

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (10) :1204 - 1211; 4 October 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.10.013

鹰嘴豆芽素 A 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌外排系统的抑制作用

邹丹, 谢鲲鹏, 王海婷, 陈禹先, 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:【目的】MRSA 外排系统是其对多种药物耐药性的主要原因, 为此研究鹰嘴豆芽素 A 对 MRSA 外排系统的抑制作用。【方法】以 MRSA41577 为供试菌株, 通过二倍稀释法、双平板法和荧光分光光度法测定鹰嘴豆芽素 A 对 MRSA41577 的抑制作用及其对外排系统的影响; 通过 RT-PCR 检测加药前后 MRSA41577 外排蛋白 *norA* 的表达量; SDS-PAGE 检测加药前后与 MRSA41577 外排相关蛋白的变化, 并用液相色谱质谱仪进行鉴定确认。【结果】鹰嘴豆芽素 A 本身无抑菌活性, 但鹰嘴豆芽素 A 和环丙沙星联合作用后, MRSA41577 对环丙沙星的敏感性显著提高, 其中 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的鹰嘴豆芽素 A 能使环丙沙星对 MRSA41577 的 MIC 从 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 降低到 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 且作用强度与药物浓度呈正相关。经鹰嘴豆芽素 A 处理 MRSA41577 后, 菌体内环丙沙星的蓄积量随着药物处理时间的增加而增加, 在处理 15min 时与对照组相比, 菌体内环丙沙星蓄积量增加了 83% ($P < 0.01$), 与阳性对照利血平的作用效果相当。鹰嘴豆芽素 A 能降低 MRSA41577 的 *norA* 表达量, 与对照组相比, 鹰嘴豆芽素 A 和环丙沙星作用 MRSA41577 16h 后, *norA* 的相对表达量降低了 65%, 其抑制效果优于阳性对照利血平的 48%。SDS-PAGE 电泳结果显示, 鹰嘴豆芽素 A 作用 MRSA41577 16h 后, 与对照组相比菌体的蛋白谱带发生了明显的变化, 其中与外排系统相关的蛋白除 *norA* 蛋白明显减少外, ABC 转运体 ATP 结合蛋白也明显减少。【结论】鹰嘴豆芽素 A 是 MRSA41577 的外排泵抑制剂, 其作用机制是通过降低 MRSA41577 菌体内 *norA* 基因的表达量, 进而减少 *norA* 蛋白的表达量, 来抑制 MRSA41577 对环丙沙星等药物的排出而恢复其对药物的敏感性。

关键词: 鹰嘴豆芽素 A, 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌, *norA* 基因, 外排蛋白

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 10-1204-08

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 是引起医院和社区感染的重要致病菌^[1-2], 它除对甲氧西林耐药外, 对 β -内酰胺类、大环内酯类、氨基糖苷类、四环素类、喹诺酮类等抗生素也均有不同程度的耐药

性^[3]。目前研究结果表明, 主动外排系统是细菌产生多重耐药的重要机制。该系统是广泛存在于细菌细胞膜上且具有特殊结构的一类膜转运蛋白, 这些膜转运蛋白可将进入胞内的药物直接泵出细胞外, 使细胞内抗菌药物浓度降低而耐药^[4]。外排系统

基金项目: 辽宁省教育厅科学研究一般项目 (L2013412); 大连市科技计划项目 (2013E13SF108)

