

纠 敏, 闫 鹏, 闫国庆, 等. 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌的抑菌作用机制[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(7): 202–206.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.07.048

冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌的抑菌作用机制

纠 敏¹, 闫 鹏¹, 闫国庆¹, 镐影雪¹, 汪伦记^{1,2}

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院/食品加工与安全国家级实验教学示范中心, 河南洛阳 471023;

2. 河南科技大学食品与生物工程学院/微生物资源开发与利用重点实验室, 河南洛阳 471023)

摘要:研究了冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌的抑菌作用机制。通过测定冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌细胞膜的通透性、呼吸代谢途径和蛋白质合成能力的影响, 探讨冬凌草甲素的抑菌机制。试验结果显示, 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)分别为 25 $\mu\text{g/mL}$ 和 50 $\mu\text{g/mL}$; 冬凌草甲素作用金黄色葡萄球菌后, 培养液的电导率升高, β -D-半乳糖苷酶活性增大, 核酸外泄量也增加, 2 MIC 药物组处理 6 h 后的电导率比空白组升高了 18% ($P < 0.01$), 处理 12 h 后的 β -D-半乳糖苷酶活性比空白组增大了 124% ($P < 0.01$), 胞外核酸大分子含量极显著高于对照组 ($P < 0.01$); 冬凌草甲素作用金黄色葡萄球菌 9h, 菌体可溶性蛋白质总量比对照组减少了约 50% ($P < 0.01$); 冬凌草甲素能抑制金黄色葡萄球菌三羧酸循环中的关键酶活性, 其中对苹果酸脱氢酶活性抑制率为 53.22% ($P < 0.01$), 对琥珀酸脱氢酶的活性抑制率为 33.96% ($P < 0.01$)。试验结果表明, 冬凌草甲素通过破坏细菌细胞膜的通透性以及抑制菌体内的蛋白质合成、代谢关键酶的活性发挥杀菌作用。

关键词:冬凌草甲素; 金黄色葡萄球菌; 抑菌机制; 细胞膜通透性; 呼吸代谢; 蛋白质合成

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)07-0202-05

食品是人类赖以生存和发展的物质基础, 而食品安全问题是关系到人体健康和国计民生的重大问题。当前, 由致病微生物造成的食品安全事件已上升为我国乃至世界面临的首要问题^[1], 其中, 引起食源性疾病的主要致病微生物有沙门氏菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌^[2]。金黄色葡萄球菌广泛存在于自然界中, 且易黏附在食品加工设备、包装材料的表面并形成生物膜, 造成设备腐蚀和食品污染, 由其肠毒素引发的食物中毒事件屡屡发生^[3]。

为控制食品中微生物的含量, 通过添加防腐剂来抑制或杀灭微生物已成为食品加工和储藏中使用最为普遍和有效的方法。但合成防腐剂大量使用带来的安全性问题正不断受到质疑^[4-5]。鉴于此, 寻求安全高效的天然食品防腐剂一直是食品科学、生物领域及中药学中的重要课题。天然植物源防腐剂以其安全、高效、抗氧化效果好、抗菌谱广等优点, 已经成为近年来人们研究的热点, 并逐步被应用于各食品领域^[6-7]。

冬凌草是我国的特色中草药, 其主要活性成分为冬凌草甲素^[8]。冬凌草甲素为贝壳杉烯骨架的四环二萜类化合物, 无色棱柱状结晶, 味道极苦, 不溶于水, 溶于乙醚、甲醇、乙醇等有机溶剂, 具有抗炎、抗微生物和抗肿瘤等多种药理活性^[9]。冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、表皮葡萄球菌、禽巴氏杆菌等都有较强的抑制作用。但是, 目前有关冬凌草甲素的作用机制研究鲜有报道。本研究以金黄色葡萄球菌为供试菌, 通过研究冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌细

胞膜通透性、蛋白质合成和呼吸代谢等方面的影响, 探讨冬凌草甲素的抑菌作用机制, 以期在冬凌草在食品行业中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 材料 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC6538, 中国普通微生物菌种保藏管理中心); 冬凌草甲素 (上海源叶生物科技有限公司); 牛血清白蛋白、戊二醛、考马斯亮蓝 G-250、碘乙酸 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司]; 琥珀酸脱氢酶试剂盒、苹果酸脱氢酶试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 牛肉膏、蛋白胨、氯化钠、氢氧化钠、盐酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、丙二酸、磷酸钠、葡萄糖 (分析纯, 天津市德恩化学试剂有限公司)。

