

## 木犀草素对金黄色葡萄球菌的抑菌活性及其机制

王倩, 谢明杰\*

(辽宁师范大学生命科学院, 大连 116029)

**摘要:**【目的】研究木犀草素对金黄色葡萄球菌的抑制活性及其机制。【方法】利用 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 染色, 细胞膜渗透性测定, SDS-PAGE 蛋白谱变化, 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 荧光染色法等对木犀草素的抑菌活性及其机制进行研究。【结果】木犀草素能影响金黄色葡萄球菌细胞膜的通透性, 木犀草素作用 16 h, 菌体可溶性蛋白总量减少 64.54%, DNA 含量减少 48.44%, RNA 含量减少 39.35%, 木犀草素的浓度为 1.6 mg/mL 时, 拓扑异构酶 I 和 II 的活性可完全被抑制。【结论】木犀草素有明显的抑菌活性, 其抑菌机制主要是通过抑制 DNA 拓扑异构酶的活性, 进而影响菌体核酸及蛋白质的合成来实现的。

**关键词:** 木犀草素; 抑菌机制; DNA 拓扑异构酶

**中图分类号:** Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 09-1180-05

木犀草素 (Luteolin) 是一种具有代表性的天然黄酮类化合物, 在自然界中分布较广, 主要存在于菊花、忍冬花、紫苏叶等天然药物中。近期的研究表明木犀草素具有抗氧化、抗肿瘤、抗菌、抗病毒及降低血脂和胆固醇等多种生物活性<sup>[1-2]</sup>。关于抑菌活性, 阎高峰等<sup>[3]</sup>的研究结果显示, 木犀草素对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、啤酒酵母和大肠杆菌等食品中常见菌种均有高效的抑制作用, 但对其抑菌作用机制尚罕见报道。本文以金黄色葡萄球菌为供试菌, 通过对其细胞膜的通透性、蛋白质、核酸的含量变化及 DNA 拓扑异构酶活性的改变等方面来研究木犀草素的抑菌作用机制, 旨在为开发高效低毒的抗菌药物和新型天然防腐剂提供理论依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:** 供试菌种为金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC26112), 购于中国医学

菌种保藏中心。

**1.1.2 培养基:** 牛肉膏蛋白胨培养基 (Nutrient broth medium, 简称 NB): 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 水 1000 mL, PH 7.2。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 木犀草素标准品购于大连检验检疫局; 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI), 二硫苏糖醇 (DTT), 苯甲基磺酰氟 (PMSF), pBR322 DNA, 蛋白酶 K 均购于上海碧云天生物技术研究所; DDS-307A (DDB-600) 型电导率仪; UV-7504 紫外可见分光光度计; 电泳凝胶定量分析系统 (TRANSILLUMZATOR 2020D); F-4500 荧光分光光度计。

#### 1.2 木犀草素抑菌活性测定

将金黄色葡萄球菌培养至对数期 (浓度为  $10^6$  -  $10^7$  cfu/mL) 后, 向 96 孔板中加入 150  $\mu$ L 菌悬液、15  $\mu$ L 不同浓度的木犀草素, 然后放入 37°C 100 r/min 摇床中培养, 待培养 24 h 后, 每孔分别加

基金项目: 辽宁省自然科学基金 (20072153); 大连市科技计划项目 (2009E12SF165)

\* 通信作者。Tel: +86-411-84259341; E-mail: xmj1222@sina.com

作者简介: 王倩 (1986-), 女, 辽宁人, 硕士研究生, 从事微生物生化研究。E-mail: wangqian19860223@163.com

收稿日期: 2010-03-16; 修回日期: 2010-04-06

入 15  $\mu\text{L}$  0.2% 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC), 37 $^{\circ}\text{C}$  100 r/min 避光培养 4 h 后,按朱越雄等<sup>[4]</sup>的方法观察其颜色变化,以无水乙醇为对照组。

### 1.3 木犀草素的测定

将培养至对数期的金黄色葡萄球菌等量分装于试管中,加入木犀草素使其终浓度分别为 0.2 g/L, 然后继续培养,分别在 0 h、2 h、4 h、6 h 时取 2 mL 菌悬液进行离心,测定上清液中木犀草素的含量<sup>[5]</sup>。实验重复 3 次,取平均值。

