

广西藤茶总黄酮对金黄色葡萄球菌抗菌机制研究

曾春晖¹, 杨柯², 徐明光², 陈益清², 吴光², 钟振国²

(1. 广西医科大学药学院, 南宁 530021; 2. 广西中医药大学药学院, 南宁 530001)

[摘要] 目的: 研究广西藤茶总黄酮(TF)抗金黄色葡萄球菌(SA)作用机制, 从而初步明确其作用靶位。方法: 使用不同终质量浓度 TF(310 ~ 38.75 mg·L⁻¹)处理 SA, 另设不经药物处理的 SA 为对照, 采用扫描电镜法观察 155 mg·L⁻¹ TF 对菌体的超微形态结构, 微生物粘着碳氢化合物法测定 155 mg·L⁻¹ TF 对菌体表面疏水性, 电导率法测定 77.5, 155, 310 mg·L⁻¹ TF 对菌体通透性及比色法测定 38.75, 77.5, 155, 310 mg·L⁻¹ TF 对细菌脱氢酶活性的影响。结果: 随着药物浓度增加, 作用时间延长, 细菌菌体超微形态有明显改变, 表现为菌体表面粗糙不平, 产生瘤状突起, 细胞间界限模糊不清, 细胞直径变大等; 与不经药物处理的 SA 比较, TF 作用 SA 4, 8, 16 h 后, 能明显降低细菌细胞表面疏水性($P < 0.01$); 明显增加细菌细胞通透性; 明显抑制细菌脱氢酶的活性。结论: 广西藤茶总黄酮可能通过降低细菌表面疏水性, 增加细菌通透性使细菌形态发生改变, 并通过抑制细菌脱氢酶活性发挥抗菌作用。

[关键词] 金黄色葡萄球菌; 超微结构; 疏水性; 通透性; 脱氢酶; 广西藤茶总黄酮

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0249-04

[doi] 10.11653/syfy2013100249

Antibacterial Mechanisms of Total Flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* on *Staphylococcus aureus*

ZENG Chun-hui¹, YANG Ke², XU Ming-guang², CHEN Yi-qing², WU Guang², ZHONG Zhen-guo²

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;

2. Pharmacy School, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the antibacterial mechanisms of total flavonoids (TF) from *Ampelopsis grossedentata* on *Staphylococcus aureus*. **Method:** The antibacterial mechanisms were studied by scanning electron microscope for ultrastructural morphology of TF (155 mg·L⁻¹). Microbial adhesion method was used for determination the effect of TF (155 mg·L⁻¹) on cell-surface hydrophobicity of hydrocarbons. Cell permeability and conductivity colorimetric method were employed for the determination of dehydrogenase activity of *S. aureus* after being treated by different concentrations of total flavone (310-38.75 mg·L⁻¹) from *Ampelopsis grossedentata* of Guangxi. **Result:** As the concentration increased and time prolonged, bacterial cell ultrastructural change was evident, characterized by cell surface uneven, warty protrusions, intercellular boundaries blurred, cell diameter increase. TF could significantly reduce the bacterial cell-surface hydrophobicity ($P < 0.01$) and increase in permeability of the bacterial cell. Activity of bacterial dehydrogenase was obviously inhibited by TF. **Conclusion:** The antibacterial mechanisms of TF from *Ampelopsis grossedentata* on *S. aureus* are related with reducing surface hydrophobicity, increasing permeability of the bacterial and inhibiting dehydrogenase activity of *S. aureus*.