1.1.2 培养基 细菌液体培养基: 蛋白胨 10 g, 氯化钠 10 g, 酵母膏 5 g, 蒸馏水 1 000 mL, 用 1 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 值至 7.2~7.4, 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min 备用。细菌平板培养基: 蛋白胨 10 g, 氯化钠 10 g, 酵母膏 5 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, 用 1 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 值至 7.2~7.4, 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min 备用。

1.1.3 主要仪器设备 UV755B 紫外可见分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司); SW-CJ-1G 超净工作台 (江苏苏净集团有限公司); LDZX-30KBS 立式压力蒸汽灭菌锅 (上海申安医疗器械厂); BSA224S 电子天平 (德国赛多利斯集团); DKB-8A 电热恒温水浴箱 (上海医疗器械厂股份有限公司); H-2050R 低温超速离心机 (湖南湘仪离心机仪器有限公司); DW-86L578J 超低温冰箱 (海尔集团); DDS-307 电导率仪 (上海仪电科学仪器股份有限公司); JY92-2D 超声细胞破碎仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司); JYD-1A

收稿日期: 2018-11-02

基金项目: 河南省自然科学基金 (编号: 182300410081); 河南省大学生创新训练项目 (编号: 201810464039)。

作者简介: 纠 敏 (1971—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事天然产物开发与利用研究。E-mail: jiumin0912@163.com。

溶解氧测定仪(南京科环分析仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种活化和标准菌悬液制备 挑取 1~2 环金黄色葡萄球菌接种在试管斜面培养基上,37℃培养 24 h 后,用无菌生理盐水洗下菌苔,制成菌悬液。采用麦氏比浊法,用无菌生理盐水调节细菌含量为 1×10^8 CFU/mL。

将复苏好的金黄色葡萄球菌菌悬液按体积比 1:50 接种于新鲜细菌液体培养基中,在温度为 37℃,转速为 220 r/min 条件下,培养 20 h 后,4℃、8 000 r/min,离心 10 min,沉淀物用无菌生理盐水洗涤 2 次,每次 10 mL,然后用无菌生理盐水调整菌悬液浓度为 5×10^8 CFU/mL,得到标准菌悬液。

1.2.2 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌最小抑菌浓度(MIC)及最小杀菌浓度(MBC)的测定^[10]

1.2.2.1 最小抑菌浓度测定 二倍稀释法:取 8 支试管分别加入 5 mL 细菌液体培养基(其中第一支试管加 9.5 mL),加入 0.5 mL 冬凌草甲素溶液于第 1 支试管中,混匀后取出 5 mL 加入第 2 支试管中,然后依次取出 5 mL 移入下一试管,到第 8 支试管时弃去 5 mL,再在这 8 支试管中分别加入 0.1 mL 培养好的菌液。另取 2 支试管分别编号为第 9 和 10,其中第 9 号试管作为空白对照 1,只加 5 mL 液体培养基,不加药液;第 10 号试管作为空白对照 2,加 5 mL 液体培养基和溶剂甲醇。用 2 倍递减稀释法将冬凌草甲素配制成 400.000、200.000、100.000、50.000、25.000、12.500、6.250、3.125 μg/mL 的冬凌草甲素溶液,溶剂为甲醇,37℃恒温培养 24 h,将培养基中完全没有菌生长(透明)的最低浓度作为冬凌草甲素的最小抑菌浓度(MIC)。

1.2.2.2 最小杀菌浓度测定 在最小抑菌浓度的基础上,将一含金黄色葡萄球菌的含培养基的培养皿均分为 6 个部分,用接种环分别取编号为 1~6(对应冬凌草甲素的质量浓度分别为 100.000、50.000、25.000、12.500、6.250、3.125 μg/mL)的试验试管中的溶液,接种于平板上对应的编号接种区,接种完成后,把培养皿置于恒温培养箱中,37℃恒温培养 24 h,平板中未见细菌生长的最低药液浓度即为其对细菌的最小杀菌浓度(MBC)。

