

· 药物代谢 ·

## 基于代谢组学分析热炎宁合剂联合利奈唑胺对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌及其生物膜的抑制机制

张璐璐<sup>1,2</sup>, 温博<sup>1</sup>, 吕诚<sup>1</sup>, 杨伟峰<sup>3</sup>, 褚亚军<sup>4</sup>, 包梅<sup>1,2</sup>, 易剑峰<sup>2</sup>, 李立<sup>1</sup>, 杜成强<sup>4</sup>, 谭勇<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院中医临床基础医学研究所, 北京 100700;

2. 宜春学院化学与生物工程学院, 江西宜春 336000;

3. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700; 4. 清华德人西安幸福制药有限公司, 西安 710043)

**[摘要]** 目的:探讨热炎宁合剂(RYN)联合利奈唑胺(LNZ)对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)及其生物膜的抑制作用。方法:采用微量稀释法测定 RYN 和 LNZ 对 MRSA 的最低抑菌浓度(MIC);微孔板法检测在生物膜生长过程中 4 个时间点(0, 6, 12, 24 h)的 MRSA 给药前后活菌量的变化;扫描电镜观察 24 h 时 MRSA 形态学变化;细胞代谢组学技术检测在 4 个时间点时两药联合干预 MRSA 的内源性小分子终端代谢物的变化。结果:RYN 和 LNZ 的 MIC 分别为 1/2 原液和 4 mg·L<sup>-1</sup>。单用 LNZ(2 mg·L<sup>-1</sup>)0 h 活菌量抑制效果优于 1/16 RYN 单用, 6, 12, 24 h 则单用 1/16 RYN 优于单用 LNZ。RYN 联合 LNZ 在 4 个时间点的抑制作用均优于单用组。两药联用对 24 h 时 MRSA 生物膜形态学结构的破坏优于单用组。环磷酸腺苷(cAMP), 二磷酸腺苷(ADP)-D-核糖和 2-甲基丁酰辅酶 A(2M-CoA)是与被膜形成相关的代谢物;LNZ 对这 3 个代谢物无治疗作用, RYN 在 12, 24 h 分别对 2M-CoA 和 ADP-D-核糖产生影响;两药联用在 24 h 对三者均有治疗作用。L-色氨酸、苯丙酮酸、胞苷和癸二酸是 LNZ 的药效代谢标志, 相关的生物通路有苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成, 苯丙氨酸代谢。L-组氨酸, 尿酸, L-赖氨酸等 4 个代谢物是 RYN 的药效标志, 相关的生物通路有苯丙氨酸代谢和氨酰转移核糖核酸的生物合成。L-色氨酸, L-赖氨酸, 鞘氨醇-1-磷酸等 9 个代谢物与两药联用的药效相关, 相关的生物通路有氨酰转移核糖核酸的生物合成, 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成, 新生霉素生物合成和酪氨酸代谢。结论:RYN 联合 LNZ 干预 MRSA 在其生物膜生长的各时间点均有抑菌增效作用;抑制被膜的机制与 cAMP 代谢相关;两药联合增效作用则与氨酰转移核糖核酸的生物合成, 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成相关。RYN 与 LNZ 联用可作为临床治疗 MRSA 感染的潜在有效方案。

**[关键词]** 热炎宁合剂; 利奈唑胺; 联合用药; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA); 生物膜; 细菌形态; 代谢组学

**[中图分类号]** R24;R378.1+1;R28;R969.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)13-0089-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20210853

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210207.1055.003.html>

**[网络出版日期]** 2021-2-7 13:10

### Analysis of Inhibitory Mechanism of Reyanning Mixture Combined with Linezolid Against MRSA and Its Biofilm Based on Metabonomics

ZHANG Lu-lu<sup>1,2</sup>, WEN Bo<sup>1</sup>, LYU Cheng<sup>1</sup>, YANG Wei-feng<sup>3</sup>, CHU Ya-jun<sup>4</sup>, BAO Mei<sup>1,2</sup>, YI Jian-feng<sup>2</sup>, LI Li<sup>1</sup>, DU Cheng-qiang<sup>4</sup>, TAN Yong<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Basic Research in Clinical Medicine,

China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. School of Chemical and Biological Engineering, Yichun University, Yichun 336000, China;

3. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

4. Tsinghua Deren Xi'an Happiness Pharmaceutical Co. Ltd., Xi'an 710043, China)

**[收稿日期]** 20201020(017)

**[基金项目]** 国家重点研发计划项目(2017YFC1703700);北京中医药科技发展项目(JJ2018-102);中国中医科学院国际合作项目(GH201909);陕西省创新药物中试工程研究中心开放课题(QHDR181102)

**[第一作者]** 张璐璐, 硕士, 实习研究员, 从事中医药抗感染研究, E-mail: jomi70@126.com

**[通信作者]** \* 谭勇, 博士, 副研究员, 从事中医药安全性评价和中医复方机制研究, E-mail: tcmtanyong@126.com

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the inhibitory effects and mechanism of Reyanning mixture (RYN) combined with linezolid (LNZ) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and its biofilm. **Method:** The minimum inhibitory concentrations (MICs) of RYN and LNZ against MRSA were determined by microdilution assay. The microplate method was used to detect the changes in viable count before and after MRSA administration at four time points (0, 6, 12, 24 h) in the process of biofilm growth. The morphological changes of MRSA after 24 h were observed by scanning electron microscope. Metabonomic technique was applied to analyze the changes in terminal metabolites of endogenous small molecules from MRSA treated by the two drugs at four time points. **Result:** The MICs of RYN and LNZ were 1/2 of the stock solution concentration and  $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively. The inhibitory effect of LNZ ( $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) against viable bacteria at 0 h was better than that of 1/16 RYN. At 6, 12, 24 h, 1/16 RYN was superior to LNZ in inhibiting MRSA. The inhibitory effects of RYN combined with LNZ were better than those of RYN or LNZ alone at the four time points. RYN combined with LNZ caused more severe damages to the morphological structure of MRSA biofilm at 24 h than RYN or LNZ alone. Cyclic adenosine monophosphate (cAMP), adenosine diphosphate (ADP)-D-ribose and 2-methylbutanoyl-coenzyme A (2M-CoA), as the metabolites related to biofilm formation, were immune to LNZ, but 2M-CoA and ADP-D-ribose were influenced by RYN at 12 h and 24 h. The combined use of RYN and LNZ interfered with the three metabolites at 24 h. *L*-tryptophan, phenylpyruvic acid, cytidine and sebacic acid were the pharmacometabolic markers of LNZ, and the related biological pathways were phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis and phenylalanine metabolism. Four metabolites such as *L*-histidine, uric acid, and *L*-lysine were the pharmacometabolic markers of RYN, with phenylalanine metabolism and aminoacyl-transfer ribonucleic acid (tRNA) biosynthesis confirmed as the related biological pathways. Nine metabolites such as *L*-tryptophan, *L*-lysine, and sphingosine-1-phosphate were responsible for the efficacy of RYN combined with LNZ. The related biological pathways involved aminoacyl-tRNA biosynthesis, phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis, novobiocin biosynthesis, and tyrosine metabolism. **Conclusion:** RYN combined with LNZ better exerts the inhibitory effects against MRSA at each time point of its biofilm formation, which is attributed to cAMP metabolism. The synergistic effect resulted from aminoacyl-tRNA biosynthesis and phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis. RYN combined with LNZ can serve as a potentially effective solution to MRSA infection.

**[Key words]** Reyanning mixture; linezolid; drug combination; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA); biofilm; bacterial morphology; metabonomics

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)是公认的“超级细菌”,严重威胁全球卫生安全<sup>[1]</sup>。利奈唑胺(LNZ)是临床治疗MRSA的首选抗生素之一。但LNZ的治疗窗较窄,不良反应发生率高,且随着使用率的增加,已出现对LNZ产生耐药的MRSA菌株<sup>[2]</sup>。生物膜的形成是MRSA耐药产生的重要机制之一,其赋予了MRSA对抗生素的抵抗力。50%的院内感染与生物膜有关,破坏生物膜结构已成为临床有效治疗细菌感染的研究热点<sup>[3]</sup>。为对抗生素治疗MRSA出现的耐药现象及毒副作用,研究人员将目光转移至中药领域,以寻找潜在的抗菌药物。

热炎宁合剂(RYN)是一种具有清热解毒功效的中成药,由蒲公英、虎杖、北败酱、半枝莲组成,主要含有大黄素、大黄蒽醌、虎杖苷、黄酮等有效成

分。有研究表明,RYN对金黄色葡萄球菌*Staphylococcus aureus*具有一定的抑制作用,其中蒲公英也能抑制其生物膜<sup>[4]</sup>。联合用药是目前临床治疗复杂疑难病症的主要方式。以整体论为用药指导的中药与以还原论为指导的西药联用有望发挥优势互补、协同增效减毒的作用。例如,临床上常用抗生素与RYN联合治疗肺炎、化脓性扁桃体炎等细菌性感染的疾病<sup>[5]</sup>。另外,有研究显示,中药可抑制生物膜生长、破坏生物膜结构,有助于抗生素与生物膜深处的休眠细菌有效接触,更大程度地抑杀细菌<sup>[6]</sup>。

综上所述,本实验拟探讨RYN联合LNZ在MRSA生物膜生成的各阶段对生物膜及膜内活菌的抑制作用,在明确两药联合对MRSA的协同抑制

效应的基础上,通过内源性终端代谢物分析阐释两药联合协同机制,可以为RYN与LNZ联合治疗MRSA感染方案的确立和优化奠定基础,并为更加安全有效的临床用药提供实验依据。

## 1 材料

BIO II Advance型生物安全柜(西班牙泰事达公司),iMark型酶标仪(美国Bio-Rad公司),THZ-D型恒温振荡培养箱(苏州培英实验设备有限公司),KBF-240型恒温恒湿培养箱(上海森信实验仪器有限公司),V-1100型紫外分光光度计(上海美普达仪器有限公司),770006型高压灭菌锅(日本三洋公司),ELX50型全自动八道洗板机(美国伯腾仪器有限公司),S-3400N型扫描电子显微镜(日本日立公司),QL-902型旋涡振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),Allegra X-15R型离心机(美国Beckman公司),ABI7500型荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Applied Biosystems公司); $C_{18}$ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8  $\mu$ m),1290 Infinity型二元液相色谱系统和6545型四极杆-飞行时间液质联用系统(美国安捷伦公司)。

