

• 论 著 •

巴西苏木素对甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌抑制作用机制研究*

简永欢,曾婷婷,林润娴,晏 嘉,刘君豪,黎梓楠,黄惠吟,周飘雁,徐令清[△]
广州医科大学附属第六医院/清远市人民医院检验科,广东清远 511518

摘 要:**目的** 探讨巴西苏木素对甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)的体外抑制作用及其机制。**方法** 收集临床分离的金黄色葡萄球菌,经 VITEK 2 Compact 全自动微生物分析仪鉴定为 MSSA,采用二倍稀释法和平板法测定巴西苏木素对其的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC);采用绘制生长曲线方法观察巴西苏木素对其生长的影响作用;采用油镜法观察巴西苏木素对 MSSA 形态的影响;采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)测定巴西苏木素对 MSSA 可溶性蛋白的影响;采用紫外分光光度计测定其 DNA 及 RNA 等大分子物质的外渗水平;通过测量 MSSA 产溶血环的大小来反映巴西苏木素对 α-溶血素分泌的影响;通过建立 MSSA 生物膜模型、计算生物膜内存活菌的数量反映巴西苏木素对 MSSA 生物膜的作用效果。**结果** 巴西苏木素对 MSSA 的 MIC 为 65 μg/mL,MBC 为 130 μg/mL;生长曲线显示巴西苏木素浓度增加,对 MSSA 的抑制作用增强;镜下形态学的改变表明,药物浓度增加,抑制作用增强,表现为菌体数量减少、干扰菌体繁殖时的聚集;SDS-PAGE 蛋白电泳结果表明药物浓度增加,对 MSSA 可溶性蛋白形成的抑制作用增强;巴西苏木素对 MSSA 的 DNA、RNA 的外渗有显著影响($P<0.05$),药物浓度增加,外渗量增大;药物浓度增加,溶血环直径减小;药物浓度增加,MSSA 生物膜内存活菌量减少。**结论** 巴西苏木素对 MSSA 具有极好的抑制作用且具有浓度依赖性,可能通过减少其可溶性蛋白的形成、改变细胞膜的通透性、影响 MSSA α-溶血素的活性,从而起到对 MSSA 的杀灭作用;药物也可能通过破坏生物膜,减少生物膜内 MSSA 的存活数量来发挥抑制作用。

关键词:甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌; 巴西苏木素; 抑制作用; 机制研究
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.02.006 **中图法分类号:**R446.5
文章编号:1673-4130(2023)02-0160-07 **文献标志码:**A

Study on the mechanism of Brazilian hematoxylin inhibitory effect on
methicillin-sensitive Staphylococcus aureus*

JIAN Yonghuan,ZENG Tingting,LIN Runxian,YAN Jia,LIU Junhao,LI Zinan,
HUANG Huiyin,ZHOU Piaoyan,XU Lingqing[△]

Department of Clinical Laboratory,the Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University/
Qingyuan People's Hospital,Qingyuan,Guangdong 511518,China

Abstract: Objective To explore the in vitro inhibitory effect of Brazilian hematoxylin on Methicillin-Sensitive Staphylococcus Aureus (MSSA) and its mechanism. **Methods** The clinically isolated Staphylococcus aureus, which were identified as MSSA by the VITEK 2 Compact automatic microbial analyzer were collected, and the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of Brazilian hematoxylin were determined by the double dilution method and the plate method; the growth curve method was used to observe the effect of Brazilian hematoxylin on its growth; oil microscope was used to observe the effect of Brazilian hematoxylin on its morphological; SDS-PAGE protein electrophoresis Technology was used to determine the influence of Brazilian hematoxylin on MSSA soluble protein; UV spectrophotometer was used to measure the expression level of extravasation of DNA and RNA and other macromolecular substances; the size of the hemolytic ring produced by MSSA was measured to reflect the effect of the drug on the secretion of α-hemolysin; the MSSA biofilm model was established and the number of viable bacteria in the biofilm was calculated to reflect the effect of the drug on the MSSA biofilm. **Results** The MIC of Brazilian hematoxylin for MSSA is 65 μg/mL, and the MBC is 130 μg/mL; the growth curve shows that the greater the concentra-

* 基金项目:广东省中医药局项目(20201490);广东省科技创新战略专项基金(DZXQY002);广东省医学科学技术研究项目(A2021490, B2019187);清远市人民医院医学科研基金项目(20190209);2022—2023 年度广州医科大学大学生科技创新项目(2021A098);2021—2022 年度广州医科大学大学生科技创新项目(2020ALY07);清远市科技局基金项目(20191110)。
作者简介:简永欢,男,本科在读,主要从事菌体耐药机制的研究。 [△] 通信作者,E-mail:13927663288@126.com。

tion of Brazilian hematoxylin, the stronger the inhibitory effect on MSSA; the morphological changes under the microscope showed that with the increase of drug concentration, the inhibitory effect was enhanced, which showed that the number of bacteria decreased and interfered with the aggregation of bacteria during reproduction; SDS-PAGE protein electrophoresis results showed that the higher the drug concentration, the stronger the inhibitory effect on the formation of MSSA soluble protein; Brazilian hematoxylin had a significant effect on the extravasation of MSSA DNA and RNA ($P < 0.05$), the higher the drug concentration, the greater the extravasation; the diameter of the hemolytic ring also decreased with the increase of the drug concentration; the number of viable bacteria in the MSSA biofilm also decreased with the increase of the drug concentration.

