

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2016.03.003

绿原酸抑制金黄色葡萄球菌机理研究^①

罗艺晨, 黄利明, 杨颖, 朱买勋,
温玉玲, 刘影, 张饶霞, 刘娟

西南大学(荣昌校区)兽医科学研究中心中药创新研究室, 重庆荣昌 402460

摘要: 为探索绿原酸(CGA)抑制金黄色葡萄球菌增殖的机制, 通过检测 β -半乳糖苷酶的变化反映细菌细胞膜通透性的变化, 凝固酶的活性反映细菌致病力; 用 Bradford 法、DNS 法和 DNP 法分别检测可溶性蛋白质量浓度、还原糖利用能力和丙酮酸质量浓度的变化反映细菌代谢的改变. 结果显示 CGA 处理金黄色葡萄球菌后菌液中 β -半乳糖苷酶出现泄漏, 且漏出量与 CGA 质量浓度呈量效关系, 无血浆凝固现象, 菌液中还原糖质量浓度急剧升高, 可溶性蛋白质量浓度降低量超过 50%, 丙酮酸质量浓度升高 5.34%, 与对照组相比差异极具统计学意义($p < 0.01$), 表明 CGA 可能通过改变金黄色葡萄球菌细胞膜的通透性, 阻碍物质和能量的代谢及细菌蛋白合成而达到抑菌作用.

关键词: 绿原酸; 金黄色葡萄球菌; 抑菌机理

中图分类号: S853.7

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)03-0015-05

绿原酸(Chlorogenic acid, CGA), 又名咖啡鞣酸, 存在于多种药用植物中, 其中金银花、杜仲含量较高, 且具有多种药理作用而被人们广泛运用于防治由细菌、病毒引起的疾病, 同样也具有降血压、降血脂、抗白血病、预防心血管疾病、糖尿病、增强免疫力等功效^[1-4]. 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 是一种常见的人畜共患致病菌, 可导致化脓性疾病, 尤其是奶牛乳房炎, 严重危害养殖业的发展, 也可能引起人畜食物中毒, 常表现出呕吐、发热、腹泻等症状, 危害动物及人类健康^[5-6]. 随着大量西药的使用, 细菌耐药性产生, 对动物机体毒害作用的增强给临床上选择抗金黄色葡萄球菌的药物加大了难度. 而抗菌药物要达到抗菌效果, 可能是通过损伤细胞壁、改变细胞通透性、改变核酸分子结构、抑制酶的作用、抑制代谢过程、抑制核酸合成^[7]等方面来完成. 本试验选取金黄色葡萄球菌探索 CGA 体外抑菌作用, 依据细菌的结构及代谢需要, 探索 CGA 对金黄色葡萄球菌细胞膜通透性、胞内外代谢和酶活力的影响, 从不同角度对 CGA 抑制金黄色葡萄球菌的机理进行探讨, 以指导临床用药.

1 试验材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种

金黄色葡萄球菌(中国兽药监察所菌种室提供, 菌株编号: ATCC25923);

① 收稿日期: 2014-04-22

基金项目: 国家公益性行业(农业)科技专项经费资助(20130304-05); 西南大学荣昌校区大学生课外科技立项资助(20121020-02).

作者简介: 罗艺晨(1981-), 女, 重庆合川人, 硕士研究生, 实验师, 主要从事药理学研究.

通信作者: 刘娟, 教授.

1.1.2 主要试剂

绿原酸(中国兽医药品检察所, Z0260611); 邻-硝基酚- β -D-半乳糖苷(南京都来生物技术有限公司产品, 2067161); 肝素(上海信裕生物科技有限公司产品, 1140430); 牛血清蛋白(南京奥多福尼生物技术有限公司产品, DB0021); 考马斯亮兰 G-250(上海生工生物工程有限公司产品, YY0504B208Y), 其余试剂均为分析纯。

1.1.3 主要仪器

数显振荡培养箱 BS-1E(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂); 721N 可见分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司); 恒温水浴箱 PHB(天津艾维欧科技发展有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 金黄色葡萄球菌活化及培养

将金黄色葡萄球菌菌株接种于营养肉汤进行活化, 37 °C 培养 6~8 h, 参照麦氏比浊管用灭菌肉汤稀释至 5×10^5 CFU/mL, 分别加入 CGA 最终质量浓度为 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 mg/mL 的培养基进行培养, 并测定绿原酸对金黄色葡萄球菌最小抑菌质量浓度。

1.2.2 β -半乳糖苷酶的测定

参照文献[8], 采用试管法, 试验设计 CGA 组和对照组, 每组做 7 个样, 其中 CGA 组加 CGA 至最终质量浓度为 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 mg/mL, 对照组加等量培养基, 37 °C 培养箱中培养 1 h 后, 每隔 1 min 用可见分光光度计测其在 420 nm 处的 OD 值, 连测 6 次。

