

内生真菌链格孢菌醋酸乙酯提取物对金黄色葡萄球菌抑菌机制的研究

王永刚¹, 杨光瑞^{1#}, 陈凯¹, 王鸣刚¹, 冷非凡¹, 杨明俊^{1*}, 田艳花²

1. 兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050

2. 山西药科职业学院 食品工程系, 山西 太原 030031

摘要: 目的 研究分离自药用植物白毛蛇 *Humata tyermanni* 的内生真菌链格孢菌发酵产物醋酸乙酯提取物 (B06_e) 对金黄色葡萄球菌细胞膜完整性和通透性的影响。方法 采用二倍稀释法测定 B06_e 对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度 (MIC); 测定 B06_e 作用前后金黄色葡萄球菌培养液电导率, 206、280 nm 处吸光度 (A) 值的变化并结合流式细胞术研究 B06_e 作用前后细胞膜通透性的变化。利用扫描电子显微镜 (SEM) 及傅里叶红外变换光谱 (FT-IR) 研究 B06_e 对细胞膜结构的影响。结果 B06_e 对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 50 μg/mL。3×MIC 处理组的电导率是对照组的 1.06 倍; 经 B06_e 处理后, 反应液的 A₂₆₀ 和 A₂₈₀ 值均显著高于对照组; 3×MIC 处理组的 β-半乳糖苷酶活性是对照组的 9.43 倍; 流式细胞仪分析表明 3×MIC 处理组被碘化丙啶 (PI) 着染的阳性细胞比例是对照组的 47.63 倍; SEM 和 FT-IR 分析结果显示, B06_e 处理后, 菌体细胞结构发生了损伤。结论 B06_e 能增强金黄色葡萄球菌细胞膜的通透性, 破坏细胞膜的完整性, 造成外源物质的大量流入和细胞质的大量外泄, 从而使得菌体细胞内渗透压和代谢调控紊乱, 最终导致细菌丧失生长繁殖的能力。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 内生真菌; 细胞膜通透性; 细胞膜完整性; 链格孢菌; 白毛蛇

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)03-0619-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.03.017

Antibacterial mechanisms of ethyl acetate extract from endophytic fungi *Alternaria alternata* against *Staphylococcus aureus*

WANG Yong-gang¹, YANG Guang-rui¹, CHEN Kai¹, WANG Ming-gang¹, LENG Fei-fan¹, YANG Ming-jun¹, TIAN Yan-hua²

1. School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China

2. Department of Food Engineering, Shanxi Pharmaceutical Vocational College, Taiyuan 030031, China

Abstract: Objective To investigate the effect of ethyl acetate extract (B06_e) from fermentation liquid of an endophytic fungus *Alternaria* spp. on the cell membrane integrity and the permeability of *Staphylococcus aureus*. **Methods** The minimum inhibitory concentration (MIC) of B06_e against *S. aureus* was measured by double dilution method; The changes of electric conductivity of bacterial culture, A₂₆₀ and A₂₈₀ before and after treated by B06_e were analyzed, respectively. Besides, the changes of cell membrane permeability before and after by B06_e was measured by flow cytometry. The effect of B06_e on the cell membrane structure was investigated by scanning electron microscopy (SEM) and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). **Results** The results showed that MIC value of B06_e against *S. aureus* was 50 μg/mL. The conductivity of 3 × MIC treatment group was 1.06 times of the value of the control group; after treatment of B06_e, the values of A₂₆₀ and A₂₈₀ were significantly higher than those of the control group; The beta-galactosidase activity of 3 × MIC treatment group was 9.43 times more than the value of the control group; Flow cytometry analysis showed that 3 × MIC treatment group by propidium iodide (PI) staining of positive cells was 47.63 times more than the control group; SEM and FT-IR analysis showed that the structure of bacterial cell changed after B06_e treatment. **Conclusion** B06_e can kill *S. aureus* cell by increasing the permeability of its cell membrane and destroy cell membrane integrity.