Conclusion Brazilian hematoxylin has an excellent inhibitory effect on MSSA and is concentration-dependent. It may kill MSSA by reducing the formation of its soluble protein, changing the permeability of cell membrane and affecting the activity of MSSA α -Hemolysin activity. The drug may exert an inhibitory effect by destroying the biofilm and reducing the survival number of MSSA in the biofilm.

Key words: methicillin-sensitive *Staphylococcus Aureus*; Brazilian hematoxylin; inhibition; mechanism research

金黄色葡萄球菌是一种人畜共患病原菌,广泛存在于自然环境中,可引起食物中毒甚至造成败血症、骨髓炎等疾病^[1-2],且其为临床感染中最为常见的致病菌之一,可致化脓性关节炎、皮肤脓肿、肺炎、心膜炎及菌血症等^[3]。大量抗菌药物在临床上的使用虽在一定程度上治愈了金黄色葡萄球菌所致的疾病,但同时也使其耐药情况越来越严重。超级细菌——耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的出现,使得治疗难度和医疗成本日益增加,给临床抗感染治疗带来了新的挑战^[3]。

巴西苏木素又称巴西红木素、苏方木素,为中药苏木的提取物,是中药苏木的主要活性成分之一^[4-5]。现代研究表明巴西苏木素有较强的药理活性,如抗肿瘤、抗炎、抗关节炎、降血糖、免疫抑制等^[6-7]。相关报道显示,巴西苏木素在抗菌方面 also 具有很好的效用,其主要成分即为巴西苏木素与原苏木素 B^[8]。也有报道直接指出,巴西苏木素对金黄色葡萄球菌有较强的抑菌作用,不仅能逆转 MRSA 对阿米卡星和庆大霉素的耐药性,而且能抑制金黄色葡萄球菌生物膜的形成并破坏成熟的生物膜从而治疗细菌感染所致的疾病;同时,金黄色葡萄球菌对其不易产生耐受性,使其在临床上具有很大的应用价值^[9-10]。由此可见,巴西苏木素应用于金黄色葡萄球菌感染所致疾病的治疗具有极大的研究开发潜力,但巴西苏木素作用于金黄色葡萄球菌的具体机制却缺乏研究。本文探究二者之间相互作用机制,在发掘中药的抗菌疗效的同时以期为指导临床用药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 本院 2020 年检验科微生物室分离收集的编号为 5804 的金黄色葡萄球菌,所选菌株经 VITEK 2 Compact 全自动微生物分析仪(法国生物梅里埃公司)鉴定,为甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA),鉴定证实后以脱脂牛奶于 -80°C 保存备用。质控菌株为 ATCC 25923 金黄色葡萄球菌。

1.1.2 试剂与仪器 巴西苏木素(成都曼斯特生物科技有限公司);血平板(江门市凯林贸易有限公司);肉汤培养基与 MH 琼脂平板(广州市迪景生物科技有限公司);二甲基亚砜(DMSO)(天津市富宇精细化工有限公司);96 孔板(北京欣兴强森生物科技有限公司);革兰染液 IFA-110T-8 型微生物培养箱(艺思高科技有限公司);DHP-9145A 电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);DensiCHEK Plus 电子比浊仪(生物梅里埃美国股份有限公司);uLtiMate 3000 型高效液相色谱仪(赛默飞世尔科技有限公司);美国 essenscien ELF6 迷你离心机(广州柯桥实验技术设备有限公司);KDC-40 低速离心机(安徽中科中佳);TY-80A 脱色摇床(常州华冠仪器制造有限公司);台式高速冷冻离心机(德国 SIGMA 1-16K);恒温混匀仪(德国 eppendorf ThermoMixer);凝胶成像系统(美国伯乐);基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF MS,德国布鲁克公司);酶标仪(德国 BMGSpectrostarNamo 全波长);BIOMATE 160 紫外分光光度计(赛默飞世尔科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 准备单菌种 取编号 5804 牛奶保存基中金黄色葡萄球菌临床分离菌种的 $10\ \mu\text{L}$ 菌液,移至血平板,于微生物培养箱中 37°C 恒温培养 24 h。使用时间飞行质谱进行鉴定。

1.2.2 菌液制备 挑取血平板培养 24 h 后的单个 MSSA 菌落,置于装有生理盐水的试管中,用比浊仪将菌液浓度校正为 0.5 麦氏浊度。每管取出 $30\ \mu\text{L}$ 稀释菌液,再用蒸馏水分别稀释 100、1 000、10 000 倍备用。

1.2.3 准备药液 将巴西苏木素溶解于 DMSO,调整药液质量浓度为 $66.7\ \text{mg/mL}$ 。用试管将 $66.7\ \text{mg/mL}$ 巴西苏木素的 DMSO 溶液用肉汤按 1 : 128 稀释成质量浓度为 $0.521\ \text{mg/mL}$ 的药液备用。

