



## 紫草素与依布硒啉对金黄色葡萄球菌的协同作用

谭超<sup>1,2,3#</sup>, 周靖轩<sup>1,2,3#</sup>, 卢倩倩<sup>1,2,3</sup>, 刘彬彬<sup>1,2,3</sup>, 蔡轶<sup>1,2,3</sup>, 王君<sup>2,3</sup>, 邹黎黎<sup>1,2,3\*</sup>

1 三峡大学第一临床医学院, 湖北 宜昌 443000

2 肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室(三峡大学), 湖北 宜昌 443002

3 三峡大学感染与炎症损伤研究所, 湖北 宜昌 443002

谭超, 周靖轩, 卢倩倩, 刘彬彬, 蔡轶, 王君, 邹黎黎. 紫草素与依布硒啉对金黄色葡萄球菌的协同作用. 微生物学报, 2022, 62(3): 1049–1060.

Tan Chao, Zhou Jingxuan, Lu Qianqian, Liu Binbin, Cai Yi, Wang Jun, Zou Lili. The synergistic effect of shikonin and ebselen against *Staphylococcus aureus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(3): 1049–1060.

**摘要:**【目的】探讨紫草素(shikonin, SKN)协同依布硒啉(ebselen, EbSe)抗金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)的作用及机制。【方法】分光光度法测定紫草素-依布硒啉抗金黄色葡萄球菌活性; 碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色检测紫草素-依布硒啉杀菌效果; 透射电子显微镜观察紫草素-依布硒啉对金黄色葡萄球菌细胞形态的影响。通过荧光探针二氯荧光素二乙酸酯(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, H<sub>2</sub>DCFDA)检测紫草素-依布硒啉上调细菌胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)产量的能力; 利用 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) [5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB]实验检测紫草素-依布硒啉对硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase, TrxR)活性的影响。通过加入还原剂二硫苏糖醇(DL-dithiothreitol, DTT)清除 ROS 进行挽救实验, 复测相关指标, 对上述结果进行验证。收集临床多重耐药金黄色葡萄球菌(multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*, MDRS), 通过分光光度法测定紫草素-依布硒啉对 MDRS 的抑菌活性。【结果】依布硒啉与紫草素均对金黄色葡萄球菌有抗菌活性, 且 10 μmol/L 依布硒啉与 5 μmol/L 紫草素可发挥显著的协同抑

**基金项目:** 国家自然科学基金(81903105); 宜昌市医疗卫生科研项目(A19-301-15, A19-301-50); 天然产物研究与利用湖北省重点实验室(三峡大学)开放课题(NPRD-2018009); 三峡大学学位论文培优基金(2020SSPY103)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81903105), by the Yichang Medical Treatment and Public Health Foundation (A19-301-15, A19-301-50), by the Project of Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development, China Three Gorges University (NPRD-2018009) and by the Research Fund for Excellent Dissertation of China Three Gorges University (2020SSPY103)

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. Tel: +86-717-6397438; E-mail: zoulili@ctgu.edu.cn

Received: 4 July 2021; Revised: 8 August 2021; Published online: 14 September 2021

菌活性( $P<0.0001$ )。紫草素-依布硒啉可协同抑制 TrxR 活性( $P<0.01$ )，同时显著上调金黄色葡萄球菌胞内 ROS 产量( $P<0.001$ )。通过回补实验发现，DTT 可挽救紫草素-依布硒啉对金黄色葡萄球菌的损伤。紫草素-依布硒啉对 MDRS 有明显的抑菌活性( $P<0.0001$ )。【结论】紫草素-依布硒啉可通过协同靶向 TrxR，诱导细菌胞内产生大量 ROS，介导金黄色葡萄球菌死亡。

**关键词：**金黄色葡萄球菌；依布硒啉；紫草素；硫氧还蛋白还原酶；活性氧

## The synergistic effect of shikonin and ebselen against *Staphylococcus aureus*

TAN Chao<sup>1,2,3#</sup>, ZHOU Jingxuan<sup>1,2,3#</sup>, LU Qianqian<sup>1,2,3</sup>, LIU Binbin<sup>1,2,3</sup>, CAI Yi<sup>1,2,3</sup>, WANG Jun<sup>2,3</sup>, ZOU Lili<sup>1,2,3\*</sup>

1 The First College of Clinical Medical Science, China Three Gorges University, Yichang 443000, Hubei, China

2 Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China

3 Institute of Infection and Inflammation, Medical College, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China

**Abstract:** [Objective] To explore the synergistical effect and mechanism of the shikonin and ebselen against *S. aureus*. [Methods] We used spectrophotometry assay to determine the antibacterial effect of shikonin-ebselen on *S. aureus*, propidium iodide (PI) staining to detect the bactericidal effect of shikonin-ebselen, and the transmission electron microscope to observe the *S. aureus* morphological changes after the shikonin-ebselen treatment. We used the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA) staining to detect the effect of shikonin-ebselen on bacterial ROS production, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) to detect the effect of shikonin-ebselen on the thioredoxin reductase (TrxR) activity. Reactive oxygen species (ROS) was eliminated by adding ROS scavenger DL-dithiothreitol (DTT), and we further detected the relevant indicators. We isolated the multidrug resistant *Staphylococcus aureus* (MDRS) strains, and the antibacterial effects of shikonin-ebselen against MDRS were determined by spectrophotometry. [Results] We found shikonin and ebselen both have inhibitory effects on *S. aureus*, and 5 μmol/L shikonin and 10 μmol/L ebselen could work synergistically against bacteria ( $P<0.0001$ ). Shikonin-ebselen can significantly inhibit the activity of TrxR ( $P<0.01$ ). Meanwhile, shikonin-ebselen can significantly induce the production of ROS in *S. aureus* ( $P<0.01$ ). DTT can rescue the *S. aureus* from the shikonin-ebselen treatment. In addition, shikonin-ebselen also has a significant antibacterial effect on MDRS ( $P<0.0001$ ). [Conclusion] Shikonin-ebselen can execute antibacterial effect on *S. aureus* through inducing the production of a large amount of ROS by co-targeting the TrxR.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*; ebselen; shikonin; thioredoxin reductase; reactive oxygen species

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)作为最常见的革兰氏阳性菌，存在于约 30%的人群中，与临床上皮疹、伤口感染、

