisters were mostly distributed in the middle and upper layers. Transcriptomic analysis showed marked downregulation of the TCA cycle and aerobic respiration, but upregulation of glycolysis. The MTT assay verified that chlorhexidine and Polident suppressed persister metabolism, while the addition of glucose reduced the persister populations; there was a statistically significant difference compared to the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** High concentrations of chlorhexidine and Polident can induce the formation of *C.a.* persisters, which are mainly distributed in the upper and middle layers of biofilms. The persisters can resuscitate after drug removal, increasing the risk of recurrent infections. *C.a.* shifts from the tricarboxylic acid cycle and aerobic respiration to glycolysis

* 国家自然科学基金面上项目（No. 32470205）资助

△ 通信作者，E-mail: renbiao@scu.edu.cn

出版日期：2026-01-20

to maintain a low metabolic level. Exogenous glucose can activate their metabolism and decrease the number of persisters.

[Key words] Denture Stomatitis *Candida albicans* Persisters Chlorhexidine Polident

持留菌是经高浓度抗菌药物处理后仍能存活的低代谢微生物亚群,可导致慢性感染与疾病复发[1-2]。念珠菌属持留菌可增加侵袭性念珠菌病、义齿性口炎等复发感染风险[3-4]。白色念珠菌(*Candida albicans, C.a.*)是义齿性口炎(denture stomatitis, DS)的主要致病菌,其在义齿表面的黏附与定植是疾病发生和反复的关键[5-7]。流行病学显示,全球15%~70%的义齿佩戴者受此困扰[8]。老年人群因免疫功能衰退更易复发[9],严重时可能发展为死亡率超60%的念珠菌血症或口腔黏膜癌变[5-6]。

口外彻底清洁义齿是防治DS的重要策略[10]。然而,*C.a.*在氯己定(chlorhexidine, CHX)等常用杀菌剂或义齿清洁剂作用下易形成持留菌,导致防治效果欠佳[11-12],在停药后短期内复发感染[10]。因此,探究义齿清洁剂诱导*C.a.*形成持留菌的机制,对开发有效义齿清洁策略具有重要意义。

本研究通过高浓度氯己定和保丽净对*C.a.*进行处理,检测持留菌诱导情况,并对其进行表征与机制初探,为防治DS提供新思路。

1 材料和方法

1.1 材料

*C.a.*标准菌株*SC5314*(ATCC MYA-2876)[13],保存于口腔疾病防治全国重点实验室。

CHX(购自MACKLIN,批号C804720-100)、保丽净(购自GSK,批号PD56312302153)、碘化丙啶(propidium, PI,购自MACKLIN,批号P796851)、荧光素二乙酸酯(fluorescein diacetate, FDA,购自MACKLIN,批号F689238)、无水葡萄糖(购自MACKLIN,批号D810588)、无水乙醇(购自MACKLIN,批号E708494)、体积分数为4%多聚甲醛(购自Sigma,批号8.18715)、YPD培养基(购自Sigma,批号Y1500),固体添加2%琼脂(购自Biofroxx,高温高压灭菌)、PBS(购自Gibco,批号10010023)、RPMI 1640培养基(购自Gibco,批号31800022)、细菌总RNA试剂盒(购自天根生化,批号DP430)、HiScript Ⅲ RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)(购自vazyme,批号R323-01)、SYBR® Premix Ex TaqTM试剂盒(购自TaKaRa,批号DRR041A)、MTT细胞增殖检测试剂盒(购自APE×BIO,批号K2249)。

1.2 成熟生物膜的形成

取10^6 mL^{-1} *C.a.*于RPMI 1640中加入12孔板。在孵箱(37 ℃,体积分数为3%CO_2)中孵育1 h,使真菌黏附至孔板底壁。去除培养基加入PBS洗孔,重复两次。向每孔中重新加入新鲜的RPMI 1640培养基。孔板在孵箱中孵育24 h,形成生物膜[14]。

1.3 持留菌的评估验证

1.3.1 最小抑菌浓度测定

取10^6 mL^{-1}的浮游*C.a.*加入孔板中,加入不同质量浓度(0~500 μg/mL)的CHX和保丽净,处理12 h后通过浊度检测对应药物的最小抑菌浓度(minimal inhibit concentration, MIC)[15]。

1.3.2 剂量依赖检测

去除已形成生物膜孔板中的培养基,轻轻加入PBS洗孔,重复两次。加入0~40 000 μg/mL的CHX和保丽净,培养24 h后用PBS轻轻冲洗,向每孔中再次加入PBS,使用超声仪超声10 min,吹打重悬生物膜。用PBS稀释后取100 μL涂布于YPD琼脂培养皿,将皿置于30 ℃下培养24 h后统计各皿中形成的菌落形成单位(colony forming unit, CFU),绘制剂量依赖性杀伤曲线[16-17]。

1.3.3 时间依赖检测

选用100倍MIC、10倍MIC浓度的CHX和保丽净处理生物膜(方法同1.3.2),同时设定无药处理组,检测培养0 h、1 h、2 h、3 h、6 h、12 h时各孔的CFUs,绘制时间依赖曲线[16]。

1.3.4 复苏评估与遗传测定

挑取1.3.3中处理12 h时持留菌菌落于新鲜的RPMI 1640培养基中继续培养12 h。测试复苏菌株的MIC(方法同1.3.1),并再次加入100倍MIC、10倍MIC清洁剂作用12 h,检测其CFUs。

