

马桑水提取物抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的作用机制研究

黄德斌, 胡泽华, 余昭芬, 黄 谨, 陈薛妃

湖北民族学院医学院, 湖北 恩施 445000

摘要: **目的** 探索马桑水提取物(CSE)对耐药金黄色葡萄球菌(MRSA)的抗菌作用机制。**方法** 分别用 AFFX 原核表达谱芯片、Western-blotting、SDS-PAGE 凝胶电泳等方法,测定 CSE 对 MRSA 相关基因表达、自溶酶以及 β -内酰胺酶的影响。**结果** MRSA 对绝大多数抗生素耐药,而 CSE 与多种 β -内酰胺类抗生素合用具有显著地协同效应($P < 0.05$);可显著下调 MRSA 的 RNA 表达总量,单用 CSE 或与氨苄西林合用均能呈剂量依赖性调控基础代谢基因、肽聚糖水解酶(*lytM*)基因、转运子基因、青霉素结合蛋白(PBPs)以及 β -内酰胺酶活性($P < 0.05$);可显著提高 MRSA 菌体内头孢唑林浓度($P < 0.05$)。**结论** CSE 具有抑制 MRSA 作用,与 β -内酰胺类抗生素合用具有协同作用。其机制与调控 *ribA*、PBPs、*lytM* 等相关靶基因的表达与转录,影响药物主动外排、细菌自溶及代谢等多种因素有关。

关键词: 马桑水提取物; β -内酰胺类抗生素; 耐药金黄色葡萄球菌; 青霉素结合蛋白; 协同效应机制

中图分类号: R285.5; R378.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)09-1802-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.09.016

Mechanism of *Coriaria sinica* extract on anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus*

HUANG De-bin, HU Ze-hua, YU Zhao-fen, HUANG Jin, CHEN Xue-fei

Department of Pharmacy, Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, China

Abstract: **Objective** To explore the synergies mechanism of *Coriaria sinica* extract (CSE) combined with β -lactam antibiotics on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Methods** The relevant gene expression, autolytic enzyme, and influence of β -lactamase were determined by AFFX prokaryotic expression microarray, Western-blotting, SDS-PAGE gel electrophoresis, etc. **Results** MRSA was resistant to the most antibiotics, and it had significant synergistic antibacterial effect while CSE was combined with β -lactam antibiotics ($P < 0.05$). The CSE can significantly reduce the total expression of RNA and regulate the expression of many genes with showing a dose-dependence when used alone or combined with ampicillin (AP), such as the basal metabolism genes, peptidoglycan hydrolase gene (*lytM*), transporter gene, PBPs, β -lactamase activity, etc. ($P < 0.05$). It can significantly improve the concentration of cefotaxime (CFX) in internal of MRSA ($P < 0.05$). **Conclusion** The CSE has significant inhibitory effects on MRSA, and it has significant synergistic effects when combined with β -lactam antibiotic on MRSA. The mechanism is associated with many factors of MRSA, such as regulation of expression and transcription on target genes (*ribA*, PBPs, *lytM*, etc.), the influence of active efflux, autolysis and metabolism, etc.

Key words: *Coriaria sinica* extract (CSE); β -lactam antibiotics; methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA); PBPs; synergies mechanism

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 是烧伤创面感染的常见菌^[1]。随 β -内酰胺类抗生素的广泛应用,在感染性疾病中,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)出现包括耐甲氧西林在内的多重耐药^[2]。氨基糖苷类抗生素具有严重的肾毒性和耳毒性,也

有相应的耐药 MRSA 菌株。目前新开发的有效抗生素价格昂贵^[2]。现已发现很多中药及相关活性成分具有显著抑制 MRSA 作用,在抗菌药物的研究方面将形成一个新的研究领域^[2]。

马桑 *Coriaria sinica* Maxim. 系木兰亚纲马桑科(Coriariaceae)马桑属 *Coriaria* Linn. 多年生落叶

收稿日期: 2016-11-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81360654)

作者简介: 黄德斌(1966—),男,硕士,教授,研究方向为神经药理与抗炎免疫药理。Tel: (071)88437479 E-mail: hdb66910@163.com

小乔木，全株均有毒。马桑根部药用，用于治风湿麻木、风火牙痛、痰饮、跌打损伤、烫火伤、急性结膜炎等。在民间有用于土农药的记载，马桑提取物对多种咀嚼式害虫具有明显的拒食和胃毒作用，可用作植物农药。马桑内酯类化合物是马桑的主要活性成分，对中枢神经系统具有显著的药理作用^[3]。本课题组研究发现马桑水提取物 (*Coriaria sinica* Maxim. extract, CSE) 对烧伤创面 MRSA 具有显著抑制作用^[4]，本研究进一步对其抗 MRSA 的作用机制进行初步探讨，为其临床应用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

PHOENIX-100 全自动微生物鉴定分析系统(美国生物-梅里埃有限公司); DHP-272 电热恒温培养箱(上海天呈实验仪器制造有限公司); BCL 系列生物超净工作台(北京亚泰科隆仪器技术有限公司); TP350 型触摸屏梯度 PCR 仪(日本 TaKaRa); DYY-2C 型稳流稳压电泳仪(常州诺基仪器有限公司); A1301049 低温高速离心机(上海艾测电子科技有限公司); KS-260 控制型 IKA 圆周式震荡器(德国 Edmund Buhler 公司); FluorChem DH 凝胶成像系统(美国 Alpha Innotech 公司); Multiskan FC 酶标仪、Smartspec TM plus 紫外分光光度计(美国 Bio-rad 公司); Prominence UFLC 高效液相色谱仪(日本岛津); BDS C₁₈ 反相色谱柱(大连江申分离

科学技术公司)。

1.2 菌株与基因盒

金黄色葡萄球菌 ATCC29213 (耐药菌) / ATCC25923 (敏感菌) 共 94 株 (ST1~94)，葡萄球菌染色体 *mec* 基因盒 (staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec*) Harmany 20~24 (SCC*mec* I~V) 购于南京便诊生物科技有限公司。