胸膜炎、肺炎、菌血症、感染性心内膜炎以及器械相关感染有关<sup>[1-2]</sup>。青霉素的问世，使金黄色葡萄球菌感染后的死亡率从 80%降低至

15%–50%<sup>[3]</sup>。然而, 由于抗生素的广泛使用甚至滥用, 金黄色葡萄球菌通过适应性进化获得了抗生素抗性<sup>[4–5]</sup>。如今耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)、耐万古霉素金黄色葡萄球菌(vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*, VRSA)所致的感染占医院感染的 60%–89%。在美国, 每年细菌感染相关医疗保健费用超过 30 亿美元, 增加了生命健康的经济负担<sup>[6–8]</sup>。目前, 临床上使用的大部分抗生素的作用机制主要是影响细菌细胞壁的合成、细胞膜的通透性、蛋白质的合成及 DNA 的复制与转录<sup>[9–11]</sup>。且绝大多数一线现役的抗生素发现于 20 世纪 80 年代之前, 服役时间长, 已无法满足日益严重的临床感染疾病治疗现状。因此, 发现高效安全且不易耐药的新型药物, 甚至寻找新的抗金黄色葡萄球菌作用靶点, 已成为当今公共卫生领域亟待解决的难题之一。

瑞典卡罗林斯卡医学院 Arne Holmgren 教授于 2013 年研究发现, 硫醇氧化还原系统(thiol-dependent redox system, TDRS)是全新的抗菌药物作用靶点。他们的结果证实, 在 TDRS 中, 当电子在从 NADPH 逐级传递至相应蛋白底物的过程受阻时, 细菌胞内会形成高氧化应激态, 从而导致细菌死亡<sup>[12]</sup>。与此同时, Holmgren 教授筛选出了可靶向作用于细菌硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase, TrxR)的有机硒化合物-依布硒啉(ebselen, EbSe), 并证实依布硒啉可竞争性抑制细菌 TrxR, 与不含硒元素的 TrxR 形成难还原的硒硫键, 从而阻断电子的传递, 导致细胞内高氧化应激, 介导细菌死亡<sup>[12]</sup>; 而在哺乳动物中, 依布硒啉则是 TrxR 的底物<sup>[12]</sup>。同时临床试验证实, 依布硒啉表现出良好的人体耐受性及生物安全性<sup>[13]</sup>。

紫草素(shikonin, SKN)是中药紫草的有效

活性成分, 已在中药领域应用了几个世纪。因其被发现具有抗炎、抗血栓形成、抗病毒、抗肿瘤的作用<sup>[14–16]</sup>, 现又成为了新的研究热点。新近研究发现, 紫草素还具有抗菌活性, 可作为抗 MRSA 和耐万古霉素肠球菌的潜在候选抗菌成分, 其衍生物也具有抗金黄色葡萄球菌与大肠杆菌的活性<sup>[17]</sup>。Li 等<sup>[18]</sup>发现, 紫草素可通过诱导大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生来促使耐吉非替尼的非小细胞型肺癌细胞的凋亡, 同时也证实了哺乳动物细胞 Trx 系统是紫草素的直接靶标。不仅如此, 紫草素也可抑制 TrxR1 诱导人早幼粒细胞白血病 HL-60 细胞中 ROS 介导的凋亡<sup>[19]</sup>。但是在原核细胞中, 其杀菌机制是否与其靶向 TrxR 有关以及是否可与依布硒啉联用发挥协同抗菌活性尚未见报道。因此本文以金黄色葡萄球菌为研究对象探究紫草素和依布硒啉的抗菌作用及机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

金黄色葡萄球菌 ATCC-25923, 多重耐药金黄色葡萄球菌(multidrug-resistant *S. aureus*, MDRS) 1074029, 0883453, 1072763, 由三峡大学第一临床医院检验科提供。

### 1.2 仪器和设备

恒温气浴摇床(中国 TS-100C); 全波长酶标仪(美国 Thermo Scientific Multiskan Spectrum); 移液器(德国 Eppendorf); 高速离心机(德国 Eppendorf 5810R); 分析型流式细胞仪(美国 BECKMAN COUTER AW15093); 超净工作台(中国苏净安泰 SW-CJ-2FD); 超声波细胞破碎仪(中国宁波新芝); 离心管(美国 Corning); 细胞培养板(美国 Corning)。

### 1.3 药品和试剂

依布硒啉(美国 Target Molecule Corp); 紫

草素(美国 Selleck); 硫氧还蛋白与硫氧还蛋白还原酶(瑞典 IMOC); 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(美国 Sigma-Aldrich); BCA 蛋白定量试剂盒(中国普利莱 C1053); NADPH(美国 Sigma-Aldrich)。

#### 1.4 培养金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 及 MDRS

三峡大学第一临床医院检验科提供的金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 及 3 株 MDRS 固体培养基平板。挑选单个菌落置于装有 5 mL LB 液体培养基的摇菌管中, 于恒温气浴培养振荡箱 37 °C、180 r/min, 培养 8 h 至对数生长期。

#### 1.5 检测紫草素-依布硒啉作用于金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 的有效抑菌浓度

将培养至对数生长期的菌液用 LB 液体培养基调节其  $OD_{600}$  为 0.4, 按照 1:1 000 的比例稀释, 混匀后用浓度梯度的依布硒啉、紫草素、紫草素-依布硒啉处理。再次混匀后接种于 96 孔板, 每孔 200  $\mu$ L。将 96 孔板放置于 37 °C 恒温气浴培养箱, 培养细菌。于不同时间点在酶标仪上测定  $OD_{600}$  (每次测定前混匀 96 孔板)。

#### 1.6 计算紫草素-依布硒啉对金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 生长抑制的协同指数

使用 Bliss 独立模型确定药物协同作用, 使用公式(1)计算协同指数<sup>[20]</sup>。

$$S=(F_x/F_0)(F_y/F_0)-(F_{xy}/F_0)。 \quad \text{公式(1)}$$

$F_{xy}$ : 在联用药物时细菌的生长速率, 其中一种药物为  $x$ , 另一种药物为  $y$ ;  $F_x$ ,  $F_y$ : 分别指在  $x$  和  $y$  的药物存在时细菌的生长速率;  $F_0$ : 没用药物处理时细菌的生长速率;  $S$ : 协同作用指数, 该参数确定于正值的相互协同作用和负值的相互拮抗作用。通过计算生长或抑制曲线的斜率来确定不同时间点的生长速率。

#### 1.7 观察紫草素-依布硒啉对金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 细胞形态的影响

将培养至对数生长期的菌液用 LB 液体培

养基调节其  $OD_{600}$  为 0.4, 用浓度梯度的依布硒啉、紫草素、紫草素-依布硒啉分别处理 10 min。于 4 °C、8 000 r/min 离心 5 min 获得细胞, 弃去上清液后用 PBS 重悬清洗, 去除胞外的残留药物以及 LB 培养基, 清洗后再次离心获得细胞继续清洗, 重复清洗 3 遍后去除上清液用 PBS 重悬细胞, 并用 2.5%戊二醛固定。于透射电子显微镜下观察金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 的形态和结构在给药前后以及联合处理后的变化。