### 1.4 培养液电导率的测定

按 Lee 等<sup>[6]</sup>的方法测定终浓度为 0.2 g/L 的木犀草素作用金黄色葡萄球菌 0 h、1 h、2 h、4 h、6 h 和 8 h 后上清液的电导率值。以不加药物只加同等体积的助溶剂无水乙醇作为对照组。实验重复 3 次,取平均值。

### 1.5 DNA、RNA 等大分子物质的测定

按 Chen 等<sup>[7]</sup>的方法测定终浓度为 0.2 g/L 的木犀草素作用金黄色葡萄球菌 0 h、2 h、4 h 和 6 h 后上清液中 DNA、RNA 等大分子物质的吸光值。以不加药组为对照。实验重复 3 次,取平均值。

### 1.6 金黄色葡萄球菌可溶性蛋白含量的测定

将培养至对数生长期的金黄色葡萄球菌菌悬液,按 2% 接种量接种到终浓度为 0.2 g/L 木犀草素的牛肉膏蛋白胨培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$  120 r/min 摇床培养 16 h,离心后收集菌体 1 mg,悬于 40  $\mu\text{L}$  无菌水中,按体积比 1:4 加入上样缓冲液,混匀,于沸水浴中煮沸 5 min,离心收集上清菌体可溶性蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳。以不加药物只加同等体积的助溶剂无水乙醇作为对照组。

### 1.7 金黄色葡萄球菌 DNA、RNA 含量的测定

将培养至对数生长期的金黄色葡萄球菌菌悬液,按 2% 接种量接种到终浓度为 0.2 g/L 木犀草素的牛肉膏蛋白胨培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$  120 r/min 摇床培养。分别取 2 mL 培养至 12 h、16 h、20 h 和 24 h 的菌体样液于 2686  $\times$  g 下离心 10 min,将沉淀悬于 1 mL 无菌水中制成菌悬液。然后向 96 孔板中加入 50  $\mu\text{L}$  菌悬液,再加 150  $\mu\text{L}$  的 DAPI 染色液(DAPI 与无菌水的体积比为 1:3),振荡混匀后立即在荧光分光光度计下测定菌体的 DNA 和 RNA 的荧光强度(DNA 的激发波长为 364 nm, RNA 的激发波长为 400 nm),以不加药物只加同等体积的助溶剂无水乙醇作为对照组,每组实验重复 3 次,取平均值。

### 1.8 DNA 拓扑异构酶的提取

具体方法参照文献<sup>[8]</sup>。

### 1.9 DNA 拓扑异构酶 I 或 II 活性的测定

2.5  $\mu\text{L}$  DNA 解旋缓冲液 I 或 II(解旋缓冲液 I: 200 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 340 mmol/L KCl, 40 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 20 mmol/L DTT, 0.12 g/L BSA, 5 mmol/L EDTA, 无 ATP; 解旋缓冲液 II: 解旋缓冲液 I, 4 mmol/L ATP) 中加入 0.5  $\mu\text{g}$  超螺旋 pBR322 DNA, 2  $\mu\text{L}$  上述粗酶提取液(含 1 U 拓扑异构酶 I 或 II 酶活力), 2  $\mu\text{L}$  不同浓度的木犀草素,用蒸馏水补足至 20  $\mu\text{L}$ , 37 $^{\circ}\text{C}$  温育 30 min, 加 2  $\mu\text{L}$  10% SDS, 1  $\mu\text{L}$  10 g/L 蛋白酶 K 终止反应,继续温育 30 min, 再加 2  $\mu\text{L}$  Loading buffer, 于 1% 琼脂糖凝胶电泳中电泳 45 min, 电压为 100-110 V, EB 染色 15 min, 用凝胶成像系统观察并照相,以无水乙醇为对照组。1 U DNA 拓扑异构酶 I (或 II) 酶活力定义为能使 0.5  $\mu\text{g}$  负超螺旋 pBR322 DNA 在无(或 4 mmol/L) ATP 条件下完全解旋的酶量。

### 1.10 木犀草素对 DNA 的直接作用<sup>[9]</sup>

2.5  $\mu\text{L}$  DNA 解旋缓冲液 I 中分别加入 0.5  $\mu\text{g}$  超螺旋 pBR322 DNA, 2  $\mu\text{L}$  不同浓度的木犀草素,用蒸馏水补足至 20  $\mu\text{L}$ 。反应、电泳及观察过程同 1.9。

