



## 和厚朴酚抑制耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物被膜形成

乔瑞红, 谢鲲鹏, 谢明杰\*

辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁省生物技术与分子药物研发重点实验室, 辽宁 大连 116081

**摘要:** 【目的】研究和厚朴酚(HNK)抑制MRSA生物被膜(BF)形成的作用机制。【方法】使用TTC法测定了HNK对供试菌株BF的形成和成熟BF的抑制作用; 刚果红平板法定性检测了HNK对PIA合成的影响; 分光光度法测定了HNK对供试菌株eDNA释放量的影响; RT-PCR技术检测了HNK对供试菌株*icaA*、*cidA*以及*agrA*基因表达量的影响。【结果】HNK对MRSA 41573 BF的形成和成熟BF均有较强的抑制作用, 其中, HNK抑制MRSA 41573 BF形成的MIC和MBC分别为10  $\mu\text{g/mL}$ 和20  $\mu\text{g/mL}$ ; 抑制成熟BF的MIC和MBC分别为50  $\mu\text{g/mL}$ 和100  $\mu\text{g/mL}$ 。当用亚抑菌浓度的HNK与万古霉素联合作用后, 可显著提高成熟BF对万古霉素的敏感性。HNK能显著抑制PIA的合成, 且呈浓度剂量依赖。HNK能抑制供试菌株eDNA的释放量, 其中1/8 MIC的HNK作用供试菌株16 h后, 与对照组相比, eDNA的释放量降低了28.3%。HNK可抑制供试菌株BF形成的相关基因, 其中1/2 MIC的HNK作用供试菌株16 h后, 与对照相比, *icaA*的表达量降低了59.1%, *cidA*的表达量降低了56%, *agrA*的表达量降低了72.3%。【结论】HNK能显著抑制MRSA 41573 BF的形成, 其作用机制主要是通过抑制*icaA*和*cidA*基因表达量, 影响PIA和eDNA的合成, 进而抑制BF的形成。此外HNK也可通过调控细菌的QS系统影响BF的形成。

**关键词:** 生物被膜, MRSA41573, 和厚朴酚, 生物被膜相关基因

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)是一种重要的人和畜禽共患病病原菌, 易于在感染部位形成生物被膜。细菌生物被膜(Bacterial biofilm, BF)的形成使得细菌能够抵抗多种不同的抗菌药物, 逃避宿主免疫系统的杀伤且难以被清除, 是临床慢性感染疾病反复发作和难以治疗的主要原因<sup>[1]</sup>。因此, 寻找控制和治疗BF感染的药物成为当前研究的热点。和厚朴酚(HNK)是我国传统中

药厚朴的主要化学成分之一, 具有多种药理作用, 如抗肿瘤、抗菌、抗炎等<sup>[2]</sup>。近年来的研究显示, HNK对病原菌的BF也有显著的抑制作用, 但目前关于HNK对BF的抑制作用机制尚缺乏系统的研究, 因此本文以MRSA 41573为供试菌株, 系统研究HNK对其BF的抑制作用机制, 旨在为其开发成BF抑制剂提供一定的理论依据。

基金项目: 辽宁省教育厅科学研究项目(L2013412)

\*通信作者。E-mail: xmj1222@sina.com

收稿日期: 2015-10-27; 修回日期: 2015-12-17; 网络出版日期: 2016-01-12

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验菌株:** MRSA 41573, 由大连市中心医院提供。

**1.1.2 培养基:** LB液体培养基(含5%的葡萄糖), 刚果红固体培养基。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 和厚朴酚标准品(HNK), 纯度分析 $\geq 98\%$ , 购于成都曼斯特生物科技有限公司; 万古霉素购于上海生工生物工程有限公司; PCR反应液, DNA Marker DL2000均购置于大连宝生物公司; IECCL31R Multispeed型超速冷冻离心机: Thermo公司; TC512型PCR仪: 英国TECHNE公司; 实时定量PCR仪Stralagene Mx3005P: TaKaRa TP800。