1.2.4 采用 K-B 纸片法 对巴西苏木素抑制 MSSA 作用进行初筛 用无菌棉拭子把 0.5 麦氏浊度菌液

均匀涂布于 MH 培养基上,均匀地贴上两张直径为 6 mm 的无菌纸片,取 5 μ L 66.7 mg/mL 药液滴加在纸片上,另一纸片加 5 μ L DMSO 作为对照。将培养皿于 37 $^{\circ}$ C 条件下培养 24 h,取出观察,用卡尺测量抑菌圈直径。

1.2.5 测定最小抑菌浓度(MIC)及最小杀菌浓度(MBC) 采用二倍稀释法测定 MIC;取制备好的三种不同浓度的菌液,各设计三个组,每组取 8 个灭菌试管,编号 1~8 号。先于每个试管中加入 0.5 mL 的肉汤(第 1 号管再另外加入 0.5 mL 的 1:128 药液),1~6 号试管倍比稀释,第 7 号试管加入 0.5 mL 1:128 的药液和 0.5 mL 肉汤作为阳性对照组。1~6 号管每管再加入 0.5 mL 待用菌液,混匀(药液终浓度为 0.130、0.065、0.033、0.016、0.008、0.004 mg/mL,每管内混液共 1 mL)。在第 8 号试管中加入 0.5 mL 的肉汤培养基和 0.5 mL 的菌液作为阴性对照。于微生物培养箱中 37 $^{\circ}$ C 恒温培养 24 h。取出培养后的菌液 20 μ L 平板划线接种至血平板,培养 24 h,观察菌落生长情况。

1.2.6 巴西苏木素对 MSSA 生长曲线的测定 调整菌液浓度(同上述步骤配成 0.5 麦氏浊度后,将菌液浓度稀释成 1×10^6 CFU/mL)。取盛有等量(3 mL)药液的试管 3 个,药液浓度为 1/2 MIC、2 MIC、4 MIC,各加入 3 mL 上述菌液,使药液终浓度为 1/4 MIC、1 MIC、2 MIC;再取一支试管加入 3 mL 肉汤和 3 mL 菌液作为阴性对照组。37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下摇床培养,每隔 4 h 取出 200 μ L 加进 96 孔板,用酶标仪测吸光度(A_{600})值,记录数据,绘制曲线。

1.2.7 MSSA 形态学改变的观察(同抑菌生长曲线同时) 取 1.2.6 步骤中各时段培养的菌液 20 μ L 直接涂片,并进行革兰染色,在镜下观察细胞形态,拍照记录。

1.2.8 巴西苏木素对 MSSA 可溶性蛋白的影响 参照李妍等^[11]的方法。采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)图谱观察巴西苏木素对 MSSA 可溶性蛋白的影响。药液与菌液混合培养同 1.2.6。将上述四组菌液置于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床培养 16 h,随后于 $3\ 155 \times g$ 离心 10 min,除去上清液,收集菌体;加入 4 mL PBS 缓冲溶液并混匀并洗涤,离心完去上清,再加入 2 mL PBS 混匀,各样本取 1 mL 加入 EP 管, $5\ 560 \times g$ 离心 5 min,去上清,收集菌体,调整菌液浓度一致并重悬于 160 μ L PBS,加入 40 μ L 蛋白上样缓冲液混匀;在转速 300 r/min 的金属浴中处理 10 min,待冷却下来继续 $13\ 350 \times g$ 离心 10 min,取上清液备用。选用 12% 分离胶,5% 浓缩胶,上样 20 μ L 进行 SDS-PAGE 电泳。经考马斯亮蓝染色 1 h,去离子水脱色,显示蛋白谱带,用凝胶成像系统观察蛋白谱带。

1.2.9 DNA 及 RNA 等大分子物质外渗水平检测 各取 0.5 麦氏浊度的菌液 1 mL 分别加入 2 支装有 1

mL 不同浓度药液的试剂管中,使药物终浓度为 1/2 MIC、1 MIC,同时以不加药为对照;混匀后 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。取样 500 μ L,进行 4 500 r/min 离心 10 min 后,吸取上清液 200 μ L 于紫外分光光度计中,检测 260 nm 处上清液的 A 值。

1.2.10 巴西苏木素对 MSSA 产溶血环的影响 各取 0.5 麦氏浊度 MSSA 菌悬液 0.5 mL,加入 0.5 mL 不同浓度的巴西苏木素,不加药为对照组,使药液终浓度为 1/4 MIC、1/2 MIC、2 MIC;放置 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 12 h。取 2 μ L 培养好的菌悬液,等距离地点样在血平板上;随后将平板倒置,继续放于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 12 h。取出平板,对金葡菌产生的溶血环进行拍照测量并记录。

1.2.11 巴西苏木素对 MSSA 生物膜内存活菌量研究 参照覃静等^[12]的方法。取 0.5 麦氏浊度 MSSA 菌悬液,以每孔 200 μ L 加入到 96 孔细胞培养板中,37 $^{\circ}$ C 培养 48 h,用无菌 PBS 溶液洗涤,得到 MSSA 生物膜模型。