1.2.3 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌细胞膜通透性的影响 电导率的测定^[11]:向生长到对数期的金黄色葡萄球菌中加入冬凌草甲素溶液,使培养基中冬凌草甲素的终浓度为 1/4、1/2、1、2 MIC,37℃下 120 r/min 恒温培养。在培养 0、2、4、6、8 h 时取 10 mL 培养液,4 500 r/min 离心 10 min,用移液枪吸取 3 mL 上清液到小试管中,再加 2 mL 无菌水混匀测定其电导率,以冬凌草甲素溶剂甲醇为对照组,平行试验 3 次,取平均值。

β-D-半乳糖苷酶活性测定^[12]:取制备的菌悬液与冬凌草甲素混合,使冬凌草甲素质量浓度达到 1/4、1/2、1、2 MIC,置于 37℃摇床中培养 12 h 后取 1 mL 菌悬液,采用邻硝基苯 β-D-半乳糖苷(ONPG)比色法测定其吸光度,具体做法:首先用 25 mmol/L pH 值为 7.2 的三(羟甲基)氨基甲烷(Tris-HCl)(含 0.5% NaCl)溶液将菌悬液稀释至浓度为 5×10^7 CFU/mL,取 10 μL 30 mmol/L ONPG 溶液加入 100 μL 菌液中,于 37℃下反应 2 h,以不加冬凌草甲素的菌液为对照,405 nm 下测定吸光度。

胞外 DNA、RNA 含量的测定^[13]:将培养至对数期的金黄色葡萄球菌,用磷酸缓冲盐溶液洗涤 2 次,制成 1×10^7 CFU/mL 的菌悬液。加入冬凌草甲素,使其终浓度为 1 MIC 和 2 MIC。在药物作用 0、2、4、6、8 h 时,将菌悬液于 5 000 r/min 下离心 10 min,取上清,用紫外分光光度计在 260 nm 处测定上清液中 DNA、RNA 大分子物质的吸光值。以不加药液为对照组,试验重复 3 次,取平均值。

1.2.4 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌胞内总蛋白质合成能力的影响 将生长到对数期的金黄色葡萄球菌用 pH 值为 7.4 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液洗涤,并稀释成浓度为 5×10^7 CFU/mL 的菌液,取 5 mL 与等体积的 1/4、1/2、1、2 MIC 冬凌草甲素混合后,于 37℃、120 r/min 摇床上培养,分别在 3、6、9 h 时取样 5 mL,10 000 r/min 离心 5 min 收集细胞。以无菌水替代冬凌草甲素作为空白对照。

取冬凌草甲素处理组和空白对照组菌体沉淀,用磷酸缓冲盐溶液将其重悬,采用麦氏比浊法调节不同处理组细菌含量为 1×10^8 CFU/mL。取 5 mL 样品,10 000 r/min 离心 5 min,弃上清。沉淀物分别加入 50 μL 无菌水和 100 μL SDS-PAGE loading buffer,混匀后于沸水浴中加热 5 min,12 000 r/min 离心 2 min,取 40 μL 上清液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),采用蛋白质定量分析试剂盒测定微生物胞内蛋白质含量。浓缩胶和分离胶的浓度分别为 4% 和 10%;电泳结束后用 0.1% 的考马斯亮蓝 R-250 进行凝胶染色,用 25% 的甲醇和 7% 的醋酸混合液脱色^[14]。

1.2.5 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌呼吸代谢的影响 在反应杯中加入 1.8 mL pH 值为 7.0 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲盐溶液,0.2 mL 1% 葡萄糖溶液和 0.5 mL 浓度为 1×10^7 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌悬液,在空气中搅拌 5 min,开始测定菌悬液中的溶氧量。测定时保证整个体系处于封闭状态。用注射器分别加入典型抑制剂碘乙酸、丙二酸和磷酸钠,使其终浓度为 500 μg/mL,再加入冬凌草甲素,使其质量浓度达到 1 MIC,以不加药液为对照组。根据菌悬浮液中溶氧量的变化,求出菌体呼吸速率。按照下列公式求出 3 种典型抑制剂与冬凌草甲素的呼吸抑制率和叠加率^[15-16]。