### 1.2 HNK抑制MRSA 41573 BF形成的MIC和MBC的测定

在96孔板中, 分别加入100  $\mu\text{L}$ 培养至对数期的MRSA 41573菌悬液( $10^6$  CFU/mL), 然后分别加入10  $\mu\text{L}$ 不同浓度的HNK, 使其终浓度分别为2.5、5、10、20和40  $\mu\text{g/mL}$ ,  $37^\circ\text{C}$ 下培养, 以不加药的培养基作为对照。培养24 h后, 每孔分别加入20  $\mu\text{L}$  0.2%氯代三苯基四氮唑(TTC), 继续避光培养4 h。以没有红色还原物甲瓞产生的最低浓度作为MIC, 然后从各孔中吸取10  $\mu\text{L}$ 菌悬液涂布于含葡萄糖的LB固体培养基,  $37^\circ\text{C}$ 培养24 h后, 以没有菌落生长的最低浓度作为HNK抑制MRSA 41573 BF形成的MBC。试验重复3次, 取平均值。

### 1.3 HNK对MRSA 41573成熟BF MIC及MBC的测定

将培养3 d的成熟BF用PBS洗3次后, 加入不同浓度的HNK, 使其终浓度分别为0、5、10、20、30、40、50、80和100  $\mu\text{g/mL}$ ,  $37^\circ\text{C}$ 静置培养24 h后, 按照1.2.1的方法测定HNK对MRSA 41573成熟BF的MIC及MBC。

### 1.4 HNK与万古霉素的协同作用对MRSA 41573成熟BF的影响<sup>[3]</sup>

将在96孔板中培养3 d的成熟BF用PBS洗3次后, 在各孔中加入等量的万古霉素和HNK, 使万古霉素的终浓度分别为2、4、8、16、32和64  $\mu\text{g/mL}$ , HNK的终浓度分别为0、6.25、12.50和25.00  $\mu\text{g/mL}$ ,  $37^\circ\text{C}$ 静置培养24 h后, TTC法测定2种药物的协同作用, 试验重复3次。

### 1.5 HNK对MRSA 41573 细胞间多糖黏附素(Polysaccharide intercellular adhesion, PIA)合成的影响<sup>[4]</sup>

将MRSA 41573菌悬液接种到含有不同浓度HNK的刚果红平板上, 使得HNK的浓度分别为1.25、2.50、5.00和10.00  $\mu\text{g/mL}$ , 以不含药平板作为阳性对照。其中菌落的颜色呈黑色的为PIA阳性菌株, 菌落呈红色的为PIA阴性菌株。

### 1.6 HNK对MRSA 41573 eDNA分泌的影响

将含终浓度分别为0、1.25、2.50和5.00  $\mu\text{g/mL}$ 的HNK的菌液加入96孔板,  $37^\circ\text{C}$ 静置培养16 h, 按Rice等<sup>[5]</sup>的方法提取eDNA, 用分光光度计检测eDNA的浓度, eDNA的表达水平用eDNA含量 $\mu\text{g}/\text{OD}_{595}$ 表示。试验重复5次。

### 1.7 MRSA 41573 *icaA*、*cidA*及*agrA*基因的检测

采用Oligo 6.0和Primers 5.0软件设计BF相关基因*icaA*、*cidA*及*agrA*的上下游引物(表1), 琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物。

表1. PCR引物

Table 1. Primer sequences used for PCR amplification

Primer name	Primer sequences (5'→3')	Size/bp
<i>icaA</i> -F	GAAACATTGGGAGGTCTT	468
<i>icaA</i> -R	GGTATCCCTCTGTCTGG	
<i>cidA</i> -F	GATTTTTCATCTTCCCTTAGCCG	300
<i>cidA</i> -R	GCGTCTACACCTTACGATGTTTAT	
<i>agrA</i> -F	TTCATTGCGAAGACGATCC	224
<i>agrA</i> -R	TGCTTACGAATTTCCTGCC	

1.8 HNK对MRSA 41573 *icaA*、*cidA*及*agrA*表达量的影响

将培养至对数期的MRSA 41573 接种到含终浓度分别为0、1.25、2.50和5.00  $\mu\text{g/mL}$  HNK的培养基中，37  $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min培养16 h后，取6 mL MRSA 41573菌悬液，采用Trizol法提取总RNA，用紫外分光光度计进行RNA的定量，然后采用两步法反转合成cDNA，用SYBR Premix ExTaq<sup>TM</sup>染料和Thermal Cycler Dice Real Time System扩增仪进行扩增，以16S rRNA为内参基因。待反应结束后分析RT-PCR的扩增曲线和融解曲线，并计算*icaA*、*cidA*及*agrA*基因的相对表达量。