1.3.5 镜下表征

荧光染色:诱导持留菌形成后去除上清,用PBS冲洗两遍后重悬生物膜。避光条件下加入100 μg/mL FDA和50 μg/mL PI作用3 h。将孔板置于共聚焦显微镜下放大10倍观察并进行10 μm层扫[16]。使用ImageJ软件对上(0~20 μm)、中(30~50 μm)、下(60~80 μm)层图片分割红/绿通道后选择荧光阈值,进行荧光强度分析。

扫描电镜下观察:在12孔板中的各孔放入细胞爬片,形成生物膜并在10倍MIC CHX和保丽净作用于生物膜12 h,诱导持留菌形成;处理12 h后将孔内培养基吸出,沿孔壁使用PBS清洗后用体积分数为4%多聚甲醛在室温下固定1.5 h,再次使用PBS清洗,而后逐步加入30%、

50%、70%、90%乙醇，每次间隔15min，最后加入无水乙醇完成脱水。取出细胞爬片于5000倍镜下观察[15]。

1.4　生物信息学分析

按照1.2中形成的生物膜，去除培养基洗孔后使用100倍MIC CHX处理2 h、6 h及无药对照的*C.a.*进行转录组测序，并进行差异基因GO和KEGG富集分析[17]。

采用细菌总RNA试剂盒依照说明书提取总RNA。使用NanoDrop 2000分光光度计(Thermo Scientific, USA)鉴定RNA纯度和定量，使用Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)评估RNA完整性。使用逆转录试剂盒纯化RNA并逆转录获得cDNA。使用SYBR® PremixEx Taq™试剂盒在LightCycler 480 Ⅱ上运行，反应条件见网络资源附件附表1。以18S为内参基因，检测白色念珠菌代谢及线粒体相关基因的表达，使用NCBI设计相关引物(网络资源附件附表2)，基因引物合成(擎科，中国)。计算基因相对表达量的公式是$2^{-\Delta\Delta Ct}$[18]。

使用MTT细胞增殖检测试剂盒进行持留菌的代谢检测。加入MTT工作溶液孵育3 h，得到紫色结晶后使用甲臜溶解液溶解2 h，于酶标仪570 nm下检测吸光度(A_{570})。

1.5　代谢干预机制验证

100倍MIC、10倍MIC浓度的CHX和保丽净处理1 h后将培养基换成加入0.5%无水葡萄糖的RPMI 1640溶液，在处理12 h后稀释并涂布平板，在30 ℃下孵育24 h进行菌落计数[16]。

1.6　统计学方法

每次实验均设3个重复，数据以$\bar{x} \pm s$表示。在剂量依赖曲线和时间依赖曲线的平台期分析中，采用单因素方差分析比较不同浓度组的活菌量。多重比较采用Bonferroni校正，比较次数根据具体分析确定，显著性水平设为$\alpha = 0.05$。如果经校正后的P值< 0.05，则认为数据结果差异具有统计学意义。复苏菌株与原始菌株、加糖组与对照组的组间比较首先通过F检验评估方差齐性；若数据满足方差齐性假设($P \geqslant 0.05$)，则采用标准的未配对双尾t检验；若方差不齐($P < 0.05$)，则采用经Welch校正的未配对双尾t检验。统计学意义阈值设定为$P < 0.05$；为控制多重比较误差，使用两阶段错误发现率(FDR)控制方法(Benjamini-Krieger-Yekutieli法)，设定FDR阈值为1%($q = 0.01$)。将q值$\leqslant 0.01$的差异定义为统计学发现(Discovery)。在GO分析中，统计每个GO条目中所包括的差异基因个数，并用超几何分布算法分析每个GO条目中差异基因富集的显著性，返回一个富集显著性的P值(利用Fisher精确检验分别对每个Term进行计算)，P值越低说明从统计学上看越显著。在KEGG分析中，使用超几何分布检验的方法分析每个通路条目中差异基因富集的显著性。基因表达中对每个基因的数据(对照组、2 h处理组、6 h处理组)进行单因素方差分析并采用Dunnett's多重比较检验，显著性水平设定为$\alpha = 0.05$。其他实验结果仅做统计描述。采用Graph prism 10.1.2(324)软件进行绘图和统计学分析。

2　结果

2.1　义齿清洁剂诱发*C.a.*生物膜产生持留菌的剂量和时间

CHX及保丽净对*C.a.*的MIC分别为100 μg/mL、200 μg/mL。通过剂量依赖曲线(图1A)可见，随着清洁剂浓度升高，生物膜中的CFUs下降，但在出现两个平台期(1 000 ~ 2 500 μg/mL和5 000 ~ 10 000 μg/mL)，此浓度区间

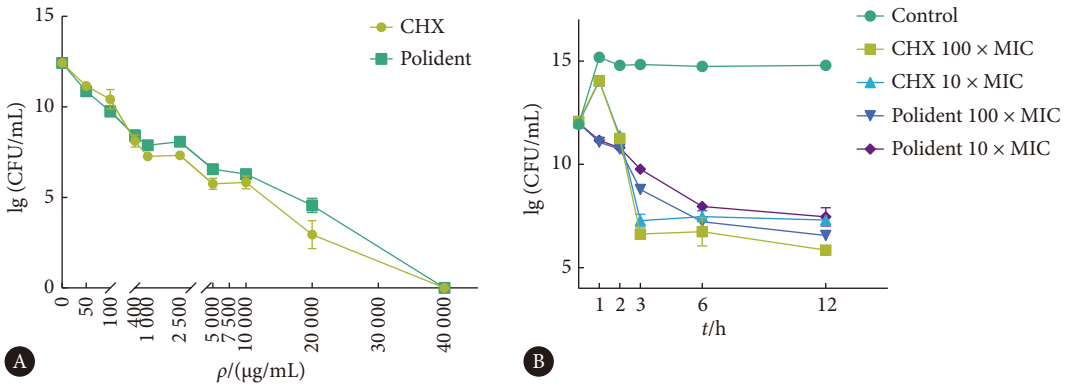

图 1　氯己定、保丽净诱导白色念珠菌生物膜形成持留菌的剂量和时间依赖曲线

Fig 1　Dose- and time-dependent curves of chlorhexidine and Polident for inducing the formation of persisters in *C.a.* biofilms

A, Dose-dependent curve ($n = 3$), The differences in CFUs between the 1 000-2 500 μg/mL and 5 000-10 000 μg/mL concentration groups were statistically significant (after Bonferroni correction, $P < 0.05$), but there was no statistically significant difference in CFUs among the concentration groups within each range. B, Time dependent curve ($n = 3$).