1.3 试剂与药品

细菌培养基(肉汤、LB 和 MH 琼脂) 购于北京索莱宝科技有限公司; 抗生素标准品均购于中国食品药品检定研究院, 包括氨苄西林、苯唑西林、氯霉素、万古霉素、米诺环素、强力霉素、利福平、亚胺培南、头孢噻肟、头孢吡肟、头孢唑啉、头孢呋辛、四环素、奥西西林、庆大霉素、环丙沙星、氨苄青霉素、红霉素、司帕沙星; RNA 保存液购于北京博尔迈生物技术有限公司; 青霉素结合蛋白 2a (PBP_{2a}) ELISA 试剂盒、小鼠抗体 GAPDH、羊抗小鼠二抗、Supersignal 发光试剂盒、Bocillin-FL 购于北京碧橙蓝生物科技有限责任公司; DNA Ladder (100 bp) 购于北京全式金生物技术有限公司; DNA Marker DL 2000 购于上海捷瑞生物工程有限公司; KT-201-TaqPCR Master Mix 试剂盒购于上海江莱生物科技有限公司; PCR 所用引物由上海捷瑞生物工程有限公司提供, 引物(用于菌株分型) 序列见表 1。

表 1 PCR 引物位点与序列

Table 1 Sites and sequence of PCR primers

基因	引物	寡核苷酸序列 (5'→3')	片段大小/bp	特征 (SCC <i>mec</i> 分型)
mecA	MECA P7	CAACTTACACTTTATCGTCG	162	内控
	MECA P4	GGTCCACCGACCTTACTTAAAA		
A	CIF2 R2	GCATTCAACTACCACGGACTAA	495	I
	CIF2 F2	GGTTAGCGTTGAACTGATGGAA		
B	KDP R1	GGAATAGAAGATGAAGAGATGC	284	II
	KDP F1	AGCTACTCATGGCATCTTGGAT		
C	MECI P3	GCGGTTTCAATTCACCTTGTC	209	II, III
	MECI P2	GGACGATCTTATTACGCACA		
D	DCS R1	CAGACTATATAACACCCGTG	342	I, II, IV
	DCS F2	CATCATCCTTGAGATCGTTG		
E	RIF4 R9	CGCTGCCTTTATATGTATCTC	243	III
	RIF4 F3	GGTATGGTTATTGAGCTGAGT		
F	RIF5 R13	GGCAATCAGACTATATACCTCT	414	III
	RIF5 F10	CTTCAATGATTGACTGCACATG		
G	pUB110 R1	AGCAACAGACTACACATGCAC	381	III
	IS431 P4	CTCATCGGCAGTATTATCGC		
H	pT181 R1	ACGAGAGACATAAGTTGGAGC	303	III
	IS431 P4	ATCGGCTCCTTAGACGCTAT		

1.4 药材

2015年9月采2年生新鲜马桑原生植物枝条,经湖北民族学院药用植物学胡泽华副教授鉴定为马桑 *Coriaria sinica* Maxim., 晾干备用。

2 方法

2.1 CSE 的制备

取1 kg 马桑粉末作为提取样品,用1 000 mL 蒸馏水浸泡30 min后,煎煮90 min 分别提取3次,将3次提取物合并、滤过和浓缩得CSE 浸膏(1 mL CSE 相当于10 g 生药)^[4], 备用。经HPLC 分析鉴定浸膏中含主要活性成分羟基马桑毒素1.83%、马桑亭0.41%、没食子酸3.62%。

2.2 CSE 最低抑菌浓度(MIC)的测定

按照文献方法^[5-6],以MH 肉汤于96孔板中依次成倍比稀释CSE 至终质量浓度为1~512 $\mu\text{g/mL}$ 。以生理盐水将菌悬液调至0.5 CFU/mL,并按1:1 000用MH 肉汤稀释后加入各孔中(50 μL , 接种量 5×10^5 CFU/mL),培养24 h (35 $^{\circ}\text{C}$),测定MIC。

2.3 CSE 与 β -内酰胺类抗生素协同作用测定(微量棋盘稀释法)

以MH 肉汤分别稀释CSE 为32、64、128 $\mu\text{g/mL}$ 3个倍比质量浓度,稀释苯唑西林、头孢唑啉或氨苄西林为2~128 $\mu\text{g/mL}$ 8个倍比质量浓度,随后分别吸取不同质量浓度药物50 μL 加入灭菌的96孔板中,于孔中加入100 μL 菌悬液(接种量 5×10^5 CFU/mL)。CSE 终质量浓度分别为8、16、32 $\mu\text{g/mL}$,苯唑西林或头孢唑啉或氨苄西林终质量浓度为0.5~32 $\mu\text{g/mL}$,各药单用或CSE 与苯唑西林或头孢唑啉或氨苄西林联用,培养24 h (35 $^{\circ}\text{C}$),将无菌生长的质量浓度定为MIC。按文献方法^[2,5]确定ATCC25923和15株MRSA 的MIC。

2.4 MRSA 菌液样品的制备

将培养24 h 的MRSA 菌株ST2 (SCCmec III 型)菌液按1:50的比例分别加入100 mL 的A组(不含药物的LB 肉汤)和B组(含CSE 32 $\mu\text{g/mL}$)中,振荡培养(200 r/min)直至吸光度(A_{600})值为1.0。室温离心15 min (4 000 r/min)收集菌体,于每管菌体沉淀中滴入10 mL RNA 样品液,静置24 h (4 $^{\circ}\text{C}$)后保存备用(-20 $^{\circ}\text{C}$)。

2.5 mecA 基因扩增及MRSA 鉴定

以接种环挑取单个菌落MRSA 于MH 琼脂平板培养24 h,然后将其接种于2 mL MH 肉汤,

于恒温培养箱中培养24 h (37 $^{\circ}\text{C}$)。随即按试剂盒说明书提取基因组DNA。即先取细菌培养液2 mL,离心1 min 弃上清(13 400 $\times g$),加入pH 8.0的缓冲液180 μL (含溶葡萄球菌酶0.1 mg/mL, Tris 20 mmol/L, Na₂-EDTA 2 mmol/L, Triton 1.2%),孵育40 min (37 $^{\circ}\text{C}$)后,于管中加入蛋白酶K 溶液(20 mg/mL) 20 μL 混匀,加入GB 缓冲液220 μL ,轻振荡15 s,静置10 min (70 $^{\circ}\text{C}$)直至变澄清,离心;加入无水乙醇220 μL 混匀,转入吸附柱置于收集管离心30 s (13 400 $\times g$)弃上清,再次转入收集管;再于吸附柱中依次加入缓冲液去蛋白漂洗液(GD)500 μL 、脱脂漂洗液(PW) 700 μL 、PW 500 μL ,分别离心30 s (13 400 $\times g$)弃上清,重转入收集管;将吸附柱重置于收集管离心2 min (13 400 $\times g$)弃上清,室温静置5 min,晾干漂洗液;将吸附柱转入离心管(1.5 mL),于吸附膜中央滴加TE 洗脱缓冲液50 μL ,室温静置5 min,离心2 min (13 400 $\times g$)弃上清,收集溶液即为细菌基因组DNA,低温保存(-30 $^{\circ}\text{C}$)。

