

# 黄芩素抑制金黄色葡萄球菌生物被膜的形成

张洺嘉, 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** 细菌生物被膜的形成是导致细菌耐药和引起持续性感染的主要原因之一。本文通过检测黄芩素对金黄色葡萄球菌 26112 菌株 (*Staphylococcus aureus* 26112, SA26112) 多糖细胞间黏附素 (polysaccharide intercellular adhesion, PIA) 的合成和胞外 DNA (extracellular DNA, eDNA) 释放量的影响, 及其对 *icaA* 和 *cidA* 基因表达量的影响, 探讨黄芩素对金黄色葡萄球菌生物被膜形成的抑制作用及其机制。结果显示, 黄芩素能抑制 SA26112 生物被膜的形成, 其抑杀 SA26112 的最低抑菌浓度和最低杀菌浓度均为 0.04 mg/mL。0.16 mg/mL 黄芩素和 256  $\mu$ g/mL 环丙沙星单独作用时, 均不能杀死其成熟生物被膜内的 SA26112 细菌, 而当二者联用时则可杀死成熟生物被膜内的细菌。黄芩素能显著抑制 SA26112 菌株 PIA 的合成、eDNA 的释放量及 *icaA* 和 *cidA* 基因的相对表达量。其中, 0.04 mg/mL 黄芩素作用 SA26112 菌株 24 h, 与对照组相比, eDNA 的释放量减少 97%, *icaA* 和 *cidA* 基因的相对表达量分别减少 62% 和 41%。上述结果表明, 黄芩素能抑制 SA26112 菌株生物被膜的形成, 其作用机制可通过降低 *icaA* 和 *cidA* 的基因表达量, 进而影响 PIA 的合成和 eDNA 的释放, 来抑制金黄色葡萄球菌生物被膜的形成。

**关键词** 生物被膜; 金黄色葡萄球菌; 黄芩素

**中图分类号** Q936

## Inhibition of *Staphylococcus aureus* Biofilm by Baicalein

ZHANG Ming-Jia, XIE Ming-Jie\*

(School of Life Sciences, Liaoning Normal University, Key Laboratory of Biotechnology and Drug Discovery of Liaoning Province, Dalian 116081, Liaoning, China)

**Abstract** The formation of bacterial biofilm is one of the main causes of bacterial resistance and persistent infection. This article aim to investigate the inhibitory effects and mechanisms of baicalein on *Staphylococcus aureus* biofilm formation by detecting the effects of baicalein on the synthesis of polysaccharide intercellular adhesion (PIA), release of extracellular DNA (eDNA) and expression of *icaA* and *cidA* genes in 26112 *Staphylococcus aureus* strains (SA26112). The results showed that baicalein could inhibit the formation of biofilm SA26112, and both the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of SA26112 biofilm were 0.04 mg/mL. The application of either 0.16 mg/mL of baicalein or 256  $\mu$ g/mL of ciprofloxacin could not destroy the SA26112 bacteria with mature biofilm when they were used separately, but it was effective when they were used in combination. Baicalein can significantly inhibited PIA synthesis, eDNA release and the expression of *icaA* and *cidA* of SA26112 strain. After treating SA26112 strain with 0.04 mg/mL of baicalein for 24 hours, the levels of released eDNA and the relative expression of *icaA* and *cidA* were reduced by 97%, 62% and 41%,

收稿日期: 2017-12-27; 修回日期: 2018-01-24; 接受日期: 2018-01-30

辽宁省大学生创新创业训练计划项目 (No. 201710165000223) 和辽宁省自然科学基金项目 (No. 201602462) 资助

\* 通讯作者 Tel: 13478958825; E-mail: xmjl222@sina.com

Received: December 27, 2017; Revised: January 24, 2018; Accepted: January 30, 2018

Supported by Liaoning Province College Students Innovation and Entrepreneurship Training Program (No. 201710165000223); Natural Science Foundation of Liaoning Province (No. 201602462)

\* Corresponding author Tel: 13478958825; E-mail: xmjl222@sina.com

respectively, when compared with control group. The above results show that baicalein can inhibit the biofilm formation of SA26112 strain by reducing the expression of *icaA* and *cidA* genes thereby affecting the PIA synthesis and the eDNA release.