热炎宁合剂(国药准字Z20050493,批号180411),处方包含蒲公英372 g,虎杖372 g,北败酱372 g,半枝莲186 g,规格100 mL×1瓶/盒,由清华德人西安幸福制药有限公司提供;利奈唑胺注射液(挪威Fresenius Kabi Norge AS,批号18D29U77);LB培养基配方包含10 g·L<sup>-1</sup>胰蛋白胨,10 g·L<sup>-1</sup>氯化钠和5 g·L<sup>-1</sup>酵母提取物,使用超纯水配制而成;胰蛋白胨LP0042和酵母提取物LP0021(英国Oxoid公司,批号分别为1863590,1390139-02),氯化钠(中国医药集团有限公司,批号20180509);2,3-双(2-甲氧基-4-硝基-5-磺苯基)-2H-四唑-5-甲酰胺内盐(XTT),吩嗪硫酸甲酯(PMS)和2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)(美国Sigma公司,批号分别为X4626,P-9625,17779-10X10ML-F)。

从北京东直门医院呼吸科住院患者痰液提取分离获得MRSA菌株。实验菌株已经过实验室内连续10代的空白培养和5代的相关抗生素诱导培养研究,两者前后药物最低抑菌浓度(MIC)稳定不变,证明具有遗传稳定性<sup>[7]</sup>。

## 2 方法

**2.1 MIC测定** 采用标准微量肉汤倍比稀释法测定RYN和LNZ对浮游MRSA的MIC<sup>[8]</sup>。从MRSA平板中挑取单菌落置于LB培养基,震荡过夜。次日于600 nm处测定吸光度 $A_{600\text{nm}}$ ,将菌液稀释至

$A_{600\text{nm}}=0.02$ 。取96孔板,RYN浓度梯度范围为1/2~1/1 024 RYN原液,LNZ的质量浓度梯度处于32~0.062 5 mg·L<sup>-1</sup>,每孔100  $\mu$ L。同时设置阴性孔(LB培养基200  $\mu$ L)和阳性孔(菌液200  $\mu$ L)。于37 °C,相对湿度(RH)80%培养24 h后,加入0.25% TTC染液30  $\mu$ L,继续培养30 min,肉眼直接观察培养孔内呈现颜色,以阴性孔为参考,红色代表孔内含菌,反之则无。因RYN药液颜色过深会影响TTC染色结果观察,故使用平板划线法观测RYN组MIC检测结果。使用接菌环蘸取RYN 96孔板各浓度待测孔中液体在LB固体培养基的不同分区逐一划线,于37 °C,RH 80%培养16 h,观察平板内细菌生长情况,以阴性孔划线结果为参考,若划线平板长菌则表示该待测孔内含菌,反之则无。实验重复3次。

**2.2 药物对MRSA生物膜生长不同时期内活菌量的影响** 采用分级抑菌浓度指数(FICI)判断药物联用最佳配伍比方法确定RYN与LNZ的最佳配伍剂量,通过微孔板法检测药物对MRSA生物膜内活菌量的影响<sup>[9]</sup>。菌液的配制方式同2.1项。取4个无菌96孔板,向各孔内加入菌液100  $\mu$ L,于37 °C,RH 80%条件下分别培养0,6,12,24 h后取出。空白组选择LB培养基,RYN单用组浓度为1/16 RYN原液(1/16 RYN),LNZ单用组质量浓度为2 mg·L<sup>-1</sup>,各100  $\mu$ L;联用组为2 mg·L<sup>-1</sup> LNZ+1/16 RYN,LNZ与RYN各50  $\mu$ L。加入药物培养24 h后,用0.9%氯化钠洗板2次,除去孔中的悬浮细菌,以XTT-PMS(200:1)混合染液分别对生物膜染色,利用酶标仪于450 nm处检测微孔板中活菌量。

**2.3 扫描电镜(SEM)观察药物对MRSA成熟生物膜的影响** 于0.5 cm×0.5 cm灭菌载玻片上培养MRSA 24 h成熟生物膜形成<sup>[9-10]</sup>。弃去浮游细菌后,分别加入2 mg·L<sup>-1</sup> LNZ,1/16 RYN和2 mg·L<sup>-1</sup> LNZ+1/16 RYN,设置同体积LB培养基为空白组。于37 °C,RH 80%培养24 h后弃去上清液,使用4%戊二醛前固定,1%锇酸后固定,乙醇逐级梯度脱水,100%叔丁醇置换,冷冻干燥、喷金后置于SEM下观察,拍照。

**2.4 药物对MRSA生物膜不同时期内源性小分子终端代谢物的影响**

**2.4.1 样品收集及预处理** 菌液配制方式同2.1项。用无菌锥形瓶培养菌液,于37 °C,RH 80%分别培养0,6,12,24 h后取出,加入配制好的药液,给药情况同2.2项,震荡过夜。次日加入等量淬灭剂(60%甲醇)淬灭,手动摇匀5 s。将淬灭好的菌液以

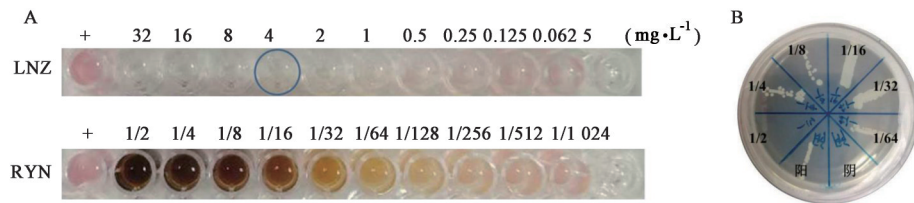
3 000 r·min<sup>-1</sup>, 4 °C离心 10 min(离心半径 20.78 cm)。去除上清液,将菌体于-80 °C保存。检测前样品于常温下解冻,用甲醇沉淀蛋白,充分涡旋 30 s,高速离心(4 °C, 12 000 r·min<sup>-1</sup>, 15 min, 离心半径 7 cm);移取上清液 200 μL,转入进样小瓶。