mecA 基因引物为F: 5'-CAACTAAAACATTC-GCGGTAATGAC-3', R: 5'-TTGCTTCCCGTATTT-GATAATCCAT-3'。mecA 基因扩增反应体系为1.0 μL 上下游引物,9.5 μL ddH₂O, 12.5 μL PCR Master Mix (2 $\times$ Taq), 1.0 μL DNA 模板^[5]。反应条件^[6]: 预变性93 $^{\circ}\text{C}$ 、2min, 93 $^{\circ}\text{C}$ →55 $^{\circ}\text{C}$ →72 $^{\circ}\text{C}$ 各30 s,共35次循环。PCR 产物电泳30 min (琼脂糖凝胶1.5%),溴化乙锭EB 染色。313 bp DNA 条带作为MRSA 阳性菌株。

2.6 RNA 的提取与检测(基因芯片分析, Microarray)

用RiboPureTM-Bacteria Kit 法提取细菌总RNA。最终得RNA 60 μL 。用分光光度计检测RNA 纯度与浓度后检测总RNA 完整性。将RNA 反转录为cDNA,反应最终总体积为30 μL ,最后纯化和定量cDNA,芯片杂交、清洗染色及扫描,RT-PCR 验证芯片结果。选取基因芯片结果中一个MRSA 特异基因mecA 和5个差异表达基因(SAV2353、Cap、lytM、ribA、16 S),按文献报道^[6-7]检索基因序列,用染料法定量分析引物序列,各实验重复3次。设计PCR 引物见表2。

室温融解2XAllin OneTM Q-PCR Mix,离心,冰上制备PCR reaction mix,混匀,加入8联管,离心,标准3步法完成PCR 反应,分析熔解曲线。

表 2 PCR 引物
Table 2 PCR Primers

基因	正向引物	反向引物
mecA	5'-TAGGCAATCAAGAACAACCTGAA-3'	5'-TTATCATACGACGCGCAACAATA-3'
SAV2353	5'-CCCACGTTTCAGTTCAACCGCCAATT-3'	5'-CAGAGAGATCAAGATAGCGCAGA-3'
Cap	5'-GTAGTGTCCGTCCTCGTGATG-3'	5'-GCAGCGTATTGGAAGGACCCAT-3'
lytM	5'-TGTCGACATGGAATGCCATGC-3'	5'-CACTAGTTAGCTTCACGCC-3'
ribA	5'-TAGCTCTACTTCATGTGCCTGC-3'	5'-CTACATAATCCACCACTGCG-3'
16 S	5'-TCGTCGTGGTGC GGAGTATT-3'	5'-TGGCGTCATCCTTCTTGTT-3'

2.7 Western-blotting 测定 PBP_{2a} 蛋白的表达

分别按比例 (1:50) 将培养 24 h 的 MRSA 菌株 (SCCmec III、IIIA 和 II₆ 型) 菌液加入 100 mL 的 MH 肉汤各组中, 分组按 1~8 共 8 个组, 即对照组、CSE (8、16、32 μg/mL)、氨苄西林 (2 μg/mL) + CSE (8、16、32 μg/mL)。振荡培养 (37 °C, 200 r/min), 调 A_{600} 值为 1.0, 离心 15 min (4 000 r/min) 收集菌体, 无菌蒸馏水清洗后分别加入 5 mL RIPA 裂解液混匀, 低温超声破碎 (功率 200 W) 持续和间隔均为 30 s, 循环 30 次后, 离心 20 min (4 °C, 10 000 r/min), 得 MRSA 上清蛋白总抽提液, 以 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。取蛋白抽提液与上样缓冲液混合加热 3 min (100 °C), 于各加样孔中加入 10 μg 蛋白样品, 70 min 电泳 (100 V, 250 mA) 转膜, 1 h 室温封闭, 加入一抗 (PBP_{2a} 1:10 000; GAPDH 1:500), 孵育 24 h (4 °C), 以 TBS-T 洗膜 3 次 (每 10 min), 加入二抗孵育 2 h (37 °C), 再洗膜 3 次后, 显影和定影, 各样本均重复 3 次。

2.8 荧光凝胶成像法检测 PBPs

按文献方法^[8-9]接种 MRSA2 于含 CSE (32 μg/mL) 和不含 CSE 的 MH 肉汤中, 孵育 A_{600} 至 0.8~0.9 (对数中期), 离心 10 min (13 000×g) 收集菌体, 以 2 mL PBS (pH 7.0) 冲洗, 使菌体全部悬浮, 以功率 200 W 的超声破碎, 共 30 次 (破碎与间隔时间均为 30 s), 离心 10 min (13 000×g), 取上清再超速离心 1 h (4 °C, 100 000×g), 用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。电泳吸取膜蛋白 20 μg, 加入 1 mg/mL Bocillin-FL, 调浓度至 25 μmol/L, 孵育 15 min (37 °C), 电泳, 选择激发光 488 nm 和发射光 530 nm 于 Fluor Chem DH 凝胶成像系统中成像。将样品与氨苄西林 (600 μg/mL) 混匀, 孵育 10 min (37 °C), 再加入 Bocillin-FL (25 μmol/L), 孵育 15 min, 电泳并荧光凝胶成像, 以检测 PBPs 与药