#### 1.8 检测紫草素-依布硒啉作用于金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 的抗生素后效应

将培养至对数生长期的菌液用 LB 液体培养基调节其  $OD_{600}$  为 0.4, 按照 1:1 000 的比例稀释, 混匀后用浓度梯度的依布硒啉、紫草素、以及紫草素-依布硒啉联合处理, 再次混匀后接种于 96 孔板, 每孔 200  $\mu$ L。将 96 孔板放置于 37 °C 恒温气浴培养箱, 培养细菌, 于不同时间点在酶标仪上测定  $OD_{600}$ 。培养 24 h 后将 96 孔板里的细菌培养液吸取至 1.5 mL EP 管, 于离心机上 4 °C、8 000 r/min 离心 5 min 收集细菌后去掉上清液, 用 PBS 清洗 3 遍后重新用 LB 液体培养基重悬, 混匀后复种于 96 孔板, 将其置于 37 °C 恒温气浴培养箱培养, 于 0、2、4、6 h 时间点在酶标仪上测定  $OD_{600}$ 。

#### 1.9 检测紫草素-依布硒啉对金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 TDRS 活性的影响

将培养至对数生长期的菌液用 LB 液体培养基调节其  $OD_{600}$  为 0.4, 用依布硒啉、紫草素、紫草素-依布硒啉分别处理 20 min。离心收细胞, 用 PBS 清洗 3 遍, 用 200  $\mu$ L 50 mmol/L Tris-HCl 和 2 mmol/L EDTA (pH 7.5)重悬细菌。于超声细胞破碎仪里冰上裂解细菌, 2 mm 变幅杆, 25%功率, 超声破碎 2 s, 间隔 4 s 的频率超声 5 min 至菌液澄清透明; 于离心机中 4 °C、

12 000 r/min 离心 30 min, 吸取上清液至新的 EP 管中。取上述蛋白上清液 10  $\mu$ L 做 10 倍稀释作为待测液用于蛋白浓度定量。取标准 BSA 蛋白样品倍比稀释为 1、0.5、0.25、0.125、0.062 5 和 0 mg/mL。在 96 孔板中每孔分别加入 25  $\mu$ L 不同浓度的标准 BSA 蛋白样品及待测样品, 200  $\mu$ L BCA 工作液, 振荡混匀, 于恒温气浴培养箱 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 冷却至室温后于酶标仪上测定  $OD_{562}$ , 制作标准曲线, 依据标准曲线计算待测样品的蛋白浓度。

每组取 25  $\mu$ g 蛋白上清液, 用去离子水定容至 20  $\mu$ L, 在 50 mmol/L Tris-HCl 和 2 mmol/L EDTA (pH 7.5) 体系中, 于 90  $\mu$ L 200  $\mu$ mol/L NADPH、5  $\mu$ mol/L Trx, 90  $\mu$ L 1 mmol/L DTNB 混合反应, 于酶标仪上测定前 10 min  $OD_{412}$ , 前 10 min 的斜率表示 TrxR 活性。用同样的方法将 5  $\mu$ mol/L Trx 换成 100 nmol/L TrxR 来测定 Trx。

### 1.10 检测紫草素-依布硒啉作用后金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 胞内 ROS 产量

将培养至对数生长期的菌液用 LB 液体培养基调节其  $OD_{600}$  为 0.4, 用依布硒啉、紫草素、紫草素-依布硒啉分别处理 20 min。离心收细胞, 用 PBS 清洗 3 遍, 最后重悬于 800  $\mu$ L PBS 中, 并用终浓度为 10 mmol/L  $H_2DCFDA$  37  $^{\circ}$ C 染色 30 min, 用流式细胞仪检测并记录 FITC 通道的平均荧光强度。

### 1.11 检测 DTT 对被紫草素-依布硒啉处理后的金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 的挽救作用

将培养至对数生长期的菌液用 LB 液体培养基调节其  $OD_{600}$  为 0.4, 按照 1:1 000 的比例稀释, 然后加入 4 mmol/L 的 DTT<sup>[21]</sup>, 混匀后再用依布硒啉、紫草素、紫草素-依布硒啉分别处理, 接种于 96 孔板, 每孔 200  $\mu$ L。将 96 孔板放置于 37  $^{\circ}$ C 恒温气浴培养箱, 培养细菌,

于不同时间点在酶标仪上测定  $OD_{600}$  (每次测定前混匀 96 孔板)。

重复本操作, 且在用依布硒啉、紫草素、紫草素-依布硒啉处理前分别加入 4 mmol/L 的 DTT, 混匀后对结果进行检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 紫草素-依布硒啉可显著抑制金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 的生长

96 孔板实验证明依布硒啉、紫草素可明显抑制金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 的生长 ( $P < 0.000 1$ ), 且 MIC 分别为 20  $\mu$ mol/L 和 40  $\mu$ mol/L。当依布硒啉与紫草素联用时, 效果显著优于单用, 且可使紫草素使用浓度降低 8 倍, 如图 1。

### 2.2 紫草素-依布硒啉具有协同抗菌效应

根据 Bliss 独立模型计算得出协同指数。协同指数大于“0”, 表明二者为协同作用, 并且越接近于“1”, 协同作用越明显。经过计算得出 5  $\mu$ mol/L 紫草素与 10  $\mu$ mol/L 依布硒啉抑制金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 的协同指数为 0.59 (图 2), 因此认为 5  $\mu$ mol/L 紫草素与 10  $\mu$ mol/L 依布硒啉有协同抗菌效应。

### 2.3 紫草素-依布硒啉作用于金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 具有抗生素后效应

为了更好地评价紫草素-依布硒啉的抗菌效果, 我们通过 96 孔板检测了紫草素-依布硒啉的抗生素后效应(post-antibiotic effect, PAE)。经依布硒啉、紫草素及紫草素-依布硒啉分别处理 24 h 后, 将药物洗脱, 重新加入培养基, 观察细菌生长能够被继续抑制的时间。如图 3 所示, 1  $\mu$ mol/L 依布硒啉作用于金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 不具有 PAE, 2  $\mu$ mol/L 依布硒啉作用于金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 的 PAE 为 4 h; 紫草素单独使用不具有 PAE, 但 10  $\mu$ mol/L

