

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.001975

朱砂七拮抗耐药金黄色葡萄球菌的实验研究
及免疫调节机制初探曹兰秀¹, 吕 娟², 赵 娟¹, 王 江¹, 马 莉¹

(陕西中医药大学:1. 基础医学院方剂教研室;2. 中药教研室, 咸阳 712046)

【摘要】目的:本研究通过多水平评价体系明确朱砂七是否可以拮抗耐药金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA), 并探讨其发挥拮抗作用的免疫调节机制。**方法:**采用试管二倍稀释法进行药物敏感试验, 观察药物对 MRSA 生长的抑制作用, 再检测朱砂七是否影响金 MRSA 对宿主细胞的侵入, 纤粘连蛋白粘附试验评价朱砂七对细菌粘附作用的影响。荧光定量 PCR(real time-PCR, RT-PCR)法检测朱砂七对 AT- II 细胞模式识别受体 Toll 样受体(Toll like receptor, TLRs)和胞质受体家族核苷结合寡聚结构域(nucleotide-binding oligomerization domain, NODs)及其下游炎症因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)/白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)基因表达的影响。通过 Western blot 检测朱砂七对 AT- II 细胞模式识别受体 MAPK 和核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)蛋白表达水平的影响。**结果:**朱砂七组 AT- II 细胞的 MRSA 侵入数量

(471.57 ± 34.32)明显低于模型组(1014.54 ± 127.51 , $P < 0.05$)和阳性对照组(810.05 ± 101.33 , $P < 0.05$)。朱砂七组 MRSA 感染 AT- II 细胞纤粘连蛋白吸附比例(0.25 ± 0.01)明显低于模型组(1.04 ± 0.12 , $P < 0.05$)和阳性对照组(0.74 ± 0.07 , $P < 0.05$)。RT-PCR 结果显示, MRSA 可明显升高 AT- II 细胞 TLR2、NOD2 及其下游炎症因子 IL-6、TNF- α ($P < 0.05$), 朱砂七可降低其升高水平 ($P < 0.05$)。Western blot 检测结果表明, 朱砂

作者介绍:曹兰秀, Email: caolanxiu66@163.com,

研究方向: 配伍对中药功效的靶向控制作用。

基金项目:陕西省科技厅专项科研资助项目(编号:2017JM8021); 陕西省教育厅自然专项科研资助项目(编号:2010JK476); 陕西省中管局资助项目(编号:2009jc67)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190222.0852.008.html>
(2019-02-22)

国医药指南, 2012, 10(15): 293-294.

[2] Wang H, Li M, Liu J, et al. *Toxoplasma gondii* infection induces high mobility group box 1 released from mouse macrophages[J]. Front Microbiol, 2017, 8: 658.

[3] Parlog A, Schluter D, Dunay IR, et al. *Toxoplasma gondii*-induced neuronal alterations[J]. Parasite Immunol, 2015, 37(3): 159-170.

[4] Tedford E, McConkey G. Neurophysiological changes induced by chronic *Toxoplasma gondii* infection[J]. Pathogens, 2017, 6(2): E19.

[5] 王大为, 郭晓改, 司海洋, 等. 弓形虫感染治疗方法的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016, 59(5): 54-57, 61.

[6] 姜 宏, 闻良珍, 凌霞珍, 等. 乙酰螺旋霉素治疗孕期弓形虫感染 62 例临床疗效观察[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2000, 16(2): 107-108.

[7] Babaie J, Sayyah M, Gharagozli K, et al. Seroepidemiological study of *Toxoplasma gondii* infection in a population of Iranian epileptic patients[J]. EXCLI J, 2017, 16: 256-264.

[8] 刘 建, 胡 薇, 徐 斌, 等. 金诺芬抗日本血吸虫活性机制及其细胞毒性的探讨[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2012, 30(6): 450-454.

[9] 邓远斐, 王江林, 李 丹, 等. 大麻素受体激动剂 WIN55,212-2 联合金诺芬对人肝癌细胞 HepG2 增殖与凋亡的影响[J]. 广东医学, 2016, 54(8): 1109-1112.

[10] 宋丽君, 曾慧慧, 余传信, 等. 几种药物对体外培养日本血吸虫成虫毒性作用的研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2011, 23(1): 54-60, 112.

[11] Subauste CS. Autophagy in immunity against *Toxoplasma gondii* [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2009, 335: 251-265.

[12] 黄永宣, 李 娟, 付亚芬, 等. 宿主细胞自噬与胞内寄生虫感染相互作用研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39(9): 770-773.