1.2.3 凝固酶活性检测

在正常生长的细菌中加入含有 CGA 的培养基和家兔血浆, 37 °C 恒温水箱中水浴 4 h 后每隔 1 h 观察血浆蛋白凝固情况, 同时设计不含细菌的空白对照组、不含 CGA 的菌液对照组, 重复试验 3 次^[9]。

1.2.4 金黄色葡萄球菌对还原糖利用能力

参照 DNS(3, 5-二硝基水杨酸)法^[10-11], 接种一定量的金黄色葡萄球菌至含 CGA 终质量浓度为 8 mg/mL 的培养基中, 培养 8 h 后, 分别于 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h 测其在 550 nm 处的 OD 值, 以葡萄糖绘制标准作为参考, 测定菌液中还原糖的降低质量浓度。

1.2.5 考马斯亮兰法测定可溶性蛋白质量浓度

参照文献[12], 取 7 支试管, 采用标准蛋白绘制标准曲线。另选 7 支试管, 接种细菌至含 CGA 的肉汤培养基中培养 8 h 后, 离心取上清液, 加入考马斯亮兰 G-250 染液, 在 595 nm 波长下测定其 OD 值, 计算出菌液中还原糖的质量浓度, 同时设菌液对照组。

1.2.6 DNP 法测定培养液中丙酮酸质量浓度

选择丙酮酸原液稀释成不同质量浓度, 绘制标准曲线。再选 7 支试管, 同 1.2.5 方法制备菌液上清液, 加 2, 4-二硝基苯胍液, 摇匀后加入 1.5 mol/L NaOH 溶液 5 mL, 520 nm 波长下测 OD 值, 计算出菌液各组丙酮酸的质量浓度^[13]。

1.2.7 数据统计分析

试验数据用 Excel 进行收集, 结果用 SPSS19.0 软件进行方差分析和显著性检验, 试验结果用 $\bar{x} \pm SD$ 表示。

2 试验结果

2.1 CGA 对金黄色葡萄球菌最小抑菌质量浓度的测定

细菌接种至含有不同质量浓度的 CGA 培养液中培养后, 药液质量浓度小于等于 4.0 mg/mL, 培养液浑浊; 质量浓度大于或等于 8.0 mg/mL 时, 培养液未浑浊, 判定其最小抑菌质量浓度为 8.0 mg/mL。

2.2 CGA 作用后菌液中 β -半乳糖苷酶测定结果

从图 1 可知, CGA 质量浓度在 1 mg/mL 以下, 细菌胞内 β -半乳糖苷酶基本未出现外漏, 与无 CGA

组和对照组相比较, 差异不具有统计学意义 ($p > 0.05$); 当 CGA 质量浓度高于 2 mg/mL 时, 菌液中 β -半乳糖苷酶急剧升高, 与对照组相比, 差异极具有统计学意义 ($p < 0.01$), 表明大量的 β -半乳糖苷酶从胞内泄漏到菌液中。

2.3 CGA 对凝固酶活性的影响

从表 1 可知, 细菌对照组水浴 4 h 后发生凝固现象, 出现纤维蛋白凝胶块, 空白对照组和 CGA 组分别在水浴后 4 h, 5 h, 6 h 均未发生凝固, 未出现纤维蛋白凝胶块。