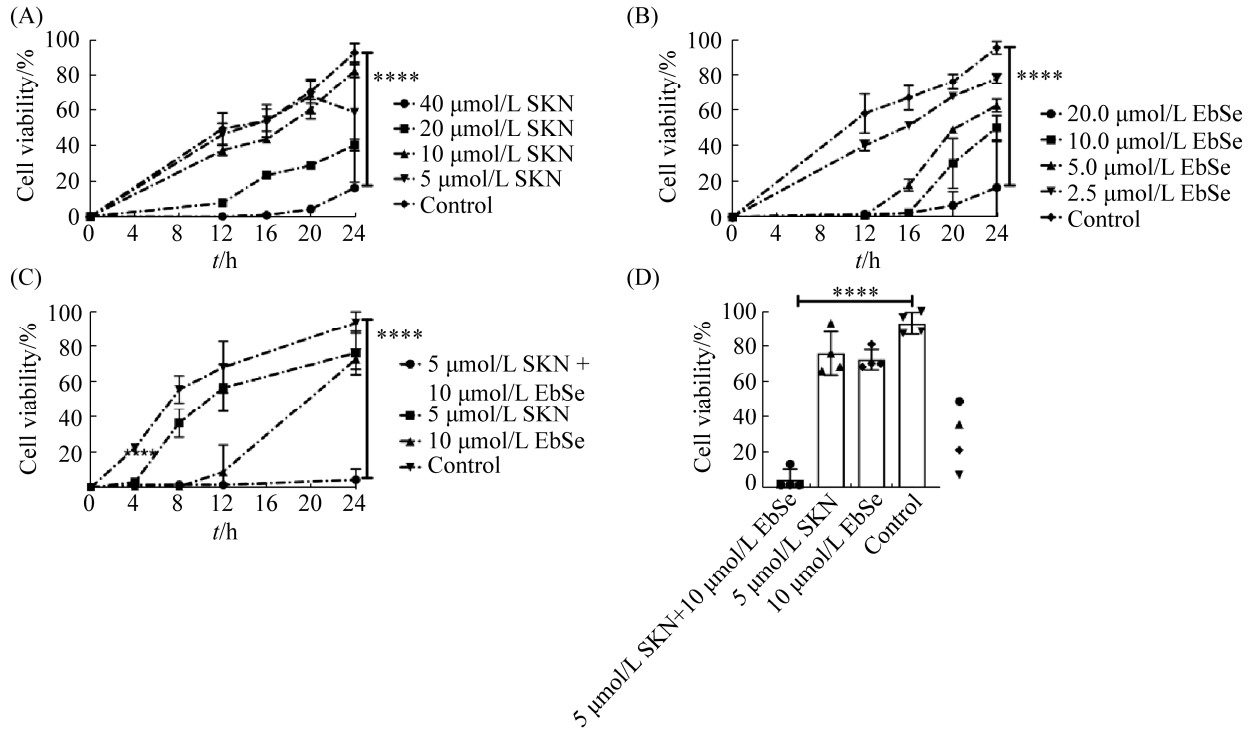


图 1 紫草素-依布硒啉对金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 生长的影响

Figure 1 The influence of shikonin-ebsele on the growth of *S. aureus* ATCC-25923. A–C: 0–24 h growth curve; A: EbSe; B: SKN; C: EbSe-SKN; D: EbSe-SKN growth curve at 24 h. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ , Student's *t* test,  $n = 4$ . EbSe: ebsele; SKN: shikonin.

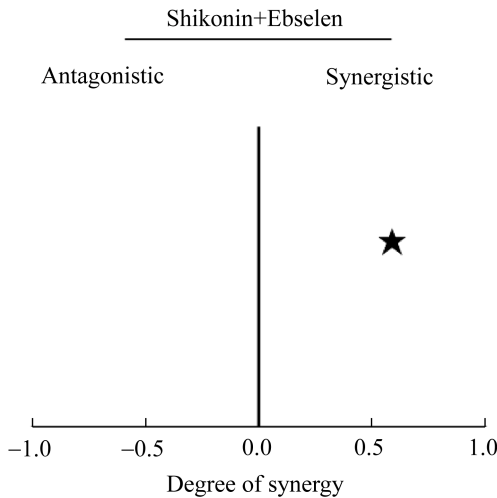


图 2 紫草素-依布硒啉对 *S. aureus* ATCC-25923 的协同抑制指数

Figure 2 The synergy degree of shikonin-ebsele against *S. aureus* ATCC-25923.

紫草素联合 1  $\mu\text{mol/L}$  依布硒啉后作用于金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 的 PAE 与单独使用 2  $\mu\text{mol/L}$  依布硒啉一样都为 4 h。

### 2.4 紫草素-依布硒啉可显著抑制金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 胞内 TrxR 活性

紫草素-依布硒啉能够显著抑制金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 的生长, 但是其与细菌 TDRS 的关系尚未可知。通过 DTNB 实验检测了紫草素-依布硒啉对金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 Trx 系统的影响。如图 4 所示, 40  $\mu\text{mol/L}$  依布硒啉联合 80  $\mu\text{mol/L}$  紫草素可显著抑制 TrxR 的活性 ( $P < 0.01$ ), 但对 Trx 活性无影响。同时, 40  $\mu\text{mol/L}$  依布硒啉不能抑制 TrxR 活性与前期结果吻合(依布硒啉提高至 80  $\mu\text{mol/L}$