$$I_R = \frac{R_0 - R_1}{R_0} \times 100\%;$$

$$R_R = \frac{R_1 - R_1'}{R_1} \times 100\%。$$

式中: I_R 为抑制剂对菌体呼吸的抑制率,%; R_0 、 R_1 分别为对照组和抑制剂组的菌体呼吸速率,μmol/(g·min); R_R 为典型抑制剂对冬凌草甲素的叠加率,%; R_1 为加入冬凌草甲素后菌体的呼吸速率,μmol/(g·min); R_1' 为加入典型抑制剂后菌体的呼吸速率,μmol/(g·min)。

1.2.6 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌胞内琥珀酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶活性的影响 向培养至对数期的金黄色葡萄球菌中加入冬凌草甲素,使其质量浓度达到 1 MIC,37℃培养分别培养 4 h 和 8 h,取培养的菌液 5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用 pH 值为 7.4 的 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液洗涤 2~3 次后,用 Tris-HCl 缓冲液将其重悬,采用麦氏比浊法将不同处理组细菌含量调至相同。取样品 5 mL,进行冰浴超声破碎,时间 1 min,间歇 2 s,功率为 200 W。细胞破碎后,

10 000 r/min 低温离心 15 min, 取出上清液, 测定酶活性。琥珀酸脱氢酶 (SDH) 和苹果酸脱氢酶 (MDH) 活性的测定按试剂盒的说明书操作。采用蛋白质定量分析试剂盒测定上清液蛋白质含量。以不加药液为对照组, 试验重复 3 次, 取平均值^[17]。

SDH 活性定义为 1 mg 蛋白质 1 min 使反应体系的吸光度值降低 0.01 为 1 个酶活性单位; MDH 活性定义为 1 mg 蛋白质在反应体系中 1 min 内催化 1 μmol 的底物变成产物定义为 1 个酶活性单位^[18]。

1.2.7 数据处理 试验数据以平均值 \pm 标准差的形式表示。

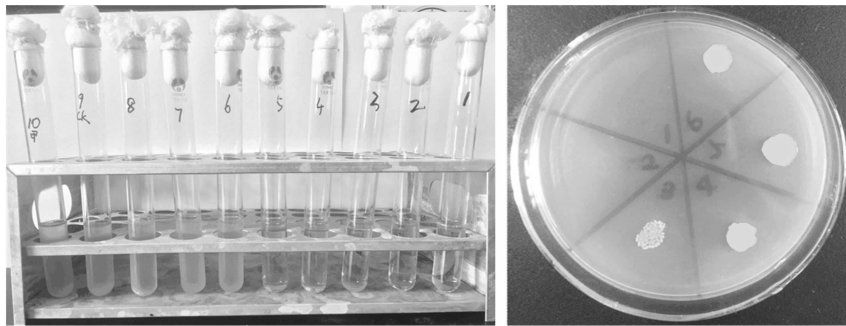
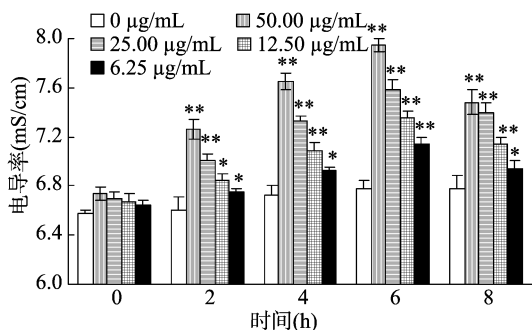


图1 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌 MIC 和 MBC 的测定

2.2 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌细胞膜通透性的影响

药物可通过破坏细胞膜的通透性抑制细菌的生长, 因此对冬凌草甲素处理后的金黄色葡萄球菌培养基溶液的电导率、胞外 β -D-半乳糖苷酶活性和核酸含量进行测定, 试验结果见图 2、图 3、表 1。由图 2 可知, 随着作用时间延长, 对照组的电导率基本没有变化, 药物处理组电导率在 0~6 h 有明显增大, 6 h 后降低。同时, 在相同作用时间内, 随着药物浓度升高电导率增大, 2MIC 浓度下作用 6 h 时电导率达到最大值为 7.95, 与对照组相比增加了 17% ($P < 0.01$)。