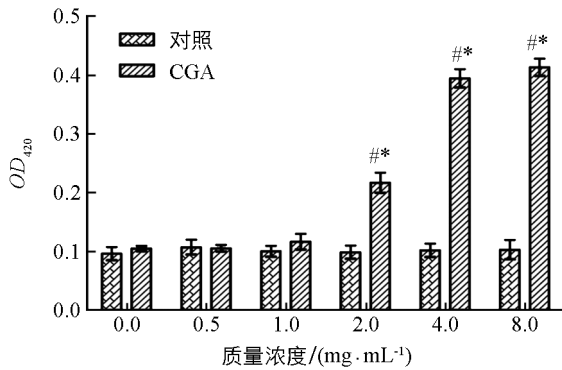
表 1 凝固酶活性检测结果

组别	空白对照组	菌液对照组	CGA 组
4 h	—	+	—
5 h	—	+	—
6 h	—	+	—
7 h	—	+	—

注: + 表示血浆蛋白凝固, — 表示血浆蛋白未凝固。

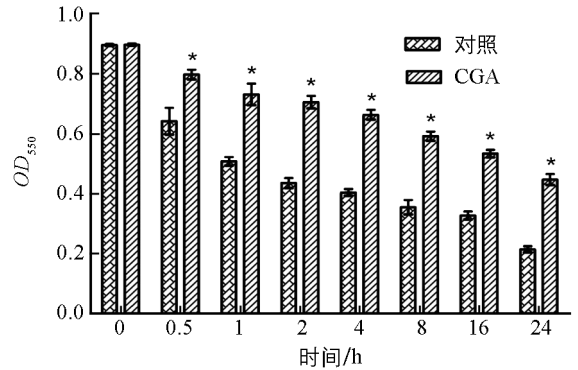
2.4 CGA 对金黄色葡萄球菌还原糖利用能力的影响

从图 2 可知, 在 CGA 作用后的金黄色葡萄球菌菌液中, 还原糖的质量浓度明显升高, 与对照组相比差异极具统计学意义 ($p < 0.01$), 说明金黄色葡萄球菌对还原糖的利用降低。



与对照组相比, * 表示差异极具有统计学意义 $p < 0.01$;
与不含 CGA 组相比, # 表示差异极具有统计学意义 $p < 0.01$ 。

图 1 菌液中 β -半乳糖苷酶的测定



与对照组相比, * 表示差异极具有统计学意义 $p < 0.01$ 。

图 2 金黄色葡萄球菌对还原糖的利用

2.5 可溶性蛋白质质量浓度测定

经测定, 可溶性蛋白标准曲线公式: $Y = 2.264 2X + 0.088 6$, $R^2 = 0.998 7$ (Y 表示吸光度 OD 值, X 表示标准蛋白溶液质量浓度, R 表示回归系数). 加入 CGA 作用 24 h 后菌液中可溶性蛋白质质量浓度显著降低, 降低量超过 50%, 与对照组相比, 差异极具统计学意义 ($p < 0.01$) (表 2)。

表 2 可溶性蛋白质质量浓度测定结果

组别	OD_{595}	蛋白质量浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
对照组	0.314 ± 0.002	9.959
CGA 组	$0.184 \pm 0.002^{**}$	4.236

2.6 丙酮酸质量浓度的测定

经测定, 丙酮酸标准曲线公式: $Y = 0.007 5X + 0.103 8$, $R^2 = 0.998 5$ (Y 表示吸光度 OD 值, X 表示标准蛋白溶液质量浓度, R 表示回归系数). 加入 CGA 作用 24 h 后菌液中丙酮酸质量浓度升高 5.34%, 与

对照组比较, 差异极具有统计学意义($p < 0.01$)(表 3).

表 3 丙酮酸质量浓度测定结果

组别	OD_{520}	丙酮酸质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
对照组	0.796 ± 0.011	92.323
CGA 组	$0.833 \pm 0.005^{**}$	97.256

3 分析讨论

金黄色葡萄球菌属革兰氏阳性菌, 主要见于化脓感染性疾病, 在临床上其主要通过产生毒素和侵袭性酶而致病. 当金黄色葡萄球菌进入动物机体之后迅速分泌溶血性毒素, 损伤血小板, 破坏溶酶体, 进而引起动物机体局部缺血和坏死; 也分泌杀白细胞素, 破坏动物白细胞和巨噬细胞, 破坏动物免疫功能; 同时血浆凝固酶使血液或血浆中的纤维蛋白结合在菌体表面, 保护菌体免受吞噬细胞的吞噬^[13]. 在凝固酶试验中, 经 CGA 处理后金黄色葡萄球菌产生结合凝固酶和游离凝固酶的量减少, 从而减少血浆中纤维蛋白原转变为纤维蛋白, 最终影响该菌的粘附能力及致病力.

在细菌的正常代谢过程中, 糖作为一种主要能源为细菌提供能量, 当糖类的吸收、利用受阻将会导致细菌能量不足, 进而影响菌体的生长繁殖. 丙酮酸作为生物体代谢的中间产物, 参与了许多的酶反映, 也是正常反映动物机体正常代谢的物质, 正常情况下丙酮酸在菌体内不会大量积累, 积累会抑制葡萄糖的吸收, 导致糖酵解和三羧酸循环不能很好偶联等, 最终导致能量代谢受阻, 从而引起动物机体能量和物质代谢障碍^[14]. 试验中 CGA 作用了的金黄色葡萄球菌对还原糖的吸收显著下降了, 丙酮酸质量浓度升高, 显示了 CGA 可能抑制细菌对糖的代谢, 其作用可能是影响了相关代谢酶的活性, 导致代谢过程受阻从而抑制细菌的正常生存.