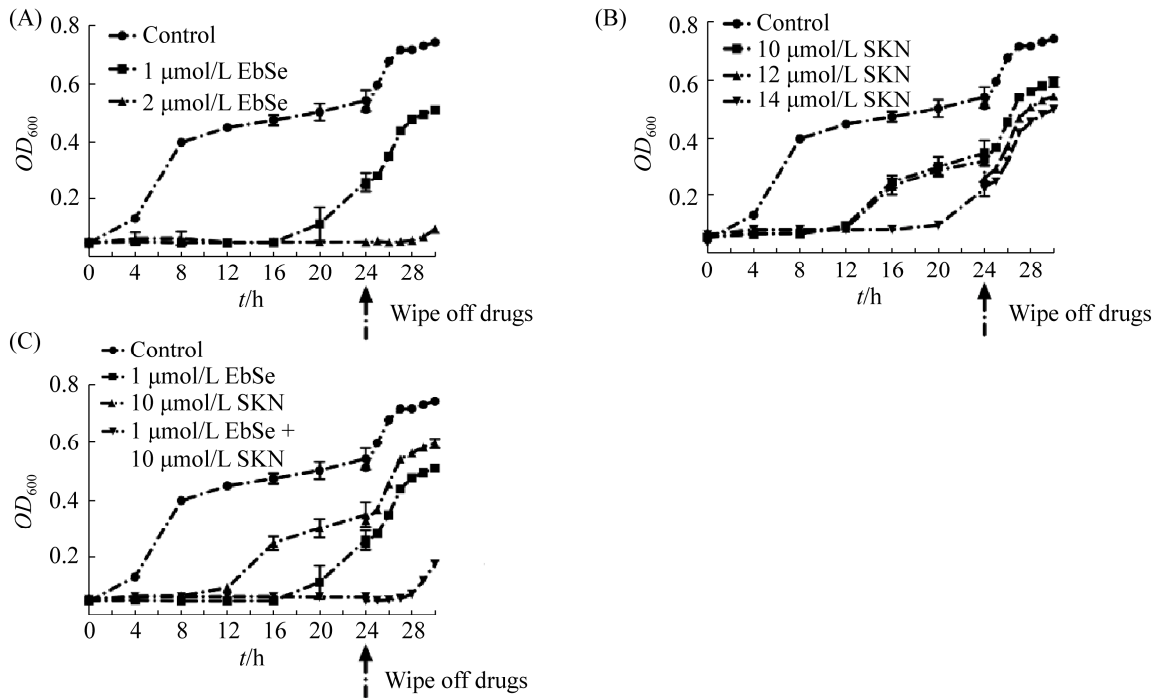


图 3 紫草素-依布硒啉作用于金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 的抗生素后效应

Figure 3 The post antibiotic effect of shikonin-ebselel against *S. aureus* ATCC-25923. A: EbSe; B: SKN; C: EbSe-SKN.  $n=4$ , no statistical analysis was needed. Standard deviation presented the discrete degree of the data collection. EbSe: ebselel; SKN: shikonin.

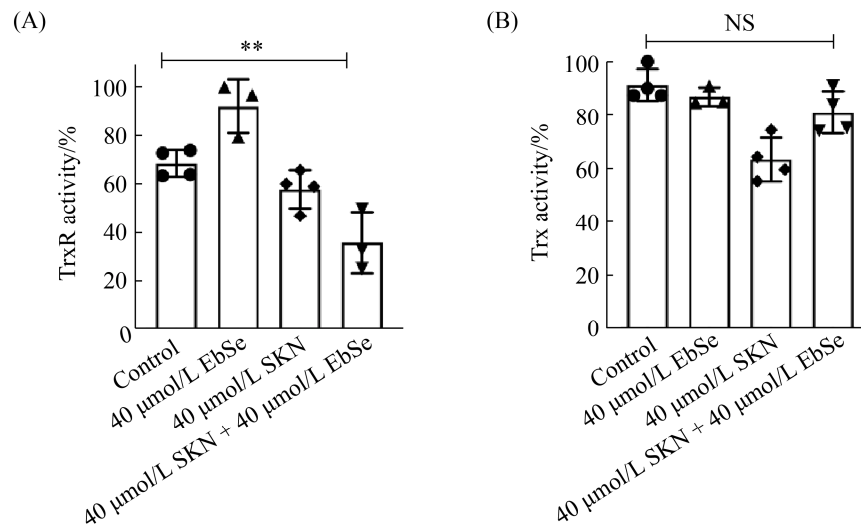


图 4 紫草素-依布硒啉对金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 Trx/TrxR 活性的影响

Figure 4 The influence of shikonin-ebselel on the Trx/TrxR activities of *S. aureus* ATCC-25923. A: TrxR activity; B: Trx activity. \*\*:  $P<0.01$ , Student's  $t$  test,  $n=4$ . NS: no statistical significance. EbSe: ebselel; SKN: shikonin.

方可抑制 TrxR 活性)。因此认为,紫草素-依布硒啉抗金黄色葡萄球菌作用与其抑制 TrxR 活性有关。

## 2.5 紫草素-依布硒啉可显著提高金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 胞内 ROS 产量

Trx 系统是金黄色葡萄球菌的抗氧化系统,可通过清除细胞内多余的 ROS 保护其免受氧化应激损伤。上述研究结果表明,紫草素-依布硒啉能够抑制金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 细胞内 TrxR 活性。那么紫草素-依布硒啉是否对细菌胞内 ROS 的产量有影响呢?如图 5 所示,40  $\mu\text{mol/L}$  紫草素联合 40  $\mu\text{mol/L}$  依布硒啉处理细菌后,平均荧光强度相对于对照组显著增强

( $P < 0.0001$ )。因此认为,紫草素-依布硒啉可显著提高金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 胞内 ROS 产量。

## 2.6 紫草素-依布硒啉对金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 形态的影响及 DTT 的挽救作用

为了进一步验证 ROS 是紫草素-依布硒啉发挥协同抗菌作用的关键分子之一,我们使用小分子还原剂 DTT 清除细菌胞内 ROS (DTT 并不与紫草素或依布硒啉反应),观察其对金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 的保护作用。结果显示,在 4 mmol/L DTT 存在条件下,5  $\mu\text{mol/L}$  紫草素联合 10  $\mu\text{mol/L}$  依布硒啉对金黄色葡萄球菌的抑制作用显著降低( $P < 0.0001$ ,如图 6)。同时,

