



研究报告

香芹酚抑制金黄色葡萄球菌生物被膜的形成

戴雨芸 李超 袁中伟 李欣越 何泾正 尹立子*

四川农业大学动物医学院 四川 成都 611130

摘要: 【背景】生物被膜是细菌的一种自我保护形式, 可以增强细菌对药物及宿主免疫应答的抵抗力, 引起细菌耐药性和持续性感染。【目的】探究香芹酚对金黄色葡萄球菌生物被膜的作用机制, 为开发新型抗生物被膜药物提供可靠的理论依据。【方法】通过结晶紫染色法检测香芹酚对供试菌株生物被膜形成的抑制和对成熟生物被膜的清除作用; 使用刚果红平板法探究香芹酚对供试菌株生物被膜形成过程中细胞间多糖黏附素(polysaccharide intercellular adhesion, PIA)合成的作用; 通过分光光度法检测香芹酚对胞外 DNA (extracellular DNA, eDNA)分泌的抑制作用; 利用 RT-PCR 技术检测香芹酚对供试菌株的生物被膜相关基因 *icaA*、*cidA* 和 *sarA* 转录水平的影响。【结果】香芹酚对生物被膜形成的抑制和生物被膜的清除均有较强作用效果。256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 香芹酚抑制 PIA 合成和 eDNA 释放的效果显著。香芹酚可通过抑制相关基因转录从而抑制生物被膜的形成, 当 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的香芹酚作用后, *sarA* 的转录水平降低了 $60.44\% \pm 2.91\%$, *cidA* 的转录水平降低了 $76.48\% \pm 1.67\%$, *icaA* 的转录水平降低了 $70.00\% \pm 1.94\%$ 。【结论】香芹酚对金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 生物被膜的抑制和清除作用显著, 其作用机制主要是通过降低 *icaA*、*sarA* 和 *cidA* 基因转录水平抑制 PIA 的合成和 eDNA 的释放。

关键词: 生物被膜, 金黄色葡萄球菌, 香芹酚, 细胞间多糖黏附素, 胞外 DNA

Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by carvacrol

DAI Yu-Yun LI Chao YUAN Zhong-Wei LI Xin-Yue HE Jing-Zheng YIN Li-Zi*

College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China

Abstract: [Background] Biofilm is a form of bacterial self-protection, which can enhance the resistance of bacteria to antibiotics and host immune response, and causes bacterial resistance and persistent infection. [Objective] To provide a reliable theoretical basis for the development of new natural antibacterial drugs, the inhibition mechanism of carvacrol on the biofilm formation of *Staphylococcus aureus* was explored. [Methods] Crystal violet staining was used to detect the inhibitory effect of carvacrol on biofilm formation and the clear effect on mature biofilm of tested strains. We used congo red agar to detect the influence of carvacrol on polysaccharide intercellular adhesion (PIA) formation, and used spectrophotometer to detect the influence of carvacrol on extracellular DNA (eDNA) release. RT-PCR analysis was used to determine the effect of carvacrol on the transcription levels of *icaA*, *cidA* and

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31702284); Double Subject Construction Plan of Sichuan Agriculture University (03571444); Sichuan Veterinary Medicine and Drug Innovation Group of China Agricultural Research System (CARS-SVDIP)

*Corresponding author: E-mail: yinlizi@sicau.edu.cn

Received: 30-06-2019; Accepted: 06-09-2019; Published online: 17-10-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31702284); 四川农业大学双支计划(03571444); 国家农业产业技术体系四川兽药创新团队专项(CARS-SVDIP)

*通信作者: E-mail: yinlizi@sicau.edu.cn

收稿日期: 2019-06-30; 接受日期: 2019-09-06; 网络首发日期: 2019-10-17

sarA. **[Results]** Carvacrol has strong effects on the inhibition of biofilm formation and the removal of mature biofilm. The inhibition of PIA synthesis and eDNA release by carvacrol at 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was significant. Carvacrol can inhibit the formation of biofilm by inhibiting the transcription of related genes. When carvacrol was 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the transcription level of *sarA* decreased by $60.44\% \pm 2.91\%$, *cidA* by $76.48\% \pm 1.67\%$, and *icaA* decreased by $70.00\% \pm 1.94\%$. **[Conclusion]** Carvacrol had significant inhibitory and removal effects on the biofilm of *Staphylococcus aureus* 25923. Its mechanism is to inhibit the synthesis of PIA and the release of eDNA by reducing the transcription levels of *icaA*, *sarA* and *cidA* genes.