建立生物膜的每孔中以加入 200 μ L 浓度分别为 1/4 MIC、1/2 MIC、1 MIC、2 MIC 巴西苏木素的肉汤培养基为实验组,不加药为对照组,37 $^{\circ}$ C 培养 12 h。倒掉孔内培养物,每孔用无菌 PBS 洗涤,再用 200 μ L 无菌 PBS 重悬,于振荡器振荡超声 10 min,结束后将混合液用生理盐水进行稀释(稀释倍数为 10^6)。随后取 10 μ L 分 3 次滴加在 MH 琼脂培养基上并涂板,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,记录 3 个培养基菌落数的平均值并换算成 CFU/mL,实验重复 3 次。(以培养时巴西苏木素浓度为横坐标,以细菌数量的对数值为纵坐标,绘制生物膜内细菌存活数量图。)计算公式 $\text{CFU/mL} = \text{同一稀释度 3 个平板菌落的平均数} \times \text{稀释倍数} \times 100$ 。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示。采用单因素方差分析(ANOVA)进行组间两两比较,以 $P < 0.05$,为差异有统计学意义。

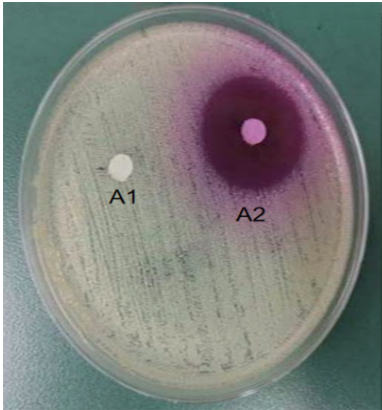
2 结 果

2.1 采用 K-B 纸片法对巴西苏木素抑制 MSSA 作用初筛 浓度为 66.7 mg/mL 的巴西苏木素对 MSSA 抑菌圈直径皆为 26 mm。根据《M100 抗微生物药物灵敏度试验执行标准》^[13],结果显示此株 MSSA 对巴西苏木素灵敏度为极敏,呈现出极佳的抑菌效果。见图 1。

2.2 巴西苏木素对 MSSA 的 MIC 及 MBC 巴西苏木素对 MSSA 的 MIC 为 65 $\mu\text{g/mL}$,MBC 为 130 $\mu\text{g/mL}$,且二者皆与菌液浓度无关。见表 1。

2.3 巴西苏木素对 MSSA 生长曲线的影响 MSSA 经过一定时间的迟缓生长后,在 8 h 进入生长的对数期开始迅速生长。从图 2 可见,经过不同质量浓度的巴西苏木素处理后 MSSA 的生长曲线总体低于阴性对照组,且巴西苏木素质量浓度越高,对生长曲线的影响越大。在培养 8~24 h 时,阴性对照组 A 值迅速

增大,菌体数量明显增加,1/4 MIC、1 MIC、2 MIC 组吸光度也有增大趋势,但增大趋势远小于阴性对照组,且巴西苏木素质量浓度越高,增长趋势越缓慢,提示巴西苏木素对 MSSA 的生长繁殖具有抑制作用。



注:A1 为 DMSO 对照组;A2 为加入巴西苏木素的实验组。

图 1 巴西苏木素对 MSSA 抑制作用(抑菌圈大小)

2.4 巴西苏木素对 MSSA 形态学改变的影响 经革兰染色后,呈蓝紫色的为 MSSA。结果可见不加药液组 MSSA 的繁殖速度极快,16 h 可见大量菌体;药液浓度为 1/4 MIC 组 MSSA 生长速度较不加药液组有

所减缓,16 h 出现大量菌体;药液浓度为 MIC 组 MSSA 生长速度缓慢,培养至 28 h 才可见明显菌体;药液浓度为 2 MIC 组几乎不生长,见图 3。从结果可以看出巴西苏木素对 MSSA 有很好的抑制作用,且成浓度依赖性。