**Key words** biofilm; *Staphylococcus aureus*; baicalein

细菌的耐药性问题是目前医学界面临的严峻问题。其中,细菌生物被膜(bacterial biofilm, BF)的形成是导致细菌耐药和引起持续性感染的主要原因之一。据报道,大约80%的细菌性感染疾病的发生和发展都与被膜的形成密切相关<sup>[1]</sup>。生物被膜是细菌自身分泌的胞外基质相互黏连形成的有特定结构和功能的细胞群体<sup>[2, 3]</sup>。生物被膜的主要成分包括胞外多糖、蛋白质和胞外DNA(extracellular DNA, eDNA)等<sup>[4]</sup>。其中,多糖细胞间黏附素(polysaccharide intercellular adhesion, PIA)是葡萄球菌被膜形成中的重要因子,在BF形成的黏附和聚集阶段发挥重要作用。PIA缺乏,其菌株间的相互黏附能力大大下降,无法形成正常的被膜。PIA的合成与 $ica$ 操纵子的调控有关<sup>[5]</sup>。eDNA在葡萄球菌的生物被膜形成过程中也发挥重要作用,它主要在被膜形成的初始黏附阶段起连接作用,在成熟被膜形成中发挥维持和稳定生物被膜结构的作用。细菌细胞的死亡和溶解是eDNA释放的基础。其中, $cid$ 操纵子参与调控葡萄球菌的死亡、溶解以及eDNA的释放<sup>[6]</sup>。由于细菌形成被膜后其耐药性极强,难以彻底清除,因此是临床治疗上的一大难题。

中药由于具有来源广泛、价格低、毒副作用小、不易产生耐药性和作用靶位多等优点,在慢性感染的治疗中充分显示了其独特的优势。研究发现,一些中药单体化合物,如穿心莲内酯、桃柁酚、黄芩素和厚朴酚等对生物被膜的形成有显著的抑制作用<sup>[7, 8]</sup>。本文以传统中药黄芩素为实验材料,通过研究其对供试金黄色葡萄球菌生物被膜的主要成分PIA的合成和eDNA释放量的影响,来探讨其抑制金黄色葡萄球菌生物被膜形成的作用机制,旨在为临床药物的开发提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

金黄色葡萄球菌(SA26112、SA1066、SA1828、SA41573、SA3002、SA25923、SA1997)由大连市中心医院检验科提供。阴性对照菌株表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis* ATCC12228)购于中国医学菌种保藏中心。培养基为含5%的葡萄糖LB液

体培养基,刚果红固体培养基。黄芩素标准品(纯度 $\geq 98\%$ ),购于成都曼斯特生物科技有限公司;环丙沙星购于上海生工生物工程有限公司;PCR反应液,DNA Marker DL2000等购于大连宝生物公司。IECCL31R Multispeed型超速冷冻离心机购于Thermo公司;TC512型PCR仪购于英国TECHNE公司;实时定量PCR仪Stratagene Mx3005P为TaKaRa TP800。

### 1.2 刚果红平板实验和结晶紫半定量实验检测供试菌株被膜的形成

刚果红平板实验:将供试菌株和阴性对照菌株分别接种于刚果红平板上,37℃培养24 h后观察结果。结果判断:菌落黑色、光亮的初步认定为能形成被膜的菌株;菌落为白色或红色的为不能形成被膜的菌株。结晶紫半定量实验<sup>[9-11]</sup>:将培养至对数期的供试菌株悬液用含5%葡萄糖LB液体培养基进行稀释( $10^6$  CFU/mL),取200  $\mu$ L加入到96孔板中,37℃培养24 h,于酶标仪595 nm下测定菌体的吸光值。再将上清除去,用PBS清洗,加入甲醇固定15 min后除去甲醇,于每孔中再加入2%结晶紫,染色8 min后水洗,再用乙醇:丙酮(体积比=80:20)悬浮菌体。于酶标仪570 nm下测定菌体吸光值。以*Staphylococcus epidermidis* ATCC12228为阴性对照,以不加菌液的培养基为空白对照,实验重复3次。