Keywords: Biofilm, *Staphylococcus aureus*, Carvacrol, Polysaccharide intercellular adhesion, Extracellular DNA

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)为革兰氏阳性菌, 隶属葡萄球菌属, 遍及自然界各处。金黄色葡萄球菌属于人畜共患病原菌, 能引起人和动物的多种感染性疾病: 小到皮肤感染、炎症反应, 大到肺炎、败血症、脓毒症等疾病^[1]。另外, 由于临床上长期使用抗生素类药物治疗金黄色葡萄球菌感染, 导致耐药菌株频现, 增加了治疗难度^[2]。

现代研究表明, 金黄色葡萄球菌形成的生物被膜是导致细菌耐药性加强的原因之一^[3]。生物被膜是一种细菌聚集膜状物, 由细菌附着在某物体表面, 同时分泌大量胞外多糖蛋白复合物将自身包裹而形成^[4]。生物被膜形成后细菌在生物被膜中, 治疗时需加大剂量或增加给药次数, 容易产生细菌耐药性和药物残留, 还可以随着生物被膜中存活细菌的再次释放, 引起反复性感染或潜伏性感染^[5]。因此, 找到有效控制和清除金黄色葡萄球菌生物被膜的药物具有重要意义。

近年来相关研究发现, 天然药物与化学合成药物相比在抗细菌生物被膜上有一定的优势, 但具体的作用机制仍旧缺乏系统地研究^[6]。香芹酚(2-甲基-5-异丙基苯酚), 又名香荆芥酚, 广泛存在于自然界的芳香植物中, 是牛至和百里香等植物精油的主要成分^[7], 具有抗菌、抗氧化、抗炎、调节血糖和增强机体免疫力等多种生物学功效^[8]。香芹酚的抗菌效果较好, 是一种广谱的抗菌剂^[9]。近年来的研究显示, 香芹酚对金黄色葡萄球菌具有较强的抑菌活性, MIC (minimum inhibitory concentration)为 128–256 $\mu\text{g}/\text{mL}$, MBC (minimum bactericidal concentration)为 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 且对金黄色葡萄球菌生

物被膜的形成有显著影响^[10], 但目前关于香芹酚对生物被膜的作用机制尚不完全明确。因此本文以金黄色葡萄球菌 ATCC25923 为供试菌株, 探讨香芹酚对生物被膜的作用机制, 为新型抗生物被膜药物的开发提供可靠的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

RNA 抽提试剂盒, 北京天漠科技发展有限公司; EvaGreen 2 \times qPCR MasterMix-No Dye、DNase/RNase-Free Water, Applied Biological Materials Inc (ABM)。酶标仪、微量分光光度计, 赛默飞世尔科技公司; 实时荧光定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司。

1.2 实验材料

金黄色葡萄球菌 ATCC25923, 美国标准菌种库; 香芹酚(纯度>98%), 上海麦克林生物技术有限公司; DMSO, 索莱宝生物科技有限公司; 脑心浸肉液汤(BHI)培养基, 青岛海博生物科技有限公司。刚果红平板(g/L): 刚果红 0.8, 脑心浸液 37.0, 蔗糖 50.0, 琼脂 10.0, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.3 香芹酚对金黄色葡萄球菌生物被膜形成的抑制作用

将含不同浓度香芹酚(0、8、16、32、64 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的金黄色葡萄球菌菌悬液培养至对数期 OD_{600} 为 0.6, 加入 96 孔板, 再加入含药的 3%蔗糖 BHI 培养基, 使香芹酚浓度不变。混匀后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧条件下培养不同时间(6、12、18、24 h)。移除 96 孔板中培养基, 加 10%的甲醛固定过夜, 移除甲醛, 0.1%结晶紫染色 30 min, 双蒸水洗涤后干燥, 加入

33%的冰乙酸溶液,充分混匀后,置于酶标仪下测定 OD_{490} ^[11]。实验重复3次,取平均值。

1.4 香芹酚对金黄色葡萄球菌生物被膜的清除作用

参照张忠斌等^[12]的试验方法,金黄色葡萄球菌生物被膜培养成熟后,用PBS洗涤3次以去除游离菌,加入不同浓度的香芹酚(0、32、64、128、256、512 $\mu\text{g}/\text{mL}$),置于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养不同时间(6、12、24 h)后,移除培养基,加入10%甲醛固定过夜,移除甲醛,0.1%结晶紫染色后弃去染液。再用PBS洗涤3次,加入33%的冰乙酸溶液,混匀,用酶标仪测定 OD_{490} 。实验重复3次,取平均值。