[Key words] *staphylococcus aureus*; ultrastructural morphology; hydrophobicity; permeability; dehydrogenase; total flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* of Guangxi

[收稿日期] 20120718(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81060357)

[第一作者] 曾春晖, 硕士, 副教授, 硕士研究生导师, 从事中草药抗菌作用及其机制和中药炮制药理研究, Tel: 0771-2219854, E-mail: chhzeng@163.com

金黄色葡萄球菌(SA)可以引起包括常见的肺组织深部感染、术后感染、毒素休克综合征、全身菌血症和菌群失调等人类多种感染性疾病。据美国疾控中心报告,由SA引起的感染占第2位,仅次于大肠杆菌。多种抗生素因对SA具有很好的杀菌作用曾作为治疗其感染的特效药物广泛用于临床。但随着抗生素的广泛使用,细菌耐药性,如具有耐多重耐药性的耐甲氧西林金葡菌(MRSA)的出现,已经成为全球性的棘手问题。笔者前期研究表明,广西藤茶黄酮类化合物单体^[1-2](简称APS)和总黄酮(简称TF,另文发表)具有良好的抗SA作用,本文重点探讨TF抗SA的作用机制。

1 材料

1.1 菌株的准备 金黄色葡萄球菌(ATCC29213, SA),由广西中医药大学微生物与免疫学教研室提供,挑取1~2个SA菌落于20 mL M-H肉汤培养基,35℃振荡培养过夜,次日 $1\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min收集菌液,弃去上清液,用灭菌生理盐水校正浓度至0.5麦氏比浊标准,再用M-H肉汤以1:100稀释(含菌量约 $1\times 10^6\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

1.2 药物的配制 藤茶植物经广西中医药大学药用植物教研室韦松基教授鉴定为葡萄科蛇葡萄属植物显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* (Hand-Mazz) W. T. Wang 的嫩茎叶,藤茶总黄酮(TF)由广西中医药大学中药化学教研室韦建华副教授分离提取,纯度>95%,为淡黄色粉末。取一定量的TF用生理盐水配成最低抑菌质量浓度(MIC)(即 $310\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)溶液后,0.22 μm 针式过滤器过滤除菌备用。

1.3 试剂和仪器 M-H肉汤培养基(北京陆桥技术有限责任公司,批号20100806),十六烷(国药集团化学试剂有限公司,批号20110816),氯化三苯基四氮唑(TTC,中国华东师范大学化工厂,批号20101026),甲苯(国药集团化学试剂有限公司,批号20080921),其他试剂均为分析纯。VEGA3型电子扫描显微镜(Tescan公司),DDS-11A型电导率仪(上海沪粤明科学仪器有限公司),UV-1800型紫外分光光度计(日本岛津公司),AE100型1/万电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),DNP-9082型恒温培养箱(上海恒勒仪器设备有限公司),SHA-B型恒温水浴振荡器(江苏省金坛市环宇科学仪器厂),SW-CJ-1F型生物安全柜(阿尔泰实验室设备有限公司)。

2 方法

2.1 对SA超微形态结构的影响 取5 mL配好的

菌悬液加入25 mL锥形瓶中,最终接种菌量约 $5\times 10^6\text{ CFU}$ 。随后加入TF药液5 mL,使药物终质量浓度为 $1/2\text{ MIC}$ (即 $155\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),另设细菌对照组(加入5 mL生理盐水)。轻轻混匀后,于35℃恒温培养箱中恒温培养,分别在加入药物前和后2,8,16 h取样, $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min收集菌体,实验重复3次。菌团用PBS洗涤3次,戊二醛固定,4℃冰箱保存。扫描电镜样品需脱水处理,方法为:先加入25%戊二醛水溶液使其终质量浓度为2.5%,37℃固定30 min后用PBS漂洗细菌2次;然后沿管壁小心加入梯度乙醇(30%,50%,70%,80%,90%,无水乙醇)和叔丁醇(50%,70%,90%,95%,100%)进行脱水固定,最后将固定好的细菌悬液直接滴到铝片上,放入-20℃无霜冰箱干燥1 h,使叔丁醇挥发即得到电镜样品。将样品喷金30 s,上VEGA3型电子扫描显微镜,观察细菌细胞体的超微形态。