的活菌量与其他浓度组间的差异具有统计学意义(经Bonferroni校正, $P<0.05$),但该区间内各浓度组的活菌量差异无统计学意义,活菌数维持稳定;在浓度达到40 000 μg/mL时未检出CFUs。以上剂量依赖曲线表明,由于使用的剂量远高于各自的MIC,两种药物均可诱发生物膜中持留菌的产生。两个平台期对应的浓度范围导致杀菌效果出现停滞,更易诱导持留菌形成。

为进一步验证义齿清洁剂对*C.a.*持留菌的诱导作用,选用剂量依赖曲线中两个平台期的药物浓度(10倍与100倍MIC)的氯己定和保丽净处理不同时间,绘制时间依赖曲线(图1B)。发现无药对照组*C.a.*快速增殖后(培养1 h)进入平台期,CFU约10^{15} CFU/mL;CHX组CFU 1 h内短暂增加,1 ~ 3 h快速下降,各时段的活菌数的差异具有统计学意义(经Bonferroni校正, $P<0.05$);3 h后进入平台期并维持该水平,形成持留菌;保丽净组加药后CFU立即大幅下降,3 ~ 6 h降幅减弱,6 h后同样进入平台期并维持,诱导形成持留菌。说明CHX和保丽净处理3 h内快速杀菌,3 h后开始产生持留菌,且数量逐渐稳定。两种药物的持续处理并不能进一步杀灭生物膜中的持留菌,存活的持留菌是诱发感染和复发感染的重要因素。

2.2 持留菌的复苏验证

为进一步验证义齿清洁剂诱发持留菌是否为耐药菌,将形成的持留菌菌落移入新的培养基中培养12 h后进行MIC检测,发现其MIC与原菌株一致(图2A)。并将复苏后的持留菌菌落重新进行10倍和100倍MIC清洁剂处理24 h(图2B),经两阶段FDR校正(q阈值= 0.01)后,野生株与复苏株的相对存活率在各时间点的比较均未达到统计学发现标准(所有$q>0.01$),发现复苏菌株和原始菌株有相同的持留菌形成趋势。表明义齿清洁剂可诱发持留菌,而非产生耐药突变,且持留菌复苏后保留原来的特性。

2.3 持留菌形态及分布表征

无药处理的正常生物膜与10倍MIC清洁剂诱导的持留菌生物膜进行扫描电镜观察,发现正常成熟的生物膜中的菌丝相互交织,形成连续且规整的网状,极少量酵母细胞均匀分布其中(图3A)。10倍MIC的氯己定处理下,白色念珠菌生物膜中存在菌丝和酵母两种形态,菌丝交缠但生物膜结构松散,部分酵母相真菌边缘模糊(图3B)。而10倍MIC的保丽净处理下,白色念珠菌菌丝较短,菌丝量较少,且呈现出明显脱壁现象,外层可见透明状包膜,内有菌丝样条状结构(图3C)。

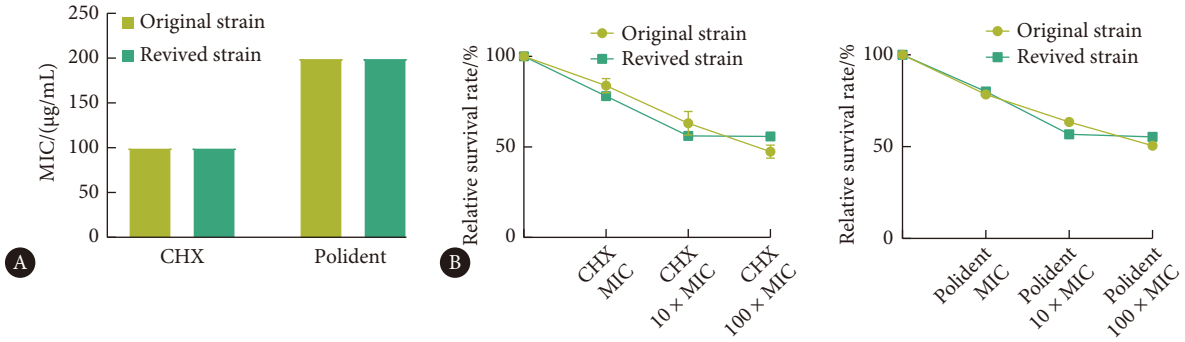

图 2 复苏菌株与原始菌株的 MIC 值

Fig 2 MIC values of the revived strain and the original strain

A, Minimum inhibitory concentrations (MIC) of chlorhexidine (CHX) and Polident for the revived and original strain (n = 3). B, Relative survival rate of persisters after treatment with 10-fold and 100-fold MIC concentrations of CHX and Polident for 24 h (n = 3). Relative survival rate = lg (CFU of drug-treated group)/lg (CFU of control group) × 100%.