[13] Juuti-Uusitalo K, Koskela A, Kivinen N, et al. Autophagy regulates proteasome inhibitor-induced pigmentation in human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelial cells[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(5): E1089.

[14] Gao D, Zhang J, Zhao J, et al. Autophagy activated by *Toxoplasma gondii* infection in turn facilitates *Toxoplasma gondii* proliferation [J]. Parasitol Res, 2014, 113(6): 2053-2058.

[15] 王正印, 汪学龙. 细胞自噬与胞内感染病原体相互作用的研究[J]. 热带病与寄生虫学, 2015, 13(4): 256-259, 262.

[16] 张 琼, 张 婧, 高劲松, 等. 自噬调控剂对小鼠体内弓形虫增殖的影响[J]. 数理医药学杂志, 2016, 29(3): 319-321.

[17] 张 婧, 高冬梅, 汪学龙, 等. 调控宿主细胞自噬对弓形虫在宿主细胞内增殖的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2015, 61(3): 290-293.

[18] Caroli A, Simeoni S, Lepore R, et al. Investigation of a potential mechanism for the inhibition of SmTGR by Auranofin and its implications for Plasmodium falciparum inhibition[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 417(1): 576-581.

[19] Feustel SM, Meissner M, Liesenfeld O. *Toxoplasma gondii* and the blood-brain barrier[J]. Virulence, 2012, 3(2): 182-192.

(责任编辑: 张辉洁)

七可以明显下调 MAPK 和 NF- κ B 信号通路蛋白表达($P<0.05$)。结论:朱砂七可以拮抗耐药金黄色葡萄球菌,该作用可能涉及 MAPK 和 NF- κ B 信号通路,进而调控 TLRs/NLRs 模式识别受体及其下游炎症因子 TNF- α /IL-6。

【关键词】朱砂七;耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;模式识别受体;NOD 样受体;核因子- κ B

【中图分类号】R392.6

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-09-17

Antagonistic effect of *Polygonum cillinerve* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its immunoregulatory mechanism: An experimental study

Cao Lanxiu¹, Lü Juan², Zhao Xian¹, Wang Jiang¹, Ma Li¹

(1. Teaching and Research Section of Prescription Science, School of Basic Medical Sciences;

2. Teaching and Research Section of Chinese Medicine Science,

Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine)

【Abstract】**Objective:** To investigate whether *Polygonum cillinerve* can antagonize methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) using a multilevel evaluation system and the immunoregulatory mechanism of its antagonistic effect. **Methods:** Tube double dilution was used to perform drug sensitivity test to observe the inhibitory effect of *Polygonum cillinerve* on the growth of *Staphylococcus aureus* and whether *Polygonum cillinerve* can affect the invasion of MRSA in host cells. Fibronectin adhesion test was used to evaluate the influence of *Polygonum cillinerve* on bacterial adhesion. Real-time PCR was used to analyze the effect of *Polygonum cillinerve* on the mRNA expression of Toll-like receptors (TLRs), nucleotide-binding oligomerization domains (NODs), and downstream inflammatory factors tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in AT-II cells. Western blot was used to investigate the effect of *Polygonum cillinerve* on the protein expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) in AT-II cells. **Results:** The *Polygonum cillinerve* group had a significantly lower number of AT-II cells with MRSA invasion than the model group and the positive control group (471.57 ± 34.32 vs. $1\ 014.54 \pm 127.51/810.05 \pm 101.33$, $P<0.05$), as well as a significantly lower fibronectin adsorption ratio in AT-II cells infected with MRSA (0.25 ± 0.01 vs. $1.04 \pm 0.12/0.74 \pm 0.07$, $P<0.05$). Real-time PCR showed that MRSA significantly increased the levels of TLR2, NOD2, and downstream inflammatory factors TNF- α and IL-6 ($P<0.05$), while *Polygonum cillinerve* significantly reduced their levels ($P<0.05$). Western blot showed that *Polygonum cillinerve* significantly downregulated the expression of the proteins involved in the MAPK and NF- κ B signaling pathways ($P<0.05$). **Conclusion:** *Polygonum cillinerve* can antagonize MRSA, and the MAPK and NF- κ B signaling pathways might be involved in this process. It further regulates the pattern recognition receptors TLRs/NOD-like receptors and the downstream inflammatory factors TNF- α and IL-6. **Key words:** *Polygonum cillinerve*; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; pattern recognition receptor; nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor; nuclear factor- κ B