1.9 数据分析

实验结果通过SPSS系统软件进行方差分析。

2 结果和分析

2.1 HNK抑制MRSA 41573 BF形成和成熟BF的MIC和MBC

实验结果显示，HNK对MRSA 41573 BF的形成及成熟BF均有较强的抑制作用，其中HNK对MRSA 41573 BF形成的MIC和MBC分别为10  $\mu\text{g/mL}$ 和20  $\mu\text{g/mL}$  (表2)。对成熟BF的MIC和MBC分别为50  $\mu\text{g/mL}$ 和100  $\mu\text{g/mL}$  (表3)。

表2. HNK抑制MRSA 41573 BF形成的MIC和MBC  
Table 2. The MIC and MBC of HNK against MRSA 41573 biofilm formation

<i>c</i> (HNK)/( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC	MBC
control	+	+
2.5	+	+
5.0	+	+
10.0	–	+
20.0	–	–
40.0	–	–

–: no bacterial growth; +: have bacterial growth.

表3. HNK抑制MRSA 41573成熟BF的MIC和MBC  
Table 3. The MIC and MBC of HNK against MRSA 41573 mature biofilm

<i>c</i> (HNK)/( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC	MBC
control	+	+
5	+	+
10	+	+
20	+	+
40	+	+
50	–	+
80	–	+
100	–	–

–: no bacterial growth; +: have bacterial growth.

2.2 HNK与万古霉素的协同作用对MRSA 41573成熟BF的抑制结果

实验结果显示，当万古霉素的浓度 $\leq 64 \mu\text{g/mL}$ 时，对供试菌株成熟的BF没有破坏作用，但与亚抑菌浓度的HNK联合作用后，成熟BF对万古霉素的敏感性显著提高(表4)。其中25  $\mu\text{g/mL}$ 的HNK与4  $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素联用时，即可对供试菌株成熟的BF有抑制作用。

表4. HNK与万古霉素的协同作用  
Table 4. The synergy of vancomycin combination with HNK

<i>c</i> (HNK)/( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>c</i> (vancomycin)/( $\mu\text{g/mL}$ )					
	2	4	8	16	32	64
0	+	+	+	+	+	+
6.25	+	+	+	+	+	+
12.50	+	+	+	–	–	–
25.00	+	–	–	–	–	–

–: no bacterial growth; +: have bacterial growth.

2.3 HNK对MRSA 41573 PIA合成的影响

刚果红平板鉴定结果显示，随着HNK浓度的增加，PIA的合成量逐渐减少，说明HNK能够抑制MRSA 41573 BF中PIA的合成(图1)。

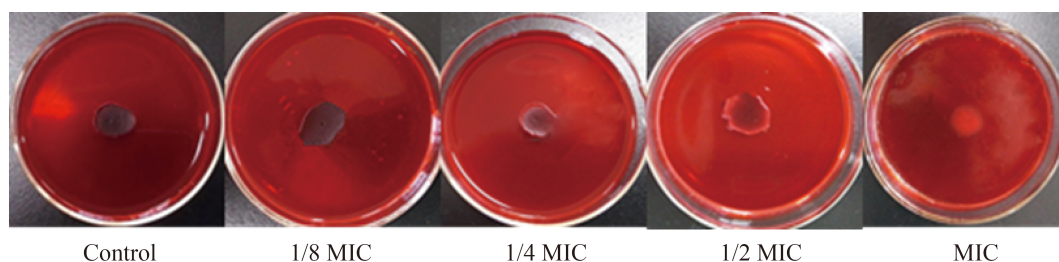


图 1. HNK对MRSA 41573 BF中PIA的影响

Figure 1. Effect of MRSA 41573 PIA expression by HNK.