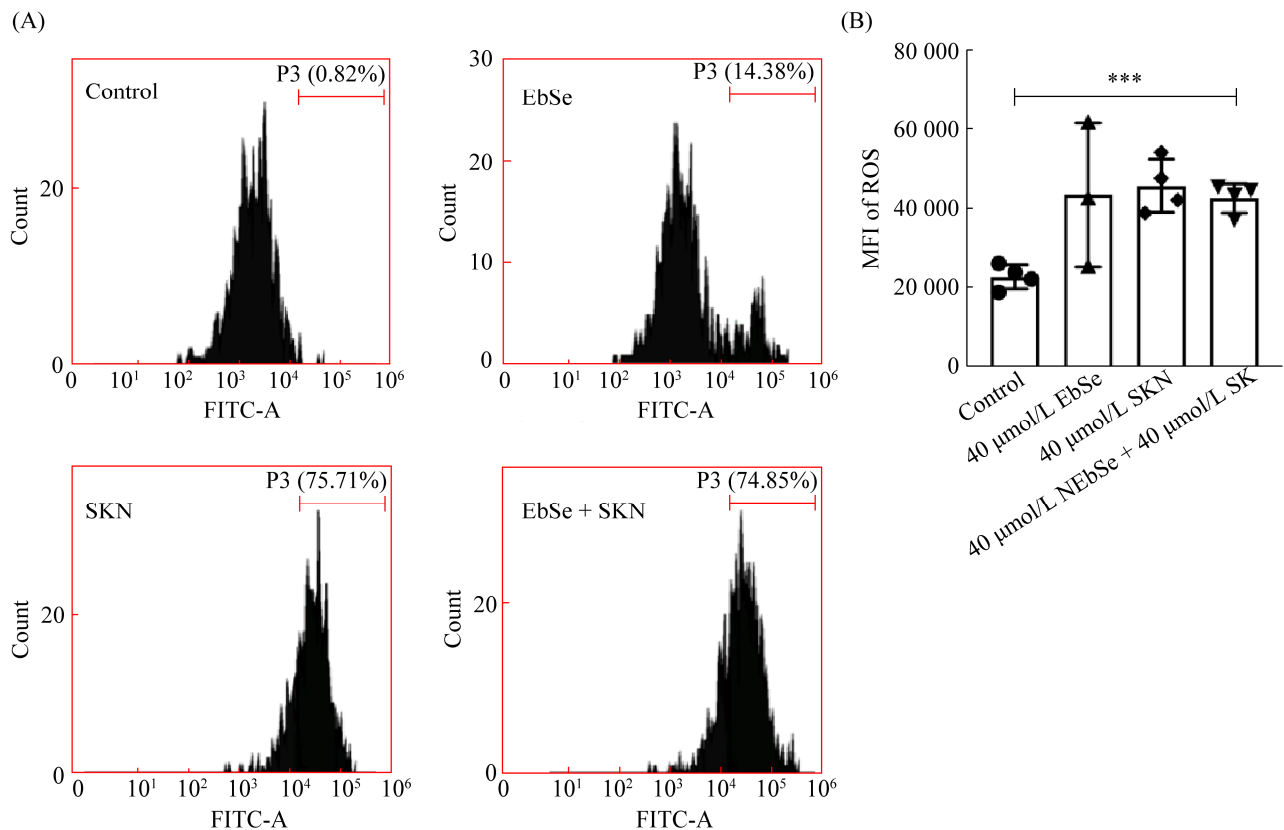


图 5 紫草素-依布硒啉对金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 胞内 ROS 产量的影响

Figure 5 The influence of shikonin-ebesen on the intracellular ROS production of *S. aureus* ATCC-25923. A: FACS diagram; B: quantified diagram. \*\*\*:  $P < 0.001$ , Student's *t* test,  $n = 4$ . EbSe: ebesen; SKN: shikonin.



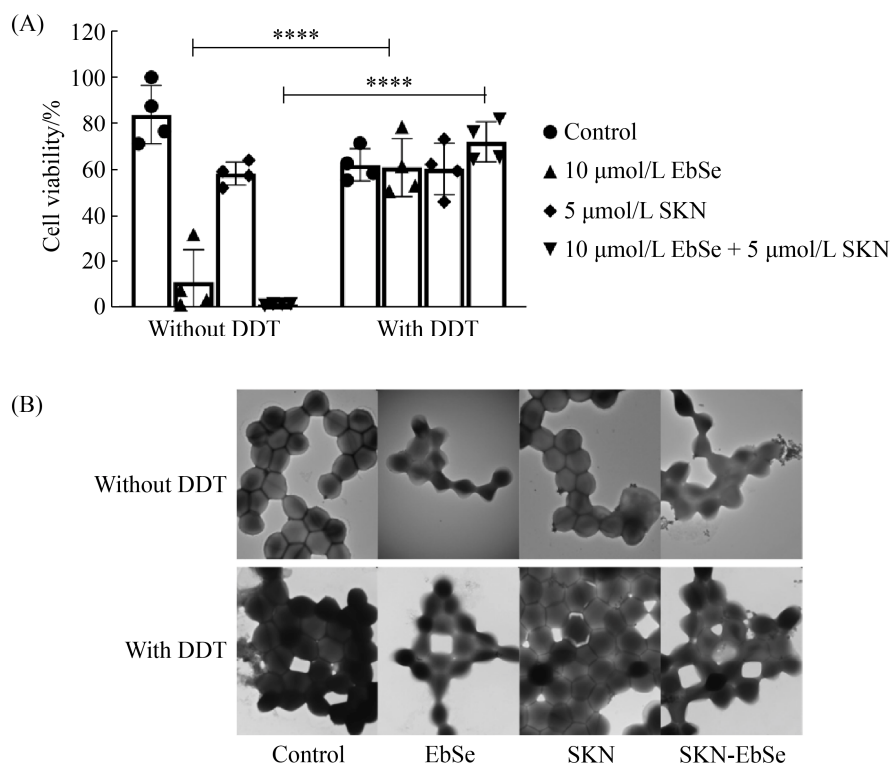


图 6 DTT 可挽救紫草素-依布硒啉处理的金黄色葡萄球菌 ATCC-25923

Figure 6 DTT could rescue *S. aureus* ATCC-25923 from shikonin-ebesen treatment. A: the growth curve at 24 h; B: TEM was used to observe the morphological change (30 000 $\times$ , magnification). \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ , Student's *t* test,  $n = 4$ . EbSe: ebesen; SKN: shikonin.

透射电子显微镜观察结果表明, 对照组的细胞形态光整圆滑, 边界清晰可见二分裂现象; 被依布硒啉处理过的细菌发生肿胀; 被紫草素处理过的细菌胞膜出现穿孔; 而经过紫草素-依布硒啉联合处理后细菌形态异常, 肿胀更加明显, 伴有内容物的流出。同时, DTT 的加入可一定程度挽救活性成分对细菌的损伤。

### 2.7 紫草素-依布硒啉对 MDRS 有显著抗菌活性

我们从临床收集了 3 株 MDRS, 观察紫草素-依布硒啉的抗菌活性。如图 7 所示, 紫草素-依布硒啉对 3 株 MDRS 均有明显的抑制作用, 5  $\mu\text{mol/L}$  紫草素与 5  $\mu\text{mol/L}$  依布硒啉联用均可明显抑制 3 株 MDRS 的生长( $P < 0.0001$ )。

## 3 讨论

金黄色葡萄球菌作为最常见的革兰氏阳性菌, 可导致临床上的多种常见感染, 如肺炎、胸膜炎和菌血症等<sup>[1]</sup>。由于金黄色葡萄球菌耐药性不断增强及耐药成分的逐渐增多, 已成为临床治疗面临的严峻挑战。