在96孔板中培养成熟的金黄色葡萄球菌生物被膜,用PBS洗涤3次以去除游离菌。各孔中加入等体积的香芹酚和苯唑西林,使香芹酚的终浓度为0、32、64、128、256、512 $\mu\text{g}/\text{mL}$,苯唑西林的终浓度为0、0.125、0.25、0.5、1、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养24 h^[13]。按上述结晶紫染色法处理后,测定 OD_{490} ,以反映对成熟生物被膜的影响。实验重复3次,取平均值。

1.5 香芹酚对金黄色葡萄球菌生物被膜形成过程中细胞间多糖黏附素合成的影响

参照官妍等^[14]方法,将培养过夜后的金黄色葡萄球菌菌悬液分别取10 μL 接种到含有不同浓度香芹酚的刚果红平板上(0、32、64、128、256 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。置于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养24 h后,观察实验结果,实验重复3次。

1.6 香芹酚对金黄色葡萄球菌胞外DNA释放的影响

将培养至对数期的金黄色葡萄球菌菌悬液加入6孔板中,向其中加入含不同香芹酚浓度的3%蔗糖BHI培养基,使终质量浓度为0、32、64、128、256 $\mu\text{g}/\text{mL}$,放置于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养24 h。按Rice等^[15]的方法提取胞外DNA (extracellular DNA, eDNA),用分光光度计检测 OD_{260}/OD_{280} 比值。eDNA的相对表达量用单位生物膜内eDNA含量表示。实验重复3次,取平均值。

1.7 香芹酚对金黄色葡萄球菌基因表达量的影响

采用Primer 5软件设计金黄色葡萄球菌生物被

膜相关基因 *sarA*、*icaA* 及 *cidA* 的上下游引物(表1),用1%琼脂糖凝胶电泳检测其PCR扩增产物。将含不同浓度香芹酚(0、8、16、32、64 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的菌悬液培养至 $OD_{600}=1.8$ 后,采用Trizol法,根据RNA抽提试剂盒说明书提取总RNA,然后反转录合成cDNA,最后进行荧光定量PCR扩增,将测定结果绘制成柱状图^[16]。试验重复3次,取其平均值。

PCR反应体系(20 μL): $2\times\text{Taq PCR MasterMix}$ 10 μL , DNase/RNase-Free Water 7 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各1 μL , DNA模块1 μL 。PCR反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 34个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 20 $^{\circ}\text{C}$ 保温。荧光定量PCR反应体系(20 μL): EvaGreen $2\times\text{qPCR MasterMix-No Dye}$ 10 μL ; DNase/RNase-Free Water 7 μL ; 上、下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各1 μL ; cDNA 1 μL 。PCR反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 39个循环; 65 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s。

1.8 数据分析

实验结果通过Prism 5.0进行数据分析(*t*检验法),结果表示为平均值 \pm 标准差。

2 结果与分析

2.1 香芹酚对金黄色葡萄球菌生物被膜形成的抑制作用

在亚抑菌浓度的香芹酚作用下,金黄色葡萄球菌生物被膜的形成显著减少。终质量浓度为8、16、32、64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的香芹酚作用18 h后,实验结果如图1所示,金黄色葡萄球菌生物被膜总量与对照组相比较分别减少24.72% \pm 2.61% ($P<0.01$)、35.35% \pm 2.10% ($P<0.01$)、61.81% \pm 2.88% ($P<0.01$)、81.47% \pm 2.64% ($P<0.01$)。香芹酚对金黄色葡萄球菌生物被膜的形成有较强的抑制效果,并呈现浓度依赖性。

表1 PCR引物

Table 1 PCR primers

Primer	Sequence (5'→3')	Length (bp)
<i>icaA</i> -F	TTTCGGGTGCTTCACTCTAT	229
<i>icaA</i> -R	CGTAGTAATACTTCGTGTCCC	
<i>cidA</i> -F	GATTTTTCATCTCCCTTAGCCG	300
<i>cidA</i> -R	GCGTCTACACCTTTACGATGTTTAT	
<i>sarA</i> -F	TTGTTTTCGCTGATGTAT	100
<i>sarA</i> -R	CAATGGTCACTTATGCTG	

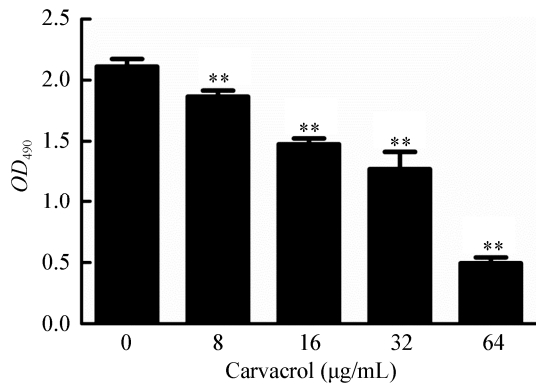


图 1 不同质量浓度的香芹酚对金黄色葡萄球菌生物被膜形成能力的影响

Figure 1 The effect of carvacrol with different concentrations on the biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus*

注: **: 与空白对照组相比较, $P < 0.01$, t 检验.