## 2 结果和分析

### 2.1 木犀草素对金黄色葡萄球菌的抑菌活性和最低抑菌浓度(MIC)的测定结果

TTC 是一种常用的活菌染料,其氧化态是无色的,该染料进入细胞后,TTC 和活细胞内的琥珀酸脱氢酶反应,生成红色的还原产物甲臜。从表 1 可以看出,经 TTC 染色后,培养基的颜色随木犀草素浓度的增加而变浅,直至无色。表明木犀草素可抑制金黄色葡萄球菌的生长,且抑制作用随药物浓度的增加而增强。当木犀草素的浓度大于 0.09 g/L 时,可完全抑制金黄色葡萄球菌的生长,故其对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 0.09 g/L。

表 1 木犀草素对金黄色葡萄球菌 MIC 测定结果

Table 1 The mensuration result of MIC of luteolin against <i>Staphylococcus aureus</i>						
c(luteolin)/(g/L)						
CK	0.06	0.07	0.08	0.09	0.1	0.15
+++	++	+	+	—	—	—

“+++”: red; “++”: peach red; “+”: pink; “—”: colorless

### 2.2 木犀草素对金黄色葡萄球菌细胞膜的影响

木犀草素作用金黄色葡萄球菌 2 h 后,木犀草素的含量从 0.2 g/L 降至 0.096 g/L,说明木犀草素可影响细胞膜的渗透性<sup>[10]</sup>。电导率的改变也可以反映细胞膜渗透性的改变,本研究的测定结果显示,

木犀草素作用菌体初期,上清液的电导率随着时间的增加而增大,当作用 6 h 时,加药组的电导率比对照组增加了 3.52% ( $P < 0.05$ ) (图 1-A),说明木犀草素能影响金黄色葡萄球菌细胞膜的通透性。为考察木犀草素对金黄色葡萄球菌细胞膜通透性的影响程度,本实验对加入木犀草素后菌体大分子物质的外漏情况进行了测定。因为通过测定加药前后 DNA 和 RNA 等大分子物质的变化可推测药物对细胞膜完整性的影响<sup>[7]</sup>。如图 1-B 所示,木犀草素作用菌体后,DNA 和 RNA 的含量与对照组相比基本没有变化。以上两个实验说明,木犀草素能引起金黄色葡萄球菌细胞膜渗透性的改变,但这种改变只是细胞膜的微小损伤,还不能使 DNA 和 RNA 等大分子物质外漏,细胞膜还是完整的,其抑菌作用的靶点不在细胞膜。

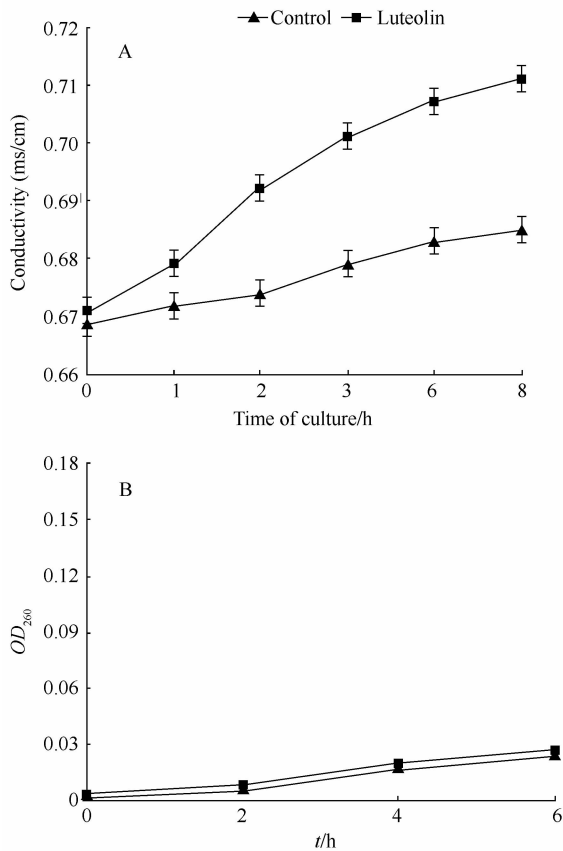


图 1 木犀草素作用金黄色葡萄球菌后培养液电导率 (A) 及大分子物质吸光值 (B) 的变化

Fig. 1 The change about conductivity (A) and OD of large molecules (B) from *Staphylococcus aureus* effected by luteolin.