表 1 巴西苏木素对 MSSA 的 MIC 及 MBC

抑制情况	稀释倍数		
	100	1 000	10 000
MIC	65	65	65
MBC	130	130	130

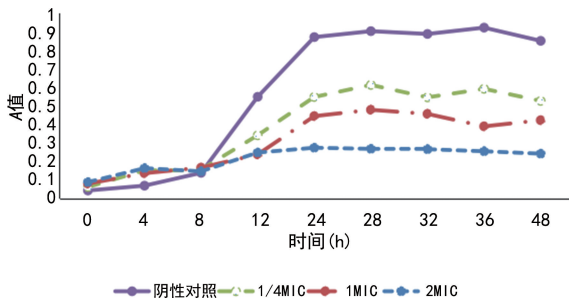
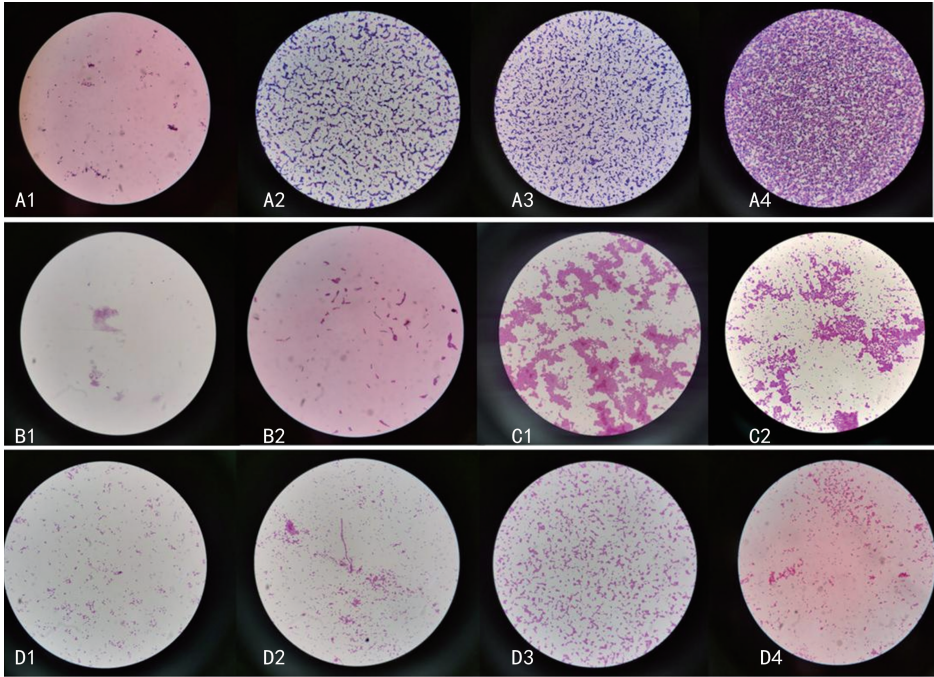


图 2 不同浓度的巴西苏木素对 MSSA 生长曲线的影响



注:A1~A4 为阴性对照组培养 8、16、24、40 h 的镜检结果;B1~B2 为 1/4 MIC 培养 8、16 h 的镜检结果;C1~C2 为 MIC 培养 28、32 h 的镜检结果;D1~D4 为 2 MIC 培养 24、28、40、48 h 的镜检结果。

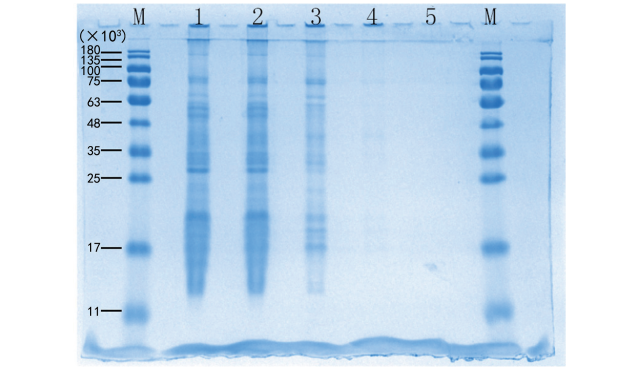
图 3 MSSA 在不同浓度药液及不同培养时间的形态学观察

2.5 巴西苏木素对 MSSA 可溶性蛋白的影响 蛋白凝胶成像系统显示(见图 4),经过不同质量浓度的巴西苏木素处理后,MSSA 所含蛋白量也随着药液浓度的升高而明显减少。与阴性对照组相比,从 1/2 MIC 开始,MSSA 的蛋白谱带明显减少,直至 2 MIC 的不明显显示,结果表明巴西苏木素可能因为能够明显抑制 MSSA 可溶性蛋白的合成而影响 MSSA 的繁殖生

长,且药物浓度越刘,对菌体可溶性蛋白生成的抑制作用就越强。

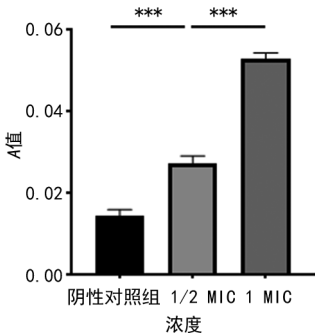
2.6 巴西苏木素对 MSSA 的 DNA 及 RNA 等大分子物质外渗水平的影响 巴西苏木素对 MSSA 的 DNA 及 RNA 等大分子物质外渗水平的影响见图 5。与对照组相比,浓度为 1/2 MIC 与 1 MIC 的巴西苏木素与 MSSA 混合培养了 24 h 后,外渗水平均显著提

高,差异有统计学意义($P<0.001$)。DNA 与 RNA 等大分子外渗水平检测结果表明巴西苏木素能够通过影响菌体细胞膜的稳定性、增大其通透性,导致 DNA、RNA 等大分子物质外渗。



注:M 为 Marker;lane 1 为阴性对照;lane 2 为 1/4 MIC;lane 3 为 1/2 MIC;lane 4 为 1 MIC;lane 5 为 2 MIC。