**2.4.2 检测条件** 色谱柱为 C<sub>18</sub> 色谱柱,色谱条件为柱温 40 °C,流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>,流动相选择 0.1% 甲酸水溶液(A)-0.1% 甲酸乙腈溶液(B)梯度洗脱(0~2 min, 95%A; 2~13 min, 95%~5%A; 13~15 min, 5%A),进样量 4 μL,自动进样器温度 4 °C。质谱条件为采用电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式检测;正离子模式下毛细管电压 4 kV,锥孔电压设定 35 kV,离子源温度 100 °C,脱溶剂气温度 350 °C,反向锥孔气流 50 L·h<sup>-1</sup>,脱溶剂气流速 600 L·h<sup>-1</sup>,萃取锥孔电压 4 V;负离子模式下毛细管电压 3.5 kV,锥孔电压 50 kV,离子源温度 100 °C,脱溶剂气温度 300 °C,反向锥孔气流 50 L·h<sup>-1</sup>,脱溶剂气流速设定 700 L·h<sup>-1</sup>,萃取锥孔电压 4 V;离子扫描时间 0.03 s,扫描时间间隔 0.02 s,数据采集范围 *m/z* 50~1 000。

**2.4.3 数据分析** 运用 Mass Profiler 12.5 对超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS)数据进行预处理,正离子模式下得到 6 623 个特征谱峰,负离子模式下获得 3 581 个特征谱峰;组织二维数据矩阵,导入 SIMCA-P 13.0 软件进行分析,并进行 *t* 检验和对 *P* 采用 Benjamini-Hochberg 方法进行错误发现率校正,通过变量投影重要性(VIP)值(VIP 值>1),*P*(*P*<0.01)和差异倍数(FC)(FC<-3倍和 FC>3倍)确定显著性差异代谢物。对确定的代谢物采用 MetaboAnalyst 4.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>)进行代谢通路富集分析。

### 3 结果

**3.1 RYN, LNZ 对抗 MRSA 的 MIC** TTC 染色结果显示, LNZ 待测孔未显红最小质量浓度 4 mg·L<sup>-1</sup>, 见图 1(A)。图 1(A)中 RYN 96 孔板各浓度待测孔结果与图 1(B)平板分区划线结果一致, RYN 各待测浓度与阴性孔的划线结果比较, 1/2 RYN 区域未长菌。综上分析, 确定 MIC<sub>RYN</sub> 为 1/2 RYN 原液, MIC<sub>LNZ</sub> 为 4 mg·L<sup>-1</sup>。



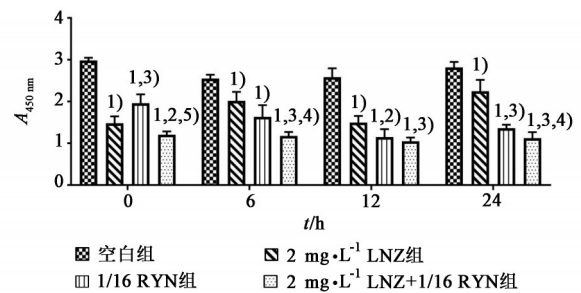
A. LNZ 和 RYN 的 TTC 显色; B. RYN 检测孔平板划线

图 1 LNZ 和 RYN 对 MRSA 的 MICs

Fig. 1 MICs of LNZ and RYN against MRSA

**3.2 RYN 和 LNZ 联合对 MRSA 生物膜不同时期内活菌量的影响** 由图 2 可知,各时间点内药物干预后的 MRSA 生物膜内活菌量与空白组相比均显著下降(*P*<0.01)。在 0 h 时, 2 mg·L<sup>-1</sup> LNZ 组药效显著优于 1/16 RYN 组(*P*<0.01); 在 6 h 时, 2 mg·L<sup>-1</sup> LNZ 组与 1/16 RYN 组的药效差异无统计学意义; 而 12, 24 h 时, 1/16 RYN 组均优于 2 mg·L<sup>-1</sup> LNZ 组(*P*<0.05, *P*<0.01)。2 mg·L<sup>-1</sup> LNZ+1/16 RYN 组在 0, 6, 24 h 中明显优于 1/16 RYN 组(*P*<0.05, *P*<0.01), 4 个时间点均优于 2 mg·L<sup>-1</sup> LNZ 组(*P*<0.05, *P*<0.01)。

**3.3 RYN 和 LNZ 联合对 MRSA 生物膜形态学的影响** 由图 3 可知, 24 h 后空白组的 MRSA 生物膜完整, 细菌排列紧密, 菌体表面光滑且大小均一。然而, 2 mg·L<sup>-1</sup> LNZ 组 MRSA 在 LNZ 作用下膜结构不如空白组完整, 但细菌排列仍较为紧密, 菌体表面光滑、大小均一。1/16 RYN 组 MRSA 生物膜结构则



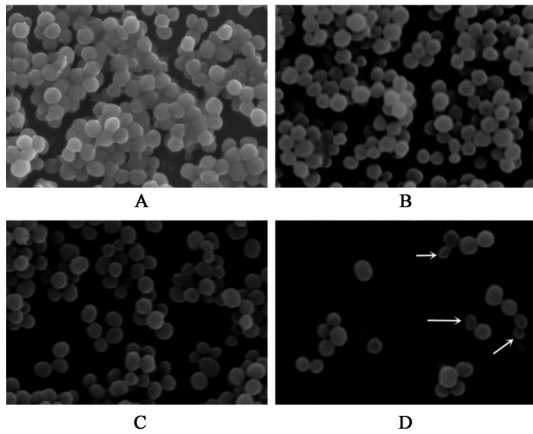
与空白组比较<sup>1)</sup>*P*<0.01; 与 2 mg·L<sup>-1</sup> LNZ 组比较<sup>2)</sup>*P*<0.05, <sup>3)</sup>*P*<0.01; 与 1/16 RYN 组比较<sup>4)</sup>*P*<0.05, <sup>5)</sup>*P*<0.01