* 通信作者。Tel: +86-411-85827068; E-mail: xmj1222@sina.com

作者简介: 邹丹 (1989-), 女, 硕士研究生, 主要从事微生物生化研究。E-mail: zoudans@sohu.com

收稿日期: 2014-03-07; 修回日期: 2014-05-12

的发现较好地解释了 MRSA 对多种药物存在的耐药性问题, 因此, 筛选和研发外排泵抑制剂也成为解决细菌耐药的有效途径^[5-6]。

目前, 已经报道的外排泵抑制剂有利血平、氧氟苯胺、奥美拉唑和雷贝拉唑等, 但它们都具有一定的毒副作用^[7], 因此, 开发安全有效、无毒副作用的外排泵抑制剂对提高抗菌药物的抗菌活性和改善临床治疗细菌感染疾病的现状具有重要意义。本实验室长期从事黄酮类化合物的研究, 已有的研究结果显示, 该类化合物具有多种生物学活性, 且大部分安全性强, 无毒副作用。Guz NR 等的研究结果显示, 鹰嘴豆芽素 A (Biochanin A)、四氢黄酮、染料木素和水飞蓟宾等黄酮类化合物与抗生素药物共同作用, 可降低药物的最小抑菌浓度 (MIC), 推测它们可能是外排系统的抑制剂^[8-11]。鹰嘴豆芽素 A 是一种天然的鹰嘴豆异黄酮, 具有抗菌、抗肿瘤、降血脂等作用^[12-13], 一些研究表明, 鹰嘴豆芽素 A 能抑制细胞的外排, 但具体作用机制尚不清楚^[14]。本文以 MRSA41577 为供试菌株, 通过双平板法、荧光分光光度法和 RT-PCR 等方法, 系统地研究鹰嘴豆芽素 A 对 MRSA41577 外排系统的作用机制, 旨在为将其开发成外排耐药系统的抑制剂提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株: 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 41577, 由大连市中心医院提供。质控菌株: 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC25923), 购于中国医学菌种保藏中心。

1.1.2 培养基: MH 肉汤培养基, 酸水解酪蛋白琼脂培养基 (Mueller-Hinton Agar, MHA), LB 固体培养基, LB 液体培养基^[16]。

1.1.3 主要试剂和仪器: 鹰嘴豆芽素 A 标准品、利血平标准品、头孢西丁药纸 (30 μg /片) 购于诺威信生物技术公司; 环丙沙星购于上海生工生物工程有限公司; 引物、PCR 反应液和蛋白回收试剂盒等购于宝生物工程 (大连) 有限公司。IECCL31R Multispeed 型超速冷冻离心机: Thermo 公司; TC512 型 PCR 仪: 英国 TECHNE 公司; 实时定量 PCR 仪: Stratagene Mx3005P; TaKaRaTP800; FL1102M001 型荧光分光光度计: 日本岛津公司; LC-MS 1000 液质

联用仪: Skyray Instrument 公司。

1.2 MRSA 的鉴定

1.2.1 头孢西丁纸片法鉴定: 将供试菌株隔夜培养至对数期, 取 150 μL 菌悬液均匀涂布在 MH 琼脂平板上, 然后将头孢西丁药纸片平放于培养基表面。35 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵育 16 - 18h 后观察并测量结果, 以金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 为质控菌株。

1.2.2 PCR 法鉴定 MRSA 的耐药基因和外排泵基因: 通过 Oligo6.0 和 Primers5.0 软件设计 MRSA41577 耐药基因 *mecA* 和外排泵基因 *norA* 的上下游引物, 然后用 TC512 型 PCR 仪进行 PCR 扩增 (预期引物扩增片段长度分别为 813 bp 和 435 bp), 12% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 将扩增产物送交宝生物工程 (大连) 有限公司进行测序。本实验操作全部在 ESCO LA2-4A1 生物安全柜下进行。

1.3 鹰嘴豆芽素 A 与环丙沙星的协同作用

于 96 孔板 (costar 3599 康宁公司) 中加入 100 μL MRSA41577 菌悬液 (浓度为 10^6 cfu/mL), 再分别加入 10 μL 鹰嘴豆芽素 A 和环丙沙星, 使 2 种药物终浓度依次为 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下 120 r/min 恒温培养 24 h。待培养结束后加入 20 μL 0.2% 的氯化三苯基四氮唑 (TTC), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 恒温避光培养 4 h, 通过观察其颜色变化测定两种药物单独处理后对 MRSA41577 的抑制作用效果。将终浓度分别为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的鹰嘴豆芽素 A 与环丙沙星共同作用, 处理方式同上, 以利血平为阳性对照组, 以不加药为空白对照组, 测定两种药物协同作用后对 MRSA41577 的抑制作用效果。鹰嘴豆芽素 A 和环丙沙星体外杀菌曲线的测定^[15]: 将菌悬液接种到终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 鹰嘴豆芽素 A、终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 鹰嘴豆芽素 A 和 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 环丙沙星的液体培养基中, 分段培养 24h 计菌落数, 并绘制体外时间杀菌曲线, 试验重复 3 次, 以不加药组为空白对照。