β -半乳糖苷酶为胞内酶, 通常不外漏, 漏出率上升说明细胞膜通透性发生了改变^[13], 主要由特异的乳糖操作系统中的阻碍物、操纵基因、启动子等协同下合成, 在培养基中存在诱导物质时, 则激发细胞内 β -半乳糖苷酶的合成, 在细胞膜通透性增强时致使大量的 β -半乳糖苷酶外漏. CGA 作为一种诱导物质, 不断刺激乳糖操作系统, 使得大量的 β -半乳糖苷酶合成, 并在培养基中检测 β -半乳糖苷酶的质量浓度升高, 间接反映 CGA 对菌体细胞内膜有一定的破坏作用, 进而说明 CGA 可能通过破坏菌体细胞膜而发挥抑菌作用.

4 结 论

CGA 可通过改变细胞通透性, 降低蛋白质量浓度进而导致细胞物质和能量代谢水平降低, 从而共同完成对金黄色葡萄球菌的抑菌作用, 其中影响蛋白合成可能是其主要的抑菌机制.

参考文献:

- [1] ZHANG A L, MA Q, GAO J M, et al. Studies on Bioactivities of Chlorogenic Acid and Its Analogues[J]. China Tradition Herb Drugs, 2001, 32(2): 173-176.
- [2] KEIKO A, KATSUNARI L, MASA Y N, et al. Absorption of Chlorogenic Acid and CGA/Affecic Acid in Rats After Oral Administration [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(11): 5496-5500.
- [3] 张建海, 冯彬彬, 胡 奎, 等. 优选秀山灰毡毛忍冬醇提取工艺研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2008, 30(11): 58-62.
- [4] 郑 敏, 彭敬东, 王丽峰. 金银花和金银花露中绿原酸和 4 种黄酮含量的测定 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2009, 11(1): 45-48.
- [5] WANG S H, KHAN Y, HINES L, et al. Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus Sequence Type 239-III, Ohio, USA, 2007-2009 [J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(10): 1557-1565.

- [6] MERTENS R, SEYLER L, LACOR P, et al. Community Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* [J]. *Acta Clin Belg*, 2012, 67(4): 235–240.
- [7] 吴华彰, 费鸿君, 赵云利, 等. 萝卜硫素对大肠杆菌抑菌机制的研究 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2012, 43(3): 386–390.
- [8] 高 鹏, 陈 浩, 黎 娅, 等. 辐照降解后壳聚糖的抑菌作用研究 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2008, 30(5): 100–105.
- [9] 张泽宏, 何义发. 紫萁提取液抑菌试验的初步研究 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2008, 30(2): 95–98.
- [10] 余志坚, 陈传红, 赵晋宇. DNS法检测食用菌多糖含量条件优化研究 [J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(1): 259–260.
- [11] 江震献, 彭 霞, 张晓林, 等. 蝎子草醇提浸膏对金黄色葡萄球菌抗菌机制的研究 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2011, 33(5): 184–188.
- [12] 何 劲, 雷帮星, 康冀川, 等. 石斛抗真菌内生细菌的筛选及其抗菌特性的初步研究 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2009, 31(6): 92–96.
- [13] 王 拮. 大肠杆菌积累丙酮酸的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
- [14] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.

Study on the Mechanism of Chlorogenic Acid Inhibiting *Staphylococcus aureus*

LUO Yi-chen, HUANG Li-ming, YANG Ying, ZHU Mai-xun,
WEN Yu-ling, LIU Ying, ZHANG Rao-xia, LIU Juan

*Chinese Herbal Drugs Innovation Research Lab of Veterinary Science Research Center,
Southwest University (Rongchang Campus), Rongchang Chongqing 402460, China*

Abstract: To explore the mechanism of chlorogenic acid (CGA) inhibiting the proliferation of *Staphylococcus aureus*, the change in β -galactosidase enzyme was monitored to reflect the change in membrane permeability of *S. aureus*, the coagulase activity was detected to reflect bacterial virulence, and the changes in the content of soluble proteins, reducing sugar utilization and pyruvate content were tested with Bradford, DNS and DNP methods, respectively, to reflect the changes in bacterial metabolism. After the treatment of *S. aureus* with CGA, β -galactosidase enzyme leakage was noticed in the bacterial liquid with a dose-response relationship. No plasma coagulation was detected, the content of reducing sugars increased sharply, soluble protein content was reduced by more than 50%, and pyruvate content increased by 5.34% in the bacterial liquid. The differences compared with the control group were highly significant statistically. The study concluded that the CGA could inhibit the proliferation of *S. aureus* and that its main antibacterial mechanism might be to change the membrane permeability of this bacterium, inhibit material and energy metabolism and retard protein synthesis.

Key words: chlorogenic acid; *Staphylococcus aureus*; antibacterial mechanism