物的亲和力。各重复 3 次。

2.9 HPLC 法测定 MRSA 摄取头孢唑啉

色谱条件为室温进样量, 波长为 272 nm, 流动相为乙腈-磷酸氢二钠柠檬酸溶液 (12:88), 体积流量为 1.0 mL/min, 稀释流动相至所需浓度, 过滤器抽滤 (孔径 0.45 μm)。分别取 1 mL 培养 24 h 的 MRSA (ST2、ST8、ST80) 及 ATCC25923 质控菌转入鲜 LB 肉汤中 (100 mL), 振荡孵育 24 h (200 r/min, 37 °C)。离心 10 min (5 000 r/min), 去上清, PBS 稀释至 40 mg/mL。分别以头孢唑啉 (100 μg/mL)、头孢唑啉 + CSE (32 μg/mL) 处理。37 °C 孵育 30 min, 分别于 5、10、15、20、25、30 min 时各取 1 mL, 离心 2 min (12 000 r/min) 去上清。再以 PBS 冲洗 2 次, 离心, 加入溶葡萄球菌酶溶液 (0.1 mg/mL) 及溶菌酶 (20 mg/mL) 的缓冲液 150 μL, 水浴 30 min (37 °C), 超声破碎, 离心 5 min, 得头孢唑啉上清菌解液, 取菌解液 100 μL 加入甲醇 300 μL, 振荡沉淀蛋白, 离心 6 min, 取上清待测。各取 100、50、20、10、5、1、0.5、0.1 μg/mL 头孢唑啉 200 μL 与甲醇按 1:3 混合, 分别取 20 μL 进样 3 次, 用峰面积和药物质量浓度绘制相应的标准曲线。于线性范围内, 计算不同质量浓度的回收率。配制头孢唑啉 20 μg/mL, 连续 5 d 重复进样 3 次, 计算日内与日间精密度。

2.10 MRSA 自溶酶和 β-内酰胺酶活性的测定

培养 24 h 的菌液离心, 加入 SDS 液 (8%), 煮沸 30 min 后 (100 °C), 冰浴冷却, 离心 15 min (5 000 r/min), 去上清, 无菌蒸馏水冲洗菌体 3 次, 离心 10 min (10 000 r/min), 去上清得细胞壁粗提物, 冷藏 (4 °C) 干燥 48 h 备用。分别接种 ST8 于含 CSE (0、8、16、32 μg/mL) 的肉汤 5 mL 中, 至 A_{600} 值 0.6 (对数中期), 离心 5 min (10 000 r/min) 去上清, 缓冲液 (Tris-Cl, pH 7.5) 洗涤, 加入 50 μL SDS (4%)

混匀, 静置 30 min, 离心 5 min (12 000 r/min), 得上清自溶酶粗提液^[9]。室温下每孔上样量 20 μg 恒流电泳 (20 mA), 蒸馏水冲洗凝胶 15 min, 共 3 次, 凝胶在自溶酶复性缓冲液中振荡 24 h (37 $^{\circ}\text{C}$), 充分溶解细胞壁, 观察自溶酶谱和酶量改变。分别于 96 孔板中加入酶液 100 μL 和不同质量浓度药物 90 μL , 孵育 30 min [CSE 和三唑巴坦 (TBT) 质量浓度为 0、16、32、64 $\mu\text{g}/\text{mL}$], 测定 A_0 (波长 492 nm)。加入 nitrocefin 液 10 μL , 孵育 10 min (37 $^{\circ}\text{C}$), 以酶标仪测定 A_1 (波长 492 nm)。各重复 3 次, 确定不含药样品 A 值 100%, 最终以 A_1 与 A_0 的差值为 β -内酰胺酶的相对活性 (吸光度值越大酶活性越大)。

2.11 统计学方法

所有实验数据以 SPSS 12.0 处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间行方差分析, 归因误检验用纽曼-科伊尔检验。

3 结果

3.1 MRSA 菌株鉴定与分型结果

确定 94 株均为 MRSA, 分离出 94 株 Harmony 20 (mecA 阳性), 质控菌 ATCC25923 (mecA 阴性), 部分 PCR 电泳结果见图 1。MRSA 菌株位于 pls 基因下游 495 bp 为 SCCmec I, 位于 kdp 操纵子 284 bp, 为 SCCmec II, 209 bp 为 SCC mecII、III, 342 bp 为 SCCmec I、II、IV, 162 bp 是 mec 结构基因, 系 MRSA 特有。94 株 MRSA 菌株中 SCCmec IIIA 型、SCCmec III 分别为 54 株和 40 株。见图 2。

3.2 抗生素的 MIC 与耐药率 (RR)

表 3 可见, 94 株 MRSA 对绝大多数抗生素耐药, 其中对氨苄西林、庆大霉素、红霉素、四环素及喹诺酮的耐药率最高, RR 超过 98.48%, 对合成四环素 (多西环素和米诺环素)、氯霉素、万古霉素几乎不耐药 (RR 低于 4.29%)。

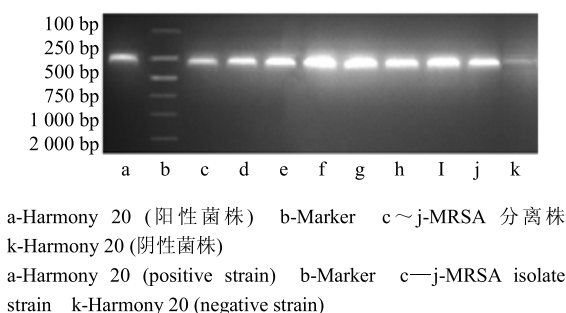


图 1 mecA 基因部分测定结果

Fig. 1 Part of measurement results of mecA gene

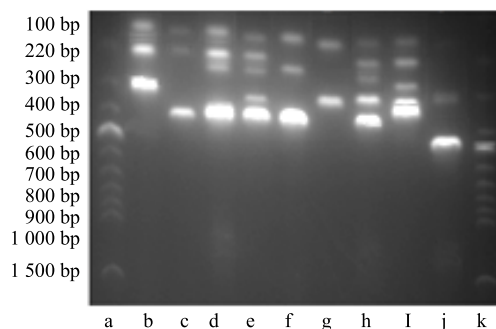


图 2 SCCmec 分型

Fig. 2 SCCmec typing

3.3 CSE 与氨苄西林、苯唑西林和头孢唑啉的协同抗菌效应

结果发现, CSE 单用时, 除了 ST8 和 ST14 菌株的 MIC 值为 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 外, 其余菌株的 MIC 值在 32~128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。CSE 与氨苄西林、苯唑西林或头孢唑啉合用能呈剂量依赖性降低各个菌株的 MIC 值。表明 CSE 与氨苄西林、苯唑西林和头孢唑啉合用对 MRSA 具有显著的协同抗菌效应。结果见表 4。

3.4 CSE 对 MRSA 基因表达的影响

RNA 样品条带结果显示, 23 S 较 16 S rRNA 表达显著, 其表达的质量与总量完全满足表达谱芯片要求 (亮度大于 1:1), 表明 RNA 可用。其中 MRSA 未经药物处理的 RNA 表达总量为 126.38 μg , 经过 CSE 处理的 RNA 表达总量为 58.37 μg 。结果见图 3。