## 2.4 HNK对MRSA 41573 eDNA分泌的影响

实验结果显示, 低浓度的HNK即可抑制供试菌株的eDNA的释放量, 如1/8 MIC的HNK作用供试菌株16 h后, 与对照组相比, eDNA的释放量降低了28.3% ( $P<0.01$ ), 但增加HNK的浓度, eDNA的变化不明显(图2)。

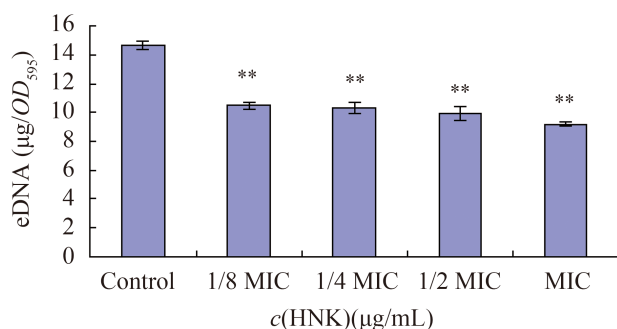


图 2. HNK对MRSA 41573生物被膜中eDNA分泌的影响

Figure 2. Effect of MRSA 41573 eDNA release by HNK. \*\*:  $P<0.01$ .

## 2.5 MRSA 41573 *icaA*、*cidA*和*agrA*的基因检测结果

MRSA 41573的*icaA*、*cidA*、*agrA*基因检测结果显示, 在供试菌株中存在与BF形成相关的*icaA*、*cidA*和*agrA*基因(图3)。

RT-PCR结果显示, HNK可显著降低供试菌株的*icaA*、*cidA*和*agrA*的相对表达量(图4)。其中1/2 MIC的HNK作用MRSA 41573 16 h后, 与对照组相比, *icaA*的表达量降低了59.1% ( $P<0.01$ ); *cidA*的表达量降低了56% ( $P<0.01$ ); *agrA*的表达量降低了72.3% ( $P<0.01$ )。

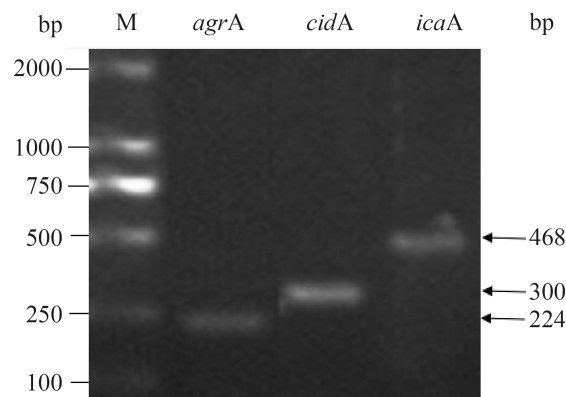


图 3. MRSA 41573生物被膜相关基因PCR扩增结果

Figure 3. Gene detection of biofilm-related in MRSA 41573 strain.

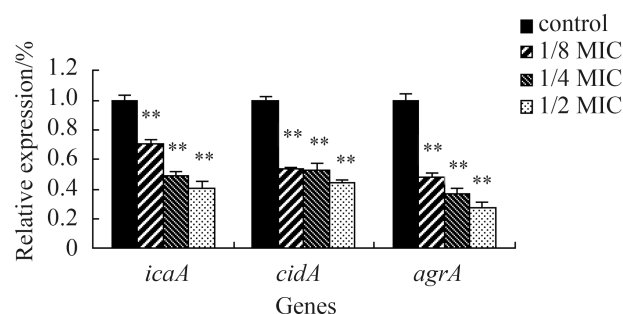


图 4. HNK对MRSA 41573生物被膜相关基因表达的影响

Figure 4. Expression of biofilm-related genes in MRSA 41573 in response to HNK. \*\*:  $P<0.01$ .

## 3 讨论

BF是引起细菌持续性感染的常见致病机制, 临床分离的多重耐药金黄色葡萄球菌形成BF的概率极高<sup>[6]</sup>, BF一旦形成, 其对抗生素和消毒剂的抵抗能力要比浮游菌显著增强, 是临床上亟待解