Note: **: Compare with blank control group, $P < 0.01$, t test.

香芹酚抑制金黄色葡萄球菌生物被膜形成的时间分析结果如图 2 所示。由图 2 可知, 当香芹酚的作用时间为 6 h 时, 几乎不影响金黄色葡萄球菌生物被膜, 从 12 h 开始对金黄色葡萄球菌生物被膜的形成有抑制作用。与空白对照组相比较, 8 µg/mL 的香芹酚对金黄色葡萄球菌生物被膜形成的影响较小, 随着作用时间的增长, 抑制效果的改变极微弱。

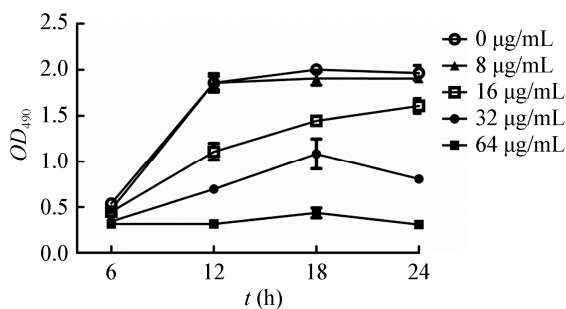


图 2 不同质量浓度香芹酚抑制金黄色葡萄球菌生物被膜形成的时间分析

Figure 2 The time analysis of biofilm formation of *Staphylococcus aureus* by different concentration of carvacrol

2.2 香芹酚对金黄色葡萄球菌生物被膜的清除作用

由图 3 可知, 当香芹酚质量浓度为 256、512 µg/mL 时, 对金黄色葡萄球菌生物被膜的清除作用显著, 与空白对照组相比, 其清除率分别为 73.32%±3.93% ($P < 0.01$) 和 81.11%±1.35% ($P < 0.01$)。在亚抑菌浓度下, 香芹酚对生物被膜清除效果不明显。

香芹酚与苯唑西林共同作用对金黄色葡萄球菌成熟生物被膜影响的实验结果如表 2 所示, 当苯唑西林的浓度为 0.125–0.25 µg/mL 时, 对供试菌株生物被膜形成有诱导效果, 在一定程度上促进它的形成。苯唑西林与香芹酚共同作用于金黄色葡萄球菌时, 对成熟生物被膜的清除作用加强。

2.3 香芹酚对金黄色葡萄球菌 PIA 合成的影响

将菌液接种到刚果红平板培养后, 其中菌落颜色呈黑色为 PIA 阳性菌落, 菌落呈红色为 PIA 阴性菌落。实验结果显示(图 4), 随着香芹酚浓度的增加, PIA 的合成量逐渐减少, 说明香芹酚可以抑制金黄色葡萄球菌生物被膜中的 PIA 合成。

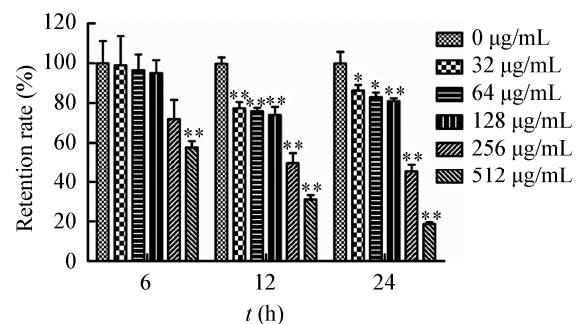


图 3 不同质量浓度的香芹酚对金黄色葡萄球菌生物被膜清除作用

Figure 3 The effect of different concentration of carvacrol on the biofilm clearance of *Staphylococcus aureus*

注: **: 与空白对照组相比较, $P < 0.01$, t 检验; *: 与空白对照组相比较, $P < 0.05$, t 检验.

Note: **: Compare with blank control group, $P < 0.01$, t test; *: Compare with blank control group, $P < 0.05$, t test.