2.2 对SA表面疏水性的影响^[3] 取配好的菌悬液,细菌培养及分组,药物终质量浓度同2.1。实验重复3次。分别在加入药物前和后2,8,16 h取样,取出2 mL菌液于5 mL离心管中, $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ KNO}_3$ (pH 6.2)将细菌清洗2次, $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,将沉淀重新悬于 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ KNO}_3$ (pH 6.2),使吸光度 $A_{400}=0.4$ (A_0)(0.4左右)。用pH 7.4的 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钠缓冲液(NAPB)作为对照。取4 mL细菌悬浮液加入0.2 mL十六烷,室温下静置10 min,然后在漩涡振荡器振荡混合2 min。待混合物完全两相分离后移出水相并测其 A_{400} (A_1)。以细菌吸附率作为细菌细胞表面疏水性指标。

$$\text{细菌吸附率} = (1 - A_1/A_0) \times 100\%$$

2.3 对SA细菌细胞膜通透性的影响^[4] 取5 mL配好的菌悬液, $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,取上清液2 mL用去离子水稀释20倍,测定电导率为 L_2 ;取5 mL配好的菌悬液和5 mL配置好的TF高、中、低药液(终质量浓度为310,155,7.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)作用, $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,取上清液2 mL用去离子水稀释20倍,测定电导率为 L_3 ;取5 mL去离子水加5 mL配置好的TF高、中、低药液(终质量浓度为310,155,77.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,取上清液2 mL用去离子水稀释20倍,测定电导率为 L_1 ;将SA沸水浴煮沸10 min,冷却后 $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,取上清液2 mL用去离子水稀释20倍,测定电导率为 L_0 。相对电导率按以下公式计算。

$$\text{相对电导率} = |(L_3 - L_2 - L_1) / L_0|$$

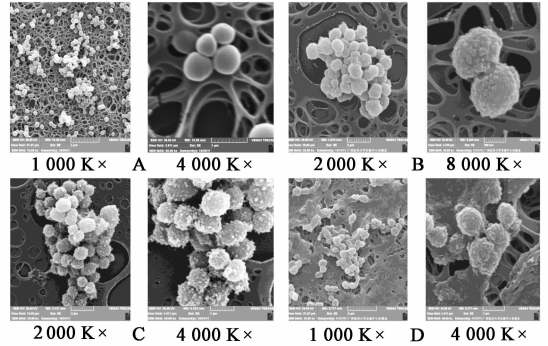
2.4 对 SA 细菌脱氢酶的影响^[3] 于 25 mL 的已灭菌具塞的锥形瓶中加入 20 mL 已灭菌的 M-H 肉汤和 200 μL 配置好的 SA 菌悬液,培养过夜活化,待用。在灭菌具塞试管中加入 1 mL 的 SA 菌液后再依次加入 2 mL 0.05 mol·L⁻¹ 的 Tris-HCl 缓冲液、2 mL 0.1 mol·L⁻¹ 葡萄糖溶液、2 mL 1 g·L⁻¹ 的氯化三苯基四氮唑 (TTC)。在各试管中加入 TF 溶液 1 mL,终质量浓度分别为 310,155,77.5,38.75 mg·L⁻¹,另设加 1 mL 去离子水做空白对照,各试管混合均匀后放入 37 °C 恒温静置 1 h 后,加入 2 滴浓 H₂SO₄ 终止反应后,用 5 mL 甲苯振荡萃取,取各试管中的上层有机物层,4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,以甲苯为参比,490 nm 处比色,记录 A。

2.5 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为有统计意义。

3 结果

3.1 对 SA 超微形态结构的影响 正常形态的 SA 呈单个圆球形,密集呈葡萄串状,表面光滑圆润,排列紧密,细胞界限清晰明显,大小均一,其直径为 0.55 ~ 0.70 μm。TF 作用 2 h 后,大部分 SA 细胞都有变化,细胞表面变得粗糙,有瘤状突起,细胞间界限变得不明显,少见有正常形态的细胞。细胞的直径变大,为 0.8 ~ 1.3 μm 左右。TF 作用 8 h 后,SA 细胞表面粗糙,瘤状突起变多且明显,细胞间界限不明显,有少部分细胞呈破裂状,未见正常形态的细