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的耐药性问题已经引起了广泛关注^[1-3]。研究报道显示金黄色葡萄球菌对青霉素的3年耐药率均大于90.00%,对红霉素3年耐药率平均约70.00%,对左氧氟沙星的耐药率平均约50.00%,对甲氧苄啶的耐药率也逐渐增加^[4]。针对金黄色葡萄球菌的耐药性问题,有学者通过在基因水平监测其可能的耐药基因,结果发现金黄色葡萄球菌的耐药基因以 tetK 及 mecA 为主^[4-5]。

朱砂七产自秦岭太白山,多生长于草滩、山坡等环境,分布广泛^[6]。其对金黄色葡萄球菌、白色葡

萄球菌、福氏痢疾杆菌、大肠埃希菌、绿脓杆菌等均有抗菌作用的报道,具有广谱抗菌特性^[7-8],研究发现朱砂七的抗菌活性强于黄连和地丁,用朱砂七抗炎^[9]、抗肿瘤^[10]、抗氧化^[11-12]、治疗单纯疱疹^[13]等,具有较好的疗效。与西药抗菌药物不同,中药抗菌药物具有多途径、多靶点、多组分的特点^[14-15]。因此在细菌耐药性方面具有明显的优势。针对目前我国金黄色球菌以及其他多种细菌耐药性的严峻形势,开展有特点、疗效确切、不易产生耐药性的中药研究,可以为缓解细菌耐药性问题提供新的思路。

在固有免疫和感染过程中,模式识别受体(pat-

tern recognition receptors, PRR)起着重要的作用,其中 NOD 样受体(nucleotide binding oligomerization domain-like receptors, NLR)和 Toll 样受体(Toll like receptors, TLR)分别作为胞内以及胞外模式识别受体,近年来得到越来越多的关注。本文从朱砂七对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)的体外生存到对 MRSA 感染 AT-Ⅱ的保护作用及其机制进行探讨,以明确朱砂七是否拮抗金黄色葡萄球菌耐药性,及其拮抗作用是否与 TLRs 和 NODs 受体相关。

1 材料与方法

1.1 实验材料

朱砂七(北京同仁堂有限责任公司)水提醇沉,滤膜过滤除菌,置于-20℃冰箱保存待用。药物敏感试验检测采用营养肉汤。固体培养基为营养肉汤中添加 2%琼脂粉。羊血清购自杭州四季青生物制品公司,RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司,纤粘连蛋白购自美国 Sigma;Trizol 购自加拿大 Bio Basic Inc,Ready-to-Use PCR Kit 购自上海生工生物工程技术服务有限公司;MMLV first strand cDNA synthesis kit 购自加拿大 Bio Basic 公司;DEPC 购自北京康为试剂有限公司;戊二醛结晶紫、庆大霉素、琼脂糖、溴化乙锭均购自 Thermo fisher;GAPDH、MAPK 和 NF- κ B 抗体购自 Abcam。

1.2 金黄色葡萄球菌的鉴定和培养

本次实验选用的菌为临床致病菌,获得后命名 09-44,菌株由中国医学科学院药理毒理研究室惠赠,经过药物敏感性实验鉴定为青霉素耐药菌($MIC_{50}=32$ mg/L, $MIC_{90}=128$ mg/L, MIC 范围为 32~256 mg/L)。将菌株划线接种于含有甘露醇高盐琼脂的平板中,并挑取单菌落,接种在营养琼脂的斜面。挑取一环菌接种于营养肉汤,37℃、150 r/min 恒温摇床摇菌培养过夜(18~20 h,根据预实验情况而定),转接 100 μ L 培养物于新鲜培养基中同条件培养约 2 h,细菌处于对数生长期,吸光度(absorbance, A)值为 0.1~0.2(约 10^8 CFU/mL)。收集培养后的菌液,在 6 000 r/min 条件下离心约 5 min,弃上清,用 PBS 洗涤 1~2 次,RPMI1640 培养基重悬,并稀释至加药实验所需的浓度后,保存待用。

1.3 AT-Ⅱ细胞培养和保存

大鼠腹腔注射水合氯醛麻醉,手术部位用碘伏消毒,打开胸腔,去除心包膜,在靠近右心室部位打开 1~2 cm,将灌注针从开口处插入大鼠肺动脉灌注肺泡灌洗液Ⅱ。气管通气 8~10 次后,用灌洗液Ⅰ、Ⅱ灌经气管插管冲洗肺部位,灌洗液Ⅱ灌洗大鼠胸腔。并取出心、肺、气管,经气管插管注入胰酶 8~10 mL 消化细胞。再去除心脏及其周围大气管,将大鼠