决的难题,因此获得能抑制或破坏BF的药物是解决临床慢性感染的方法之一。Sun等<sup>[7]</sup>的研究结果显示,HNK能降低白色念珠菌的黏附,抑制其由酵母型向菌丝型转变来抑制BF的形成。Kim等<sup>[8]</sup>认为HNK对霍乱弧菌的BF也有抑制作用。本文的研究结果表明,HNK对MRSA 41573 BF的形成和成熟BF均有较强的抑制作用,当与万古霉素联合应用时,其对BF的抑制作用效果更为显著。目前万古霉素被认为是治疗MRSA的“最后防线”,但其对已经形成BF的MRSA的抑制效果不明显<sup>[9]</sup>,本研究的实验结果也显示,当万古霉素的浓度 $\leq 64 \mu\text{g/mL}$ 时,其对MRSA 41573 成熟BF没有破坏和杀灭作用,但当HNK和万古霉素联合应用时,4  $\mu\text{g/mL}$ 的万古霉素即可对供试菌株起到杀菌作用。究其原因可能与HNK破坏BF的结构,促进万古霉素渗透到BF内完成其杀菌作用有关。

BF的形成过程十分复杂,是多种因素综合作用的结果,涉及定殖、黏附、聚集、成熟和播散5个阶段的相关基因的调控,其中PIA在BF形成的黏附和聚集阶段发挥重要作用,其表达与*ica*操纵子的调控有关<sup>[10]</sup>。本文的研究结果显示,HNK能够抑制MRSA 41573 PIA的合成,且呈浓度剂量依赖。RT-PCR检测HNK对供试菌株*icaA*的表达量影响趋势与PIA结果一致,当1/2 MIC的HNK作用MRSA 41573 16 h后,与对照组相比,*icaA*的表达量降低了59.1% ( $P<0.01$ ),表明HNK可通过降低*icaA*的表达抑制MRSA 41573 PIA的合成。eDNA也是BF的主要成分,在BF的初始黏附阶段起作用,在成熟BF中可维持和稳定BF的结构<sup>[11]</sup>。其中*cid*、*lrg*和*atl*操纵子参与调控eDNA的释放<sup>[12-13]</sup>。本文的研究结果显示,HNK可抑制供试菌株eDNA的释放量,RT-PCR结果显示,当1/8 MIC的HNK作用MRSA 41573 16 h后,与对照组相比,*cidA*

的表达量降低了47% ( $P<0.01$ ),由此推测HNK抑制MRSA 41573 eDNA的合成与*cidA*有关。

目前的研究认为,密度信号感应(Quorum sensing, QS)系统与BF的形成、毒力因子释放和细菌耐药有关。*agr*是葡萄球菌重要的QS系统成分之一,Coelho等<sup>[14]</sup>发现,*agr*在BF形成能力强的MRSA和MSSA菌株中正调控BF的形成,在BF形成能力弱的MRSA和MSSA菌株中负调控BF的形成。本研究的RT-PCR结果显示,HNK能显著抑制*agrA*的表达量,且呈浓度剂量依赖,其中1/2 MIC的HNK作用供试菌株16 h后,与对照组相比,*agrA*的表达量降低了72.3% ( $P<0.01$ ),该结果与Coelho的结论一致。

综上所述,HNK能显著的抑制MRSA 41573 BF的形成,其作用机制主要是通过抑制*icaA*和*cidA*的基因表达量,进而影响PIA、eDNA等的合成,来抑制BF的形成。此外HNK也可通过调控细菌的QS系统的*agrA*的表达量来影响BF的形成。关于HNK抑制BF的形成与其他因素的关系,还有待于今后的进一步研究。

## 参考文献

- [1] Wang XH, Yu L, Zhou L, Xiong LZ, Shi QY, Song XP. Effects of totarol on *cidA* expression and biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2013, 35(5): 359–363. (in Chinese)  
王晓红, 于录, 周渤, 熊凌铤, 史祺云, 宋晓平. 桃柞酚对金黄色葡萄球菌生物膜形成及*cidA*表达的影响. *中国预防兽医学报*, 2013, 35(5): 359–363.
- [2] Lin L, Ding Y. Recent pharmacological development and advances of honokiol. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2011, 27(1): 110–113. (in Chinese)  
林琳, 丁一. 和厚朴酚最新药理学研究进展与评述. *中药药理与临床*, 2011, 27(1): 110–113.