胞。细胞的直径变化较大,为 0.65 ~ 1.1 μm 左右。TF 作用 16 h 后,SA 细胞表面粗糙不平,瘤状突起明显,细胞间界限模糊不清,有很多细胞破裂,有些细胞成熔融状,且细菌分散,不成串状,未见有正常形态的细胞。细胞的直径变化较大,大小为 0.8 ~ 1.4 μm 左右。TF 作用 SA 后,会造成细胞表面粗糙不平,产生瘤状突起,细胞间界限模糊不清,细胞直径变大,随作用时间延长,细菌细胞表面受损加重,结果见图 1。



A. 正常 SA; B. TF 作用 2 h;
C. TF 作用 8 h; D. TF 作用 16 h

图 1 155 mg·L⁻¹ TF 作用不同时间对 SA 超微形态结构的影响

3.2 对细菌表面疏水性的影响 TF 作用于 SA 4, 8, 16 h 后,与不经药物处理细菌比较,药物处理后细菌吸附率明显降低 (*P* < 0.01),相对不经药物处理的 SA 分别下降了 28.0%, 24.0%, 35.6%。见表 1。

表 1 TF 作用不同时间对 SA 表面疏水性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	终质量浓度 /mg·L ⁻¹	4 h		8 h		16 h	
		A	吸附率/%	A	吸附率/%	A	吸附率/%
正常	-	0.064 5 ± 0.005	84.35	0.058 8 ± 0.005	85.29	0.051 9 ± 0.003	86.97
TF	155	0.156 8 ± 0.003 ¹⁾	60.76	0.141 0 ± 0.005 ¹⁾	64.81	0.176 1 ± 0.004 ¹⁾	56.01

注:与正常组比较¹⁾ *P* < 0.01。

3.3 对细菌通透性的影响 培养液电导率的改变可以反映细胞膜渗透性的变化,TF 作用 SA 后电导率随着作用时间的延长而增大,说明 TF 可使菌体细胞膜的通透性增加,使菌体细胞质渗漏到细胞外,不经药物处理细菌的培养液电导率无明显变化,见图 2。

3.4 对细菌脱氢酶的影响 结果显示,SA 在加入低浓度的 TF 溶液时仍然有部分 TTC 转化为三苯基甲脂,随着 TF 浓度增加,脱氢酶活性逐渐减弱,由此可知,低浓度的 TF 溶液能够影响细菌脱氢酶的