肺组织在 37℃水浴锅中放置约 20 min。在含有 DNase 的 2 mL 细胞分散液中将组织轻轻剪碎至约 1 cm³ 大小,避免用力过度产生的机械损伤。加入 2.5 mL FBS,再用补灌洗液Ⅱ补足至 10 mL,并在 37℃恒温摇床中放置 5 min,经 200 目筛网过滤后,于 800 r/min 条件下离心 5 min,弃上清。无血清 RPMI1640 培养基重悬所得细胞,吹打混匀后将重悬液加入已用大鼠 IgG 预包被处理后的细胞培养皿中,于 37℃恒温培养约 3 h。收集细胞悬液,于 800 r/min 条件下离心 10 min,弃上清。用无血清 RPMI1640 洗涤 1~2 次,并用细胞培养液重悬,细胞接种于培养瓶中。在 37℃恒温、5% CO₂ 环境下继续培养。

1.4 药物敏感实验

用试管二倍稀释法检测药物敏感实验。具体条件如下:朱砂七提取物以 MH 肉汤培养基溶解,首先配制 128 g/L 稀释母液,并用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌,用 MH 肉汤为稀释液将母液进行等倍稀释,具体浓度为 64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.125、0.06、0.03、0.015、0 g/L,每个浓度的终体积为 3~5 mL,各 4 个复孔。挑取金黄色葡萄球菌一环接种于营养肉汤,37℃150 r/min 摇床培养过夜 18~20 h,转接 100 μ L 培养物于新鲜 MH 培养基中在同一条件下培养约 2 h,细菌处于对数生长期, $A_{600nm}=0.1\sim0.2$ 。菌液以 MH 肉汤稀释 1 000 倍,每试管加入 0.1 mL(终浓度约 0.5×10^5 CFU/mL),加入药物及金葡萄菌的试管于 37℃静置培养 18~22 h,肉眼观察试管是否澄清,计算最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC),质控菌株同法操作,结果与美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)标准加以对照。

1.5 侵入实验

取 AT-Ⅱ细胞接种于 24 孔板,贴壁培养约 36 h。共设 4 组:正常组(NS)、MRSA 组、朱砂七(PC, 2 g/L)+MRSA 组、青霉素(PG, 200 mg/L)+MRSA 组,试验开始前约 16 h,将维持液替换掉生长液,将按照上述处理过的细菌和细胞混合液(10:1)进行侵染,置 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中侵袭 2 h。弃上清液,细胞用 PBS 洗涤 2~3 次,以去除未粘附的细菌,并加入 RPMI1640 维持液(含有 100 mg/L 庆大霉素)1 mL,37℃培养 60 min,杀死未侵入细胞的细菌。被细菌侵染的细胞以 PBS 洗涤 3 次,加入 1 mL 胰酶(0.25%),在 37℃条件下孵育 10 min,再加入 100 μ L 的 TritonX-100,充分摇晃涡旋 15~30 s。取细胞裂解液 10 倍系列稀释,涂布于营养琼脂平板,倒置培养在 37℃条件下 12~16 h 后计数,比较各组侵入细菌数目。

1.6 纤粘连蛋白粘附实验

取 AT-Ⅱ细胞接种于 96 孔板。共设 4 组:正常组(NS)、MRSA 组、朱砂七(PC, 2 g/L)+MRSA 组、青霉素(PG, 200 mg/L)+MRSA 组。纤粘连蛋白 Fn 用 PBS 溶液稀释至 40 μ g/mL, 0.22 μ m 微孔滤膜除菌过滤后,加入 96 孔板中,其中每孔加入 200 μ L,于室温条件下过夜。次日,弃蛋白上清,剩余未结

合位点以 50 μ L, 10% 羊血清 37 $^{\circ}$ C 封闭 60 min, PBS 洗涤 3 次, 加入各组药物培养过夜 (16~18 h), 处理细菌使每孔约 1×10^7 个细菌, 37 $^{\circ}$ C 培养 60 min。PBS 洗涤 3 次, 用 2% 戊二醛溶液固定约 60 min, 再用 0.5% 结晶紫染色 5~6 min。染色后使用无菌水溶液洗涤 3 次, 在室温条件下风干, 各组样品的 A 值用酶标仪测定。并设阴性对照 (未加细菌)。吸附值 (A) = (实际测定 A 值 - 阴性对照孔 A 值) $\times$ 100%。