图 4 SDS-PAGE 检测巴西苏木素对 MSSA 可溶性蛋白合成的影响

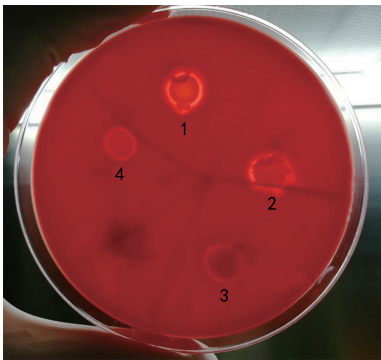


注:*** $P<0.001$ 。

图 5 巴西苏木素对 MSSA 的 DNA 及 RNA 等大分子物质外渗水平的影响

2.7 巴西苏木素对 MSSA 产溶血环的影响 巴西苏木素作用后的 MSSA 在血平板上产生的 β 型透明溶血环见图 7。由图可见,随着巴西苏木素质量浓度的增加,溶血环的直径也逐渐变小,当浓度为 2 MIC 时,溶血环的直径从阴性对照组的 10.5 mm 减小到了 7.5 mm,变化最明显。分析可知,溶血环直径的减小是由于巴西苏木素抑制了 MSSA 的 α -溶血素分泌,从而导致红细胞的溶解数量随之减少,溶血环也随之减小。

2.8 巴西苏木素对 MSSA 生物膜内存活菌量研究 巴西苏木素作用 12 h 后的 MSSA 存活量如图 7 所示,阴性对照组的生物膜内 MSSA 存活菌数为 (8.93 ± 0.40) Lg10 CFU/mL,实验组随着巴西苏木素浓度的增加,生物膜内 MSSA 存活菌数逐渐下降,且在浓度为 2 MIC 时,生物膜内 MSSA 存活菌数降低至 (8.00 ± 0.69) Lg10 CFU/mL。结果表明,巴西苏木素在一定程度上能够对生物膜产生破坏作用,且在生物膜的屏障保护下,仍能较为有效地减少生物膜内 MSSA 的存活数量。



注:1 为阴性对照;2 为 1/4 MIC;3 为 1/2 MIC;4 为 2 MIC。

图 6 巴西苏木素对 MSSA 的溶血环大小的影响

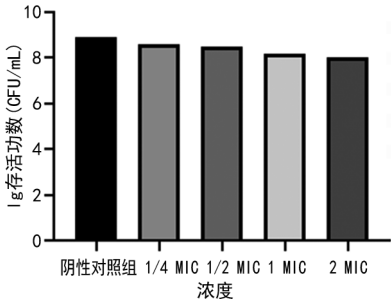


图 7 巴西苏木素对 MSSA 生物膜内存活菌量的影响

3 讨 论

中药具有多种用途,如广谱抗菌、免疫调节等作用,且一般不良反应较小。苏木据我国历版《中国药典》记载为豆科苏木属植物,木材入药,有多种功效。在 KIM 等^[14]对苏木的研究中发现,苏木的水提取液——苏木素对 MRSA、耐万古霉素肠球菌、具有多药耐药性的洋葱伯克霍尔德菌及其他菌种具有很强的抑制作用,展现了苏木显著的抗菌效用。而苏木素的主要成分正是巴西苏木素与原苏木素 B^[8]。经本课题组前期高效液相色谱分析发现,苏木素中原苏木素 B 无活性,产生抗菌作用的主要组分为巴西苏木素。目前巴西苏木素对菌体具体作用机制研究不多,因此本文分析巴西苏木素与金黄色葡萄球菌的相互作用机制,为巴西苏木素抗菌研究提供理论支持。

本研究结果显示,巴西苏木素对 MSSA 的抑制作用,且指出抑制作用呈现药物浓度依赖性;对巴西苏木素具体作用机制进行研究发现,其能通过减少 MSSA 可溶性蛋白的形成、改变 MSSA 细胞膜的稳定性和通透性导致 DNA 和 RNA 等大分子物质的外渗、影响 MSSA α -溶血素的活性等途径来发挥抑菌作用。同时,在 MSSA 形成成熟的生物膜时,巴西苏木素也能在一定程度上打破生物膜的屏障保护作用而较有效地减少生物膜内 MSSA 的存活菌量,从而发挥抑菌作用。本研究在影响可溶性蛋白的形成方面分析发现,1 MIC 巴西苏木素下的蛋白质含量已较阴性对照组有了明显减少,而 2 MIC 浓度下培养后减少得更为显著,说明随着巴西苏木素浓度的递增,干扰 MSSA 的蛋白形成的作用也逐渐增强,这与李梦森

等^[15]的玫瑰茄醇提取物可减少金黄色葡萄球菌的蛋白质生成结果类似,这说明二者也许可通过相似的作用途径对菌体内蛋白的生成起抑制作用。

经分析可知,本研究 MSSA 菌体内可溶性蛋白质含量的减少,可能途径之一是由于巴西苏木素干扰了菌体内核酸的稳定,从而导致菌体的转录、翻译过程受到干扰。本实验进行了对 DNA 与 RNA 等大分子物质外渗实验的探究,发现不同浓度下的巴西苏木素作用 MSSA 后,细菌 DNA 与 RNA 等大分子物质外渗量可随着药物浓度的增加而增加,其在 1 MIC 下的含量甚至增加到原来的 3 倍以上。根据蒋斌^[16]等的研究中连翘会影响金黄色葡萄球菌的细胞膜使 DNA、RNA 等大分子物质外渗水平明显增多的结果与本研究一致提示,巴西苏木素可通过破坏细胞膜的稳定性及其完整性使得菌体内核酸渗出增加,从而对菌体内蛋白质的生成及菌体的正常生长造成影响。