Key words: *Staphylococcus aureus*; endophytic fungus; cell membrane permeability; cell membrane integrity; *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl; *Humata tyermanni* Moore

收稿日期: 2017-08-27

基金项目: 国家自然科学基金项目资助 (31460032; 81660581)

作者简介: 王永刚 (1983—), 男, 博士, 研究方向为微生物基因工程。E-mail: 412316788@163.com

*通信作者 杨明俊 E-mail: yangmj@lut.cn

#并列第一作者 杨光瑞 (1992—), 男, 硕士生, 主要从事微生物生理及基因工程。E-mail: ygr_115602@163.com

植物内生真菌是指那些长期定植于健康植物组织和器官中,而不使宿主表现出明显感染症状的一类真菌^[1-2]。已有研究表明,内生真菌具有产生与宿主植物相同或相似化学组分的能力^[3],国内外许多科学家已经从多种药用植物内生真菌发酵产物中发现了具有抗菌、抗氧化、抗癌和抗肿瘤的活性物质^[1-5]。

近年来,由于人们对抗生素的滥用,许多传统抗生素已逐渐失去或减弱了对病原菌的抑制作用,越来越多的抗药性病菌的出现使得医疗难度增大,医疗费用也越来越高昂。因此,开发新型的抗生素已经迫在眉睫^[6]。多年来,本课题组一直致力于甘肃省道地药材的研究,先后从黄芪、甘草、白毛蛇等多种药用植物中分离获得一大批内生真菌,并筛选获得了多株具有较好抗氧化、抑菌、抗肿瘤活性的菌株^[7]。其中,从白毛蛇 *Humata tyermanni* Moore 根部组织中分离到的内生真菌链格孢菌 *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, 其发酵液醋酸乙酯提取物 (B06_e) 对多种测试菌均具有较强的抑制作用^[8],对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑制作用尤为显著。本研究从细胞水平探究了 B06_e 对金黄色葡萄球菌细胞膜通透性和完整性的影响,以期为新型抗生素的开发及利用提供基础理论依据。

1 材料

1.1 菌株

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* CMCC (E)26013、链格孢菌 *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl 菌株为本实验室分离、保藏菌种^[9]。

1.2 主要试剂

二甲基亚砷 (DMSO), 上海中泰化学试剂有限公司; 邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷 (ONPG), 生工生物工程(上海)股份有限公司; 碘化丙啶 (PI), Sigma-Aldrich Co. Ltd.。

1.3 主要仪器

UV-5200 紫外可见分光光度计, 上海元析仪器有限公司; FE30 Plus 电导率仪, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; BD LSRFORtessa TM Cell 流式细胞仪, BD Biosciences 公司; JSM-6701F 型号冷场发射型扫描电子显微镜, 日本电子光学公司; Nexus 670 FT-IR 傅里叶变换红外光谱仪, 美国 Nicolet 公司。

2 方法

2.1 B06_e 的提取

用接种针挑取 1 环已活化的链格孢菌菌株菌丝

体, 接种于 250 mL PDB 液体发酵培养基中, 于 28 °C、160 r/min 振荡培养 14 d。发酵结束后, 抽滤分离发酵液和菌丝体, 将滤液用等体积的醋酸乙酯进行萃取, 萃取 3 次, 合并萃取液。减压浓缩后自然风干成浸膏, 得到 B06_e。用 DMSO 将 B06_e 配制成 5 mg/mL 母液, 于 4 °C 保存, 备用^[10]。

2.2 B06_e 最小抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC) 的测定

参照 Andrews 的方法^[11], 稍作改进。取 9.6 mL 已灭菌的 LB 培养基, 加入 400 μL 5 mg/mL B06_e, 混匀后用二倍稀释法稀释成系列质量浓度, 各取 2 mL, 均接种入 200 μL 37 °C 下培养 3~4 h 至对数生长期 ($A_{600}=0.50\pm 0.02$) 的金黄色葡萄球菌, 充分混匀后继续于 180 r/min 下振荡培养。12 h 后观察, 以培养液变浑浊的前 1 个 B06_e 稀释质量浓度认定为 MIC。吸取 100 μL 未变浑浊的培养液, 均匀涂布于 LB 固体培养基表面, 置于 37 °C 继续培养 24 h, 以无菌生长的 B06_e 最小稀释质量浓度认定为 MBC, 以已灭菌的 LB 液体培养基和 DMSO 代替 B06_e 溶液分别作为空白和溶剂对照组, 每个质量浓度设 3 个平行。