1.7 RT-PCR

AT-II 细胞共分 4 组: 正常组 (NS)、MRSA 组、朱砂七 (PC, 2 g/L)+MRSA 组、青霉素 (PG, 200 mg/L)+MRSA 组。AT-II 细胞 (朱砂七+MRSA 组及青霉素+MRSA 组同时加入相应药物共培养) 后加 1 mL Trizol 匀浆, 转移至 1.5 mL 无菌离心管。所收集细胞按照 5×10^6 个细胞加入 1 mL Trizol, 再加 200 μ L 氯仿至 1.5 mL 离心管中, 按照常规方法制备细胞总 RNA, 并检测 RNA 纯度, $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ 应为 1.8~2.0。试验所用引物 mRNA 由北京生工生物工程技术有限公司合成, 使用前以双蒸水配为 10 μ mol/L, 各引物序列见表 1。利用 AB applied biosystem 全自动 PCR 仪进行梯度温度反应设置。PCR 反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C 预热 5 min; 94 $^{\circ}$ C 下变性 45 s, 60 $^{\circ}$ C 条件退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 总计 40 个循环; 再 72 $^{\circ}$ C 条件下 10 min。

表 1 PCR 各基因的引物序列和名称

基因名称	序列号	引物序列	Tm ($^{\circ}$ C)
TLR2	NM-011905	5'-TTTACCACTGCCCGTAGAT-3' 5'-TTCGCAGGAGCAAACAACT-3'	57.8
NOD2	NM-145857	5'-CCGTGTGCTTTAACCTTTG-3' 5'-AGGATCAGCAGGTACATGTC-3'	55.8
TNF- α	NM-027113	5'-TTAGATCTGCCCGTAGAT-3' 5'-AGTTCCGCAAGGACAAACT-3'	64.0
IL-6	NM-008237	5'-CCGTGTGCTTTAACCTTTG-3' 5'-CATATCAGCAAGGGTAGTC-3'	60.5
GADPH	NM-008085	5'-CCATGCCATCACTGCCACTCAGAAGAC-3' 5'-GAGCGGCTCTCTTGTCTCTCAGTATC-3'	66.5

1.8 Western blot

AT-II 细胞共分 4 组: 正常组 (NS)、MRSA 组、朱砂七 (PC, 2 g/L)+MRSA 组、青霉素 (PG, 200 mg/L)+MRSA 组。MRSA 组加入金黄色葡萄球菌感染, PC+MRSA 组加入朱砂七共培养, PG+MRSA 组加入青霉素共培养。各组共培养 12 h 后, 用 RIPA (含 1% 蛋白酶抑制剂) 提取总蛋白, BCA 法定量。用 PBS 调均后, 99 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 于 -20 $^{\circ}$ C 保存待用。配 10% 分离胶 (康为试剂) 蛋白取样品 10 μ L 上样, 进行 SDS-PAGE 电泳, 70 V、约 20 min 后调整至 120 V, 300 mA 转膜约 1 h, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 3 h。TBST 洗膜 3 次, 5 min/次, 加入一抗 GAPDH (1:2 000, Abcam)、MAPK (1:1 000,

Abcam)、NF- κ B (1:1 000, Abcam), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜 12~16 h。TBST 洗膜 3 次, 5 min/次。室温条件下与二抗孵育 1 h, 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体 (1:3 000) (Abcam, USA), TBST 洗膜 3 次, 5 min/次, 显影。

1.9 统计学处理

得到的全部数据均采用 SPSS18.0 软件进行统计分析。计量资料结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD- t 法, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 MRSA 对朱砂七敏感性评价

通过试管二倍稀释法检测得到朱砂七最低抑菌浓度为 0.5 g/L, 显示出很好的抑制作用。说明对青霉素耐药的 MRSA 对朱砂七依然较为敏感。

2.2 朱砂七减少 MRSA 对 AT-II 细胞的侵入

PC+MRSA 组和 PG+MRSA 组均可降低 MRSA 对 AT-II 细胞侵入 ($P<0.05$), 但是实验条件下, PG+MRSA 组抑制作用较低, PC+MRSA 组抑制效果更明显, 侵入活菌数量明显低于 PG+MRSA 组 ($P=0.010$)。具体数据见表 2。