图 2 RYN 和 LNZ 对 MRSA 生物膜不同时期内活菌量的影响  
Fig. 2 Effects of RYN and LNZ on viable contents in MRSA biofilm at different time points

受到破坏, 细菌排列松散, 菌体大小不均。与此同时, 2 mg·L<sup>-1</sup> LNZ+1/16 RYN 组 MRSA 生物膜的结构受到了破坏, 菌体大小不一且出现空壳结构。

### 3.4 RYN 和 LNZ 对生物膜终端代谢物的影响

**3.4.1 对生物膜生长相关代谢标志的影响** 通过



A. 空白组; B. 2 mg·L<sup>-1</sup> LNZ组; C. 1/16 RYN组; D. 2 mg·L<sup>-1</sup> LNZ+1/16 RYN组

图3 RYN和LNZ对MRSA成熟生物膜的影响(SEM, ×1万)

Fig. 3 Effects of LNZ and RYN on mature MRSA biofilm (SEM, ×10 000)

空白组中6, 12, 24 h与0 h的差异代谢物进行对比, 发现了3个与MRSA生物膜生长相关的代谢标志, 分别为环磷酸腺苷(cAMP), 二磷酸腺苷-D-核糖(ADP-D-ribose)和2-甲基丁酰辅酶A(2M-CoA), 见表1。在2 mg·L<sup>-1</sup> LNZ组4个时间点的代谢物谱中, 2M-CoA并未出现。1/16 RYN组中2M-CoA在12 h时出现且相较同时间点空白组含量降低。2 mg·L<sup>-1</sup> LNZ+1/16 RYN组中24 h时间点2M-CoA的含量相较于同时间点空白组同样出现降低。cAMP在生物膜生长12 h时出现并随着时间的增加含量有所降低, 在2 mg·L<sup>-1</sup> LNZ组中cAMP仅在12 h的时间点出现, 且含量与同时间点空白组相比出现增加, 变化趋势相同, 不具有治疗意义。在1/16 RYN组4个时间点的代谢物谱中, cAMP并未出现, 表明1/16 RYN对其无影响。2 mg·L<sup>-1</sup> LNZ+1/16 RYN组中24 h时间点cAMP的含量与同时间点空白组相比出现降低, 表明两药联用对其具有治疗作用。ADP-D-ribose含量随生物膜形成时间增加而减少, 2 mg·L<sup>-1</sup> LNZ组ADP-D-ribose在6, 24 h出现, 2个时间点的含量变化趋势与同时间点空白组相同。ADP-D-ribose在1/16 RYN组24 h时间点出现, 且含量与同时间点空白组相比出现升高, 这一结果与2 mg·L<sup>-1</sup> LNZ+1/16 RYN组相同, 表明1/16 RYN及两药联用均可对ADP-D-ribose起到一定的治疗作用。

**3.4.2 LNZ干预MRSA的药效代谢标志分析** 将2 mg·L<sup>-1</sup> LNZ组4个时间点与空白组0 h的差异代谢物进行对比, 发现了4个代谢标志物, 分别为苯丙酮酸、胞苷、癸二酸和L-色氨酸(L-Trp), 见表2。对这4个代谢标志物进行通路分析后发现, 与LNZ药

表1 MRSA生物膜生长相关的代谢标志及不同给药干预对其的影响

Table 1 Effect of different drug interventions on metabolic markers related to MRSA biofilm growth

组别	t/h	FC		
		cAMP	ADP-D-ribose	2M-CoA
空白	6	-	-3.691	5.314
	12	6.071	-4.600	6.878
	24	4.493	-5.387	7.369
2 mg·L <sup>-1</sup> LNZ	0	-	-	-
	6	-	-6.439	-
	12	3.192	-	-
1/16 RYN	0	-	-	-
	6	-	-	-
	12	-	-	-6.797
2 mg·L <sup>-1</sup> LNZ+1/16 RYN	0	-	-	-
	6	-	-	-
	12	-	-	-
24	-	-	4.462	-
	24	-4.947	4.324	-4.962

注: 正数代表此代谢物含量上升, 负数代表此代谢物含量下降。

效显著相关的通路为苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成、苯丙氨酸代谢。

表2 LNZ干预MRSA的药效代谢标志

Table 2 Pharmacometabolic markers of LNZ against MRSA

代谢标志物	FC			
	0 h	6 h	12 h	24 h
L-Trp	-3.519	-3.519	-3.016	-3.136
苯丙酮酸	13.099	7.271	13.628	3.852
胞苷	-3.472	3.857	5.180	6.889
癸二酸	-7.178	5.586	7.127	9.140

**3.4.3 RYN干预MRSA的药效代谢标志** 将1/16 RYN组4个时间点与空白组0 h的差异代谢物进行对比分析, 发现了4个代谢标志, 分别为L-组氨酸(L-His), 尿酸, L-赖氨酸(L-Lys)和鞘氨醇-1-磷酸(S1P), 见表3。对这4个代谢标志物进行通路分析后发现, 与RYN药效显著相关的通路为苯丙氨酸代谢和氨酰转移核糖核酸的生物合成。