供试菌株形成生物被膜能力的判断: $A_{570}/A_{595} < \text{ODC}$ ,为生物被膜阴性菌株,用“-”表示; $\text{ODC} < A_{570}/A_{595} < 2\text{ODC}$ ,为形成生物被膜较弱的菌株,用“+”表示; $2\text{ODC} < A_{570}/A_{595} < 4\text{ODC}$ ,为形成生物被膜较强的菌株,用“++”表示; $A_{570}/A_{595} > 4\text{ODC}$ ,为形成生物被膜强菌株,用“+++”表示; $\text{ODC}$  = 阴性对照组  $A_{570} + 3\text{SD}$ (SD为标准偏差); $A_{570}$  = 570 nm下测得的A值 - 空白对照的A值; $A_{595}$  = 595 nm下测得的A值 - 空白对照的A值。

### 1.3 SA26112生物被膜形成的测定

取200  $\mu$ L培养至对数期的SA26112菌悬液( $10^6$  CFU/mL)加到96孔板中,分别培养1、2、3、4、5、6和7 d,弃去上清,PBS洗3次。甲醇固定15 min,每孔加入2%结晶紫染色8 min。水洗96孔板至流水无色,每孔加入200  $\mu$ L乙醇:丙酮(体积比=

80:20) 悬浮菌体,于酶标仪 570 nm 下测吸光值,每组设置 3 个复孔,取其平均值。

1.4 黄芩素抑杀 SA26112 的 MIC 和 MBC 的测定

于 96 孔板中,分别加入 100  $\mu$ L ( $10^6$  CFU/mL) 培养至对数期的 SA26112 菌悬液,再分别加入 100  $\mu$ L 黄芩素,使其终浓度分别为 0.005、0.01、0.02、0.04 和 0.08 mg/mL,以不加药组为空白对照。37℃ 培养 24 h,每孔分别加入 20  $\mu$ L 0.2% 氯代三苯基四氮唑 (TTC),继续避光培养 4 h。以无红色还原物甲臌产生的最低浓度作为最低抑菌浓度 (MIC)。然后,从各孔中吸取 10  $\mu$ L 菌悬液涂布于 LB 固体培养基 (含 5% 葡萄糖),37℃ 培养 24 h,以无菌落生长的最低浓度作为黄芩素杀死 SA26112 的最低杀菌浓度 (MBC)。每组设置 3 个复孔,取其平均值。

1.5 黄芩素与环丙沙星联用对 SA26112 成熟生物膜抑制作用的检测

将培养 3 d 的成熟生物膜用 PBS 清洗后,在每孔中同时加入等量的黄芩素和环丙沙星,其中黄芩素的终浓度分别为 0、0.02、0.04、0.08、0.12 和 0.24 mg/mL,环丙沙星的终浓度分别为 0、16、32、64、128 和 256  $\mu$ g/mL。37℃ 静置培养 24 h,用 TTC 法检测黄芩素和环丙沙星联用后对成熟生物被膜的破坏作用。

1.6 黄芩素对 SA26112 合成多糖细胞间黏附素 (PIA) 作用的分析

将 2 mL 培养至对数期的 SA26112 菌悬液 ( $10^7$  CFU/mL) 加入到 6 孔板中,再加入一定量的黄芩素使其终浓度分别为 0、0.005、0.01、0.02 和 0.04 mg/mL,37℃ 静置培养 24 h,分别得到游离细菌上清液和用 EDTA 溶解的生物被膜菌悬液,然后按照 Dot-Blot 法分别检测其中所含 PIA 的量<sup>[12,13]</sup>。

1.7 黄芩素对 SA26112 胞外 DNA (eDNA) 分泌量的分析

将 2 mL 培养至对数期的 SA26112 菌悬液 ( $10^7$  CFU/mL) 加入到 6 孔板中,再加入一定量的黄芩素使其终浓度分别为 0、0.005、0.01、0.02、0.04 mg/mL,37℃ 静置培养 24 h,按 Christensen 等<sup>[14]</sup> 方法提取 eDNA,用分光光度计检测 eDNA 的浓度,eDNA 表达水平用 eDNA $\mu$ g/ $A_{595}$  表示。实验重复 3 次。

1.8 黄芩素对 SA26112 *icaA* 和 *cidA* 基因表达量的分析

首先采用 Oligo 6.0 和 Primers 5.0 软件设计与生物被膜形成的相关基因 *icaA* 和 *cidA* 的上下游引物 (Table 1),琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