表 2 朱砂七对 MRSA 感染 AT-II 细胞侵入和纤粘连蛋白的影响

组别	侵入活菌数量	吸附比例 (%)
NS组	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
MRSA组	1 014.54 $\pm$ 127.51 ^a	1.04 $\pm$ 0.12
PC+MRSA组	471.57 $\pm$ 34.32 ^{ab}	0.25 $\pm$ 0.01 ^a
PG+MRSA组	810.05 $\pm$ 101.33 ^{abc}	0.74 $\pm$ 0.07 ^{ab}
<i>F</i> 值	15.430	8.180
<i>P</i> 值	0.000	0.020

注: 侵入活菌数量指标: a, 与 NS 比较, $P<0.05$; MRSA, $P=0.000$; PC+MRSA, $P=0.000$; PG+MRSA, $P=0.000$; b: 与 MRSA 比较, $P<0.05$; PC+MRSA, $P=0.000$; PG+MRSA, $P=0.030$; c: 与 PC+MRSA 比较, $P<0.05$; PG+MRSA, $P=0.010$;

吸附比例指标: a, 与 MRSA 比较, $P<0.05$; PC+MRSA, $P=0.01$; PG+MRSA, $P=0.04$; b: 与 PC+MRSA 比较, $P<0.05$; PG+MRSA, $P=0.020$

2.3 朱砂七降低对 MRSA 纤粘连蛋白的粘附

作为胞外主要基质之一, 纤粘连蛋白是 MRSA 结合的主要位点。通过纤粘连蛋白粘附实验考察朱砂七对 MRSA 感染 AT-II 细胞吸附作用的影响, 结果发现, PC+MRSA 组和 PG+MRSA 组均可降低 MRSA 感染 AT-II 细胞的吸附作用 ($P=0.010$, $P=0.040$), 由于本次选取的为耐药菌株, PG+MRSA 组抑制作用较低, 与 PG+MRSA 组比较, PC+MRSA 组具有更强的抑制作用, 吸附比例更低 ($P=0.020$)。具体数据见表 2。

2.4 朱砂七对 MRSA 感染 AT-II 细胞 TLR2、NOD2 受体及下游炎症因子 TNF- α /IL-6 的 mRNA 表达水平的影响

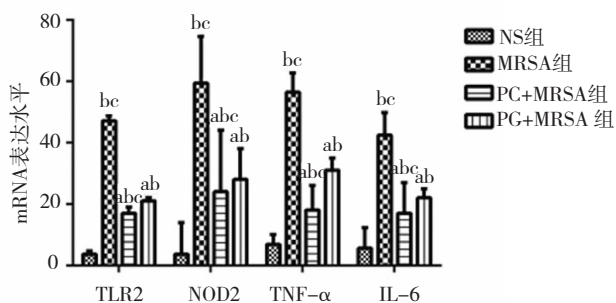
与 NS 组比较, MRSA 组 TLR2、NOD2 及其下游炎症因子 IL-6、TNF- α 均有明显上升 ($P<0.05$), PG+MRSA 组、PC+

表 3 朱砂七对 MRSA 感染 AT-Ⅱ 细胞 TLR2、NOD2、TNF- α 、IL-6 的 mRNA 表达水平的影响 ($n=6$)

组别	TLR2	NOD2	TNF- α	IL-6
NS组	3.63 $\pm$ 1.12	3.71 $\pm$ 1.62	6.88 $\pm$ 2.33	5.66 $\pm$ 1.21
MRSA组	47.13 $\pm$ 10.23 ^{bc}	59.34 $\pm$ 15.23 ^{bc}	56.44 $\pm$ 20.8 ^{bc}	42.44 $\pm$ 10.57 ^{bc}
PC+MRSA组	17.12 $\pm$ 3.22 ^{abc}	24.54 $\pm$ 6.33 ^{abc}	18.71 $\pm$ 8.12 ^{abc}	17.88 $\pm$ 4.90 ^{abc}
PG+MRSA组	21.43 $\pm$ 6.67 ^{ab}	28.42 $\pm$ 7.32 ^{ab}	31.00 $\pm$ 10.20 ^{ab}	22.92 $\pm$ 3.53 ^{ab}
<i>F</i> 值	18.103	22.596	26.005	21.146
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注:a,与 MRSA 比较, $P<0.05$;b:与 NS 比较, $P<0.05$;c:与 PG+MRSA 比较, $P<0.05$