**3.4.4 RYN与LNZ联用干预MRSA的药效代谢标志** 将2 mg·L<sup>-1</sup> LNZ+1/16 RYN组4个时间点与空白组0 h的差异代谢物进行对比, 结果发现9个代谢标志, 分别为L-Trp, 尿苷, L-酪氨酸(L-Tyr), 蔗糖,

表3 RYN干预MRSA的药效代谢标志

Table 3 Pharmacometabolic markers of RYN against MRSA

代谢标志物	FC			
	0 h	6 h	12 h	24 h
L-His	-	-7.303	-5.570	-5.450
尿酸	-	4.076	5.099	10.603
L-Lys	5.753	-12.179	-6.079	-4.973
S1P	-8.506	-9.526	-4.703	-10.876

L-脯氨酸(L-Pro), 犬尿氨酸(Kyn), 酪氨酸甲酯(TME), L-Lys, S1P, 见表4。对这9个代谢标志物进行通路分析后发现, 与联合用药药效显著相关的通路为氨酰转移核糖核酸的生物合成, 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成, 新生霉素生物合成和酪氨酸代谢。

表4 RYN与LNZ联用干预MRSA的药效代谢标志

Table 4 Pharmacometabolic markers of RYN combined with LNZ against MRSA

代谢标志物	FC			
	0 h	6 h	12 h	24 h
L-Trp	-	-4.728	-4.714	-4.905
尿苷	-4.361	3.564	4.267	3.777
L-Tyr	-3.522	-13.241	-4.518	-9.918
蔗糖	8.015	12.130	12.954	3.546
L-Pro	11.643	5.078	4.311	4.521
Kyn	-5.636	-4.006	-4.765	-5.055
TME	3.651	4.897	4.766	4.830
L-Lys	-12.954	-8.378	-7.074	-7.645
S1P	-4.580	-6.011	-4.664	-8.764

#### 4 讨论

MRSA作为典型耐药病原菌, 严重威胁着人类健康。生物膜是MRSA重要的致病和耐药原因之一<sup>[11]</sup>。生物膜帮助细菌在宿主组织中定植, 同时作为细菌在体内传播的毒素之一, 其也是造成高发病率和病死率的慢性感染源<sup>[12]</sup>。成熟生物膜结构为细菌的生存提供物理和化学保护屏障, 如外排泵激活、新酶的获得和药物靶标的突变等<sup>[3]</sup>。其增强了细菌对抗菌剂和宿主免疫反应清除的抵抗力, 妨碍了抗生素药效的正常发挥<sup>[13]</sup>。LNZ作为细菌蛋白质合成抑制剂, 需作用于细菌50S核糖体亚单位, 抑制信使核糖核酸(mRNA)与核糖体连接, 阻止蛋白质合成<sup>[14]</sup>。但位于生物膜中心代谢缓慢的休眠细菌与胞外基质产生的静电排斥作用对LNZ的治疗产生了负面影响, 难以完全清除附着的生物膜, 由

此造成细菌的反复感染与全身性扩散<sup>[15]</sup>。因此, 抑制生物膜已成为开发针对细菌感染的新治疗方案的关键目标。中药在对抗细菌感染方面具有良好的药效, 具体表现在对生物膜及毒力因子的抑制、阻碍细菌的生长繁殖、增强机体免疫功能等方面<sup>[16]</sup>。RYN的药效成分大黄素和白藜芦醇的抗菌能力均已经得到研究证明。大黄素可以显著干扰*S. aureus*胞外脱氧核糖核酸(DNA)的释放, 并抑制生物膜相关基因*cidA*, *icaA*, *sarA*, *dltB*和*agrA*的表达<sup>[17]</sup>; 白藜芦醇联合环丙沙星可对MRSA的生长起抑制作用<sup>[18]</sup>。RYN与抗生素联合有望成为抗MRSA及其生物膜的有效药物组合。

本文研究结果显示, 2 mg·L<sup>-1</sup> LNZ在生物膜未形成时(0 h)对MRSA活菌量的抑制高于1/16 RYN; 但生物膜生长6 h后, 1/16 RYN的抑制强度则超过了2 mg·L<sup>-1</sup> LNZ; 表明随着生物膜的形成, LNZ的抑菌作用逐渐降低, RYN的抑菌作用增加, 提示RYN较LNZ对抑制形成生物膜的MRSA更具优势。2 mg·L<sup>-1</sup> LNZ+1/16 RYN组在4个时间点对MRSA生物膜内活菌量的抑制作用均优于两药单用效果, 提示两药联合对各个时间点的浮游MRSA及生物膜期MRSA均存在一定联合抑制作用, 推测RYN对MRSA生物膜的抑制可能有助于LNZ接触生物膜内深层的休眠细菌, 起到杀灭作用。SEM影像学结果同样显示, LNZ单用时菌体状态与空白组相差不大, 而与RYN联用后MRSA生物膜结构被破坏, 菌体大小不一, 出现空壳形态。结合MIC结果, LNZ在1/2 MIC<sub>LNZ</sub>浓度下仅对浮游MRSA(0 h)起到抑制作用, 对生成生物膜后的MRSA无抑制作用, 而与1/8 MIC<sub>RYN</sub>的RYN联用后, 则可对各时间点的MRSA均起到抑制作用, 提示RYN与LNZ联合可提高MRSA对LNZ的敏感性, 降低LNZ的使用剂量。