ROS 作为一个重要分子可参与为数众多的细胞生理活动, 但过量的 ROS 会导致氧化应激致细胞损伤。众所周知, 与 ROS 直接相关的是 TDRS, 且对金黄色葡萄球菌来说其 TDRS 就是 Trx 系统。Trx 系统作为抗菌靶点的机制与传统抗生素不同, 它是基于哺乳动物与细菌的 TrxR 在分子量、酶结构、电子传递方式上的天然差

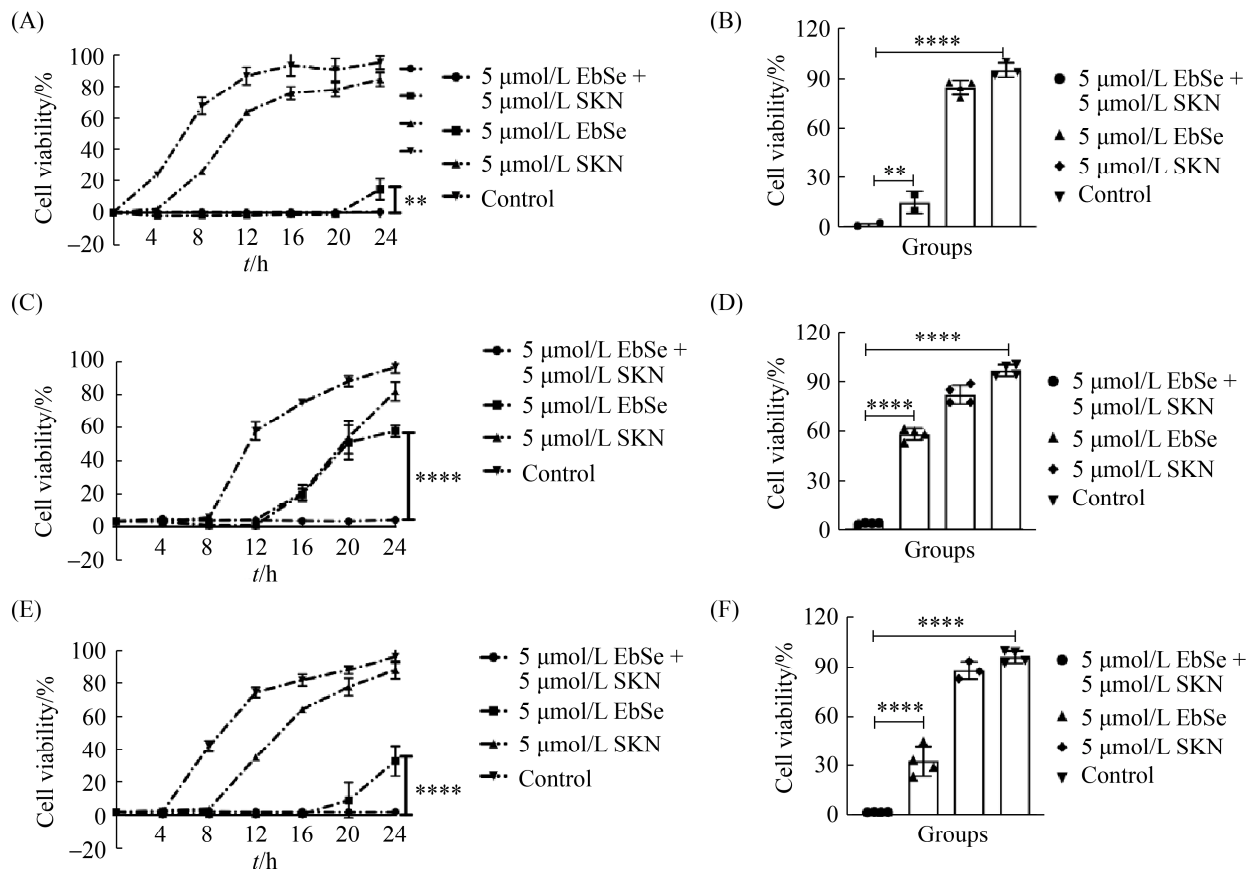


图 7 紫草素-依布硒啉对 MDRS 生长的抑制作用

Figure 7 The inhibitory effect of shikonin-ebesen on the growth of MDRS strains. A: the growth curve of MDRS 1074029 strain at 0–24 h; B: the growth curve of MDRS 1074029 strain at 24 h; C: the growth curve of MDRS 0883453 strain at 0–24 h; D: the growth curve of MDRS 0883453 strain at 24 h; E: the growth curve of MDRS 1072763 strain at 0–24 h; F: the growth curve of MDRS 1072763 strain at 24 h. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ , Student's  $t$  test,  $n=4$ . EbSe: ebselen; SKN: shikonin.

异, 从而导致细菌与哺乳动物细胞内出现完全不同的氧化还原状态。又由于 Trx 系统是金黄色葡萄球菌唯一的氧化还原系统, 所以针对 Trx 系统为靶点的药物对金黄色葡萄球菌可表现出差异性毒性, 为治疗金黄色葡萄球菌感染提供了新思路。我们团队前期通过筛选, 已获得了特异性作用于细菌 TrxR 的小分子化合物-依布硒啉, 其可通过抑制 TrxR 活性, 影响电子氧化呼吸链的传递, 诱导氧化应激, 实现对蛋白质、细胞膜及 DNA 损伤。这种抗菌机制的揭示为我们将来将细菌 TrxR 作为先导依据筛选其他药物提供了

平台。

近些年随着对中药成分的深入研究, 一些中药成分的单体物质被发现具有较好的抗菌作用, 但往往起效较慢或使用浓度较大, 且单独使用存在一定弊端<sup>[22]</sup>。我们发现醌类化合物紫草素具有抗菌活性, 可抑制金黄色葡萄球菌的生长, 但具体机制不明。紫草素是从紫草根中提取出来的有效活性物质, 其被发现具有与抗癌、抗炎和伤口愈合相关的多种生物活性成分<sup>[14,16-17]</sup>。我们的实验证明, 紫草素也有抗金黄色葡萄球菌的活性, 且可与依布硒啉发挥协同

抗菌作用。紫草素-依布硒啉不仅对 ATCC 株有很好的抗菌效果, 针对临床上筛选分离出的 MDRS 也具有明显的抗菌效果。这个发现也为临床上治疗金黄色葡萄球菌的感染提供了新的可能。此外, 紫草素-依布硒啉不仅可有效地杀灭金黄色葡萄球菌, 且联用也可降低药物的使用浓度, 保证良好的安全性及耐受性, 同时可防止耐药菌的产生。