MRSA组可明显降低该上升趋势($P<0.05$)。PC+MRSA 组相比 PG+MRSA 组降低该趋势作用更加明显($P<0.05$)。见图 1、表3。

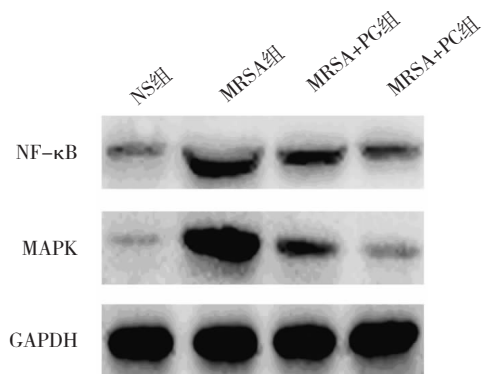


a: 与 MRSA 比较, $P<0.05$;b: 与 NS 比较, $P<0.05$;c: 与 PG+MRSA 比较, $P<0.05$

图 1 朱砂七对 MRSA 感染 AT-Ⅱ 细胞 TLR2、NOD2、TNF- α 、IL-6 的 mRNA 表达水平的影响 ($n=6$)

2.5 朱砂七对 MRSA 感染 AT-Ⅱ 细胞 MAPK、NF- κ B 蛋白表达水平的影响

与 NS 组比较,MRSA 模型组 MAPK、NF- κ B 明显上升($P<0.05$),PG+MRSA 组、PC+MRSA 组可明显降低该上升趋势,MAPK、NF- κ B 通路在蛋白水平变化较为明显($P<0.05$)。且 PC+MRSA 组相比 PG+MRSA 组降低趋势更加明显($P<0.05$),见图 2、表 4。

图 2 朱砂七对 MRSA 感染 AT-Ⅱ 细胞 MAPK、NF- κ B 蛋白表达水平的影响表 4 朱砂七对 MRSA 感染 AT-Ⅱ 细胞 MAPK、NF- κ B 蛋白表达水平的影响

组别	NF- κ B/GAPDH	MAPK/GAPDH
NS组	0.13 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.02
MRSA组	0.78 $\pm$ 0.12 ^{bc}	1.12 $\pm$ 0.26 ^{bc}
PC+MRSA组	0.31 $\pm$ 0.08 ^{abc}	0.18 $\pm$ 0.06 ^{abc}
PG+MRSA组	0.45 $\pm$ 0.10 ^{ab}	0.30 $\pm$ 0.09 ^{ab}
<i>F</i> 值	14.093	20.341
<i>P</i> 值	0.000	0.000

注:a,与 MRSA 比较, $P<0.05$;b:与 NS 比较, $P<0.05$;c:与 PG+MRSA 比较, $P<0.05$

3 讨论

多种原因形成的金黄色葡萄球菌耐药性问题是临床治疗 MRSA 感染性疾病面临的难题^[4-5]。针对该问题,临床治疗金黄色葡萄球菌感染性疾病时常根据药敏试验结果选用相应的抗生素,以延缓金黄色葡萄球菌耐药性的产生,但这并不能很好地解决这一难题,耐药性形势依然很严峻。新的耐药菌的出现总伴随着新一代抗生素的应用。但是,目前几乎所有基于单靶点研究发明的抗生素均出现了相应的耐药菌,而中药作用机制的多靶点、多途径特点发挥了重要功能。两种不同机制或者不同作用靶点的药物联用情况下,细菌必须同时发生 2 次突变才可生长。本研究结果显示朱砂七可拮抗金黄色葡萄球菌耐药性,与普通的抗生素治疗方案(包括联合治疗)相比,具有抗菌成分相互协同的功能,在保留了较好抗菌效果的基础上,可以很好地拮抗金黄色葡萄球菌耐药性,具有非常显著的优势。进一步研究发现这种拮抗作用可能是通过调控 TLRs 和 NODs 受体及其下游的炎性因子来实现的。TLR 是 LPS 的主要识别受体,LPS 是革兰阴性细菌外膜的

共同成分,具有很强的刺激免疫能力。TLRs/NODs 模式识别受体在包括 MRSA 在内的多种细菌对宿主动物及细胞的感染过程中起到关键作用,可激发机体的固有免疫并抑制下游的炎症因子 TNF- α 表达^[7]。而 TNF- α 作为重要的调控因子参与炎症反应的多个环节,与 IL-1/IL-6 的形成过程有关。有学者^[15]将金黄色葡萄球菌滴鼻接种后,C57BL/6J 小鼠肺组织 TLR2 和 NOD2 蛋白表达水平明显升高,并且上调 TLR2 和 NOD2 的 mRNA 表达,说明金黄色葡萄球菌感染后 TLRs 和 NODs 受体可能受到一定程度的影响。综上,朱砂七拮抗耐药金黄色葡萄球菌感染 AT-II 并抑制下游炎症因子 TNF- α 、IL-6 的表达,且该作用可能与抑制 TLRs 和 NODs 受体进一步激发机体的固有免疫调控有关。