2.3 菌液电导率的测定

参照钱丽红等^[12]的方法, 将对数生长期的金黄色葡萄球菌悬液用 0.85% NaCl 溶液洗涤 2 次, 重悬至菌体浓度约为 1×10^8 CFU/mL ($A_{600}=0.50\pm 0.02$), 吸取 4.9 mL, 分别与 100 μL 不同质量浓度的 B06_e 溶液混合, 使其终质量浓度分别为 $1\times$ MIC、 $2\times$ MIC 和 $3\times$ MIC, 以无菌水代替 B06_e 溶液作为对照组, 于 37 °C、150 r/min 振荡培养, 分别于 0、1、2、4、6、8 h 时, 取其上清液测定电导率, 每个处理重复 3 次。

2.4 细胞内核酸、蛋白质泄漏的测定

菌液细胞处理方法与“2.3”项相同。取各时间段的培养液, 分别测定上清液在 260 nm 和 280 nm 处的吸光度值 (A_{260} 和 A_{280}), 以无菌水代替 B06_e 溶液作为对照组, 每个处理重复 3 次^[13]。

2.5 β-半乳糖苷酶活性的测定

将已活化的金黄色葡萄球菌按 1:100 比例接种于 50 mL 含有 5% 乳糖的 LB 液体培养基中, 于 37 °C、180 r/min 振荡培养至对数生长期。用 0.05 mol/L PBS (pH 7.4) 洗涤并重悬菌体, 参照“2.3”项中所述方法, 分别取 200 μL 各时间段的上清液与 800 μL 0.05 mol/L ONPG 混合, 于 37 °C 水浴反应

40 min 后, 加入 1 mL 0.5 mol/L Na₂CO₃ 终止反应。在 420 nm 处测定 A 值 (A₄₂₀), 设置无菌水为对照组, 实验重复 3 次。计算 β-半乳糖苷酶活力单位 (β-半乳糖苷酶活力单位 = A₄₂₀ × 2.778)。

2.6 流式细胞仪分析^[14]

菌体细胞处理方法与“2.3”项所述相同。培养后的菌体用 0.85% NaCl 溶液洗涤 2 次, 调整菌体浓度约为 1 × 10⁸ CFU/mL。在处理后的菌液中均加入终质量浓度为 50 μg/mL PI, 于 37 °C 避光孵育 30 min 后, 用流式细胞仪检测。

2.7 扫描电子显微镜 (SEM) 分析

取对数生长期的金黄色葡萄球菌菌液, 用 0.05 mol/L PBS (pH 7.4) 洗涤 2 次, 重悬至菌体浓度约为 1 × 10⁸ CFU/mL。取 50 mL 菌悬液, 向其中加入终质量浓度为 1 × MIC 的 B06_e 溶液, 以无菌水代替 B06_e 溶液作为对照组, 于 37 °C、150 r/min 振荡培养 4 h。菌体用 PBS 冲洗 2 次后用 40 倍体积的 2.5% 戊二醛溶液于 4 °C 过夜固定。依次用梯度体积分数 (30%、50%、70%、80%、90%) 的乙醇溶液脱水, 最后用叔丁醇置换乙醇 3 次, 室温干燥。镀膜后通过 SEM 观察^[15]。

2.8 傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 分析 B06_e 对细菌细胞膜结构的影响

菌体细胞处理过程与“2.7”项所述相同, 取少量样品粉末与 150 mg 干燥的 KBr 混合, 于玛瑙研钵研磨至粒径在 2.5 μm 以下, 将研磨后的样品在压片机上压片。使用 FT-IR 进行检测, 检测方法为衰减全反射法。检测波数范围为 4 000 ~ 500 cm⁻¹, 分辨率为 4 cm⁻¹, 扫描次数为 32 次。光谱结果采用 OMNIC 软件进行分析^[15]。

2.9 数据统计分析

以上测定均为 3 组平行, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据图均利用 Origin Pro 8.0 处理完成。

3 结果与分析

3.1 B06_e 对金黄色葡萄球菌的 MIC 和 MBC

B06_e 对金黄色葡萄球菌的 MIC 和 MBC 测定结果表明, 其对金黄色葡萄球菌的 MIC 和 MBC 均为 50 μg/mL。DMSO 组并没有抑制金黄色葡萄球菌的生长, 表明 DMSO 作为溶剂并不干扰 B06_e 对金黄色葡萄球菌 MIC 和 MBC 的测定。