表 2 香芹酚与苯唑西林共同作用对金黄色葡萄球菌成熟生物被膜的影响

Table 2 Effects of carvacrol and oxacillin on mature biofilm of *Staphylococcus aureus* ($\bar{X} \pm SD, n=3$)

Oxacillin concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Carvacrol concentration ($\mu\text{g/mL}$)					
	0	32	64	128	256	512
0	1.607 \pm 0.045	0.948 \pm 0.118**	0.905 \pm 0.197**	0.997 \pm 0.128**	0.608 \pm 0.038**	0.424 \pm 0.038**
0.125	1.900 \pm 0.032**	1.801 \pm 0.391	2.113 \pm 0.402	1.473 \pm 0.306	0.520 \pm 0.096**	0.476 \pm 0.006**
0.250	2.161 \pm 0.069**	1.891 \pm 0.105*	1.717 \pm 0.517	0.601 \pm 0.072**	0.547 \pm 0.085**	0.462 \pm 0.011**
0.500	1.313 \pm 0.107*	1.182 \pm 0.380**	0.417 \pm 0.019**	0.567 \pm 0.028**	0.559 \pm 0.102**	0.441 \pm 0.093**
1.000	0.644 \pm 0.028**	0.574 \pm 0.098**	0.497 \pm 0.051**	0.574 \pm 0.085**	0.569 \pm 0.022**	0.489 \pm 0.051**
2.000	0.535 \pm 0.046**	0.510 \pm 0.085**	0.528 \pm 0.124**	0.593 \pm 0.067**	0.419 \pm 0.901**	0.402 \pm 0.076**

注: **: 与空白对照组相比较, $P < 0.01$, t 检验; *: 与空白对照组相比较, $P < 0.05$, t 检验.

Note: **: Compare with blank control group, $P < 0.01$, t test; *: Compare with blank control group, $P < 0.05$, t test.

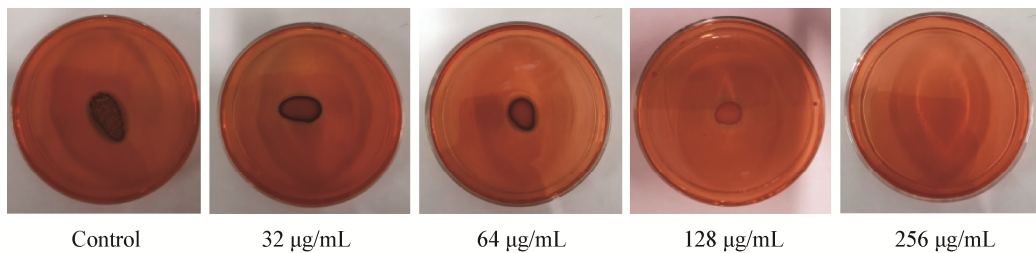


图 4 香芹酚对金黄色葡萄球菌生物被膜中 PIA 的影响

Figure 4 Effect of carvacrol on PIA in *Staphylococcus aureus* biofilm

2.4 香芹酚对金黄色葡萄球菌 eDNA 分泌的影响

实验结果如图 5 所示, 低浓度的香芹酚即可对金黄色葡萄球菌生物被膜 eDNA 的释放有抑制效果。随着药物浓度的增加, 抑制作用加强, 在 256 $\mu\text{g/mL}$ 的香芹酚作用 24 h 后, 与空白对照组相比较, eDNA 的释放量降低了 83.19% \pm 1.74% ($P < 0.01$)。

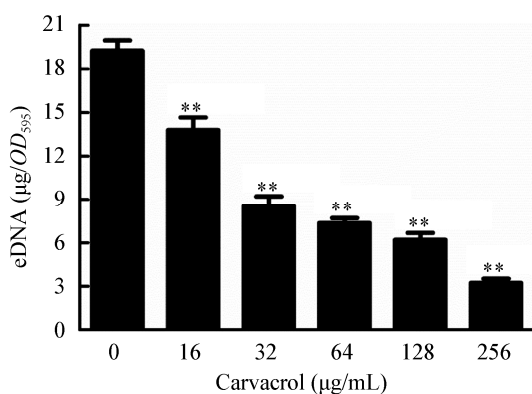


图 5 香芹酚对金黄色葡萄球菌生物被膜中 eDNA 分泌的影响

Figure 5 Effect of carvacrol on eDNA secretion in *Staphylococcus aureus* biofilm

注: **: 与空白对照组相比较, $P < 0.01$, t 检验.