将培养至对数期的 SA26112 接种到黄芩素的终浓度分别为 0、0.005、0.01、0.02 和 0.04 mg/mL 的培养基中,37℃ 培养 24 h,取菌悬液 6 mL,采用 Trizol 法提取总 RNA,定量后采用两步法反转合成 cDNA,然后用 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,分析 RT-PCR 的扩增曲线和融解曲线,并计算 *icaA* 和 *cidA* 的相对表达量。

Table 1 PCR primers

Primer	Sequence (5'→3')	Product/bp
icaA-F	GAAACATTGGGAGGTCTT	468
icaA-R	GGTATTCCTCTGTCTGG	
cidA-F	GATTTTTCATCTTCCCTTAGCCG	300
cidA-R	GCGTCTACACCTTACGATGTTTAT	

1.9 统计学方法

采用 SPSS 17.0 及 Curve Expert1.3 统计软件进行分析,组内比较采用单因素方差分析,组间采用 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 供试菌株形成被膜的测定

为了获得形成被膜能力较强的实验菌株,对供试的菌株进行了定性和半定量的检测。结果 (Fig. 1) 显示,供试的 7 株金黄色葡萄球菌中,有 5 株菌能形成黑色、光亮的干燥菌落,表明其可形成被膜。

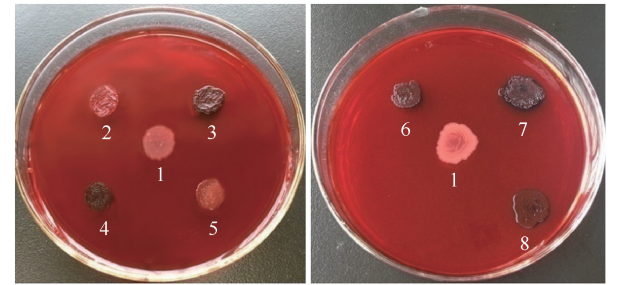


Fig. 1 The ability biofilm formation of *S. aureus* The experimental bacteria group (SA1066, SA1828, SA41573, SA3002, SA25923, SA26112, SA1997) and negative control group (ATCC12228) were inoculated on the congo red plate, respectively and cultured in 37℃ for 24 hours. The blackness and smooth surface of bacterial colonies indicated the formation of BF, whereas the whiteness or redness showed failure of BF formation. (1) ATCC12228, (2) SA1066, (3) SA1828, (4) SA41573, (5) SA3002, (6) SA25923, (7) SA26112, (8) SA1997

结晶紫半定量结果 (Table 2) 显示,在能形成被



膜的 5 株菌中,有 3 株菌为形成被膜较弱的菌株,2 株菌为形成被膜较强的菌株。其中,SA26112 菌株形成被膜的能力强于 SA25923,提示 SA26112 菌株可作为后续的实验菌株。

Table 2 Biofilm formation with semi-quantitative adherence assay

Test strains	SA26112	SA25923	SA1997	SA41573	SA1828
$A_{570}/A_{590}$	1.94	1.33	1.5	0.85	0.78
Biofilm formation ability	++	++	+	+	+

“+” indicates the formation of weaker BF strains; “++” indicates the formation of stronger BF strains

2.2 SA26112 生物被膜的形成

为了观察 SA26112 菌株生物被膜的形成过程,通过显微镜观察和结晶紫半定量法进行了测定。实验结果显示,当培养时间为 1 d 时,SA26112 菌株生物被膜存在大块未被结晶紫染色的白色空隙即未形成生物被膜的区域,说明此时生物被膜的结构较为疏松;培养 3 d 时,SA26112 菌株生物被膜可被结晶紫均匀染色,说明此时生物被膜的结构较为致密(Fig. 2)。且当培养时间达到 3 d 后,SA26112 菌株生物被膜内的菌量基本恒定(Fig. 3),提示 SA26112 菌株在培养至第 3 d 时即可形成成熟的生物被膜。