3.2 B06_e 对菌体细胞膜通透性的影响

3.2.1 菌液的电导率测定结果 如图 1 所示, 在 B06_e 与金黄色葡萄球菌作用 0 ~ 8 h, 反应液的电导

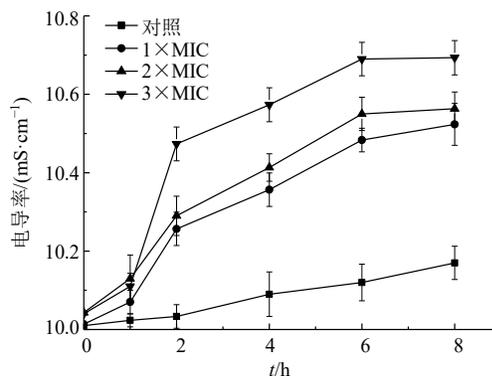


图 1 B06_e 对金黄色葡萄球菌电导率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 1 Effect of B06_e on electric conductivity of *S. aureus* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

率呈逐渐增大趋势。在 0 ~ 1 h 时, 终质量浓度为 2 × MIC B06_e 组的菌液电导率始终大于其他组。在 1 ~ 2 h 时, 反应液的电导率迅速增大, 终质量浓度为 3 × MIC B06_e 组的菌液电导率最大, 1 × MIC 组菌液电导率最小, 但远远大于对照组。在 2 ~ 6 h 时, B06_e 组的菌液电导率增大趋势有所变缓, 在 6 h 时, 3 × MIC B06_e 组的菌液电导率达到最大值 [(10.690 ± 0.043) mS/cm], 是对照组的 1.06 倍。此后基本不再变化。在 6 ~ 8 h 时, 1 × MIC 和 2 × MIC B06_e 组的菌液电导率持续缓慢增大, 在 8 h 时达到最大值, 其值分别为 (10.520 ± 0.053)、(10.560 ± 0.043) mS/cm。对照组菌液电导率随着时间的增大逐渐增大, 从 2 h 开始增大趋势显著加剧, 直至 8 h 达到最大值 [(10.170 ± 0.053) mS/cm], 可能是由于菌体自溶所导致的。

3.2.2 B06_e 对金黄色葡萄球菌核酸、蛋白质类物质泄漏量的影响 如图 2 所示, B06_e 与金黄色葡萄球菌作用 0 ~ 6 h, 培养液上清液的 A₂₆₀ 一直持续增大, 此后 A₂₆₀ 增大幅度明显放缓, 在 8 h 时达到最大值, 并且溶液的 A₂₆₀ 随着 B06_e 质量浓度的增大而增大。8 h 时, A₂₆₀ 增大的总趋势为 3 × MIC 组最大, 其值为 0.059 ± 0.003; 2 × MIC 组次之, 其值为 0.056 ± 0.002; 1 × MIC 组最小, 其值为 0.052 ± 0.005; 但在 1 h 时, 2 × MIC 组的 A₂₆₀ 大于 3 × MIC 和 1 × MIC 组。而在 2 h 时, 1 × MIC 和 3 × MIC 组的 A₂₆₀ 基本相同, 且大于 2 × MIC 组; B06_e 处理组溶液的 A₂₆₀ 显著高于对照组 (0.011 ± 0.002)。培养液上清液 A₂₈₀ 的变化趋势与 A₂₆₀ 基本一致, 1 × MIC、2 × MIC 和 3 × MIC 组的 A₂₈₀ 均在 8 h 时达到最大值, 其值分别为 0.090 ± 0.010、0.110 ± 0.010、0.115 ± 0.007, 均大