*、**分别表示与空白组在 0.05、0.01 水平上差异显著。图3同图2 不同质量浓度冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌电导率的影响

通常宿主菌 β -D-半乳糖苷酶存在于胞内, 当细胞内膜渗透性达到一定水平时, 其胞内的 β -D-半乳糖苷酶就会渗透到细胞外。而 ONPG 是 β -D-半乳糖苷酶的底物, 水解后生成半乳糖和黄色的邻-硝基苯酚 (ONP)。ONP 在 405~420 nm 处有紫外吸收, 因此培养物吸光值的变化可以反映细胞内膜通透性的改变^[12]。由图 3 可知, 随着冬凌草甲素质量浓度升高, 吸光度不断增大, 这表明细胞内的 β -D-半乳糖苷酶外泄量增多。2MIC 处理下吸光度达到 0.746, 与对照组相比增大了 124% ($P < 0.01$)。

统计分析采用 SPSS 软件, 组间分析采用 One-Way ANOVA 两两比较得到相应的 P 值, $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 为显著和极显著差异。

2 结果与分析

2.1 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌 MIC 及 MBC 的测定

最小抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC) 是测量抑菌物质抑菌活性大小的重要指标, 试验结果见图 1。冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 25 $\mu\text{g/mL}$, MBC 为 50 $\mu\text{g/mL}$ 。

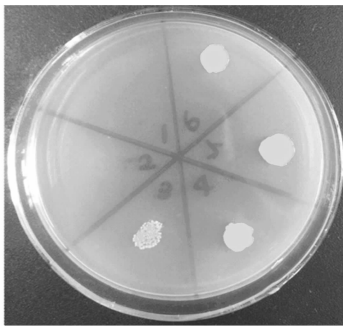


图3 不同质量浓度冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌 β -D-半乳糖苷酶活性的影响

对冬凌草甲素作用后的金黄色葡萄球菌菌体核酸大分子物质的外泄情况进行研究, 试验结果见表 1。25 $\mu\text{g/mL}$ 与 50 $\mu\text{g/mL}$ 的冬凌草甲素作用金黄色葡萄球菌后, 胞外核酸大分子含量极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 且随着冬凌草甲素质量浓度的增加, 核酸外泄量增加。对药物处理的金黄色葡萄球菌培养基溶液的电导率、胞外 β -D-半乳糖苷酶活性和核酸含量分析结果说明, 冬凌草甲素能破坏金黄色葡萄球菌细胞膜的通透性, 导致其胞内物质大量外流, 进而抑制其生长繁殖。

2.3 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌呼吸代谢作用的影响

磷酸钠、碘乙酸和丙二酸分别是生物体内磷酸戊糖途径、糖酵解途径和三羧酸循环的典型抑制剂^[16]。冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌呼吸代谢影响见表 2。1 MIC 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌呼吸抑制率为 14.74%, 当冬凌草甲素分别与 3 种抑制剂联合使用时, 结果显示, 与丙二酸作用时叠加率最小, 仅有 3.70%。叠加率的大小可反映冬凌草甲素与典型抑制剂间的增效作用。叠加率越小, 表明药物与典型抑制剂抑制相同代谢途径的可能性越大^[19]。因此, 冬凌草甲素主要是通过抑制三羧酸循环途径而起作用的。

表 1 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌胞外核酸大分子的影响

冬凌草甲素质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	核酸在 260 nm 处的吸光度				
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h
0	0.126 ± 0.007	0.143 ± 0.006	0.237 ± 0.015	0.296 ± 0.005	0.457 ± 0.048
25	$0.215 \pm 0.001^{**}$	$0.324 \pm 0.014^{**}$	$0.553 \pm 0.002^{**}$	$0.666 \pm 0.004^{**}$	$0.813 \pm 0.008^{**}$
50	$0.232 \pm 0.001^{**}$	$0.369 \pm 0.005^{**}$	$0.763 \pm 0.002^{**}$	$0.864 \pm 0.003^{**}$	$0.952 \pm 0.015^{**}$