- [3] Zou D, Xie KP, Wang HT, Chen YX, Xie MJ. Inhibitory effects of biochanin A on the efflux pump of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(10): 1204–1211. (in Chinese)  
邹丹, 谢鲲鹏, 王海婷, 陈禹先, 谢明杰. 鹰嘴豆芽素A对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌外排系统的抑制作用. *微生物学报*, 2014, 54(10): 1204–1211.
- [4] Guan Y, Zhang JY, Wang CZ, Wang N, Liu ZF, Shi JJ. Preliminary study of effects of andrographolide on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2012, 37(14): 2147–2150. (in Chinese)  
官妍, 章九云, 汪长中, 王宁, 刘志芳, 石晶金. 穿心莲内酯对表皮葡萄球菌生物被膜作用初探. *中国中药杂志*, 2012, 37(14): 2147–2150.
- [5] Rice KC, Mann EE, Endres JL, Weiss EC, Cassat JE, Smeltzer MS, Bayles KW. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(19): 8113–8118.
- [6] Kwon AS, Park GC, Ryu SY, Lim DH, Lim DY, Choi CH, Park Y, Lim Y. Higher biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2008, 32(1): 68–72.
- [7] Sun LM, Liao K, Wang DY. Effects of magnolol and honokiol on adhesion, yeast-hyphal transition, and formation of biofilm by *Candida albicans*. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0117695.
- [8] Kim HI, Kim JA, Choi EJ, Harris JB, Jeong SY, Son SJ, Kim Y, Shin OS. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial efficacy of natural plant-derived compounds against *Vibrio cholerae* of O1 El Tor Inaba serotype. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2015, 79(3): 475–483.
- [9] Rose WE, Poppens PT. Impact of biofilm on the *in vitro* activity of vancomycin alone and in combination with tigecycline and rifampicin against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2009, 63(3): 485–488.
- [10] Cue D, Lei MG, Lee CY. Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in *Staphylococci*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2012, 2: 38.
- [11] Das T, Sehar S, Koop L, Wong YK, Ahmed S, Siddiqui KS, Manefield M. Influence of calcium in extracellular DNA mediated bacterial aggregation and biofilm formation. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91935.
- [12] Rice KC, Bayles KW. Molecular control of bacterial death and lysis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2008, 72(1): 85–109.
- [13] Büttner H, Mack D, Rohde H. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2015, 5: 14.
- [14] Coelho LR, Souza RR, Ferreira FA, Guimarães MA, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AMS. *agr* RNA III divergently regulates glucose-induced biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, 2008, 154(11): 3480–3490.

# Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm by honokiol

Ruihong Qiao, Kunpeng Xie, Mingjie Xie\*

Key Laboratory of Biotechnology and Drug of Liaoning Province, College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116081, Liaoning Province, China

**Abstract:** [Objective] To study the inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilm by honokiol. [Methods] We used triphenyl tetrazolium chloride method to evaluate the inhibition of biofilm formation and mature by honokiol. We used congo red agar and spectrophotometer to detect the influence of honokiol on polysaccharide intercellular adhesion formation and extracellular DNA release. RT-PCR analysis was used to determine the effect of honokiol on expression of *icaA*, *cidA* and *agrA*. [Results] Honokiol showed strong antimicrobial activity both on biofilm formation and mature biofilm of MRSA 41573. Minimum inhibitory concentration was 10 µg/mL for biofilm formation and 50 µg/mL for mature biofilm. Minimum bactericidal concentration was 20 µg/mL for biofilm formation and 100 µg/mL for mature biofilm. Honokiol showed synergy effect with vancomycin and it significantly increased the sensitivity of mature biofilm to vancomycin. Polysaccharide intercellular adhesion formation and extracellular DNA release were effectively inhibited by honokiol. Extracellular DNA release decreased by 28.3% when honokiol at 1/8 MIC. After incubated with 1/2 MIC of honokiol for 16 h, the relative expression of *icaA*, *cidA* and *agrA* of MRSA41573 was reduced by 59.1%, 56% and 72.3%, respectively. [Conclusion] Honokiol can significantly inhibit biofilm formation of MRSA41573 and its mechanism is mainly the inhibited expression of *icaA* and *cidA* to influence the synthesis of polysaccharide intercellular adhesion and extracellular DNA. Moreover, it also affect biofilm formation by QS system.

**Keywords:** biofilm, MRSA41573, honokiol, biofilm-related genes

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Liaoning Provincial Department of Education Science Generral Project (L2013412)

\*Corresponding author. E-mail: xmj1222@sina.com

Received: 27 October 2015; Revised: 17 December 2015; Published online: 12 January 2016