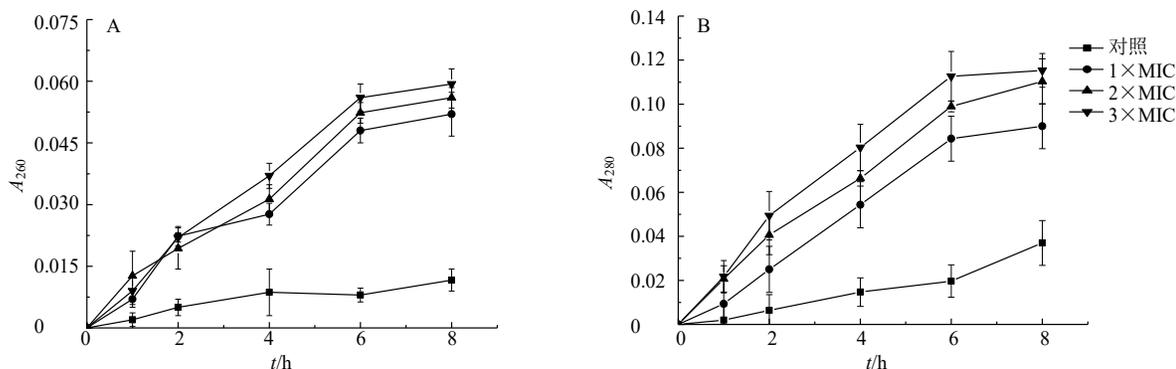


图 2 B06_e对金黄色葡萄球菌核酸 (A) 和蛋白质 (B) 泄漏的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of B06_e on leakage of nucleic acid (A) and protein (B) out of *S. aureus* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

于对照组 (0.037±0.010)。核酸、蛋白质类物质分别在 260 nm 和 280 nm 处有强吸收峰, 在 0~8 h, A 值的增加表明在此时间段内培养液中核酸、蛋白质含量增加; 而在正常情况下核酸、蛋白质类大分子物质被细胞膜阻隔在细胞内, 不会泄漏至细胞外, 这进一步表明, 在 B06_e 的作用下细胞膜通透性增大。

3.2.3 β-半乳糖苷酶活性的测定结果 β-半乳糖苷酶是一种胞内酶, 正常情况下不会在细胞外检测到, 但当细胞膜通透性增大或细胞膜遭到破坏时, β-半乳糖苷酶外漏至胞外^[13]。如图 3 所示, 在 0~1 h, B06_e 作用的菌液中 β-半乳糖苷酶的含量快速增加, 在 1 h 时, 1×MIC、2×MIC 和 3×MIC 组菌液中的 β-半乳糖苷酶的含量并无显著性差异。在 2~6 h 时, B06_e 作用的菌液中的 β-半乳糖苷酶的活性继续增加, 在此时间段内 3×MIC 组的 β-半乳糖苷酶的含量高于 1×MIC 和 2×MIC 组, 且 3×MIC 组的 β-半乳糖苷酶的含量在 6 h 时达到了最大值, 其值为 (0.066±0.003) U/mL, 分别是 1×MIC 和 2×MIC 组的 1.38 倍和 1.12 倍, 是对照组的 9.43 倍, 然而在 6~8 h, β-半乳糖苷酶的含量有所下降。在 6~8 h 时, 1×MIC 和 2×MIC 组的 β-半乳糖苷酶的含量继续增加, 但增加趋势明显减小, 在 8 h 时达到最大, 其值分别为 (0.049±0.004)、(0.061±0.004) U/mL, 但均小于 3×MIC 组。对照组的 β-半乳糖苷酶的含量在后期虽有所增加, 但远远小于 B06_e 作用组。以上结果表明, B06_e 与金黄色葡萄球菌作用后, 极大地增大了细胞膜的通透性, 破坏了膜的完整性。

3.3 流式细胞仪分析细菌细胞膜的通透性

PI 是核酸染料, 但它并不能直接穿透细胞膜进入细胞, 但当细胞膜通透性增大或膜不完整时, PI 就能非特异性地与 DNA 结合, 当其与 DNA 结合后,

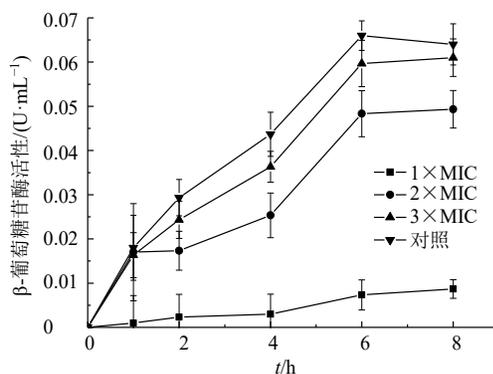


图 3 B06_e对β-半乳糖苷酶泄漏的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of B06_e on leakage of β-galactosidase out of *S. aureus* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