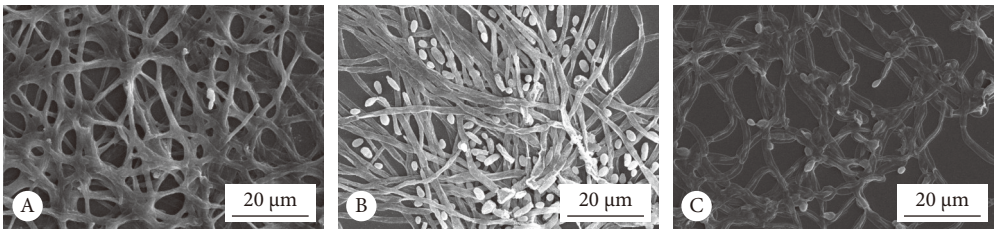

图 3 持留菌生物膜扫描电镜观察

Fig 3 Scanning electron microscopy observation of biofilms

A, Control group; B, 10 × MIC chlorhexidine; C, 10 × MIC Polident.

通过共聚焦显微镜观察(绿色荧光为活菌,红色荧光为死菌)发现,无药处理的正常生物膜(图4A),活菌主要分布在生物膜结构的中上层,下层的活菌量相对较少,中层活菌量最多。经10倍和100倍MIC氯己定和保丽净处理的生物膜(图4B ~ 4E),虽然活菌较少,但存活的持留菌也主要分布在生物膜的中上层,与正常生物膜相似(图5)。

2.4　持留菌降低代谢

为揭示义齿清洁剂诱发*C.a.*持留菌形成的机制,对100倍MIC氯己定处理2 h和6 h的*C.a.*进行转录组测序分析。两组上下调基因火山图如图6。2 h组有1 459个基因下调,1 362个基因上调;而6 h组有1 339个基因下调,1 186个基因上调。细胞内涉及代谢、细胞增殖等多种生物过程的多个基因表达发生变化,其中持留菌中参与三羧酸循环的异柠檬酸脱氢酶 1(*IDP1*)、异柠檬酸脱氢酶2(*IDP2*)以及糖异生途径中的关键酶磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(*PCK1*)下调、果糖-1,6-二磷酸酶(*FBP1*)下调;而

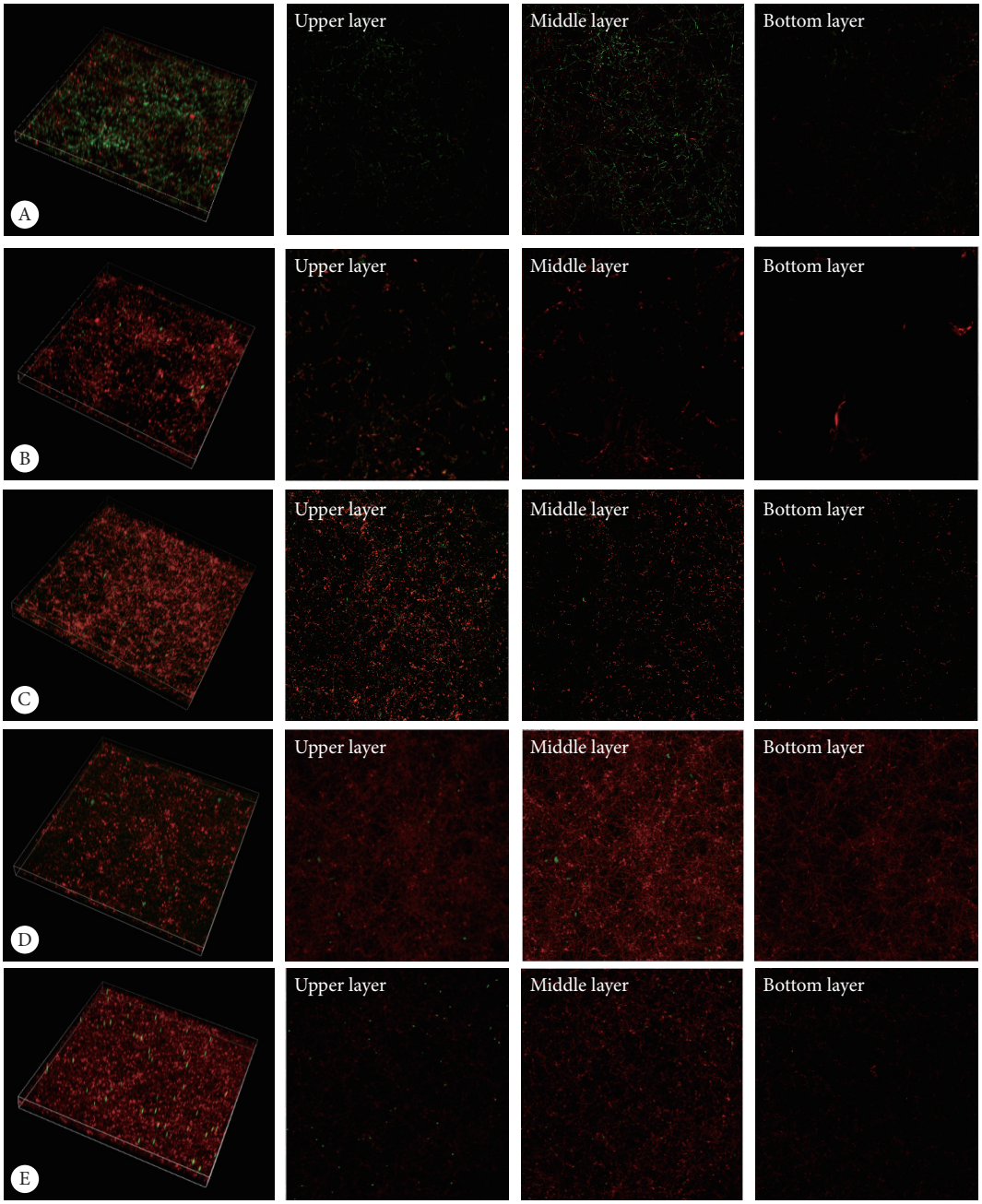

图 4　共聚焦显微镜下观察10倍和100倍MIC氯己定和保丽净处理的生物膜中的活菌(绿色荧光)情况(×10)

Fig 4　Observation of viable fungi (green fluorescence) in biofilms treated with chlorhexidine and Polident at 10 × and 100 × MIC concentrations under confocal microscopy (original magnification × 10)

A, Control group; B, 100 × MIC chlorhexidine; C, 10 × MIC chlorhexidine; D, 100 × MIC Polident; E, 10 × MIC Polident.