Note: **: Compare with blank control group, $P < 0.01$, t test.

2.5 香芹酚对金黄色葡萄球菌基因转录水平的影响

琼脂糖凝胶电泳检测结果显示(图 6A), 供试菌株中的 *sarA*、*cidA* 和 *icaA* 都有表达, 且条带单一。RT-PCR 结果显示(图 6B), 香芹酚可影响供试菌株中的 *sarA*、*cidA* 和 *icaA* 转录水平。64 $\mu\text{g/mL}$ 的香芹酚作用于金黄色葡萄球菌后, 与空白对照组相比, *sarA* 的转录水平降低了 60.44% \pm 2.91%; *cidA* 的转录水平降低了 76.48% \pm 1.67%; *icaA* 的转录水平降低了 70.00% \pm 1.94%。

3 讨论与结论

细菌生物膜是与游离菌不同的另一种存在形式。相关研究表明, 生物被膜一旦形成后细菌数量将显著增加, 且可以躲避免疫系统的识别与巨噬细胞的吞噬^[17]。另外, 生物被膜中的细菌对药物的敏感性也大大下降, 使用抗生素清除生物膜需要的剂量大概是浮游菌的 5 000 倍左右^[18]。

本研究中, 我们探究了香芹酚对金黄色葡萄球菌生物被膜的作用。结果表明, 香芹酚抑制金黄色

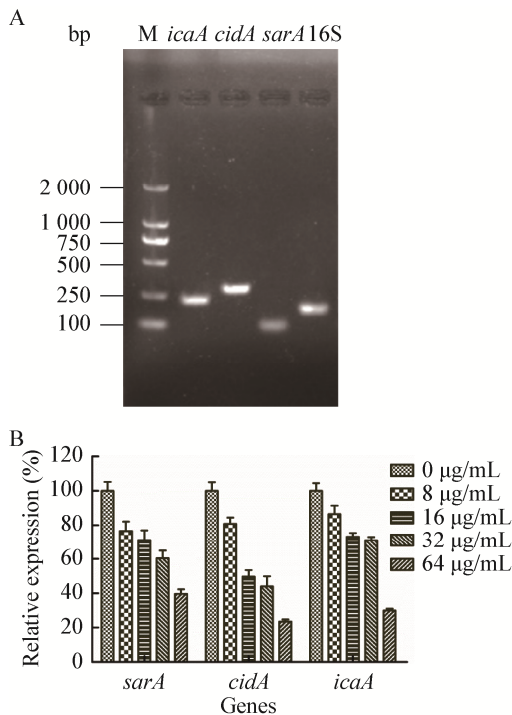


图 6 香芹酚对金黄色葡萄球菌生物被膜相关基因转录水平的影响

Figure 6 Effects of carvacrol on the transcriptional level of *Staphylococcus aureus* biofilm related genes

注: A: 金黄色葡萄球菌生物被膜相关基因 PCR 扩增结果; B: 相关基因的荧光定量 PCR 结果。

Note: A: Results of PCR amplification of *Staphylococcus aureus* biofilm related genes; B: results of fluorescence quantitative PCR of related genes.

葡萄球菌标准菌株生物被膜形成和清除成熟的生物被膜均有较强作用。目前, 抗生素类药物是临床治疗金黄色葡萄球菌感染的有效方法, 但单独使用某种抗生素很容易出现耐药菌株^[19]。近年来相关研究表明, 金黄色葡萄球菌对苯唑西林耐药率显著增加, 所以联合用药成为目前的首选解决方案^[20]。本实验研究结果显示, 当大于 0.25 µg/mL 的苯唑西林与香芹酚联合应用时较单一用药效果增强, 且呈现一定浓度依赖性。

生物被膜形成是一个十分繁杂的过程, 涉及到多种基因的表达与调控, 是各种因素共同作用的结果。胞外多糖、蛋白质以及胞外 DNA 等是生物被膜的主要组成成分。PIA 的合成在生物被膜的黏附和聚集阶段起至关重要的作用^[21]。PIA 合成减少,

会导致菌株间黏附能力降低, 随之生物被膜的形成能力也下降。eDNA 是菌株程序性死亡并溶解后释放到细胞外的 DNA, 主要的作用是在黏附阶段起连接作用, 在成熟被膜中起稳定结构的作用^[22]。本研究结果显示, 香芹酚可明显地抑制 PIA 合成与 eDNA 释放, 从而减少生物被膜的形成。