生物体内源性代谢物是生物活动的终端产物, 可通过代谢组学技术考察生物体受到环境因素影响后的代谢物变化, 并准确分析代谢通路<sup>[19]</sup>。中药复方具有多成分、多途径、多靶点的作用特点, 通常单一指标难以完整阐述其作用机制, 为全局、深入、准确地对其进行药效评价和机制探索, 可采用高通量的代谢组学研究策略。本研究利用细胞代谢组学技术探讨联合用药随着时间的推移对MRSA代谢物谱的影响, 探寻药效标志、揭示药效机制。cAMP, ADP-D-ribose, 2M-CoA是反映MRSA生物膜生长的代谢标志。cAMP可通过下调菌毛生长,

减少菌毛对细菌的黏附作用,促进细菌生物膜的扩散,有利于细菌在宿主体内的游走<sup>[20-21]</sup>。本研究中cAMP在空白组12,24 h中呈增加的趋势,提示在MRSA生长12 h后生物膜出现扩散生长现象。两药联用的情况下24 h时MRSA中cAMP减少,表明在药物联合干预下,MRSA生物膜的扩散生长可能受阻。2M-CoA是异亮氨酸(Ile)的代谢产物之一。主成分分析(PCA)发现*S. aureus*生物膜中Ile的含量显著高于浮游型*S. aureus*,Ile参与生物膜形成所依赖的氮代谢途径<sup>[22-23]</sup>。2M-CoA的含量在空白组随时间延长而上升。RYN可使2M-CoA的含量在12 h时减少,两药联用组则是24 h时含量下降,这两组的2M-CoA含量均在生物膜生成时期降低,表明RYN可能干扰了MRSA的氮代谢功能。

2 mg·L<sup>-1</sup> LNZ单独干预MRSA后,苯丙酮酸、胞苷、癸二酸和L-Trp在4个不同时间点中与空白组相比发生了一定含量变化。胞苷有利于细菌细胞壁的合成。LNZ作用后,胞苷含量随时间延长在MRSA菌体内累积,这可能提示LNZ在细菌细胞壁合成中对胞苷类物质产生了扰动作用。L-His,尿酸,L-Lys和S1P是反映1/16 RYN单用的药效标志。L-His与生物膜形成涉及的氮代谢和氨基酸合成密切相关<sup>[24-26]</sup>。RYN单独干预MRSA 6 h后,L-His的含量呈下降趋势,这与生物膜内活菌量实验1/16 RYN组6 h的结果相符合。L-Lys是培养*S. aureus*生物膜所需的重要蛋白质组成之一<sup>[27]</sup>。1/16 RYN组MRSA中L-Lys的含量在0 h增加,但在生物膜开始形成的6 h后,L-Lys含量则呈下降趋势,表明RYN对开始形成生物膜的MRSA的L-Lys吸收可能起到一定抑制作用。综上分析,RYN单用在MRSA生物膜生长过程中的药效作用与菌体内氨基酸含量密切相关。氨基酸作为蛋白质合成的基础物质参与细菌蛋白质的合成,其吸收代谢受阻则会影响细菌的正常生命活动,包括形成生物膜。

2 mg·L<sup>-1</sup> LNZ+1/16 RYN组中L-Tyr, L-Trp, Kyn, 尿苷,蔗糖,L-Pro, TME, L-Lys, S1P是体现其药效特征的代谢标志物。L-Tyr含量在两药联用的4个时间点内均降低,表明L-Tyr的吸收可能受到了抑制。据报道,L-Tyr残基的微环境受到改变会引起膜脂肪酸组成和膜蛋白构象的扰动,而抑制L-Tyr的吸收很大程度上可能会干扰MRSA的细胞膜合成<sup>[28]</sup>。除L-Tyr外,RYN与LNZ联合对Kyn和L-Trp在菌体内的含量同样产生扰动。说明两药联用影响了MRSA氨基酸代谢。尿苷可被N-乙酰葡萄糖

胺-1-磷酸尿苷酰转移酶(GlmU)催化形成尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺(UDP-GlcNAc),这是革兰氏阳性菌肽聚糖生物合成中的重要前体<sup>[29]</sup>。尿苷的含量在两药联用组生物膜生长6 h的MRSA内增高,提示两药联用可能干扰了GlmU对尿苷的催化作用,导致尿苷无法正常转化为UDP-GlcNAc,从而干扰MRSA肽聚糖的合成。

综上分析,LNZ对浮游MRSA具有抑杀作用,而对具有生物膜的MRSA的作用不明显。RYN可多方位地进攻MRSA,干扰生物膜形成,其作用机制主要与干扰MRSA氨基酸代谢有关。RYN联合LNZ加剧了对MRSA碳氮来源、膜蛋白构象、细胞壁肽聚糖合成的影响,从而抑制了MRSA的生长及其生物膜的形成。本研究为中西药联用抑制MRSA感染在体内的扩散,缩短MRSA感染病程,降低MRSA感染的反复复发奠定了一定的理论基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 胡付品,朱德妹,汪复,等. 2015年CHINET细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(6): 685-694.
- [2] SHAW K J, POPPE S, SCHAADT R, et al. *In vitro* activity of TR-700, the antibacterial moiety of the prodrug TR-701, against linezolid-resistant strains[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(12): 4442-4447.
- [3] ZHANG L L, LIANG E J, CHENG Y C, et al. Is combined medication with natural medicine a promising therapy for bacterial biofilm infection?[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 128: 110184.
- [4] 霍佳楠,姜晓文,许晶,等. 蒲公英水提物对体外金黄色葡萄球菌生物膜形成的影响[J]. 中兽医医药杂志, 2015, 34(1): 12-15.
- [5] 梁广雷,梁琬晨. 热炎宁合剂联合阿莫西林克拉维酸钾治疗小儿化脓性扁桃腺炎的C反应蛋白及临床症状变化[J]. 白求恩医学杂志, 2017, 15(2): 193-195.
- [6] DEY P, PARAI D, BANERJEE M, et al. Naringin sensitizes the antibiofilm effect of ciprofloxacin and tetracycline against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm[J]. *Int J Med Microbiol*, 2020, 310(3): 151410.
- [7] 姜童童. 痰热清注射液对临床分离耐药菌的逆转作用及机制探讨[D]. 长春:吉林农业大学, 2019.
- [8] 刘珏玲,杨伟峰,孙娅楠,等. 痰热清注射液对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物膜三维结构的影响[J]. 中