1.4 双平板法检测鹰嘴豆芽素 A 对 MRSA 外排作用的影响^[16]

首先在培养皿中倒入 15 mL 底层固体培养基, 待凝固后, 再把含有终浓度为 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 环丙沙星和 MRSA41577 菌悬液的 5mL 上层培养基摇匀后倒在底层培养基上。待凝固后, 打孔 (直径 6 mm) 并

在孔中分别加入含药量为 60 μg 和 40 μg 的鹰嘴豆芽素 A 和利血平, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 24 h 后观察并测量抑菌圈直径。实验重复 3 次, 取平均值, 以不加环丙沙星的上层为对照组。

1.5 鹰嘴豆芽素 A 对 MRSA 体内环丙沙星蓄积量的影响^[17]

用终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的鹰嘴豆芽素 A 处理 MRSA41577 16 h 后, 离心收集菌体并洗涤。加入环丙沙星作用菌体使其终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 分别在加入环丙沙星后的 3 min、8 min、15 min、20 min 取样, 离心收集菌体并洗涤。沉淀中加入 1 mL 0.1 mol/L 的盐酸甘氨酸溶液 (pH3.0), 混匀, 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 后离心。取上清液于 FL1102M001 型荧光分光光度计下进行测定, 并通过绘制的环丙沙星标准曲线计算菌体内环丙沙星蓄积量。以利血平为阳性对照, 以不加药处理为空白对照。

1.6 鹰嘴豆芽素 A 对 NorA 外排蛋白基因表达量的影响

将培养至对数期的 MRSA41577 接种到含终浓度为 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 环丙沙星的培养基中, 再加入鹰嘴豆芽素 A, 使其终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 培养 16 h 后, 取 5 mL MRSA41577 菌悬液, 采用 Trizol 法提取总 RNA, 用紫外分光光度计进行 RNA 的定量, 然后采用两步法反转合成 cDNA^[18], 用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 染料和 Thermal Cycler Dice Real Time System 扩增仪进行扩增, 以 16SRNA 为内参基因。待反应结束后分析 RT-PCR 的扩增曲线和融解曲线, 并计算 *norA* 基因的相对表达量, 以环丙沙星处理组为空白对照组, 以利血平处理组为阳性对照组。

1.7 鹰嘴豆芽素 A 对外排蛋白的影响

将 MRSA 41577 分别接种到含鹰嘴豆芽素 A 的液体培养基中, 使其终浓度分别为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 下培养 16 h 后离心收集菌体。将收集到的菌体用溶菌酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 7 min 后, 3360 \times g 离心 2 min。将沉淀加入 RIPA 裂解液和 PMSF 于冰上处理 40 min 后, 6720 \times g 离心 30 min, 然后取上清液进行 SDS-PAGE。将电泳图谱中蛋白含量明显减少的条带切下, 回收, 用 LC-MS 1000 液相色谱质谱联用仪进行鉴定, 以不加药处理作为空白对照组。

1.8 数据处理

实验结果通过 SPSS 统计软件进行方差分析。

2 结果和分析

2.1 MRSA 的鉴定

2.1.1 头孢西丁纸片法鉴定: 头孢西丁纸片法结果显示, 质控菌株 *S. aureus* ATCC25923 的抑菌圈直径为 28 mm, 而供试菌株 MRSA 41577 无抑菌圈。根据美国临床和实验室标准协会 (CLSI2010) 判定标准, 当抑菌圈小于 21 mm 为耐药株, 大于 22 mm 为非耐药株, 故可基本判定本试验采用的供试菌株为高耐药菌株。