### 2.3 木犀草素对金黄色葡萄球菌可溶性蛋白的影响

利用 Gel-Pro Analyzer 蛋白分析软件对木犀草素作用金黄色葡萄球菌的 SDS-PAGE 蛋白谱带定量

分析结果表明,木犀草素可明显的抑制金黄色葡萄球菌胞可溶性蛋白的表达,与对照组相比,木犀草素作用 16 h 后的金黄色葡萄球菌总蛋白量减少了 64.54%,且随药物作用时间的延长,蛋白表达量减少明显。其原因可能是木犀草素影响了金黄色葡萄球菌核酸的合成和相关基因的表达,从而阻碍了某些蛋白和酶的合成,使菌体蛋白表达量下降。

### 2.4 木犀草素对金黄色葡萄球菌核酸含量的影响

荧光强度检测结果显示,木犀草素能明显抑制金黄色葡萄球菌的核酸含量。木犀草素作用细菌 16 h 后,对照组相比,DNA 的荧光强度减少了 48.44% ( $P < 0.01$ ) (图 2-A),RNA 的荧光强度减少了 39.35% ( $P < 0.01$ ) (图 2-B)。DAPI 是一种能够与 DNA 和 RNA 结合的荧光染料,核酸含量越大,荧光度也就越强。加药组菌体的荧光度明显低于对照组,说明木犀草素可抑制菌体核酸的合成。但药物作用 16 h 后,加药组的核酸含量出现了增加的趋势,推测其原因可能是随着培养时间的增加,药物发挥作用的效力逐渐降低,对抑制核酸合成的某些酶

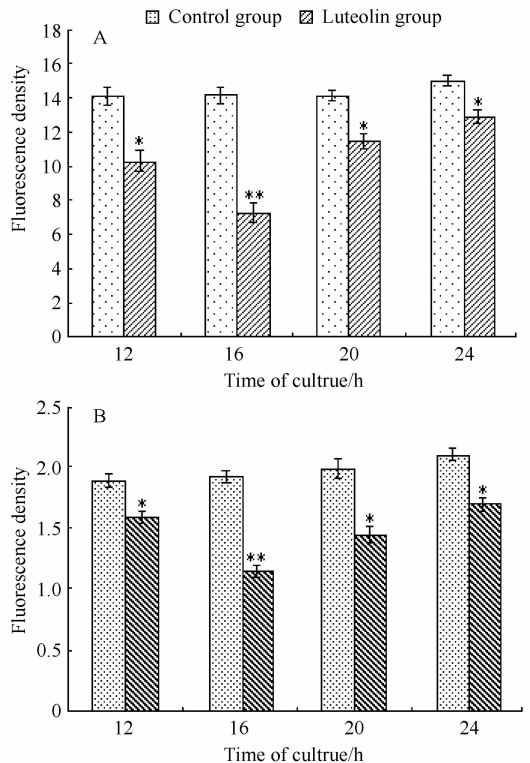


图 2 木犀草素作用不同时间对金黄色葡萄球菌核酸含量的影响

Fig. 2 Effect of luteolin on synthesis of nucleic acid on *Staphylococcus aureus*. A: DNA group; B: RNA group. \* Means that difference is significant compared with control ( $P < 0.05$ ) \*\* Means that difference is most significant compared with control ( $P < 0.01$ ).

的影响减小,从而导致菌体核酸含量的增加。

## 2.5 木犀草素对金黄色葡萄球菌拓扑异构酶 I 和 II 活性的影响

DNA 拓扑异构酶是 DNA 复制、转录和重组过程中的关键酶之一,其功能是催化 DNA 链的解旋和断裂,完成 DNA 的复制、转录等过程。由图 3 可知,随着木犀草素浓度的增加,超螺旋 DNA (Form I) 逐渐增多,缺口或线性 DNA (Form II) 逐渐减少,说明木犀草素可抑制拓扑异构酶 I 和 II 的活性。当木犀草素的浓度为 1.6 mg/mL 时,拓扑异构酶 I 和 II 的活性可完全被抑制。