既往 PENG 等^[10]的实验结果显示,巴西苏木素对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 32 $\mu\text{g/mL}$,本研究结果中,巴西苏木素对 MSSA 的 MIC 为 65 $\mu\text{g/mL}$,证实了巴西苏木素对甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌仍具有较好的抑制作用。张晓伟^[17]等研究结果表明,肉叶芸香碱能抑制金黄色葡萄球菌 α -溶血素的分泌进而抑制溶血环的形成,透明溶血环直径随着肉叶芸香碱浓度的增加而减小,当浓度为 128 $\mu\text{g/mL}$ 时,溶血环的直径减小了 47%。本实验中,巴西苏木素作用 MSSA 后血平板同样出现完全透明溶血环,当浓度为 130 $\mu\text{g/mL}$ 时,溶血环直径较阴性对照的 10.5 mm 减少到了 7.5 mm,减小了 29%,且溶血环直径的减少呈浓度依赖性。因此,通过本研究可知,巴西苏木素同样可抑制菌体 α -溶血素的分泌导致溶血环直径减小。 α -溶血素是金黄色葡萄球菌致病的关键毒力因子,巴西苏木素潜在以 α -溶血素为靶向抗菌,因此更进一步探究 α -溶血素的表达基因(hla 基因)对指导临床用药具有重要意义。巴西苏木素对已形成的成熟生物膜的破坏作用及其生物膜内存活菌的抑制作用也证实了巴西苏木素作用的广泛性及用于临床的优越性。

本研究以发掘前人鲜有研究的巴西苏木素对金黄色葡萄球菌抑制作用入手来阐述中药的作用广泛性及其优越性,不仅可以为治疗金黄色葡萄球菌感染所致疾病的治疗提供新思路,且在中药使用时不易使耐药菌株的产生优点基础上,较为深入地发掘苏木在抗菌方面的作用机制,可为丰富传统中药的作用库提供理论依据,同时也给大家带来治疗耐药菌的一种新思路。本研究主要从菌体可溶性蛋白合成的影响及 DNA、RNA 等大分子外渗水平进行机制研究,从 α -溶血素、生物膜等多角度阐述药物对 MSSA 活性抑制作用的机制,为后续更加深入探究巴西苏木素抑制各类

型的金黄色葡萄球菌甚至 MRSA 提供实验依据。本实验提出稀释菌液浓度用以混合培养测量菌株 MIC 及 MBC,不同浓度更佐证了此实验结果的准确性。

由于中药抑菌机制的复杂性,本研究仅从细胞膜的通透性、可溶性蛋白的合成等方面的机制进行了分析,而关于其更深层次的抗菌机制还需要从分子水平进一步揭示。巴西苏木素对金黄色葡萄球菌的抑制机制研究已取得一定的进展,本团队还将继续深入研究其分子机制,以明确巴西苏木素更多方面的抗菌作用,并从分子水平上寻求药物的作用靶点,不仅为临床治疗金黄色葡萄球菌感染提供新思路,而且为巴西苏木素的开发和利用提供理论基础,使传统中药的特色优势得到充分发挥,使广大患者获益。

参考文献

- [1] 张从超. 生牛乳中金黄色葡萄球菌的快速检测及耐药性研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2017.
- [2] GHOSH A, RICKE S C, ALMEIDA G, et al. Combined application of essential oil compounds and bacteriophage to inhibit growth of *Staphylococcus aureus* in vitro[J]. *Curt Microbiol*, 2016, 72(4): 426-435.
- [3] HETEM D J, BONTEN M J M. Clinical relevance of mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*[J]. *J Hosp Infect*, 2013, 85(4): 249-256.
- [4] 孙世芹, 王有志, 周亚滨. 中药单体化合物免疫抑制活性的研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(3): 393-396.
- [5] 梁光焰, 吴云山, 陈伟英, 等. 巴西苏木素在大鼠体内的代谢产物与代谢途径分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(1): 67-73.
- [6] MEKALA K, RADHA R. Herbal formulation development for hypolipidemic and anti-obesity activity on heartwood of *Caesalpinia sappan* Linn[J]. *IJMRA*, 2016(4): 409-420.
- [7] ZHANG T, HE J, ZHANG S, et al. Brazilin induces T24 cell death through c-Fos and GADD45 β independently regulated genes and pathways[J]. *IUBMB Life*, 2018, 70(11): 1101-1110.
- [8] 黄泰康. 常用中草药成分与药理手册[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1992: 995-997.
- [9] 韩宗其, 左国营, 郝小燕, 等. 巴西苏木素逆转耐甲氧西林金黄色葡萄球菌对阿米卡星和庆大霉素的耐药性[J]. *中国医院药学杂志*, 2014, 34(18): 1533-1537.
- [10] PENG D, CHEN A, SHI B, et al. Preliminary study on the effect of brazilin on biofilms of *Staphylococcus aureus* [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(3): 2108-2118.
- [11] 李妍, 松长青, 周本宏. 安石榴苷的抗菌活性筛选及对金黄色葡萄球菌的作用机制研究[J]. *中国药师*, 2020, 23(8): 1492-1497.
- [12] 覃静, 祖敬芝, 罗沙, 等. 大黄酸抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抗菌机制[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(6): 2111-2117.