PI 的荧光强度会成倍增加^[16]。因此, 可以通过流式细胞计数法计算被 PI 着染的细胞数来间接反映细胞膜通透性的变化。

如图 4 所示, 在对照组中, 被 PI 着染的阳性细胞比例仅为 1.1%, 但经 B06_e 处理后, 阳性细胞比例明显上升, 当 B06_e 终质量浓度增大到 3×MIC 时, 被 PI 着色的阳性细胞比例达到了 52.4%, 分别是 1×MIC 组 (10%) 和 2×MIC 组 (38.1%) 的 5.24 倍和 1.38 倍, 是对照组的 47.63 倍。以上结果表明, B06_e 作用后, 有超过 50% 的金黄色葡萄球菌细胞膜的通透性发生了明显变化, 并且随着 B06_e 质量浓度的增大, 对细胞膜的通透性影响越大。

3.4 FT-IR 分析细胞膜结构的改变

FT-IR 技术被广泛运用于细菌细胞膜表面有机官能基团的检测^[17]。图 5 为 B06_e 处理前后, 金黄色葡萄球菌的 FT-IR 光谱图, 但从原始的 FT-IR 光谱图中无法分辨出峰位的变化。为了进一步解析出原始图谱中包含的信息, 需要对原始图谱进行二阶导数和去卷积^[18]。图 6 为金黄色葡萄球菌在 1 800~

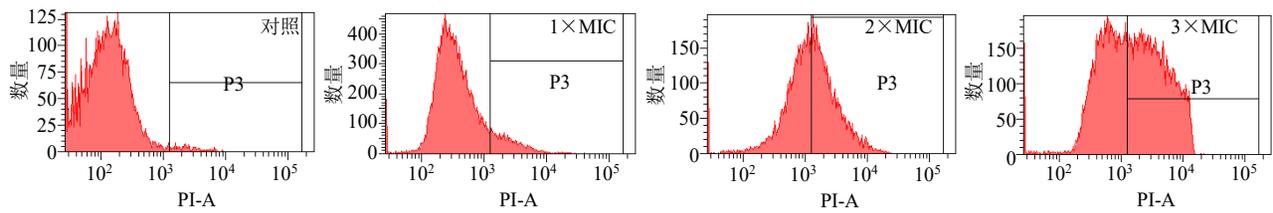


图 4 流式细胞仪分析

Fig. 4 Flow cytometry analysis

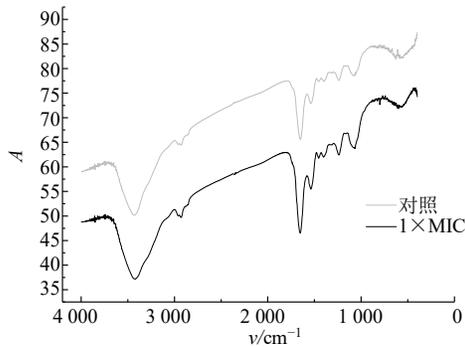


图 5 B06_e处理前后金黄色葡萄球菌的 FT-IR 光谱图

Fig. 5 FT-IR spectra of control group and B06_e-treated samples of *S. aureus*

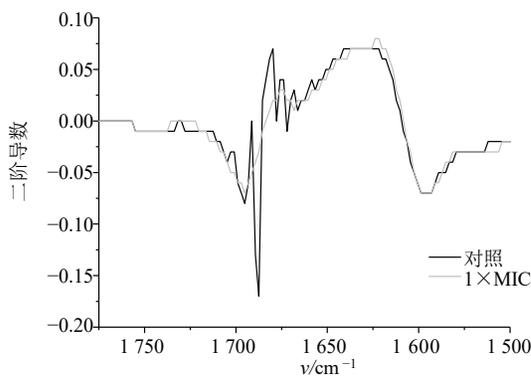


图 6 B06_e处理前后金黄色葡萄球菌的 FT-IR 二阶导数图

Fig. 6 Second-derivative FT-IR spectra of control group and B06_e-treated samples of *S. aureus*

1 550 cm^{-1} 下的二阶导数图谱。在红外光谱中, 1 700~1 600 cm^{-1} 代表蛋白类物质酰胺 I 带 C=O 伸缩振动。其中, 1 682 cm^{-1} 和 1 674 cm^{-1} 的峰代表 β 转角, 1 660 cm^{-1} 处的峰代表无规卷曲, 1 644 cm^{-1} 的峰代表 α 螺旋, 1 638 cm^{-1} 和 1 630 cm^{-1} 的峰代表 β 折叠^[18]。由图 6 可见, 处理后, 金黄色葡萄球菌细胞蛋白质结构发生了明显变化, 其中全细胞蛋白的 β 转角 (1 682 cm^{-1} 和 1 674 cm^{-1}) 和无规卷曲 (1 660