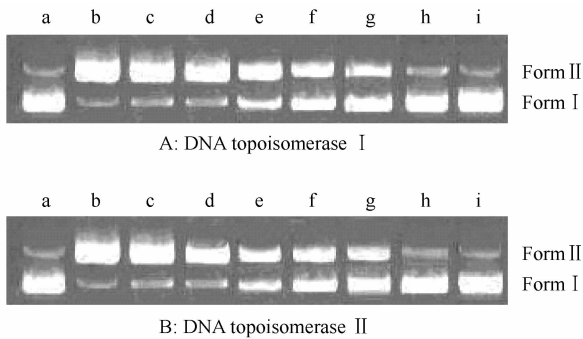


图 3 木犀草素对金黄色葡萄球菌拓扑异构酶 I 和 II 活性的影响

Fig. 3 Effect of luteolin on topoisomerase I and II on *Staphylococcus aureus*. Form II: open circular DNA and linear DNA; Form I: supercoiled DNA; a: pBR322 DNA; b: 1 U topoisomerase; c: 100% ethanol; d-i: 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 mg/mL Luteolin.

## 2.6 木犀草素对 DNA 的直接作用

由图 4 可知,当木犀草素浓度大于 0.8 g/L 时,超螺旋 DNA (Form I) 逐渐减少,缺口或线性 DNA (Form II) 逐渐增多,说明一定浓度的木犀草素对菌体 DNA 也有直接断裂作用。

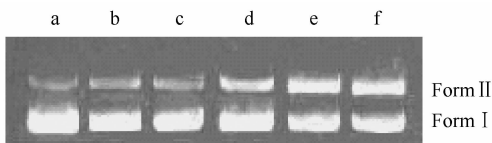


图 4 木犀草素对 DNA 的直接作用

Fig. 4 The direct break effect of Luteolin on pBR322 DNA. a: pBR322 DNA; b-f: 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 mg/mL luteolin.

## 3 讨论

已有的研究表明,药物的抑菌机制,主要是通过破坏细胞壁及细胞膜的完整性和抑制蛋白、核酸的合成等途径来实现的。本实验结果显示,木犀

草素在作用菌体初期即进入细胞内,并使金黄色葡萄球菌培养液的电导率增加,但胞内 DNA、RNA 等大分子物质没有明显外漏,说明木犀草素只引起金黄色葡萄球菌细胞膜渗透性的改变,是一种微小损伤,并未破坏细胞膜的完整性,因此其抑菌作用靶点不是细胞膜。

蛋白质是生物生命活动的主要承担者,而核酸是遗传信息的携带者,核酸含量的减少,会直接导致蛋白合成量的降低,从而对菌体细胞中的各种生理机能产生严重影响。本实验结果显示,木犀草素作用金黄色葡萄球菌 16 h 后,菌体可溶性蛋白总量减少了 64.54%,DNA 含量减少了 48.44%,RNA 含量减少了 39.35%,说明在木犀草素作用下,菌体可溶性蛋白及核酸的合成受到明显抑制,究其原因可能是药物抑制了核酸代谢中某些关键酶的活性。DNA 拓扑异构酶就是调控核酸代谢的关键酶之一,其可催化 DNA 链的解旋和断裂,完成 DNA 的复制、转录等过程。有关抗肿瘤的研究表明,某些黄酮类化合物是 DNA 拓扑异构酶 I 和 II 的典型抑制剂<sup>[11-12]</sup>。尽管该方面的研究主要是集中在真核生物的酶系,但因为 DNA 拓扑异构酶是在自然进化中被保留下的主要结构<sup>[13]</sup>,因此原核生物的 DNA 拓扑异构酶很可能也对黄酮类化合物的有效组分敏感。本实验结果显示,木犀草素可抑制 DNA 拓扑异构酶 I 和 II 的活性,且抑制作用呈剂量依赖关系,该结果与 Chowdhury AR 和 Mittra B 在真核细胞中所得结论一致<sup>[14-15]</sup>。其作用机制可能是药物作用于 DNA 拓扑异构酶的相关亚基,引起其结构发生改变,致使酶失活<sup>[16-17]</sup>。此外,当木犀草素浓度大于 0.8 g/L 时,能使菌体 DNA 直接断裂,从而也能影响核酸的合成。

总之,本研究结果显示,木犀草素对金黄色葡萄球菌的抑制活性主要是通过药物抑制 DNA 拓扑异构酶的活性,进而影响菌体核酸及蛋白质的合成来实现的。其具体的作用机制还有待于进一步的研究。

## 参考文献

- [1] Huang YT, Hwang JJ, Lee PP, Ke FC, Huang JH, Huang CJ, Kandaswami C, Middleton E, Jr, Lee MT. Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor receptor. *British Journal of Pharmacology*, 1999, 128:999-1010.
- [2] 李星霞,郭澄. 木犀草素的药理活性研究. *中国药房 (China Pharmacy)*, 2007, 18(18):1421-1424.