3.5 基因差异表达结果

结果显示, 经 CSE 处理后, 基因表达上调的有 148 个, 其中功能明确的 54 个; 基因表达下调 311 个, 其中功能明确的 103 个。整体上调基因包括: 基础代谢基因、编码 lytM 基因 (与细菌自溶有关), 上调幅度平均为 4.37 ± 0.77 , 与未用 CSE 处理的基因表达 (2.84 ± 0.69) 具有显著差异 ($P < 0.05$)。整体下调基因包括: 转运子基因、转录调控基因、核酸代谢基因、DNA 复制与修复基因、毒力基因、RNA 甲基化酶基因 (与应激有关), 下调幅度平均为 0.368 ± 0.029 , 与未用 CSE 处理的基因表达 (0.871 ± 0.016) 具有显著差异 ($P < 0.05$)。见图 4。

表 3 抗生素对 MRSA 的 MIC 和 RR
Table 3 MIC and RR of antimicrobial drugs in MRSA

药物	MRSA/株			MIC/(mg·L ⁻¹)			RR/%
	敏感	临界耐药	耐药	范围	MIC ₅₀ (抑菌)	MIC ₉₀ (杀菌)	
氯霉素	81	13	0	0.125~16	2	6	0.00
万古霉素	93	1	0	0.125~5	1	2	0.00
米诺环素	82	11	1	0.125~4	2	4	1.06
强力霉素	58	33	3	0.125~32	4	16	3.19
利福平	52	5	37	0.125~64	0.5	32	39.36
亚胺培南	8	4	82	0.5~128	64	128	87.23
头孢噻肟	6	5	83	2~256	128	256	88.30
头孢吡肟	4	6	84	2~256	128	128	89.36
头孢唑啉	4	5	85	2~256	128	256	90.43
头孢呋辛	4	4	86	1~256	128	256	91.49
四环素	0	2	91	0.25~256	128	128	96.81
奥西西林	0	1	93	128~512	256	256	98.94
庆大霉素	0	1	93	64~512	256	256	98.94
环丙沙星	0	1	93	16~128	128	128	98.94
氨苄青霉素	0	0	94	32~256	128	128	100.00
红霉素	0	0	94	128~512	512	512	100.00
司帕沙星	0	0	94	0.125~16	16	16	100.00

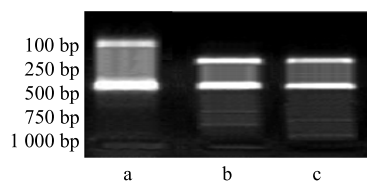
表 4 CSE 分别合用氨苄西林、苯唑西林或头孢唑啉对 MRSA 和 ATCC25923 的 MIC 值

Table 4 MIC of ampicillin, oxacillin and cefazolin combined respectively with CSE against ATCC 25923 and 15 strains MRSA

菌株	氨苄西林 MIC/(μg·mL ⁻¹)				苯唑西林 MIC/(μg·mL ⁻¹)				头孢唑啉 MIC/(μg·mL ⁻¹)			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
ATCC 25923	0.25	0.25	0.125	0.125	2	2	0.5	0.125	1	0.5	0.125	0.125
ST1	32	16	4	0.25	128	16	16	2	128	64	64	16
ST2	128	32	16	1	256	32	32	2	128	32	16	0.125
ST3	128	64	16	2	256	64	64	4	128	32	16	1
ST4	256	128	32	4	128	64	64	0.5	64	16	16	0.5
ST5	64	32	32	2	256	64	64	2	256	64	16	2
ST6	256	128	32	4	128	64	32	4	64	32	16	2
ST7	64	32	16	2	64	32	32	2	128	32	32	0.5
ST8	64	32	16	2	128	64	64	1	128	64	16	2
ST9	64	32	16	1	256	128	128	2	256	64	16	2
ST10	128	64	64	4	256	64	32	4	256	64	32	4
ST11	64	16	16	0.5	128	64	64	2	128	64	32	2
ST12	64	32	16	2	128	64	16	0.5	128	64	32	4
ST13	32	16	8	0.5	256	128	128	4	128	64	16	0.125
ST14	128	64	64	4	128	128	64	2	16	8	4	0.125
ST15	64	16	8	2	64	32	4	0.125	64	32	16	0.125

A-单用抗生素; B~D-抗生素+CSE (8、16、32 μg·mL⁻¹)

A-antimicrobial drugs alone; B—D-antimicrobial drugs + CSE (8, 16, 32 μg·mL⁻¹)



a-Marker b-未经药物处理的 MRSA ($1.489 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) c-经 CSE 处理的 MRSA ($0.992 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

a-Marker (Control RNA) b-RNA of the MRSA on being untreated with drug ($1.489 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) c-RNA of the MRSA on being treated with CSE ($0.992 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

图 3 样品总 RNA

Fig. 3 Total RNA of samples

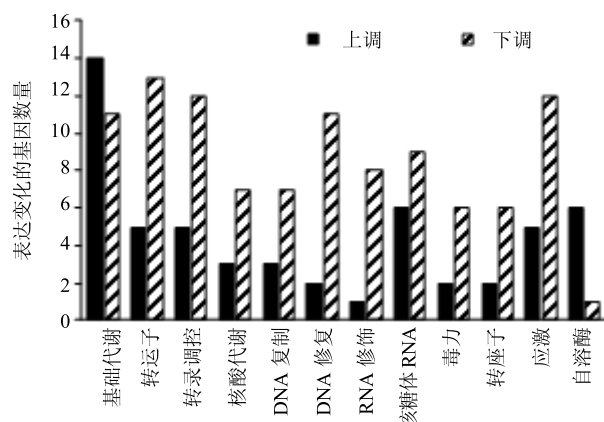


图 4 相关基因表达的变化

Fig. 4 Changes of expression in related genes

3.6 CSE 对 MRSA 转录水平的影响

结果发现,与全基因组表达谱芯片结果相符,其中 CSE 对编码 PBP_{2a} 蛋白的 *mecA* 基因表达无显著性调节作用 ($P>0.05$),但可明显上调 *ribA* 和 *lytM* 基因的表达 ($P<0.05$),下调 *SAV2353* 和 *Cap1C* 的表达 ($P<0.05$)。结果见表 5。

3.7 CSE 对 PBP_{2a} 表达的影响

结果发现,氨苄西林能显著诱导 MRSA 的 PBP_{2a} 表达 ($P<0.05$);单用 CSE 或与氨苄西林合用均能呈剂量依赖性下调 MRSA 的 PBP_{2a} 表达 ($P<0.05$)。见图 5。