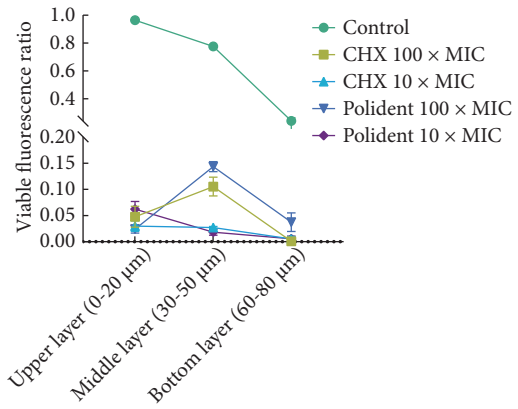

图 5 白色念珠菌生物膜在不同浓度药物处理下的活菌荧光强度占比

Fig 5 Proportion of viable fluorescence intensity in *C.a.* biofilms treated with various drug concentrations

Viable fluorescence proportion = Viable fluorescence intensity/(Viable fluorescence intensity + Dead fluorescence intensity). $n = 3$.

糖酵解途径中的关键酶烯醇化酶(*ENO1*)、己糖激酶2(*HXK2*)、磷酸丙糖异构酶(*TPI1*)上调,而氧化磷酸化中的琥珀酸脱氢酶(*SDH2*)下调。两组相关上下调基因火山图见图6,实时定量逆转录聚合酶链式反应验证关键基因如图7。

通过对差异表达基因进行GO富集分析,筛选三种分类中对应PopHits≥5的GO条目,按照每个条目对应的$-\log_{10}P$由大到小排序(详见网络资源附件附图1),发现加药后*C.a.*展现出动态的代谢调整与应激适应:在加药2 h内,*C.a.*通过下调线粒体电子传递链、核糖体组装、氨基酸生物合成及翻译过程,迅速降低能量代谢和蛋白质合成活性,同时激活氧化应激系统和蛋白酶体介导的蛋白质降解;并转向增强低产能的糖酵解过程。随着加药时间延长至6 h,*C.a.*的线粒体功能紊乱加剧,表现为三羧酸循环受到抑制和呼吸链复合体Ⅳ功能下调。值得注意的是,在加药两个时间点下蛋白酶体活性与氧化还原酶功能表现为持续激活,而糖酵解与DNA修复途径的强化则呈现时间依赖性增强。

筛选对应PopHits≥ 5的Pathway条目,按照每个条目对应的$-\log_{10}P$由大到小排序,KEGG分析结果(详见网络资源附件附图2)与GO分析相似,在加药后,*C.a.*迅速启动糖酵解/糖异生通路,持续下调线粒体有氧呼吸的关键通路,同时增强淀粉和蔗糖代谢以维持碳源供应;并同步激活DNA复制、重组及错配修复通路,配合蛋白降解和吞噬体功能强化以维持基础稳态。而加药时间为6 h后,新增的线粒体能量代谢持续下调与脂肪酸延长通路抑制标志了线粒体功能紊乱加剧和脂质合成受限,迫使细胞更依赖糖酵解途径,并可能通过戊糖-葡萄糖醛酸转化平衡氧化应激。

为了进一步验证持留菌代谢变化,利用MTT试剂盒检测发现,10倍和100倍浓度处理组的代谢能力均低于对照组,例如100倍浓度氯己定处理下则降为对照组的10%(图8),与转录组结果一致,说明持留菌在清洁剂处理下代谢能力降低。

2.5 外源添加葡萄糖激活持留菌代谢

如图9所示,高浓度氯己定药物处理下,在外源添加0.5%的葡萄糖后生物膜中的持留菌存活量降低2 ~ 3倍;保丽净处理下持留菌存活率也下降。说明白色念珠菌通过降低能量代谢,形成持留菌抵抗高浓度的义齿清洁剂,而通过外源加葡萄糖激活持留菌代谢,可增强义齿清洁剂对持留菌的杀灭效果。