注：*、** 分别表示与空白组在 0.05、0.01 水平上差异显著。表 3、表 4 同。

表 2 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌呼吸代谢的影响

抑制剂	质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	抑制率 (%)	叠加率 (%)
冬凌草甲素	25	14.74	
丙二酸	500	29.47	3.70
磷酸钠	500	17.89	17.28
碘乙酸	500	41.05	30.86

2.4 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌 SDH 和 MDH 活性的影响

琥珀酸脱氢酶(SDH)和苹果酸脱氢酶(MDH)在微生物能量代谢中起着关键作用,其活性降低是细胞能量代谢损伤的标志。试验结果(表 3)显示,1 MIC 冬凌草甲素作用金黄色葡萄球菌 8 h 后,与对照组相比,SDH 和 MDH 活性都降低了,其中 MDH 的活性降低 53.22% ($P < 0.01$),SDH 的活性降低 33.96% ($P < 0.01$)。表明冬凌草甲素能通过抑制呼吸

代谢中三羧酸循环的 SDH 和 MDH 活性来抑制金黄色葡萄球菌的能量代谢,其中对 MDH 的抑制效果较为明显。

表 3 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌 SDH 和 MDH 活性的影响

处理	作用时间 (h)	MDH 活性 (U/mg)	SDH 活性 (U/mg)
阴性对照	4	5.56 ± 0.23	8.25 ± 0.35
	8	8.08 ± 0.26	10.10 ± 0.28
冬凌草甲素	4	$4.49 \pm 0.31^{*}$	8.01 ± 0.24
	8	$3.78 \pm 0.42^{**}$	$6.67 \pm 0.27^{**}$

2.5 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌胞内可溶性蛋白质含量的影响

药物可通过抑制蛋白质的合成来抑制细菌的生长繁殖。因此,对冬凌草甲素作用金黄色葡萄球菌的胞内可溶性蛋白质含量进行测定,试验结果见表 4。

表 4 不同质量浓度冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌胞内可溶性蛋白质含量的影响

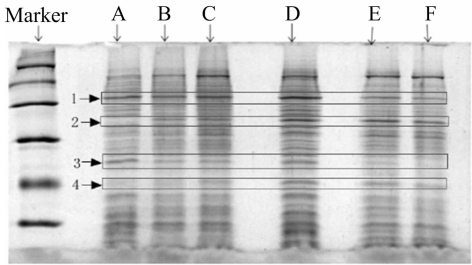
冬凌草甲素质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	胞内可溶性蛋白质含量($\mu\text{g/mL}$)		
	3 h	6 h	9 h
0	$1\,068.67 \pm 15.01$	$1\,008.67 \pm 15.53$	909.33 ± 11.72
6.25	$835.33 \pm 20.53^{**}$	$711.33 \pm 11.37^{**}$	$563.33 \pm 10.26^{**}$
12.50	$814.67 \pm 13.01^{**}$	$606.00 \pm 15.87^{**}$	$505.33 \pm 6.43^{**}$
25.00	$784.00 \pm 7.21^{**}$	$534.00 \pm 11.13^{**}$	$462.67 \pm 11.02^{**}$
50.00	$649.33 \pm 16.65^{**}$	$521.33 \pm 7.02^{**}$	$455.33 \pm 11.37^{**}$

由表 4 可知,金黄色葡萄球菌胞内可溶性蛋白质总量随着冬凌草甲素质量浓度的增加,呈现逐渐降低的趋势,与对照组相比,50 $\mu\text{g/mL}$ 的冬凌草甲素处理 3 h 时金黄色葡萄球菌胞内可溶性蛋白质总量降低了约 40% ($P < 0.01$);且随着冬凌草甲素作用时间的延长,菌胞内可溶性蛋白质总量呈下降趋势,50 $\mu\text{g/mL}$ 的冬凌草甲素处理 9 h 时比对照组降低了约 50% ($P < 0.01$)。