cm^{-1}) 的变化最为明显。这些结果进一步说明了经 B06_e 处理后, 金黄色葡萄球菌细胞膜的结构发生了改变。

3.5 SEM 对金黄色葡萄球菌菌体显微形态的观察

如图 7 所示, 在对照组中, 金黄色葡萄球菌菌体饱满, 形态完整、细胞表面光滑、圆润。而 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1 \times MIC) B06_e 作用 4 h 后的金黄色葡萄球菌菌体表面变得粗糙, 细胞壁塌陷, 部分菌体细胞完全裂解。由此说明, B06_e 对金黄色葡萄球菌细胞形态具有较强的破坏作用。

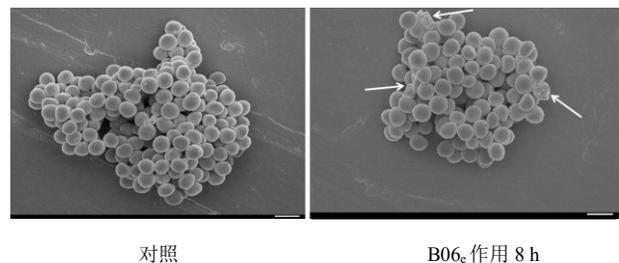


图 7 B06_e 对金黄色葡萄球菌菌体显微形态的影响 ($\times 10\ 000$)

Fig. 7 Effect of B06_e on morphology of *S. aureus* ($\times 10\ 000$)

结合前面关于细胞膜通透性以及细胞表面 FT-IR 等研究结果, 进一步表明, B06_e 对金黄色葡萄球菌的抑菌作用, 不仅仅是使得细胞形态发生变化或者裂解, 有可能从核酸复制、转录水平上影响该菌株的繁殖, 从而达到抑制效果。

4 讨论

内生真菌广泛存在于多种植物组织中, 其种类和丰度与宿主植物的种类和生长环境密切相关, 并且其同一宿主植物不同组织部位中的分布差异较大, 分布广泛, 种类繁多, 并且能产生与宿主植物相同或相似的活性物质, 是人们发现和寻找新骨架化合物和新功能化合物的丰富资源。药用植物内

生真菌次级代谢产物具有抗菌、抗癌、抗肿瘤等活性的发现,为人们治疗繁杂疾病开辟了一条新的途径。但由于其作用机制尚不明确,因此,其在临床上的应用仍是一个巨大的挑战。本研究中, B06_e 与金黄色葡萄球菌作用后,反应液的电导率、核酸和蛋白含量随着作用时间的延长而显著增大,这表明 B06_e 可增大细胞膜的通透性,使胞内物质释放至外环境中。刘松鑫等^[19]研究了紫茎泽兰挥发油对金黄色葡萄球菌抑制作用,在不同反应时间点测量了反应液的电导率及其在 260 nm 和 280 nm 处的 *A* 值,发现电导率和 *A* 值均显著增大,这与本研究结果一致。而 Chen 等^[20]利用 SDS-PAGE 方法研究了甜菜多酚对金黄色葡萄球菌细胞膜通透性的影响,结果表明,在实验组反应菌液中检测到了蛋白质。本研究利用流式细胞仪技术发现经 B06_e 作用后被 PI 着染细胞数显著增加,这进一步表明 B06_e 能增大细胞膜的通透性。再结合 SEM 及 FT-IR 的结果,充分证明了 B06_e 能对细胞膜造成破坏,导致细胞膜结构改变,膜功能丧失,非胞质物质大量进入细胞质,最终导致细胞膜裂解,细胞死亡。而本研究的结果显示, B06_e 主要作用于细胞膜,但是否对细胞壁有直接作用或在细胞内有无结合位点尚不明确,而对其作用于细胞膜的准确位点也有待进一步研究。为进一步研究 B06_e 的有效成分及其详细的作用机制,本研究组正在对 B06_e 进行单体化合物的分离、鉴定工作,对其有效单体进行细胞毒性实验,评价其对细胞的毒害作用,为其在临床实践中的应用奠定理论依据。

综上所述, B06_e 能显著地抑制金黄色葡萄球菌的生长,其 MIC 为 50 μg/mL。研究结果表明 B06_e 能增大细胞膜通透性,使得细胞内容物,如 Na⁺、K⁺ 等小分子物质及核酸及 β-半乳糖苷酶等大分子物质泄漏至细胞外。正是由于其对细胞膜通透性的改变,造成外源物质的大量流入和细胞质物质的大量外泄,从而使得菌体细胞内渗透压和酶代谢系统紊乱,最终导致细菌丧失了生长繁殖的能力。而且, B06_e 对金黄色葡萄球菌的抑制作用呈现质量浓度依赖性。

参考文献

[1] Ferreira M C, Vieira M L A, Zani C L, et al. Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the

medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2015, 59: 36-44.