实验通过进一步测定细菌胞内 TrxR 活性与 ROS 产量证实紫草素也可抑制 TrxR 活性, 通过诱导大量 ROS 的产生导致细菌死亡。值得注意的是, 我们发现紫草素-依布硒啉处理后细菌胞内 ROS 产量虽然增多, 但与紫草素单独使用无统计学差异。结合透射电子显微镜观察的结果发现, 紫草素-依布硒啉作用后导致了更多的细胞穿孔, 故考虑联用后细胞内产生的 ROS 经过破碎的细胞膜逸出, 因此无法准确指示细菌胞内 ROS 的含量。

实验中除证实紫草素-依布硒啉可靶向 TrxR 的机制外, 还有明显的膜损伤, 这也可能是它们发挥抗菌活性的重要机制, 这为我们深入研究作用机制提供了新的方向。此外, 已有研究表明, 紫草素与膜通透剂或 ATPase 抑制剂联用具有协同抗菌作用<sup>[23]</sup>。故紫草素可能具有膜损伤作用, 不仅可直接损伤细菌, 未来还可被用来增强抗生素入胞的能力, 使得一些穿透能力弱、不易入胞的那些被淘汰的抗生素重新为我们所用。

在未来, 我们认为分子对接、分子模拟等新技术可进一步帮助破解紫草素-依布硒啉的协同抗菌机制。通过研究抗菌活性基团, 再经过化学结构改造发现更有效的抗菌活性物质, 或根据这些活性位点在化合物库中进行筛选, 获得具有抗菌活性的化合物用于下游研究。此外, 虽然紫草素-依布硒啉有较好的抗金黄色葡

萄球菌活性, 但是否可有效平移到体内, 对宿主的免疫系统功能是否产生影响, 仍需要进一步探索。可以预见, 从实验室到临床, 未来还有很长的路要走。

## 参考文献

- [1] Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 2015, 28(3): 603–661.
- [2] Coates R, Moran J, Horsburgh MJ. *Staphylococci*: colonizers and pathogens of human skin. *Future Microbiology*, 2014, 9(1): 75–91.
- [3] Van Hal SJ, Jensen SO, Vaska VL, Espedido BA, Paterson DL, Gosbell IB. Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clinical Microbiology Reviews*, 2012, 25(2): 362–386.
- [4] McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 2017, 90(2): 269–281.
- [5] Pantosti A, Sanchini A, Monaco M. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiology*, 2007, 2(3): 323–334.
- [6] Infectious Diseases Society of America (IDSA), Spellberg B, Blaser M, Guidos RJ, Boucher HW, Bradley JS, Eisenstein BI, Gerding D, Lynfield R, Reller LB, Rex J, Schwartz D, Septimus E, Tenover FC, Gilbert DN. Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives. *Clinical Infectious Diseases*, 2011, 52(S): S397–S428.
- [7] Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Craig AS, Zell ER, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, Fridkin SK. Active bacterial core surveillance (ABCs) MRSA investigators. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *The Journal of American Medical Association*, 2007, 298(15): 1763–1771.
- [8] Talbot GH, Bradley J, Edwards JE, Gilbert D, Scheld M, Bartlett JG. Antimicrobial availability task force of the infectious diseases society of America. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline

- from the antimicrobial availability task force of the infectious diseases society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 2006, 42(5): 657–668.
- [9] Fischbach MA, Walsh CT. Antibiotics for emerging pathogens. *Science*, 2009, 325(5944): 1089–1093.
- [10] Kim L. Platforms for antibiotic discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2013, 12(5): 371–387.
- [11] Silver LL. Challenges of antibacterial discovery. *Clinical Microbiology Reviews*, 2011, 24(1): 71–109.
- [12] Lu J, Vlamis-Gardikas A, Kandasamy K, Zhao R, Gustafsson TN, Engstrand L, Hoffner S, Engman L, Holmgren A. Inhibition of bacterial thioredoxin reductase: an antibiotic mechanism targeting bacteria lacking glutathione. *The FASEB Journal*, 2013, 27(4): 1394–1403.
- [13] Noguchi N. Ebselen, a useful tool for understanding cellular redox biology and a promising drug candidate for use in human diseases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2016, 595: 109–112.
- [14] Staniforth V, Wang SY, Shyur LF, Yang NS. Shikonins, phytocompounds from *Lithospermum erythrorhizon*, inhibit the transcriptional activation of human tumor necrosis factor  $\alpha$  promoter *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(7): 5877–5885.
- [15] Papageorgiou VP, Assimopoulou AN, Couladouros EA, Hepworth D, Nicolaou KC. The chemistry and biology of alkannin, shikonin, and related naphthazarin natural products. *Angewandte Chemie International Edition*, 1999, 38(3): 270–301.
- [16] Li HM, Tang YL, Zhang ZH, Liu CJ, Li HZ, Li RT, Xia XS. Compounds from *Arnebia euchroma* and their related anti-HCV and antibacterial activities. *Planta Medica*, 2012, 78(1): 39–45.
- [17] Shen CC, Syu WJ, Li SY, Lin CH, Lee GH, Sun CM. Antimicrobial activities of naphthazarins from *Arnebia euchroma*. *Journal of Natural Products*, 2002, 65(12): 1857–1862.
- [18] Li X, Fan XX, Jiang ZB, Loo WT, Yao XJ, Leung ELH, Chow LW, Liu L. Shikonin inhibits gefitinib-resistant non-small cell lung cancer by inhibiting TrxR and activating the EGFR proteasomal degradation pathway. *Pharmacological Research*, 2017, 115: 45–55.
- [19] Duan DZ, Zhang BX, Yao J, Liu YP, Fang JG. Shikonin targets cytosolic thioredoxin reductase to induce ROS-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014, 70: 182–193.
- [20] Hegreness M, Shoresh N, Damian D, Hartl D, Kishony R. Accelerated evolution of resistance in multidrug environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(37): 13977–13981.
- [21] Kirakosyan G, Bagramyan K, Trchounian A. Redox sensing by *Escherichia coli*: effects of dithiothreitol, a redox reagent reducing disulphides, on bacterial growth. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 325(3): 803–806.
- [22] Zhang LL, Liang EJ, Cheng Y, Mahmood T, Ge F, Zhou K, Bao M, Lv L, Li L, Yi JF, Lu C, Tan Y. Is combined medication with natural medicine a promising therapy for bacterial biofilm infection? *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 128: 110184.
- [23] Lee YS, Lee DY, Kim YB, Lee SW, Cha SW, Park HW, Kim GS, Kwon DY, Lee MH, Han SH. The mechanism underlying the antibacterial activity of shikonin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 2015: 520588.

(本文责编 张晓丽)