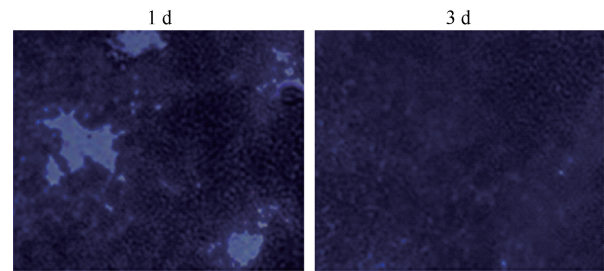


Fig. 2 The images of biofilm formation SA26112 under microscopy The slide was placed in the petri dish and 20 mL 10<sup>6</sup> CFU/mL bacterial suspension was added. The sample was cultured for 1 to 3 days. Slides were stained with crystal violet and observed under an optical microscopy

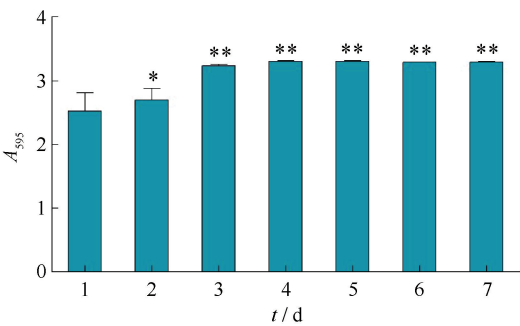


Fig. 3 The measurement of SA26112 biofilm formation with semi-quantitative adherence assay The SA26112 suspension on logarithmic phase (10<sup>6</sup> CFU/mL) was cultured in 96-well plates for indicated times and 2% crystal violet was added to stain each sample. Suspended bacteria by Ethanol-propanol mixture (ratio of 80:20) after rinsing and the absorption values of each sample was recorded at 570 nm using microplate reader. Each sample was set for triplicate and average was obtained. Values are presented mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$ , each group compared with the group of 1 day

2.3 黄芩素抑制和杀死 SA26112 的 MIC 和 MBC

为探讨黄芩素对 SA26112 菌株的抑杀作用,采用 TTC 法进行测定。结果(Table 3)显示,黄芩素抑杀 SA26112 的 MIC 和 MBC 均为 0.04 mg/mL。提示黄芩素能抑制 SA26112 菌株生物被膜的形成。

Table 3 The result of MIC and MBC of baicalein against SA26112

Baicalein(mg/mL)	Control	0.005	0.01	0.02	0.04	0.08
MIC	+	+	+	+	-	-
MBC	+	+	+	+	-	-

“+” for bacteria growth; “-” for aseptic growth

2.4 黄芩素与环丙沙星联用杀死 SA26112 成熟生物被膜内的细菌

为探讨黄芩素对成熟生物被膜内细菌的抑杀作用及作用机制,采用 TTC 法进行检测。结果(Table 4)显示,当 0.16 mg/mL 黄芩素和 256  $\mu$ g/mL 环丙沙星单独作用 SA26112 时,均不能杀死其成熟生物被膜内的细菌,但二者联用,如黄芩素的浓度为 0.04 mg/mL,环丙沙星的浓度为 64  $\mu$ g/mL 时,即可完全杀死被膜内的细菌。提示黄芩素能够通过破坏被

膜的结构,使环丙沙星渗透到被膜内来发挥其杀菌作用。

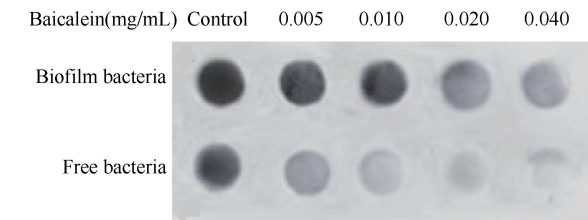
2.5 黄芩素抑制 SA26112 多糖细胞间黏附素的合成

基于 PIA 在细菌被膜形成的黏附和聚集阶段发挥重要的作用,测定了黄芩素对 SA26112 PIA 合成量的影响。结果(Fig. 4)显示,随着黄芩素浓度的增大,生物被膜内细菌和游离细菌合成 PIA 量都随之减少,提示黄芩素能够通过抑制 SA26112 菌株 PIA 的合成来抑制其生物被膜的形成。

Table 4 Baicaleinin association with ciprofloxacin against SA26112 mature biofilm