采用 SDS-PAGE 对质量浓度为 12.50 $\mu\text{g/mL}$ 的冬凌草甲素抑制金黄色葡萄球菌胞内蛋白质合成情况进行分析,由图 4 可知,随着作用时间的延长,有的蛋白质条带颜色逐渐变浅,表明蛋白质的合成量变少;用药组和对对照组相比,蛋白质含量有明显差异,对照组蛋白质谱带多而清晰,而药物作用后,大多蛋白质条带变浅,有的谱带甚至消失,但有的蛋白质条带颜色变深(箭头所示),这种变化随着时间的延长,更加明显。

3 结论与讨论

天然植物中含有生物碱、挥发油、黄酮、有机酸等生物活性物质,它们具有不同程度的抗菌作用,对这些天然化合物的抗菌机制的研究结果证实,其主要通过破坏细胞膜的完整性、抑制三羧酸循环、抑制蛋白质和核酸的合成等抑制细菌正常



A~C—9、6、3 h 试验组; D~F—3、6、9 h 对照组
图 4 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌可溶性蛋白质含量的影响

生长代谢^[20]。

冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌具有显著的抑菌活性,其最低抑菌浓度和最小杀菌浓度分别为 25 $\mu\text{g/mL}$ 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 。对冬凌草甲素作用金黄色葡萄球菌后培养液的电导率、胞外 β -D-半乳糖苷酶活性和核酸含量研究结果显示,冬凌草甲素可以使金黄色葡萄球菌培养液的电导率增加,胞内的 β -D-半乳糖苷酶和核酸大分子物质明显外漏,表明冬凌草甲素能够破坏金黄色葡萄球菌的细胞膜结构。

新陈代谢是一切生命体生命活动的基础,是同外界不断进行物质和能量交换的过程。呼吸作用是生物体主要的产能

代谢之一,呼吸作用的抑制或终止可导致生命活动受阻甚至停止。本研究测定了冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌呼吸代谢的抑制率以及与糖酵解途径、磷酸戊糖途径和三羧酸循环途径典型抑制剂的叠加率。试验结果表明,冬凌草甲素与抑制剂丙二酸联合使用时叠加率最小,为 3.70%。表明冬凌草甲素主要通过抑制三羧酸循环途径来抑制金黄色葡萄球菌的呼吸代谢。

SDH 和 MDH 是真核细胞和原核细胞三羧酸循环中的关键酶,在细胞能量代谢中起着重要的作用,其活性变化可反映细胞的能量代谢状况^[21]。冬凌草甲素作用金黄色葡萄球菌后的 MDH、SDH 活性测定结果表明,冬凌草甲素能够抑制 MDH、SDH 活性,1 MIC 的冬凌草甲素作用金黄色葡萄球菌 8 h,与对照组相比,MDH 活性降低了 53.22% ($P < 0.01$),SDH 活性降低了 33.96% ($P < 0.01$)。试验结果表明冬凌草甲素通过抑制呼吸代谢中 MDH、SDH 活性来抑制金黄色葡萄球菌的能量代谢,其中对 MDH 的抑制效果较为明显。

能量代谢障碍会进一步导致蛋白质和核酸的合成受到阻碍,进而影响细胞的生长繁殖。冬凌草甲素作用金黄色葡萄球菌后的胞内可溶性蛋白质含量测定结果显示,冬凌草甲素能抑制菌体蛋白质的合成,与对照组相比,50.00 $\mu\text{g/mL}$ 的冬凌草甲素作用金黄色葡萄球菌 9h,其胞内的可溶性蛋白质总量降低了约 50% ($P < 0.01$)。质量浓度为 12.50 $\mu\text{g/mL}$ 的冬凌草甲素处理组的 SDS-PAGE 结果证实,用药组和对照组的蛋白质表达有明显差异,对照组蛋白质谱带多而清晰,而药物作用后,大多蛋白质条带变浅,有的谱带甚至消失,但有的蛋白质条带颜色变深,这种变化随着时间的延长,更加明显。

植物杀菌剂的抑菌机制多种多样且有差异,可能是单一机制,也可能是多种机制的协同作用^[22-23]。研究表明,冬凌草甲素可通过破坏细胞膜的通透性、抑制菌体的呼吸代谢和蛋白质的合成等途径影响金黄色葡萄球菌的生长与繁殖。由于杀菌剂抑菌机制的复杂性,本研究仅从细胞膜的通透性、蛋白质合成和呼吸代谢情况等表象进行了初步分析,而关于其深层次的抑菌机制还需要从分子水平进行进一步的揭示。