在生物被膜形成过程中, *ica* 操纵子是合成 PIA 的关键因子, 也是参与金黄色葡萄球菌生物被膜形成的主要调控基因, *ica* 的调控可以减少细菌间的黏附和聚集进而破坏生物被膜稳定性。*ica* 操纵子包括串联存在的 *icaABCD* 4 个功能基因团, 其中 *icaA* 编码合成的 *icaA* 蛋白具 N-乙酰葡聚糖转移酶活性, 在 *icaA* 操纵子中功能最为显著^[23]。*cid* 操纵子是参与细菌的程序性死亡和溶解的主要基因。细菌的程序性死亡和溶解产生 eDNA, 所以 *cid* 操纵子参与 eDNA 释放的调控^[24-25]。*sarA* 是金黄色葡萄球菌的主要毒力基因表达调控系统。*sarA* 可通过与 *ica* 操纵子的启动子结合来促进 *ica* 的表达, 达到影响 PIA 合成的效果; 通过降低胞外蛋白酶的分泌间接影响核酸酶活性, 从而降低 eDNA 的释放^[26]。研究表明, *sarA* 属于全局调控因子, 不论体内或体外都可通过调控金黄色葡萄球菌生物被膜的相关基因表达进而影响生物被膜的形成^[27]。在本研究中, 通过荧光定量 RT-PCR 技术检测了 *icaA*、*cidA* 及 *sarA* 3 种基因转录水平, 结果显示, 与空白对照组相比, 加入香芹酚后 3 种基因表达均受到抑制, 且呈浓度剂量依赖。由此可以证实, 香芹酚抑制金黄色葡萄球菌生物被膜 PIA 的合成与 *icaA* 和 *sarA* 调控有关, eDNA 的释放与 *cidA* 的调控有关。

综上所述, 香芹酚可以有效地抑制和清除金黄色葡萄球菌 ATCC25923 的生物被膜。其作用机制主要是通过抑制 *icaA*、*cidA* 和 *sarA* 基因的转录水平, 减少 PIA 的合成与 eDNA 的释放, 达到抑制生物被膜形成和清除成熟生物被膜的效果, 但香芹酚降低相关基因转录水平的具体方式以及其他机制还有待更深入的探究。