Baicalein( mg/mL)	Ciprofloxacin ( μg/mL)					
	0	16	32	64	128	256
0	++	++	++	++	++	++
0.02	++	++	++	+	-	-
0.04	++	++	+	-	-	-
0.08	+	+	-	-	-	-
0.16	+	-	-	-	-	-

“+” for bacteria growth; “-” for aseptic growth



**Fig. 4 The inhibition of baicalein on SA26112 PIA synthesis** To determine the influence of baicalein on SA26112 PIA synthesis, SA26112 (10<sup>7</sup> CFU/mL) was cultured in different concentrations of baicalein (0, 0.005,0.01,0.03,0.04 mg/mL) in 37℃ for 24 hours. Free bacterial supernatant and biofilm suspension (dissolved by EDTA) was acquired and the amount of PIA was determined by Dot-Blot method

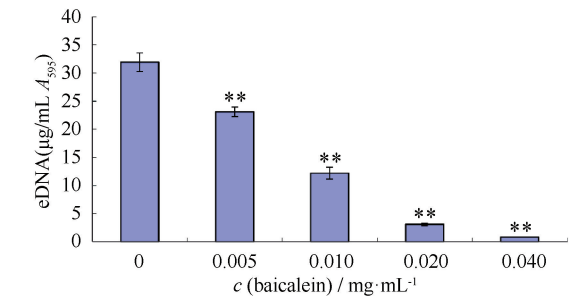
2.6 黄芩素能抑制 SA26112 eDNA 的分泌量

基于 eDNA 在被膜的初始黏附阶段和后期在维持与稳定成熟被膜的结构中也发挥重要的作用,因此测定黄芩素对 SA26112 eDNA 释放量的影响。结果(Fig. 5)显示,随着黄芩素浓度的增加,SA26112 菌株释放 eDNA 的量逐渐减少,其中0.04 mg/mL 的黄芩素作用 SA26112 菌体 24 h,与对照组相比,eDNA 的释放量减少 97% ( $P < 0.01$ )。提示黄芩素能通过减少 SA26112 菌株 eDNA 的分泌量,影响其生物被膜的形成。

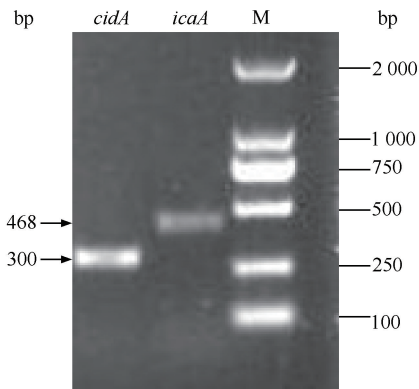
2.7 黄芩素抑制 SA26112 *icaA* 和 *cidA* 基因的相对表达量

基于 PIA 的合成和 eDNA 的释放分别受 *icaA* 和 *cidA* 操纵子的调控,首先证明 SA26112 菌株中是否存在 *icaA* 和 *cidA* 基因,并采用 RT-PCR 法测定黄芩素对 SA26112*icaA* 和 *cidA* 基因表达量的影响。检测结果(Fig. 6)显示,在供试菌株中存在与被膜形成相关的 *icaA* 和 *cidA* 基因。

RT-PCR 结果显示,黄芩素可显著降低 SA26112 菌株中的 *icaA* 和 *cidA* 的相对表达量。其中,0.04 mg/mL 的黄芩素作用 SA26112 菌体 24 h,与对照组相比,*icaA* 和 *cidA* 的表达量分别减少 62% 和 41% ( $P < 0.01$ ) (Fig. 7)。提示黄芩素能通过降



**Fig. 5 The levels of released eDNA after application of different concentration of baicalein of SA26112** To determine the influence of baicalein on SA26112 eDNA release, SA26112 (10<sup>7</sup> CFU/mL) was cultured in different concentration baicalein (0, 0.005, 0.01, 0.03, 0.04 mg/mL) in 37℃ for 24 hours. The eDNA was extracted and the concentration was determined by Christensen’s method. The eDNA expression level was represented by content of eDNA (μg/A<sub>595</sub>). Values are presented as mean ± SD of three independent experiments. \*\*  $P < 0.01$  as compared with the group of 0 mg/mL baicalein