另外,MAPK、NF- κ B 信号通路是生物体内重要的分子通路,参与多种细胞生长、分化、肿瘤形成、炎症形成和发展过程,有研究报道金黄色葡萄球菌耐药性涉及 MAPK、NF- κ B 信号通路的多环节^[16-17]。本研究结果显示朱砂七可明显降低 MRSA 感染的 AT-II 细胞 MAPK、NF- κ B 蛋白表达水平,提示朱砂七对 TLRs 和 NODs 受体及下游炎症因子 TNF- α 、IL-6 的调控作用可能与 MAPK、NF- κ B 信号通路相关。

本文在整体、细胞和分子水平进行初步研究,有助于认识朱砂七拮抗 MRSA 及其耐药性作用靶点的调控机制。开展对中药朱砂七抗菌作用的机制及其作用靶点的深入研究,从本质上明确多组分、多靶点、多途径的作用方式,可更清晰地认识朱砂七及其组分配伍抗菌作用的机制。当然,目前本课题组研究的覆盖面依然很窄,下一步还将在动物水平继续评价朱砂七对 TLRs/NODs 模式识别受体及其下游炎症因子 TNF- α 、IL-6 的调控作用。

参 考 文 献

[1] Eby JC, Richey MM, Platts-Mills JA, et al. A Healthcare improvement intervention combining nucleic acid microarray testing with direct

physician response for management of Staphylococcus aureus bacteremia[J]. Clin Infect Dis, 2018, 66(1): 64-71.

[2] Pauchard LA, Blot M, Bruyere R, et al. Linezolid and atorvastatin impact on pneumonia caused by Staphylococcus aureus in rabbits with or without mechanical ventilation[J]. PLoS One, 2017, 12(11): e0187187.

[3] Kerremans JJ, Goessens WH, Verbrugh HA, et al. Rapid identification of Staphylococcus aureus in positive-testing blood cultures by slidex staph plus agglutination test[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(1): 395.

[4] 沈林海, 赵 岚, 谢利军, 等. 金黄色葡萄球菌的耐药性分析与基因分型研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(11): 2408-2410.

[5] 袁文常. 金黄色葡萄球菌适应性耐药及 MRSA 耐药调控机制的研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2013.

[6] 王晓梅, 袁菊莉. 朱砂七提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 化学与生物工程, 2011, 28(10): 32-34.

[7] 姬丽娜. 朱砂七多糖的体外抑菌作用及对小鼠免疫功能的影响[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2013.

[8] Wu Y, Wang X, Liu P, et al. Quantitative determination of anthraquinones and resveratrol in Polygonum cillinerive (Nakai) Ohwi by HPLC-PAD[J]. J AOAC Int, 2017, 100(1): 25-29.

[9] 王晓梅, 袁菊莉, 李 健, 等. 朱砂七及其提取物的抗炎作用研究[J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(5): 48-50.

[10] 赵 勤, 郭惠玲, 郭 玲, 等. 朱砂七总蒽醌抗肿瘤的实验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(8): 1222-1224.

[11] 王晓梅, 李宗孝, 任莉君. 朱砂七多糖的抗氧化作用研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(34): 19346-19347.

[12] 王晓梅, 赵立芳, 支娟娟, 等. 朱砂七总鞣质的提取及抗氧化活性研究[J]. 化工时刊, 2011, 25(1): 25-28.

[13] 赵 勤, 冯宝平, 胡 锐, 等. 朱砂七抗 II 型单纯疱疹病毒的体外研究[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(3): 79-81.

[14] 王振苗. 苦苣菜水提物的抗炎作用及其作用机制研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015.

[15] Cui JJ, Yuan JF, Zhang ZQ. Anti-oxidation activity of the crude polysaccharides isolated from Polygonum cillinerive (Nakai) Ohwi in immunosuppressed mice[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 132(2): 512-517.

[16] Zhang TZ, Yang SH, Yao JF, et al. Sangxingtang inhibits the inflammation of LPS-induced acute lung injury in mice by down-regulating the MAPK/NF- κ B pathway[J]. Chin J Nat Med, 2015, 13(12): 889-895.

[17] Ye J, Piao H, Jiang J, et al. Polydatin inhibits mast cell-mediated allergic inflammation by targeting PI3K/Akt, MAPK, NF- κ B and Nrf2/HO-1 pathways[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 11895.

(责任编辑: 冉明会)