2.1.2 MRSA 的基因型鉴定结果: PCR 法鉴定供试菌株的耐药基因和外排泵基因结果显示, 在供试菌株中检测到了 *mecA* 基因和 *norA* 基因, 进一步证明供试菌株为 MRSA, 且该菌株的耐药性可能与存在的 *norA* 外排基因有关。

2.2 鹰嘴豆芽素 A 与环丙沙星协同作用的测定

实验结果显示, 鹰嘴豆芽素 A 和利血平在 2 - 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内对 MRSA41577 均无抑菌作用, 而环丙沙星在低浓度时对 MRSA41577 无抑菌作用, 高浓度时对 MRSA41577 有抑制作用, 其 MIC 为 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (表 1)。但鹰嘴豆芽素 A 和环丙沙星联合作用后, 供试菌株对环丙沙星的敏感性显著提高, 其敏感程度与鹰嘴豆芽素 A 的浓度呈正相关。其中 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的鹰嘴豆芽素 A 能使环丙沙星对 MRSA41577 菌株的 MIC 从 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 降低到 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (表 1)。

表 1. 鹰嘴豆芽素 A 与环丙沙星协同作用的测定结果

Table 1. The synergistic effect of Ciprofloxacin combination with Biochanin A

Concentrate/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Biochanin A	Reserpine	CIP	CIP + 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BA	CIP + 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BA
256	+	+	-	-	-
128	+	+	-	-	-
64	+	+	-	-	-
32	+	+	+	-	-
16	+	+	+	-	-
8	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+

" - "no bacteria growth; " + "have bacteria growth.

体外杀菌曲线试验结果显示 (图 1), 鹰嘴豆芽素 A 和环丙沙星单独作用于 MRSA41577 时, 与空

白对照组相比无明显变化,但二者联合作用后,则具有较强的杀菌作用,与对照组比较,其杀菌率提高了 61.25% ($P < 0.01$),说明鹰嘴豆芽素 A 可恢复环丙沙星对 MRSA41577 的抑制作用,推测可能是鹰嘴豆芽素 A 抑制了 MRSA41577 对环丙沙星的外排作用导致的。

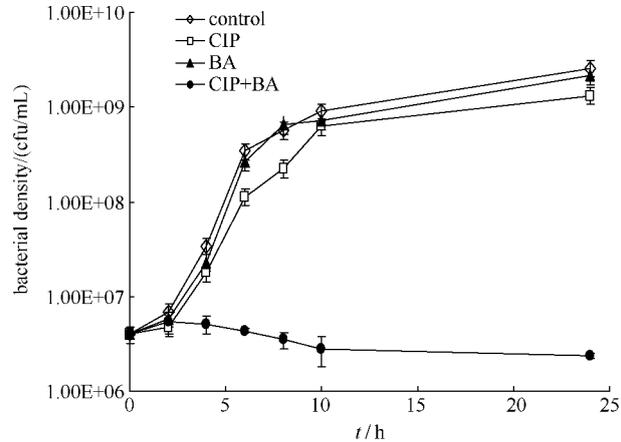


图 1. 鹰嘴豆芽素 A 与环丙沙星联合作用的体外杀菌曲线
Figure 1. In vitro time-kill curves of biochanin A and ciprofloxacin alone and in combination.

2.3 鹰嘴豆芽素 A 对 MRSA41577 外排作用的影响

双平板法试验结果显示,鹰嘴豆芽素 A 在不含环丙沙星的对照组平板中,对 MRSA41577 无抑制作用(图 2-A),在含环丙沙星的试验组平板中能形成明显的抑菌圈(图 2-B),且抑菌圈大小随着鹰嘴豆芽素 A 浓度的增加而增大,与阳性对照利血平结果一致,说明鹰嘴豆芽素 A 是 MRSA41577 的外排泵抑制剂。