表 5 CSE 对 MRSA 转录水平的影响

Table 5 Effects of CSE on transcription level of MRSA

基因	n	基因芯片	RT-PCR
<i>mecA</i>	5	0.613 ± 0.007	0.595 ± 0.041
<i>ribA</i>	5	5.172 ± 1.371	$8.736 \pm 1.182^*$
<i>lytM</i>	5	1.987 ± 0.213	$4.272 \pm 0.301^*$
<i>SAV2353</i>	5	1.308 ± 0.011	$0.314 \pm 0.212^*$
<i>Cap1C</i>	5	1.306 ± 0.008	$0.211 \pm 0.013^*$

与基因芯片法比较: $^*P<0.05$

$^*P<0.05$ vs microarray

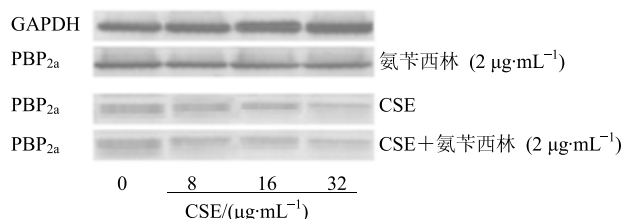


图 5 CSE 对 MRSA PBP_{2a} 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effects of CSE on protein expression of PBP_{2a} in MRSA

3.8 CSE 对 PBP1 表达和活性的影响

结果显示,当在肉汤中加入 CSE $32 \mu\text{g}/\text{mL}$ 后,MRSA 的 PBP₁ 和 PBP₂ 表达量显著降低 ($P<0.05$);由于氨苄西林能封闭 PBP_s 与 Bocillin-FL (只结合 PBP_{2a}) 的结合位点,因此, CSE 对 PBP_s 与 Bocillin-FL 的亲合力无显著性影响 ($P>0.05$)。结果见图 6。

3.9 CSE 对 MRSA 摄取头孢唑啉的影响 (HPLC 法)

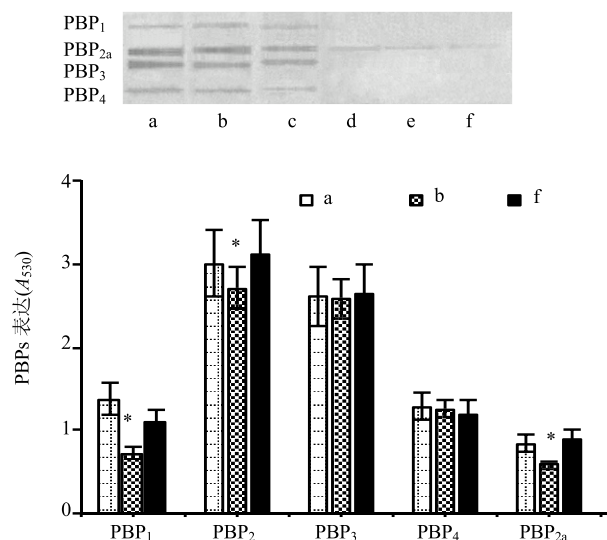
结果发现,经 CSE ($32 \mu\text{g}/\text{mL}$) 处理后,在各时间点 MRSA 和 ATCC25923 菌体内头孢唑啉浓度均显著高于对照组 ($P<0.05$ 、 0.01)。提示 CSE 能明显增加菌体内头孢唑啉的蓄积浓度。结果见表 6。

3.10 CSE 对 MRSA 自溶酶谱与活性的影响

结果发现, CSE $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ 能明显减弱 MRSA 大相对分子质量自溶酶部分条带 (IIm 基因),增强低相对分子质量部分条带,并随 CSE 浓度的增高而增强、增多。其中, *lytM* 相对分子质量位于 $35\ 000$,与基因芯片结果相符。表明 CSE 能促进 MRSA 自溶酶的表达。结果见图 7-A。CSE 呈现剂量依赖性抑制 β -内酰胺酶活性 ($P<0.05$),其抑制作用显著弱于 TBT ($P<0.05$)。结果见图 7-B。

4 讨论

木兰亚纲马桑科植物马桑系多年生落叶小乔木,全株均有毒,其主要成分包括马桑毒素、马桑亭、羟基马桑毒素等^[6]。有报道^[7], CSE 和醇提取



a-PBPs 空白组 b-CSE 32 $\mu\text{g/mL}$ 的 PBPs 表达 c-膜蛋白+CSE 32 $\mu\text{g/mL}$ 的 PBPs 与 Bocillin-FL 亲和力 d-PBP_{2a} 空白组 e-CSE 32 $\mu\text{g/mL}$ 的 PBP_{2a} 表达 f-MP+AP 预孵, 再与 CSE 32 $\mu\text{g/mL}$ 孵育后 PBP_{2a} 与 Bocillin 的亲和力; 与 a 组比较: * $P < 0.05$

a-control of PBPs b-CSE 32 $\mu\text{g/mL}$ c-affinity of PBPs with Bocillin-FL in membrane protein (MP) and CSE 32 $\mu\text{g/mL}$ d-Control of PBP_{2a} e-PBP_{2a} with CSE 32 $\mu\text{g/mL}$ f-affinity of PBP_{2a} with Bocillin-FL in CSE 32 $\mu\text{g/mL}$ after pre-incubation with MP and AP; * $P < 0.05$ vs a group

图 6 CSE 对 MRSA PBPs 蛋白表达的影响

Fig. 6 Effects of CSE on expression of PBPs protein

物对多种细菌和真菌有明显抑制作用。随 β -内酰胺类抗生素的广泛应用, MRSA 已成为烧伤创面感染的常见耐药菌^[1]。因此, 寻找治疗烧伤创面感染的有效外用药物已成为当今医学的一大难题。研究发现, 马桑水提取物能有效抑制和杀灭烧伤创面感染常见 3 种耐药菌^[4]。本研究培养 94 株 MRSA 对绝大多数 β -内酰胺类抗生素耐药 (耐药率超过 98.48%), 对多西环素、米诺环素、氯霉素、万古霉素几乎不耐药 (低于 4.29%)。结果证实, CSE 对 94 株耐药菌仍表现出显著抗菌效力, 除了 ST8 和 ST14 菌株的 MIC 值为 16 $\mu\text{g/mL}$ 外, 其余在 32~128 $\mu\text{g/mL}$ 内。结果还发现, CSE 与 β -内酰胺类抗生素合用能呈剂量依赖性降低各个菌株的 MIC 值, 表明其与 β -内酰胺类抗生素合用对 MRSA 具有显著地协同抗菌效应。其作用机制可能与多种因素有关。