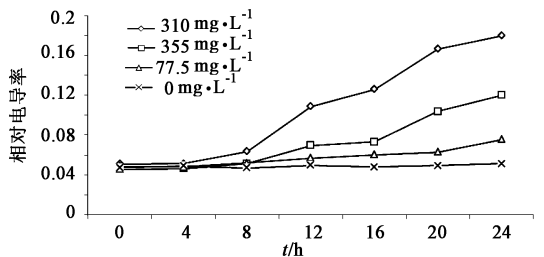


图 2 不同质量浓度 TF 作用不同时间对 SA 相对电导率的影响

活性从而影响细菌的正常生命代谢,当 TF 达到一定浓度时,可完全抑制细菌的活性,使其新陈代谢过

程终止从而死亡。见图 3。

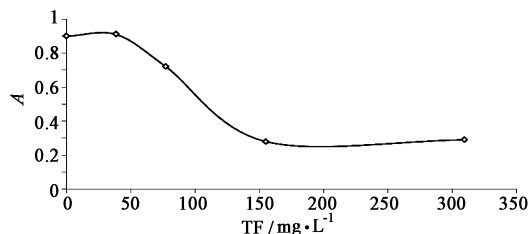


图 3 不同质量浓度 TF 对 SA 脱氢酶活性的影响

4 讨论

除支原体外,几乎所有的细菌都有细胞壁。革兰阳性细菌细胞壁的主要成分是肽聚糖,在生长繁殖期大量合成,它使得这层壁坚韧并富有弹性。肽聚糖的合成过程分 3 个连续步骤^[5-6],在细胞的不同部位进行。第 1 步在细胞质内进行;第 2 步在细胞质膜上进行;第 3 步在转肽酶参与下,在细胞膜外进行。细菌细胞壁的主要功能是保护细胞、维持细胞形状、协助鞭毛运动等,而且还与细菌的抗原性、致病性和对噬菌体的敏感性有关;细菌表面带有一定量的负电荷,其表面带的负电荷越多,吸附百分率越大,细菌的吸附性越强,则其致病可能性越大^[7-8];细菌培养液电导率的改变可以反映细胞膜渗透性的变化,通过电导率的测定,可以评价药物对细菌细胞膜通透性的影响^[9-10];脱氢酶是一类催化物质氧化还原反应的酶,生物体中绝大多数氧化还原反应都是在脱氢酶及氧化酶的催化下进行。物质经脱氢酶催化氧化,最后通过电子传递链而被氧化,此时通过氧化磷酸化作用生成三磷酸腺苷(ATP),这是异养生物体取得能量的主要途径。脱氢酶是细菌呼吸代谢过程中所必需的酶,以脱氢酶催化氯化三苯基四氮(TTC)生成三苯基甲脂的量可衡量脱氢酶的活性,从而反映细菌细胞被破坏的程度^[11]。

本实验结果显示,TF 能降低细菌的吸附率,可能和 TF 本身的结构有关,TF 带有阳离子基团,能够中和细菌的表面负电荷,吸引细菌表面带负电荷的基团趋向表面分布进行重排,导致细菌表面疏水性下降,从而降低了细菌的吸附率;加入 TF 后,菌液的电导率增加,说明 TF 可使菌体细胞膜的通透

性增加,使菌体细胞质渗漏到了细胞外,究其原因,可能是 TF 诱导产生了某些降解细胞壁和细胞膜的酶所致。综上所述,TF 抗菌机制与其降低细菌表面疏水性、增加细菌通透性使细菌细胞壁形态发生缺失或异常有关,并通过抑制细菌脱氢酶活性,削弱甚至终止细菌的新陈代谢而发挥抗菌作用。

[参考文献]

- [1] 曾春晖,杨柯,林启云,等. 广西藤茶提取物 APS 体外抗菌作用研究 [J]. 中国药物应用与检测, 2006, 3(6): 36.
- [2] 曾春晖,杨柯,林启云,等. 广西藤茶提取物 APS 抗菌机制研究 [J]. 山东中医杂志, 2007, 26(6): 415.
- [3] 赵清风,陈介南,张林,等. AgNO₃ 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌作用及机制 [J]. 生物加工过程, 2011, 9(3): 52.
- [4] 冯小强,李小芳,杨声,等. 壳聚糖对细菌细胞膜及膜蛋白的作用 [J]. 食品科学, 2009, 30(13): 84.
- [5] Gale E F, Cundliffe E, Reynolds P E, et al. The molecular basis of antibiotic action [M]. London: John Wiley and Sons, 1972: 49.
- [6] Farnkin T J, Snow G A. Biochemistry of antimicrobial action [M]. London: Chapman and Hall Ltd. 1971: 22.
- [7] 侯利霞,翟培,施用晖,等. 家蝇抗菌肽对细菌细胞表面特性影响及其作用机理的研究 [J]. 微生物学通报, 2007, 34(3): 434.
- [8] Im K C, Takasaki Y, Endo A, et al. Antibacterial activity of α -type zeolite supporting silver ions in deionized distilled water [J]. Antibact J Antifung Agents, 1996, 24(4): 269.
- [9] 邓淑华,王鸿梅,刘艳华. 黄芩茎叶总黄酮抗菌作用的实验研究 [J]. 承德医学院学报, 2008, 25(3): 324.
- [10] 杨滋渊,李巧如,赵院莉,等. 丁香挥发油的抗菌作用研究 [J]. 西北药学杂志, 2007, 22(4): 181.
- [11] 朱南文,闵航,陈美慈,等. TTC: 脱氢酶测定方法的探讨 [J]. 中国沼气, 1996, 16(2): 3.

[责任编辑 李玉洁]