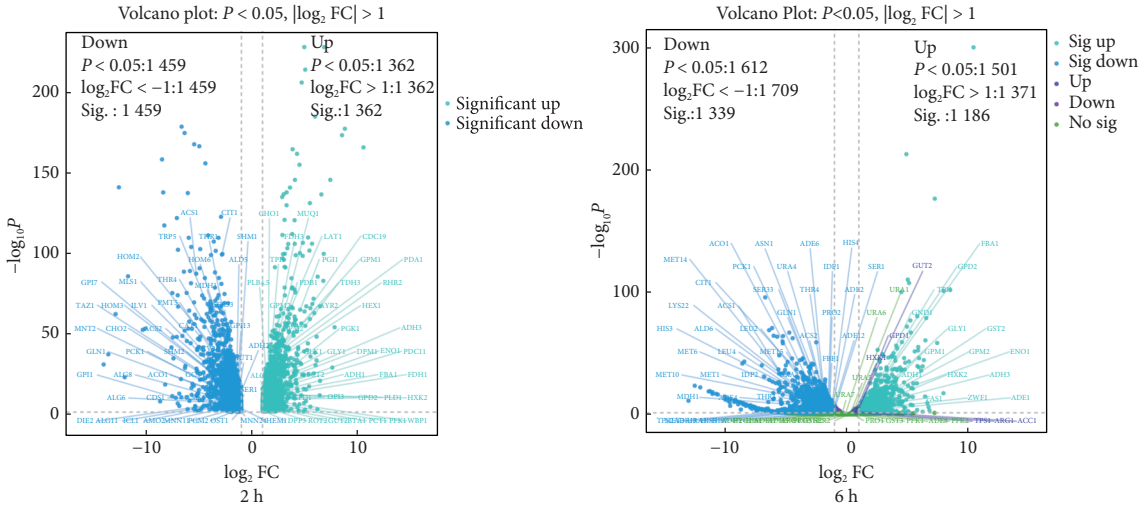

图 6 100倍MIC氯己定处理2 h和6 h的生物膜中的差异表达基因及火山图

Fig 6 Differentially expressed genes and volcano plot in biofilms treated with 100-fold MIC chlorhexidine for 2 hours and 6 hours

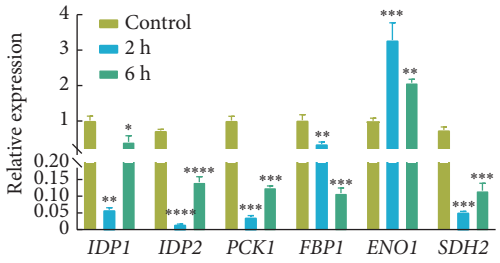

图 7 关键基因验证

Fig 7 Validation of key genes

$n = 3$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\,1$, vs. control group.

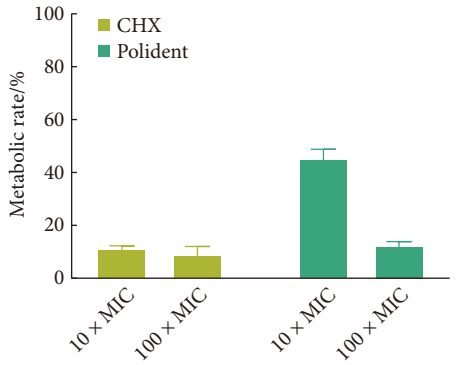

图 8 持留菌代谢能力

Fig 8 Metabolic rate of persisters

Metabolic rate = (A_{570} of drug-treated group − A_{570} of blank group) / [the average value of (A_{570} of control group − A_{570} of blank group)] × 100%. $n = 3$.

3 讨论

*C.a.*附着于义齿上形成生物膜是DS的重要诱因之一。清洁义齿有机械和化学两种方法。由于义齿材料有一定的孔隙率，使用研磨工具与材料进行清洁会增加义齿表面的粗糙度，使*C.a.*等致病微生物更易附着[8]。同时即使结合化学方法消灭了义齿生物膜内的大部分微生物，小部分存活的持留微生物还将继续诱发宿主感染，为新定植者提供额外的附着位点和营养来源[19]。本研究采用De Brucker K等提出的“真菌黏附-形成生物膜-高浓度药物处理-表征测试”的方案[20]，系统探究了*C.a.*在义齿清洁药物诱导下产生持留菌的作用机制。

氯己定的杀菌原理主要是进入真菌使真菌破裂、蛋白沉淀、造成活性氧（reactive oxygen species, ROS）积累等[21]；而保丽净作为过氧化物泡腾片，在水中溶解后释放出具有强氧化性的活性氧物质从而起到杀菌作用。在共聚焦显微镜下中得到三维模型和层扫图片，活死菌多于中上层被染色，其比例符合持留菌存活率，与既往研究中一致[14]。这表明在高浓度氯己定和保丽净处理下，持留菌并非聚集在药物难以抵达的深层，而是中上层的白色念珠菌接触杀菌药物后，激活持留机制，形成持留菌，抵抗高浓度杀菌药物而生存。真菌持留菌常见于非增殖状态的生物膜环境中，其形成与进入一种类似G_0期的休眠状态和下调TORC1等关键营养感知与代谢通路密切相关[22-23]，通过比较加药2 h与6 h的转录组变化，发现*C.a.*在6 h时持续降低有氧呼吸能力、转向糖酵解途径，应激响应呈现时间依赖性演进。2 h内的反应以代谢抑制与急性应激激活为主，表现为线粒体呼吸下调、糖酵解增强以及氧化应激系统启动；至6 h三羧酸循环与脂肪酸合成持续抑制，且DNA修复与糖酵解途径强化，其通过强化低效产能途径与修复机制来适应长期压力，支持*C.a.*在药物压力下进入并维持持留状态。除线粒体结构和功能的显著变化之外，核糖体在长时间应激状态下的变化也值得关注[24]，后期可通过单细胞测序技术对同源细胞群体的亚群组成和表型异质性进行研究。

清除持留菌通常有两种途径，即直接靶向和“唤醒杀灭”[25]。针对持留菌代谢下调，本研究设计添加外源葡萄糖以激活持留菌的代谢，从而提高持留菌对义齿清洁剂的敏感性。本研究涉及的持留机制主要针对体外义齿清洁中产生的持留菌，义齿清洁剂及干预措施不涉及细胞及体内组织的接触，但未被清除的持留菌可能在口腔环境中恢复代谢导致进一步感染，因此通过干预措施降低持留菌数量有助于减少DS的复发。同时葡萄糖残留于义