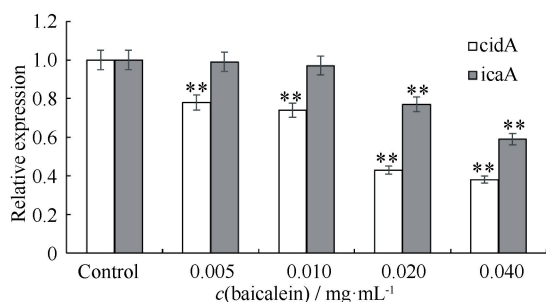


**Fig. 6 Detection of *icaA* and *cidA* genes** Oligo 6.0 and Primers 5 softwares were used to design the upstream and downstream primers of *icaA* and *cidA*. The PCR products were detected by agarose gel electrophoresis

低 *icaA* 和 *cidA* 基因的相对表达量来抑制 SA26112 菌株被膜的形成。

3 讨论

由于生物被膜的形成能使被膜内的细菌逃避人



**Fig. 7 Effects of baicalein on *icaA* and *cidA* of SA26112 strain**

To determine the influence of baicalein on the expression levels of SA26112 *icaA* and *cidA* genes, SA26112 was cultured in different concentrations of baicalein solution (0, 0.005, 0.01, 0.02, 0.04 mg/mL) in 37°C for 24 hours. Total RNA was extracted in suspension by Trizol method and cDNA was acquired by reverse transcription. The 16s rRNA was used as a reference gene in RT-PCR amplification and the *icaA* and *cidA* genes expression level were determined. Values are presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \*\*  $P < 0.01$  as compared with the control

机体免疫系统的攻击和抗菌药物的杀伤作用,进而导致疾病的扩散和持续性感染的发生,因此,获得能抑制或破坏被膜的药物是解决细菌耐药和治疗临床慢性感染的有效途径<sup>[15]</sup>。鉴于被膜的形成可使细菌对抗生素等药物的抵抗能力明显增强,致使目前用于临床的有效药物明显不足的情况下,对中药单体化合物抑制 SA26112 生物被膜的形成及其作用机制的研究具有一定的理论意义和实践意义。近年来,黄芩素因具有多重的药理作用而受到国内外学者的广泛关注,但目前关于黄芩素影响细菌生物被膜形成的作用机制尚缺乏系统的研究。本研究结果可为开发新药治疗由 *Staphylococcus aureus* 生物被膜引起的临床感染提供理论依据。本研究结果表明,黄芩素对 SA26112 生物被膜的形成具有较强的抑制作用。黄芩素和环丙沙星单独作用 SA26112 时,均不能杀死其成熟生物被膜内的细菌。但当二者联用时,则可杀死成熟被膜内的细菌。究其原因可能是黄芩素破坏了被膜的结构,致使环丙沙星渗透到被膜内而发挥其杀菌作用。

被膜的形成过程十分复杂,包括定殖、黏附、聚集、成熟和播散 5 个阶段。其中 PIA 在被膜形成的黏附和聚集阶段发挥重要作用,是维持生物被膜稳定性的主要组成成分<sup>[16]</sup>。本研究结果显示,黄芩素可通过降低 SA26112 菌株中 *icaA* 的表达量,来抑制 PIA 的合成。这与已报道的 PIA 的合成与 *ica* 操纵

子的调控,来阻断细菌间的黏附和聚集进而破坏生物被膜稳定性的结果一致<sup>[17, 18]</sup>。

eDNA 也是被膜的主要成分,它在生物膜形成早期,作为细胞与载体表面相互作用的介质,是调节生物膜形成的重要因子,在维持和稳定成熟被膜的结构中也发挥重要的作用<sup>[19, 20]</sup>。本研究结果显示,黄芩素可通过降低 SA26112 菌株中 *cidA* 基因的表达量,影响生物被膜的形成。这与已报道的 *cid* 操纵子能参与调控葡萄球菌的死亡、溶解以及破坏生物被膜稳定性的结果一致<sup>[21, 22]</sup>。

综上所述,黄芩素能抑制金黄色葡萄球菌 26112 生物被膜的形成,其作用机制是通过降低 *icaA* 和 *cidA* 基因的表达,阻断 PIA 的合成及 eDNA 的释放来影响 SA26112 生物被膜的形成。黄芩素究竟通过何种方式降低 *icaA* 和 *cidA* 基因的表达,还有待深入研究。此外,被膜的形成是由多种因子和多基因共同调控的过程,关于黄芩素抑制被膜形成的其他作用机制也有待于进一步的研究。