参考文献:

- [1]董庆利,王海梅,Malakar P K,等. 我国食品微生物定量风险评估的研究进展[J]. 食品科学,2015,38(11):221-229.
- [2]Scallan E, Hoekstra R M, Angulo F J, et al. Foodborne illness acquired in the United States major pathogens [J]. Emerging Infectious Diseases,2011,17(1):7-12.
- [3]王琼,唐俊妮,汤承,等. 6 种食品防腐剂对金黄色葡萄球菌抑菌效果及肠毒素基因表达影响[J]. 食品科学,2016,37(21):151-156.
- [4]Parke D V, Lewis D F. Safety aspects of food preservatives[J]. Food Additives & Contaminants,1992,9(5):561-577.
- [5]Soni M G, Carabin I G, Burdock G A. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens) [J]. Food and Chemical Toxicology,2005,43(7):985-1015.
- [6]Sahari M A, Asgari S. Effects of plants bioactive compounds on foods microbial spoilage and lipid oxidation [J]. Food Science and Technology,2013,4(5):531-538.
- [7]Negi P S. Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application [J]. International Journal of Food Microbiology,2012,156(1):7-17.
- [8]Chen S, Gao J, Halicka H D, et al. The cytostatic and cytotoxic effects of oridonin (Rubescenin), a diterpenoid from *Rabdosia rubescens*, on tumor cells of different lineage[J]. International Journal of Oncology, 2005,26(3):579-588.
- [9]Li D H, Han T, Liao J, et al. Oridonin, a promising ent-kaurane diterpenoid lead compound [J]. international journal of molecular sciences,2016,17(9):1395-1413.
- [10]汪伦记,许美秋,纠敏,等. 冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌生物膜形成的抑制作用[J]. 天然产物研究与开发,2017,29(6):1000-1005.
- [11]周磊,云宝仪,汪业菊,等. 大黄素对金黄色葡萄球菌的抗菌作用机制[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2011,27(12):1156-1160.
- [12]刘睿杰,幸新干,于榛榛,等. 磷脂酶 C 对大肠杆菌细胞膜通透性的影响[J]. 现代食品科技,2015,31(7):32-36.
- [13]Chen C Z, Cooper S L. Interactions between dendrimerbiocides and bacterial membranes [J]. Biomaterials, 2002, 23 (16): 3359-3368.
- [14]钱丽红,陶妍,谢品. 茶多酚对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的抑菌机理[J]. 微生物学通报,2010,37(11):1628-1633.
- [15]王海洪,包杰中,宁正祥,等. 富马酸二甲酯对微生物生长和呼吸的抑制作用[J]. 食品与发酵工业,1993,19(2):1-6.
- [16]陈亚非,黄凯玲,高建华,等. α -溴代肉桂醛及烷烯基酸酯类对微生物的呼吸代谢的抑制作用研究[J]. 食品与发酵工业,1994,20(3):26-29.
- [17]云宝仪,周磊,谢鲲鹏,等. 黄芩素抑菌活性及其机制的初步研究[J]. 药学报,2012,47(12):1587-1592.
- [18]李婷,杨舒然,陈敏,等. 姜厚朴水提物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌机理研究[J]. 现代食品科技,2016,32(2):84-92.
- [19]陶能国,郑世菊,敬国兴,等. 柠檬醛对指状青霉糖酵解的影响[J]. 现代食品科技,2015,31(12):172-176.
- [20]刘旺景,敖长金,萨茹丽,等. 植物提取物抑菌活性及作用机理[J]. 动物营养学报,2016,28(8):2344-2452.
- [21]罗颖颖,陈兰英,简晖,等. 白头翁皂苷调节 Bel-7402 人肝癌异体移植瘤裸鼠能量代谢的研究[J]. 中草药,2014,45(7):973-977.
- [22]Brul S, Coote P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms [J]. International Journal of Food Microbiology,1999,50(1):1-17.
- [23]张军,田子罡,王建华,等. 有机酸抑菌分子机理研究进展[J]. 畜牧兽医学报,2011,42(3):323-328.