- [15] MONDAL M, CONOLE D, NAUTIYAL J, et al. UCHL1 as a novel target in breast cancer; emerging insights from cell and chemical biology[J]. Br J Cancer, 2022, 126(1): 24-33.
- [16] ZHONG J, ZHAO M, MA Y, et al. UCHL1 acts as a colorectal cancer oncogene via activation of the β -catenin/TCF pathway through its deubiquitinating activity[J]. Int J Mol Med, 2012, 30(2): 430-436.
- [17] KOBAYASHI E, HWANG D, BHEDA-MALGE A, et al. Inhibition of UCH-L1 deubiquitinating activity with two forms of LDN-57444 has anti-invasive effects in metastatic carcinoma cells[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(15): 3733.
- [18] ZHAO Y, LEI Y, HE S W, et al. Hypermethylation of UCHL1 promotes metastasis of nasopharyngeal carcinoma by suppressing degradation of cortactin (CTTN)[J]. Cells, 2020, 9(3): 559.
- [19] ZHANG D, FU Y, TIAN G, et al. UCHL1 promotes proliferation and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma and could be a potential therapeutic target[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2021, 133(6): 684-697.
- [20] DING X, GU Y, JIN M, et al. The deubiquitinating enzyme UCHL1 promotes resistance to pemetrexed in non-small cell lung cancer by upregulating thymidylate synthase[J]. Theranostics, 2020, 10(13): 6048-6060.
- [21] LIU S, GONZÁLEZ-PRIETO R, ZHANG M, et al. Deubiquitinase activity profiling identifies UCHL1 as a candidate oncoprotein that promotes TGF β -induced breast cancer metastasis[J]. Clin Cancer Res, 2020, 26(6): 1460-1473.
- [22] KWAN S Y, AU-YEUNG C L, YEUNG T L, et al. Ubiquitin carboxyl-Terminal hydrolase L1 (UCHL1) promotes uterine serous cancer cell proliferation and cell cycle progression[J]. Cancers (Basel), 2020, 12(1): 118.
- [23] HATTORI A, TAKAMUCHI K, OH S, et al. New revisions and current issues in the eighth edition of the TNM classification for non-small cell lung cancer[J]. Jpn J Clin Oncol, 2019, 49(1): 3-11.
- [24] SONG H M, LEE J E, KIM J H. Ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 regulates EMT process and cancer metastasis in prostate cell lines[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 452(3): 722-727.
- [25] JANG M J, BAEK S H, KIM J H. UCH-L1 promotes cancer metastasis in prostate cancer cells through EMT induction[J]. Cancer Lett, 2011, 302(2): 128-135.
- [26] JIN C, YU W, LOU X, et al. UCHL1 is a putative tumor suppressor in ovarian cancer cells and contributes to cisplatin resistance[J]. J Cancer, 2013, 4(8): 662-670.
- [27] LI L, TAO Q, JIN H, et al. The tumor suppressor UCHL1 forms a complex with p53/MDM2/ARF to promote p53 signaling and is frequently silenced in nasopharyngeal carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(11): 2949-2958.
- [28] FINNERTY B M, MOORE M D, VERMA A, et al. UCHL1 loss alters the cell-cycle in metastatic pancreatic neuroendocrine tumors[J]. Endocr Relat Cancer, 2019, 26(4): 411-423.
- [29] JIN Y, ZHOU H, GONG L, et al. Prognostic potential and oncogenic effects of UCH-L1 expression in hilar cholangiocarcinoma[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2017, 10(11): 10802-10811.
- [30] KIM H J, KIM Y M, LIM S, et al. Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 is a key regulator of tumor cell invasion and metastasis[J]. Oncogene, 2009, 28(1): 117-127.
- [31] 屈肖杰, 王衍富. 脂质体转染 UCH-L1 siRNA 对肺腺癌细胞系 H157 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国癌症杂志, 2010, 13(4): 292-296.
- [32] NAGATA A, ITOH F, SASHO A, et al. The evolutionarily conserved deubiquitinase UBH1/UCH-L1 augments DAF7/TGF- β signaling, inhibits dauer larva formation, and enhances lung tumorigenesis[J]. J Biol Chem, 2020, 295(27): 9105-9120.

(收稿日期: 2022-05-27 修回日期: 2022-09-08)

(上接第 165 页)

- [13] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30th ed. CLSI supplement M100[S]. Wayne, PA: CLSI, 2020.
- [14] KIM K J, YU H H, JEONG S I, et al. Inhibitory effects of Caesalpiniasappan on growth and invasion of methicillin-resistant Staphylococcus aureus[J]. J Ethnopharmacol, 2004, 91(1): 81-87.
- [15] 李梦森, 谢鲲鹏, 隋佳琪, 等. 玫瑰茄醇提物的抑菌活性及其作用机制[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2015, 31(10): 1057-1063.
- [16] 蒋斌, 苏琰, 蔡玉华. 连翘对金黄色葡萄球菌的抑菌作用及机制的试验研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(8): 3401-3406.
- [17] 张晓伟. 肉叶芸香碱抗金黄色葡萄球菌的活性及机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2020.

(收稿日期: 2022-03-12 修回日期: 2022-07-28)