REFERENCES

- [1] Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections[J]. New England Journal of Medicine, 1998, 339(8): 520-532
- [2] Li YP, Gong XH, Zhou N. Analysis of clinical distribution characteristics and drug resistance of *Staphylococcus aureus*[J]. Chinese Journal of Modern Drug Application, 2019, 13(3): 237-238 (in Chinese)
李一鹏, 宫晓红, 周娜. 金黄色葡萄球菌的临床分布特点及耐药性分析[J]. 中国现代药物应用, 2019, 13(3): 237-238
- [3] Lewis K. Riddle of biofilm resistance[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, 45(4): 999-1007
- [4] Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, et al. Microbial biofilms[J]. Annual Review of Microbiology, 1995, 49: 711-745
- [5] Qian YE, Chen X. The relationship between the biofilm-forming capacity and drug resistance of *Staphylococcus aureus*[J]. Chinese Journal of Microecology, 2013, 25(3): 339-341 (in Chinese)
钱燕儿, 陈晓. 金黄色葡萄球菌生物膜形成能力与耐药性关系的研究[J]. 中国微生物学杂志, 2013, 25(3): 339-341
- [6] Dong SH, Qu D, Liu MR. Progress in biological membrane control by natural drugs[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2015, 38(4): 862-865 (in Chinese)
董士华, 曲狄, 刘铭然. 天然药物防治生物膜的研究进展[J]. 中药材, 2015, 38(4): 862-865
- [7] Ma JM, Wang JQ, Wang LX. The contents of thymol and carvacrol in oregano were determined by HPLC[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2018(13): 205-206 (in Chinese)
马建民, 王金秋, 王黎霞. 高效液相色谱法测定牛至中麝香草酚和香芹酚含量[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(13): 205-206
- [8] de Souza JRL, de Oliveira PR, Anholeto LA, et al. Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females ticks (Acari: Ixodidae)[J]. Micron, 2019, 116: 66-72
- [9] Li BP, Hu WC. Review on the bioactivity of carvacrol[J]. Journal of Longdong University, 2017, 28(1): 48-52 (in Chinese)
李博萍, 胡文春. 香芹酚的生物学活性概述[J]. 陇东学院学报, 2017, 28(1): 48-52
- [10] Gan YY, Yuan ZW, Zhang TY, et al. Antibacterial mechanism of carvacrol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (USA300)[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2019, 37(2): 276-282 (in Chinese)
甘盈盈, 袁中伟, 张天翼, 等. 香芹酚对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(USA300)抑菌机制的研究[J]. 四川农业大学学报, 2019, 37(2): 276-282
- [11] Zhang B, Teng ZH, Li XH, et al. Chalcone attenuates *Staphylococcus aureus* virulence by targeting sortase a and alpha-hemolysin[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1715
- [12] Zhang ZB, Gao T, Ding WY, et al. Elimination effect of rhubarb extract on *Streptococcus suis* biofilm[J]. Heilongjiang Medicine Journal, 2016, 29(6): 1056-1058 (in Chinese)
张忠斌, 高天, 丁文雅, 等. 大黄提取物对猪链球菌生物被膜的消除作用[J]. 黑龙江医药, 2016, 29(6): 1056-1058
- [13] Qiao RH, Xie KP, Xie MJ. Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm by honokiol[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(8): 1266-1272 (in Chinese)
乔瑞红, 谢鲲鹏, 谢明杰. 厚朴酚抑制耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物被膜形成[J]. 微生物学报, 2016, 56(8): 1266-1272
- [14] Guan Y, Zhang JY, Wang CZ, et al. Preliminary study of effects of andrographolide on *Staphylococcus epidermidis* biofilms[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2012, 37(14): 2147-2150 (in Chinese)
官妍, 章九云, 汪长中, 等. 穿心莲内酯对表皮葡萄球菌生物被膜作用初探[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(14): 2147-2150
- [15] Rice KC, Mann EE, Endres JL, et al. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(19): 8113-8118
- [16] Li WL. Study on the activity of honokiol against planktonic and biofilm of *Staphylococcus aureus*[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2015 (in Chinese)
李文莉. 厚朴酚抗浮游态和生物被膜态金黄色葡萄球菌活性研究[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2015
- [17] You YB. Biofilm formation and fibrinogen binding ability of *Staphylococcus aureus*[D]. Hefei: Doctoral Dissertation of University of Science and Technology of China, 2014 (in Chinese)
游轶博. 金黄色葡萄球菌生物被膜和纤维蛋白原结合能力研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学博士学位论文, 2014
- [18] Huo JN. Dandelion aqueous extract effects on *Staphylococcus aureus* biofilm[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2014 (in Chinese)
霍佳楠. 蒲公英水提物对金黄色葡萄球菌生物膜的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2014
- [19] Hou YC. The molecular regulation mechanism of *Staphylococcus aureus* biofilm formation under antibiotic stress[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2018 (in Chinese)
侯玉超. 抗生素胁迫下金黄色葡萄球菌生物被膜形成的

- 分子调控机制[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2018
- [20] Qin JQ, Li M, Qin YY, et al. Dynamic observation and antibiotic susceptibility analysis of biofilm of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2019, 42(2): 140-145 (in Chinese)
覃金球, 李荫, 覃媛媛, 等. 临床分离金黄色葡萄球菌生物膜动态观察及药物敏感性研究[J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(2): 140-145
- [21] Li TT, Guo JW, Li JR, et al. Research progress of bacterial biofilm and its relationship with quorum sensing[J]. Chinese Fishery Quality and Standards, 2017, 7(1): 1-7 (in Chinese)
李婷婷, 国竞文, 励建荣, 等. 细菌生物被膜的研究进展及与群体感应的关系[J]. 中国渔业质量与标准, 2017, 7(1): 1-7
- [22] Das T, Sehar S, Koop L, et al. Influence of calcium in extracellular DNA mediated bacterial aggregation and biofilm formation[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e91935
- [23] Cue D, Lei MG, Lee CY. Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2012, 2: 38
- [24] Qiao RH, Xie KP, Xie MJ. Progress in gene regulation mechanisms of *Staphylococcus* biofilm development - a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(10): 1238-1244 (in Chinese)
乔瑞红, 谢鲲鹏, 谢明杰. 葡萄球菌生物被膜的基因调控机制研究进展[J]. 微生物学报, 2015, 55(10): 1238-1244
- [25] Büttner H, Mack D, Rohde H. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2015, 5: 14
- [26] Tormo MA, Martí M, Valle J, et al. SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(7): 2348-2356
- [27] Zheng YY, Cao FJ, Ming D, et al. Progress in study of impact of SarA on biofilm formation by *Staphylococcus aureus*[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2017, 51(12): 62-67 (in Chinese)
郑艳阳, 曹凤娇, 明迪, 等. SarA 调控金黄色葡萄球菌生物被膜形成的研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2017, 51(12): 62-67