[2] Gond S K, Mishra A, Sharma V K, et al. Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Nyctanthes arbortristis*, a well-known medicinal plant of India [J]. *Mycoscience*, 2012, 53(2): 113-121.

[3] 程玉鹏, 李天聪, 林进华, 等. 内生真菌与药用植物宿主间的交流 [J]. 中医药信息, 2016(6): 120-122.

[4] 周琢艳, 刘玉寒, 刘文洪, 等. 铁皮石斛内生真菌的分离及其体外抑菌和抗肿瘤活性初步研究 [J]. 中草药, 2017, 48(3): 533-538.

[5] 葛飞, 唐尧, 龚倩, 等. 40 株银杏内生真菌抗菌活性比较及其活性成分研究 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1554-1559.

[6] Saleem M, Nazir M, Ali M S, et al. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates [J]. *Nat Prod Rep*, 2010, 27(2): 238-254.

[7] 杨明俊, 李娟, 薛鸿燕, 等. 水仙内生真菌的分离及抑菌和抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2014, 45(6): 819-824.

[8] 王永刚, 杨光瑞, 马雪青, 等. 内生真菌链格孢菌醋酸乙酯提取物对大肠杆菌抑菌机制的研究 [J]. 中草药, 2018, 49(2): 374-381.

[9] 王帆. 六种中药材内生真菌的分离纯化及其发酵产物活性研究 [D]. 兰州: 兰州理工大学, 2016.

[10] Amorim M R, Somensi A, Araujo A R, et al. Compounds of *Anthostomella brabeji*, an endophytic fungus isolated from *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae) [J]. *J Braz Chem Soc*, 2016, 27(6): 1048-1054.

[11] Andrews J M. Determination of minimum inhibitory concentrations [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 48: 5-16.

[12] 钱丽红, 陶妍, 谢晶. 茶多酚对和铜绿假单胞菌的抑菌机理 [J]. 微生物学通报, 2010, 37(11): 1628-1633.

[13] Mason D J, Power E G, Talsania H, et al. Antibacterial action of ciprofloxacin [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39(12): 2752-2758.

[14] Saravanan R, Mohanram H, Joshi M, et al. Structure, activity and interactions of the cysteine deleted analog of tachyplexin-1 with lipopolysaccharide micelle: Mechanistic insights into outer-membrane permeabilization and endotoxin neutralization [J]. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembr*, 2012, 1818(7): 1613-1624.

- [15] Wu C L, Tsou C Y, Tseng Y C, *et al.* Preparation and characterization of biodegradable polyurethanes composites filled with silver nanoparticles-decorated graphene [J]. *J Polym Res*, 2016, 23(12): 263-277.
- [16] Imura Y, Nishida M, Ogawa Y, *et al.* Action mechanism of tachyplesin I and effects of PEGylation [J]. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembr*, 2007, 1768(5): 1160-1169.
- [17] 姜交龙, 张涛, 江波, 等. 杜仲内生真菌代谢产物对大肠杆菌的作用机理研究 [J]. *食品工业科技*, 2012, 33(23): 110-113.
- [18] Cao W, Peng X, Chen X, *et al.* Facile synthesis of cationic polymer functionalized nanodiamond with high dispersity and antibacterial activity [J]. *J Mater Sci*, 2017, 52(4): 1856-1867.
- [19] 刘松鑫, 韦会平, 程君, 等. 紫茎泽兰挥发油对金黄色葡萄球菌的抗菌机制 [J]. *中国医院药学杂志*, 2012, 32(21): 1742-1745.
- [20] Chen M, Zhao Z, Meng H, *et al.* The antibiotic activity and mechanisms of sugar beet (*Beta vulgaris*) molasses polyphenols against selected foA-borne pathogens [J]. *LWT-FoA Sci Technol*, 2017, 82: 354-360.