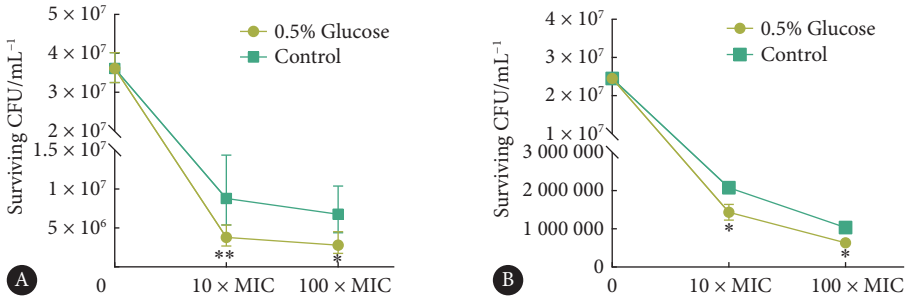

图 9 外源葡萄糖对氯己定（A）和保丽净（B）持留菌的影响

Fig 9 Effect of exogenous glucose on the persisters by chlorhexidine (A) and Polident (B)

$n = 3$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, vs. control group.

齿会造成破坏口腔微生态、促进*C.a.*再增殖、促发龋病的风险[26],因此在临床转化中须注意实施干预措施后义齿的清洁与防护,以平衡疗效与潜在风险。

综上所述,高浓度氯己定和保丽净处理可诱发白色念珠菌生物膜形成持留菌,该持留菌主要分布在生物膜中上层,其在药物移除后可复苏,增加复发感染风险。持留菌通过下调三羧酸循环和有氧呼吸,转入糖酵解途径维持低代谢休眠状态,外源补充葡萄糖激活代谢后,可增强药物杀灭效果,降低持留菌存活率。本研究为白色念珠菌持留菌作用机制以及持留菌临床清除提供了科学参考。

* * *

作者贡献声明 林祎璠负责论文构思、数据审编、调查研究、研究方法、验证和初稿写作,程磊、周学东、廖生和朱卓立负责经费获取、研究项目管理、提供资源和监督指导,任彪负责论文构思、数据审编、经费获取、研究方法、研究项目管理、提供资源、监督指导和审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊,且对将要发表的版本进行最终定稿,并同意对工作的所有方面负责。

Author Contribution LIN Yifan is responsible for conceptualization, data curation, investigation, methodology, validation, and writing--original draft. CHENG Lei, ZHOU Xuedong, LIAO Ga, and ZHU Zhuoli are responsible for funding acquisition, project administration, resources, and supervision. REN Biao is responsible for conceptualization, data curation, funding acquisition, methodology, project administration, resources, supervision, and writing--review and editing. All authors consented to the submission of the article to the Journal. All authors approved the final version to be published and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

利益冲突 本文作者周学东是本刊编委会编委,程磊是本刊编委会青年编委。该文在编辑评审过程中所有流程严格按照期刊政策进行,且未经其本人经手处理。除此之外,所有作者均声明不存在利益冲突。

Declaration of Conflicting Interests ZHOU Xuedong is a member of the Editorial Board of the journal. CHENG Lei is a member of the Junior Editorial Board of the journal. All processes involved in the editing and reviewing of this article were carried out in strict compliance with the journal's policies and there was no inappropriate personal involvement by the authors. Other than this, all authors declare no competing interests.

参 考 文 献

[1] LEWIS K. Persister Cells. Annu Rev Microbiol, 2010, 64(1): 357-372. doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134306.

[2] JU Y, LONG H, ZHAO P, *et al*. The top 100 cited studies on bacterial persisters: A bibliometric analysis. Front Pharmacol, 2022, 13: 1001861. doi: 10.3389/fphar.2022.1001861.

[3] MAHERONNAGHSH M, FATAHINIA M, DEHGHAN P, *et al*. Identification of *Candida* Species and Antifungal Susceptibility in Cancer Patients with Oral Lesions in Ahvaz, Southern West of Iran. Adv Biomed Res, 2020, 9: 50. doi: 10.4103/abr.abr_214_19.

[4] BRADIĆ-VASIĆ M, PEJČIĆ A, KOSTIĆ M, *et al*. Influence of local denture-related factors on the inflammatory marker levels in patients with denture stomatitis. BMC Oral Health, 2025, 25(1): 744. doi: 10.1186/s12903-025-06160-6.

[5] SINGH H P, BANSAL P, HALAPPA T S. Interrelationship between *Candida* Colonization, Dentures, and Mucosal Tissue Inflammation in the Pathogenesis of Denture Stomatitis. J Pharm Bioallied Sci, 2024, 16(Suppl 1): S520-S523. doi: 10.4103/jpbs.jpbs_841_23.

[6] 廖敏, 程磊, 周学东, 等. 白色念珠菌对口腔黏膜疾病恶性转化作用的研究进展. 华西口腔医学杂志, 2020, 38(4): 431-437. doi: 10.7518/hxkq.2020.04.014.
LIAO M, CHENG L, ZHOU X D, *et al*. Research progress of *Candida albicans* on malignant transformation of oral mucosal diseases. West China J Stomatol, 2020, 38(4): 431-437. doi: 10.7518/hxkq.2020.04.014.

[7] 李瑞莲, 王倬, 杜昱光. 白色念珠菌生物被膜研究进展. 微生物学报, 2017, 57(8): 1206-1218. doi: 10.3969/j.issn.2096-0387.2021.03.044.
LI R L, WANG Z, DU Y G. Recent progress in *Candida albicans* biofilm. Acta Microbiol Sin, 2017, 57(8): 1206-1218. doi: 10.3969/j.issn.2096-0387.2021.03.044.