4.1 调控相关靶基因的表达与转录, 下调 PBPs 表达

研究显示, 经过 CSE 处理后, MRSA 的 RNA 表达总量显著下调。其中, 基因表达上调 148 个, 包括基础代谢基因及与细菌自溶有关的编码肽聚糖水解酶 *lytM* 基因。下调基因 311 个, 包括转运子基因、转录调控基因、核酸代谢基因、DNA 复制与修复基因、毒力基因及与应激有关的 RNA 甲基化酶基因。CSE 对编码 PBP_{2a} 蛋白的 *mecA* 基因表达

表 6 CSE (32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 对 MRSA 菌体内头孢唑啉质量浓度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effects of CSE (32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) on Cefazolin concentration of MRSA *in vivo* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

时间/min	组别	头孢唑啉/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$			
		MRSA-ST2	MRSA-ST8	MRSA-ST10	ATCC 25923
5	头孢唑啉	0.19 $\pm$ 0.07	0.14 $\pm$ 0.07	0.21 $\pm$ 0.04	0.43 $\pm$ 0.07
	头孢唑啉+CSE	1.08 $\pm$ 0.15*	1.89 $\pm$ 0.67*	2.33 $\pm$ 0.19**	2.67 $\pm$ 0.08**
10	头孢唑啉	0.34 $\pm$ 0.17	0.23 $\pm$ 0.22	0.44 $\pm$ 0.05	0.25 $\pm$ 0.05
	头孢唑啉+CSE	2.53 $\pm$ 0.74**	2.15 $\pm$ 0.56**	3.14 $\pm$ 0.51**	2.39 $\pm$ 0.62**
15	头孢唑啉	0.42 $\pm$ 0.26	0.31 $\pm$ 0.28	0.54 $\pm$ 0.03	0.16 $\pm$ 0.01
	头孢唑啉+CSE	3.48 $\pm$ 0.41**	2.81 $\pm$ 0.84**	4.16 $\pm$ 0.27**	3.04 $\pm$ 1.51**
20	头孢唑啉	0.31 $\pm$ 0.24	0.44 $\pm$ 0.23	0.23 $\pm$ 0.05	0.36 $\pm$ 0.07
	头孢唑啉+CSE	3.97 $\pm$ 0.32**	3.48 $\pm$ 0.39**	3.83 $\pm$ 0.62**	4.37 $\pm$ 0.85**
25	头孢唑啉	0.26 $\pm$ 0.15	0.17 $\pm$ 0.05	0.31 $\pm$ 0.14	0.23 $\pm$ 0.18
	头孢唑啉+CSE	4.02 $\pm$ 0.65**	5.88 $\pm$ 0.47**	4.24 $\pm$ 0.17**	5.58 $\pm$ 0.32**
30	头孢唑啉	0.38 $\pm$ 0.28	0.30 $\pm$ 0.02	0.52 $\pm$ 0.04	0.08 $\pm$ 0.01
	头孢唑啉+CSE	6.24 $\pm$ 1.03**	5.82 $\pm$ 0.88**	3.06 $\pm$ 0.22*	7.89 $\pm$ 0.18**

与头孢唑啉组同一菌种同一时间点比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs Cefazolin group of the same species at the same point of time

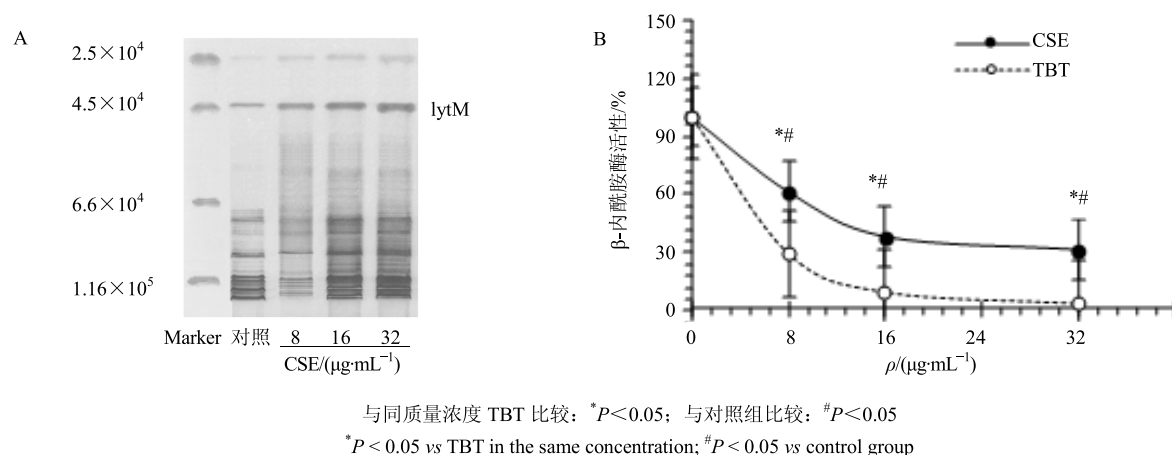


图7 CSE对MRSA自溶酶谱(A)和 β -内酰胺酶活性(B)的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 7 Effects of CSE on zymography of autolytic enzyme (A) and activity of β -lactamase in MRSA ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

无显著调节作用,但可上调 *ribA* 和 *lytM* 基因表达,下调 SAV 2353 和 *cap1C* 表达。单用 CSE 或与氨苄西林合用均呈剂量依赖性下调 MRSA 的 PBP_{2a} 表达。CSE 32 $\mu\text{g/mL}$ 能显著降低 MRSA 的 PBP₁ 和 PBP₂ 表达量,不影响 PBPs 与 Bocillin-FL 亲和力。PBPs 是一类酶,在胞浆内促进合成肽聚糖,并加上氨基糖形成短肽转运至细胞膜外链接成层状的细胞壁,再由 PBP_{1b} (转肽酶) 合成 5-甘氨酸链形成稳定的交链立体细胞壁^[8-9];小分子 PBP₂ 和 PBP₃ 分别维持菌体形态和参与有丝分裂^[10-11]。MRSA 的耐药与 PBPs 基因的表达上调、变构以及与抗生素亲和力下降密切相关。CSE 的抗菌作用可能是通过调控 PBP_{1a}、PBP_{1b}、PBP₂ 和 PBP₃ 的转录基因,下调其表达,而影响 MRSA 细胞壁短肽和 5-甘氨酸链的形成,干扰有丝分裂与改变菌体形态。