- [ 3 ] 阎高峰,叶小利,袁吕江,李学刚.天然抗氧化剂木犀草素抗氧化活性的研究.食品与发酵工业(*Food and Fermentation Industries*),2005,(8):31-33.
- [ 4 ] 朱越雄,曹广力.TTC快速药敏试验在虾细菌病诊断中的应用.水利渔业(*Reservoir Fisheries*),2003,23(1):59-60.
- [ 5 ] 罗伟强,李济权,黄梅珍.花生壳中总黄酮含量的测定.西部粮油科技(*China Western Cereals & Oils Technology*),2002,27(2):48-49.
- [ 6 ] Lee HJ, Choi GJ, Cho KY. Correlation of lipid peroxidation in *Botrytis cinerea* caused by dicarboximide fungicides with their fungicidal activity. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1998, 46: 737-741.
- [ 7 ] Chen CZ, Cooper SL. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes. *Biomaterials*, 2002, 23: 3359-3368.
- [ 8 ] Sullivan DM, Glisson BS, Hodges PK, Smallwood-Kentros S, Ross WE. Proliferation dependence of topoisomerase II mediated drug action. *Biochemistry*, 1986, 25: 2248-2256.
- [ 9 ] 蒙凌华,蒋超,刘兆乾,齐清,丁健.螺旋藻提取物对DNA拓扑异构酶活性的抑制及对DNA的直接影响.癌症(*Chinese Journal of Cancer*),2000,19(8):768-771.
- [ 10 ] 冯小强,李小芳,杨声,王廷璞,苏中兴.壳聚糖对细菌细胞膜的影响.食品科学(*Food Science*),2009,30(7):63-67.
- [ 11 ] Snyder RD, Gillies PJ. Evaluation of the clastogenic, DNA intercalative, and topoisomerase II-interactive properties of bioflavonoids in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2002, 40: 266-276.
- [ 12 ] Chang YC, Nair MG, Nitiss JL. Metabolites of daidzein and genistein and their biological activities. *Journal of Natural Products*, 1995, 58(12): 1901-1905.
- [ 13 ] Ulanowska K, Tkaczyk A, Konopa G, Wegrzyn G. Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Archives of Microbiology*, 2006, 184: 271-278.
- [ 14 ] Chowdhury AR, Sharma S, Mandal S, Goswami A, Mukhopadhyay S, Majumder HK. Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I. *Biochemical Journal*, 2002, 366: 653-661.
- [ 15 ] Mitra B, Saha A, Chowdhury AR, Pal C, Mandal S, Mukhopadhyay S, Bandyopadhyay S, Majumder HK. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. *Molecular Medicine*, 2000, 6(6): 527-541.
- [ 16 ] Schwartzman JB, Stasiak A. A topological view of the replicon. *European Molecular Biology Organization*, 2004, 5(3): 256-261.
- [ 17 ] Pan XS, Ambler J, Mehtar S, Fisher LM. Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1996, 40(10): 2321-2326.

## Antibacterial activity and mechanism of Luteolin on *Staphylococcus aureus*

Qian Wang, Mingjie Xie \*

(College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] To investigate the antibacterial activity and mechanism of luteolin on *Staphylococcus aureus*. [ **Methods** ] The antibacterial activity and mechanism experiments were carried out by using 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC), determining membrane penetrability, the change of SDS-PAGE protein spectra and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining assay. [ **Results** ] Luteolin could affect the membrane permeability of *Staphylococcus aureus*, but not destroy the membrane integrity directly. After treated with luteolin for 16 hours, the total content of proteins decreased to 64.54%, the quantity of both DNA and RNA reduced to 48.44% and 39.35% respectively. The activity of DNA topoisomerase I and II was inhibited completely by 1.6 mg/mL luteolin. [ **Conclusion** ] Luteolin showed obvious antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. The antibacterial mechanism of luteolin is that it could inhibit the activity of DNA topoisomerase I and II, which resulted in some decrease in the nucleic acid and protein synthesis.

**Keywords:** luteolin; antibacterial mechanism; DNA topoisomerase

(本文责编:王晋芳)