- 国病原生物学杂志, 2017, 12(12): 1152-1156.
- [9] YANG W F, LIU J L, BLAŽEKOVIĆ B, et al. *In vitro* antibacterial effects of Tanreqing injection combined with vancomycin or linezolid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. BMC Complement Altern Med, 2018, 18(1): 169.
- [10] MILLER K, STOREY C, STUBBINGS W J, et al. Antistaphylococcal activity of the novel cephalosporin CB-181963 (CAB-175) [J]. J Antimicrob Chemother, 2005, 55(4): 579-582.
- [11] PATEL M. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, recognition and management [J]. Drugs, 2009, 69(6): 693-716.
- [12] OTTO M. Staphylococcal biofilms [J]. Microbiol Spectr, 2018, doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0023-2018.
- [13] BOLES B R, THOENDEL M, ROTH A J, et al. Identification of genes involved in polysaccharide-independent *Staphylococcus aureus* biofilm formation [J]. PLoS One, 2010, 5(4): e10146.
- [14] CHASTRE J, BLASI F, MASTERTON R G, et al. European perspective and update on the management of nosocomial pneumonia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after more than 10 years of experience with linezolid [J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20(Suppl 4): 19-36.
- [15] CHEN L, WEN Y M. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies [J]. Int J Oral Sci, 2011, 3(2): 66-73.
- [16] ZHANG L L, BAO M, LIU B, et al. Effect of andrographolide and its analogs on bacterial infection: a review [J]. Pharmacology, 2020, 105(3/4): 123-134.
- [17] YAN X, GU S S, SHI Y J, et al. The effect of emodin on *Staphylococcus aureus* strains in planktonic form and biofilm formation *in vitro* [J]. Arch Microbiol, 2017, 199(9): 1267-1275.
- [18] 陈尚岳, 纪亚明, 李玉环, 等. 虎杖白藜芦醇、槲皮素异构体联用抗生素对耐药金黄色葡萄球菌的抑制作用 [J]. 食品工业科技, 2019, 40(16): 97-101.
- [19] NICHOLSON J K, CONNELLY J, LINDON J C, et al. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function [J]. Nat Rev Drug Discov, 2002, 1(2): 153-161.
- [20] HUFNAGEL D A, EVANS M L, GREENE S E, et al. The catabolite repressor protein-cyclic AMP complex regulates *csgD* and biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* [J]. J Bacteriol, 2016, 198(24): 3329-3334.
- [21] HUYNH T T, MCDOUGALD D, KLEBENSBERGER J, et al. Glucose starvation-induced dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is cAMP and energy dependent [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42874.
- [22] POHL K, FRANCOIS P, STENZ L, et al. CodY in *Staphylococcus aureus*: a regulatory link between metabolism and virulence gene expression [J]. J Bacteriol, 2009, 191(9): 2953-2963.
- [23] HOCHBAUM A I, KOLODKIN-GAL I, FOULSTON L, et al. Inhibitory effects of *D*-amino acids on *Staphylococcus aureus* biofilm development [J]. J Bacteriol, 2011, 193(20): 5616-5622.
- [24] CABRAL M P, SOARES N C, ARANDA J, et al. Proteomic and functional analyses reveal a unique lifestyle for *Acinetobacter baumannii* biofilms and a key role for histidine metabolism [J]. J Proteome Res, 2011, 10(8): 3399-3417.
- [25] ZEIDAN M B, ZARA G, VITI C, et al. *L*-Histidine inhibits biofilm formation and FLO11-associated phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae* flor yeasts [J]. PLoS One, 2014, 9(11): e112141.
- [26] PAHWA S, KAUR S, JAIN R, et al. Structure based design of novel inhibitors for histidinol dehydrogenase from *Geotrichum candidum* [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 20(13): 3972-3976.
- [27] CHEN J, FALLARERO A, MAATTANEN A, et al. Living cells of *Staphylococcus aureus* immobilized onto the capillary surface in electrochromatography: a tool for screening of biofilms [J]. Anal Chem, 2008, 80(13): 5103-5109.
- [28] WANG L H, WANG M S, ZENG X A, et al. Membrane and genomic DNA dual-targeting of citrus flavonoid naringenin against *Staphylococcus aureus* [J]. Integr Biol (Camb), 2017, 9(10): 820-829.
- [29] SUMAN E, D'SOUZA S J, JACOB P, et al. Anti-biofilm and anti-adherence activity of GIm-U inhibitors [J]. Indian J Med Sci, 2011, 65(9): 387-392.

[责任编辑 刘德文]