[8] McREYNOLDS D E, MOORTHY A, MONELEY J O, *et al*. Denture stomatitis—An interdisciplinary clinical review. J Prosthodont, 2023, 32(7): 560-570. doi: 10.1111/jopr.13687.

[9] Le BARS P, KOUADIO A A, BANDIAKY O N, *et al*. Host's Immunity and *Candida* Species Associated with Denture Stomatitis: A Narrative Review. Microorganisms, 2022, 10(7): 1437. doi: 10.3390/microorganisms10071437.

[10] SULTAN A S, RIZK A M, VILA T, *et al*. Digital Design of a Universal Rat Intraoral Device for Therapeutic Evaluation of a Topical Formulation against *Candida*-Associated Denture Stomatitis. Infect Immun, 2019, 87(12): e0061. doi: 10.1128/iai.00617-19.

[11] LAFLEUR M D, QI Q, LEWIS K. Patients with Long-Term Oral Carriage Harbor High-Persister Mutants of *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(1): 39-44. doi: 10.1128/AAC.00860-09.

[12] RIBEIRO ROCHA G D S, NEVES DUARTE T, De OLIVEIRA CORRÊA G, *et al*. Chemical cleaning methods for prostheses colonized by *Candida* spp. : A systematic review. J Prosthet Dent, 2020, 124(6): 653-658. doi: 10.1016/j.prosdent.2019.10.004.

[13] FONZI W A, IRWIN M Y. Isogenic Strain Construction and Gene Mapping in *Candida Albicans*. Genetics, 1993, 134(3): 717-728. doi: 10.1093/genetics/134.3.717.

[14] LAFLEUR M D, KUMAMOTO C A, LEWIS K. *Candida albicans* Biofilms Produce Antifungal-Tolerant Persister Cells. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(11): 3839. doi: 10.1128/AAC.00684-06.

[15] YE X, LIU Y, CHEN D, *et al*. Moxidectin elevates *Candida albicans* ergosterol levels to synergize with polyenes against oral candidiasis. Appl Microbiol Biotechnol, 2024, 108(1): 509. doi: 10.1007/s00253-024-13343-8.

[16] JIANG Y L, QIU W, ZHOU X D, *et al*. Quaternary ammonium-induced multidrug tolerant *Streptococcus mutans* persisters elevate cariogenic virulence *in vitro*. Int J Oral Sci, 2017, 9(12): e7. doi: 10.1038/ijos.2017.46.

[17] De BRUCKER K, De CREMER K, CAMMUE B P A, *et al*. Protocol for Determination of the Persister Subpopulation in *Candida Albicans* Biofilms. Methods Mol Biol, 2016, 1333: 67-72. doi: 10.1007/978-1-4939-2854-5_6.

[18] LIAO M, XIA X, MENG Q, *et al*. Holotoxin A1 from Apostichopus japonicus inhibited oropharyngeal and intra-abdominal candidiasis by inducing oxidative damage in *Candida albicans*. Br J Pharmacol, 2024, 181(12): 1857-1873. doi: 10.1111/bph.16333.

[19] ZHOU Y, YANG H, ZHOU X, *et al*. Lovastatin synergizes with itraconazole against planktonic cells and biofilms of *Candida albicans* through the regulation on ergosterol biosynthesis pathway. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(12): 5255-5264. doi: 10.1007/s00253-018-8959-8.

[20] BUKHARI M A, ALGAHTANI M A, ALSUWAILEM F A, *et al*. Epidemiology, etiology, and treatment of denture stomatitis. Int J Community Med Public Health, 2022, 9(2): 981. doi: 10.1111/j.1532-849x.2011.00698.x.

[21] JIANG Q, DENG Y, Li S, *et al*. Sub-lethal concentrations of chlorhexidine inhibit *Candida albicans* growth by disrupting ROS and metal ion homeostasis. J Oral Microbiol, 2023, 15(1): 2278937. doi: 10.1080/20002297.2023.2278937.

[22] BOJSEN R, REGENBERG B, GRESHAM D, *et al*. A common mechanism involving the TORC1 pathway can lead to amphotericin B-persistence in biofilm and planktonic Saccharomyces cerevisiae populations. Sci Rep, 2016, 6: 21874. doi: 10.1038/srep21874.

[23] WANG R, LV J, CHEN L, *et al*. Antifungal persistence: Clinical relevance and mechanisms. PLoS Pathog, 2025, 21(9): e1013456. doi: 10.1371/journal.ppat.1013456.

[24] DUMEAUX V , MASSAHI S , BETTAUER V , *et al*. *Candida albicans* exhibits heterogeneous and adaptive cytoprotective responses to antifungal compounds. eLife, 2023, 12: e81406. doi: 10.7554/eLife.81406.

[25] LU K Y, YANG X, ELDRIDGE M J G, *et al*. A host-directed adjuvant sensitizes intracellular bacterial persisters to antibiotics. Nat Microbiol, 2025, 10(11): 3013-3025. doi: 10.1038/s41564-025-02124-2.

[26] YANG J, ZHANG H, SUN S, *et al*. Autophagy and Hsp70 activation alleviate oral epithelial cell death induced by food-derived hypertonicity. Cell Stress Chaperones, 2020, 25(2): 253-264. doi: 10.1007/s12192-020-01068-2.

（2025－10－29收稿，2026－01－08修回）

编辑　汤　洁

开放获取　本文使用遵循知识共享署名—非商业性使用4.0国际许可协议（CC BY-NC 4.0），详细信息请访问https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/。

OPEN ACCESS　This article is licensed for use under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC 4.0). For more information, visit https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.

© 2026《四川大学学报(医学版)》编辑部

Editorial Office of *Journal of Sichuan University (Medical Sciences)*