## 参考文献 (References)

- [1] Chicurel M. Bacterial biofilms and infections. *Slimebusters* [J]. *Nature*, 2000, **408** (6810): 284-286
- [2] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections [J]. *Science*, 1999, **284** (5418): 1318-1322
- [3] Kaiser TD, Pereira EM, Dos Santos KR, *et al.* Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013, **75** (3): 235-239
- [4] 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]. *中国渔业与质量标准* (Li TT, Guo JW, Li JR, *et al.* Research progress on bacterial biofilm and its relationship with population sensitivity [J]. *Chin Fish Qual Stand*), 2017, **7** (1): 1-7
- [5] Mack D, Fischer W, Krokotsch A, *et al.* The intercellular adhesion involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1, 6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis [J]. *J Bacteriol*, 1996, **178** (1): 175-183
- [6] Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, *et al.* The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation [J]. *Infect Immun*, 1999, **67** (10): 5427-5433
- [7] 乔瑞红, 谢鲲鹏, 谢明杰. 和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* (Qiao RH, Xie KP, Xie MJ. Inhibition mechanism of honokiol on biofilm formation by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Acta Microbiol Sin*), 2016, **56** (8): 1266-1272
- [8] Sun L, Liao K, Wang D. Effects of magnolol and honokiol on adhesion, yeast-hyphal transition, and formation of biofilm by *Candida albicans* [J]. *PLoS One*, 2015, **10** (2): e0117695
- [9] 云宝仪, 周磊, 谢明杰, 等. 黄芩素抑菌活性及其机制的初步研究 [J]. *药学报* (Yun BY, Zhou L, Xie MJ, *et al.* Antibacterial activity and mechanism of Baicalein [J]. *Acta Pharm Sin*), 2012, **47** (12): 1587-1592
- [10] 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* (Guan Y, Zhang JY, Wang CZ, *et al.* Preliminary study of effects of andrographolide

- on *Staphylococcus epidermidis* biofilms[J]. China J Chin Mater Med), 2012, **37**(14): 2147-2150
- [11] Olsson AG, Pears J, Mckellar J, *et al.* Effect of rosuvastatin on low-density lipoprotein cholesterol in patients with hypercholesterolemia[J]. Am J Cardiol, 2001, **88**(5): 504-508
- [12] Gao Z, Huang K, Yang X, *et al.* Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi[J]. Biochim Biophys Acta, 1999, **1472**(3): 643-650
- [13] Chinnam N, Dadi P, Sabri S, *et al.* Dietary bioflavonoids inhibit *Escherichia coli* ATP synthase in a differential manner[J]. Int J Biol Macromol, 2010, **46**(5): 478-486
- [14] Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, *et al.* Adherence of coagulase-negative *staphylococci* to plastic tissue culture plates; a quantitative model for the adherence of *staphylococci* to medical devices[J]. J Clin Microbiol, 1985, **22**(6): 996-1006
- [15] Gristina AG. Biomaterial-centered infection; microbial adhesion versus tissue integration[J]. Science, 1987, **237**(4822): 1588-1595
- [16] Højby N, Ciofu O, Johansen HK, *et al.* The clinical impact of bacterial biofilms[J]. Int J Oral Sci, 2011, **3**(2): 55-65
- [17] Borlee BR, Goldman AD, Murakami K, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix[J]. Mol Microbiol, 2010, **75**(4): 827-842
- [18] Højby N, Ciofu O, Johansen HK, *et al.* The clinical impact of bacterial biofilms[J]. Int J Oral Sci, 2011, **3**(2): 47-56
- [19] 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
- [20] Harmsen M, Lappann M, Knochel S, *et al.* Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes* [J]. Appl Environ Microbiol, 2010, **76**(7): 2271-2279
- [21] Bullitt E, Makowski L. Structural polymorphism of bacterial adhesion pili[J]. Nature, 1995, **373**(6510): 164-167
- [22] Rice KC, Mann EE, Endres JL, *et al.* The *cidA* muriein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, **104**(19): 8113-8118