4.2 下调转运子基因的表达与转录,可能与干扰药物的主动外排有关

MRSA 耐药的另一机制是主动外排。主动外排系统包括泵出药物的转运子、外膜蛋白(泵出药物通道)和附加蛋白(接转运子来的药物转出)^[11-12]。结果发现,经 CSE (32 $\mu\text{g/mL}$) 处理后,在各时间点 MRSA 和 ATCC25923 菌体内头孢唑啉的浓度均显著高于对照组。提示 CSE 能增加菌体内头孢唑啉蓄积,提高菌体内药物浓度很可能与抑制转运子活性和阻断外膜蛋白通道有关。有关证据将在以后的实验中深入探究。

4.3 上调 *lytM* 和下调 *llm* 基因的表达与转录,促其自溶死亡

药物激活自溶酶,促进病原微生物自溶死亡,

是抗菌药物抗菌的最为重要的机制,尤其是低分子自溶酶,数量多,活性强,性质稳定,合成速度快^[9,13]。有研究证实, *llm* 基因可稳定溶酶体膜,抑制溶酶体酶活性,阻滞细菌自溶死亡^[9,14]。自溶酶编码基因 *lytM* 与 *llm* 基因活性失活是促进耐药性产生的基础^[9]。CSE 呈剂量依赖性减弱 MRSA 大分子量自溶酶部分条带 (*llm* 基因),增强小分子量部分条带 (*lytM* 基因)。提示 CSE 能促进 MRSA 自溶酶的表达。这可能是 CSE 抗菌作用最为重要的机制。

4.4 CSE 的多成分稳定结构致使水解酶作用难以发挥

β -内酰胺类抗生素抗菌的关键结构是 β -内酰胺环和酰胺基团。细菌产生的 β -内酰胺酶^[8-9]可迅速水解酰胺基团,打开 β -内酰胺环,同时与 β -内酰胺类抗生素大量稳定结合而快速耐药^[11]。CSE 的主要成分为马桑毒素、羟基马桑毒素、马桑宁等^[4,11],其结构不存在 β -内酰胺环和酰胺基团的结合位点, β -内酰胺酶难以发挥“水解”和“牵制”效应。结果还发现,CSE 呈现剂量依赖性抑制 β -内酰胺酶活性,其抑制作用虽然显著弱于三唑巴坦,但也能与 β -内酰胺类抗生素产生协同抗菌效应。

4.5 上调 *ribA* 基因的表达,可能与影响细菌核黄素的合成有关

核黄素是细胞生物氧化与能量代谢的关键物质,与蛋白质、核酸和糖类物质的代谢密切相关,促进细胞分裂繁殖和维持细胞膜的完整性^[9]。而核黄素合成的关键限速酶基因与 *ribA* 基因表达有关^[9,13]。本研究发现,CSE 显著上调 *ribA* 的表达,可能限制了细菌核黄素的合成,而影响 MRSA 的分裂繁殖和

细胞膜的完整性。

4.6 影响与应激有关的核酸甲基化酶基因的表达

在甲基化酶的作用下,核酸被甲基化,未进行甲基化的核酸由限制酶分解和修饰,是 RNA 转录产物的必经过程^[7-9]。若甲基化酶异常表达将直接影响蛋白质的合成过程。本研究证实,CSE 能显著抑制 DNA 甲基化酶基因的表达,而诱导 tRNA 甲基化酶基因的表达。这可能是 CSE 抑制 MRSA 的又一机制。

总之,CSE 具有体外显著抗 MRSA 作用,其机制系多环节的共同效应。由于 CSE 系多成分提取物,抗菌机制较复杂。要进一步探明其机制,需要研究单一成分的作用与机制,将在以后的研究中进一步研究。

参考文献

- [1] 倪俊,顾海峰,许献荣,等.烧伤病房难愈性创面病原菌分布及耐药性分析[J].中国微生态学杂志,2013,25(2): 184-187.
- [2] 彭青.黄芩素与 β -内酰胺类抗生素对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的协同抗菌作用研究[D].汕头:汕头大学,2010.
- [3] 张雁冰,朱献民,艾国民,等.马桑籽中马桑内酯类化合物的提取分离及其活性[J].中草药,2007,38(5): 678-680.
- [4] 黄德斌,胡泽华,余昭芬,等.马桑水提取物对烧伤创面感染常见3种耐药菌的抑制作用[J].中国药理学通报,2016,32(10): 1388-1394.
- [5] 蔡海军.烧伤患者感染的病原菌分布及耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2012,22(11): 2446-2449.
- [6] 黄德斌,胡泽华,余昭芬,等.马桑水提取物促进大鼠烧伤创面愈合的机制[J].中国病理生理杂志,2013,29(1): 138-142.
- [7] 周莉君,宋良成,侯若彤,等.马桑提取物的抑菌作用和抑菌机理的初步研究[J].四川大学学报:自然科学版,2006,43(5): 1165-1168.
- [8] 吕瑞林.芦荟提取物对烫伤大鼠深Ⅱ度创面愈合的影响及可能的作用机制研究[D].福州:福建医科大学,2005.
- [9] 王茜.黄连素抑制TNF- α 刺激ARPE-19细胞产生炎症因子的作用及机制研究[D].重庆:重庆医科大学,2012.
- [10] 乔亮,杨惠忠,袁克俭,等.抑制应激反应措施对严重烧伤大鼠早期创面侵袭性感染的影响[J].中华烧伤杂志,2005,21(2): 85-88.
- [11] 张雁冰,李玲,刘宏民,等.马桑化学成分研究[J].郑州大学学报:理学版,2005,37(1): 75-77.
- [12] 孙建文,万新亮,任孔华,等.金黄色葡萄球菌对红霉素和克林霉素诱导耐药分析[J].检验医学,2010,25(9): 675-677.
- [13] 危华玲,农生洲.我院2010—2012年铜绿假单胞菌耐药率与抗菌药物使用量的相关性研究[J].中国药房,2015,26(5): 609-611.
- [14] 沙莹,方鉴,赵玉培,等.注射用多尼培南体外抗菌活性研究[J].中国药理学通报,2015,31(8): 1179-1180.