2.4 鹰嘴豆芽素 A 对 MRSA41577 体内环丙沙星蓄积量的影响

环丙沙星标准曲线测定结果显示,环丙沙星在 0.2 - 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度间其荧光强度与浓度呈线性关系,线性回归方程为 $y = 5.0472x + 2.0088$, $R^2 = 0.9987$ 。荧光分光光度计结果显示,鹰嘴豆芽素 A 对 MRSA41577 体内环丙沙星蓄积量的影响随着环丙沙星作用菌体时间的增加而增加,其中当环丙沙星作用菌体 15min 后,菌体内环丙沙星蓄积量比对照组增加了 83% ($P < 0.01$) (图 3),与阳性对照利血平的作用效果相当,该结果可证明鹰嘴豆芽素 A 是 MRSA41577 的外排泵抑制剂。

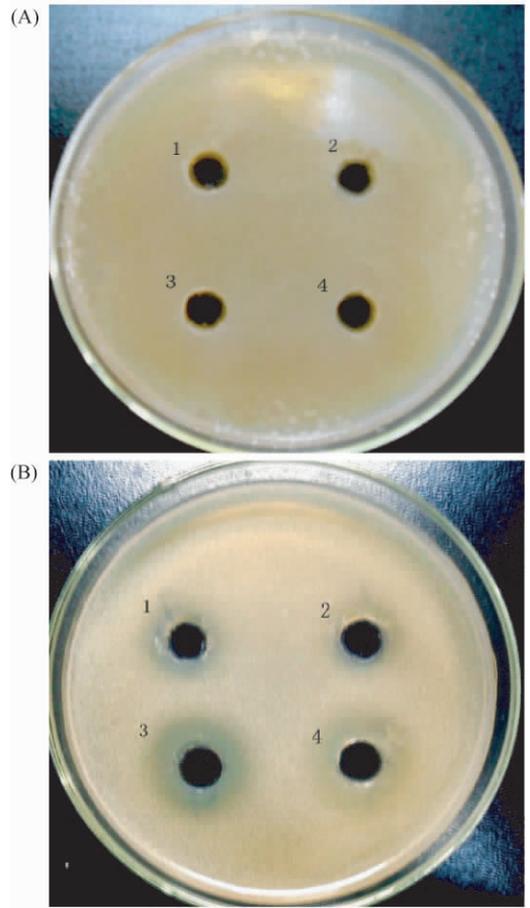


图 2. 鹰嘴豆芽素 A 对 MRSA41577 外排作用的影响
Figure 2. Effect of Biochanin A on efflux effect of MRSA41577. A: control group; B: test group. 1, 60 μg Biochanin A; 2, 40 μg Biochanin A; 3, 60 μg reserpine; 4, 40 μg reserpine.

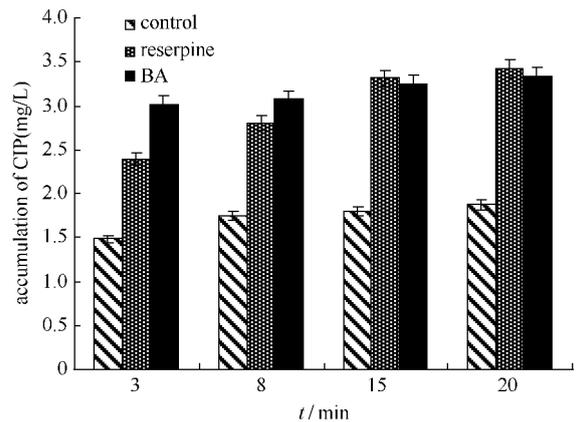


图 3. 鹰嘴豆芽素 A 对 MRSA41577 体内环丙沙星蓄积量的影响
Figure 3. Effect of biochanin A on accumulation of ciprofloxacin in MRSA41577.

2.5 鹰嘴豆芽素 A 对 MRSA41577 外排基因 *norA* 表达量的影响

试验结果显示, 鹰嘴豆芽素 A 作用 MRSA41577 16 h 后, 可显著降低 MRSA41577 菌体内 *norA* 基因的相对表达量, 与对照组相比降低了 65% ($P < 0.01$) (图 4), 其作用效果优于阳性对照利血平的 48%。

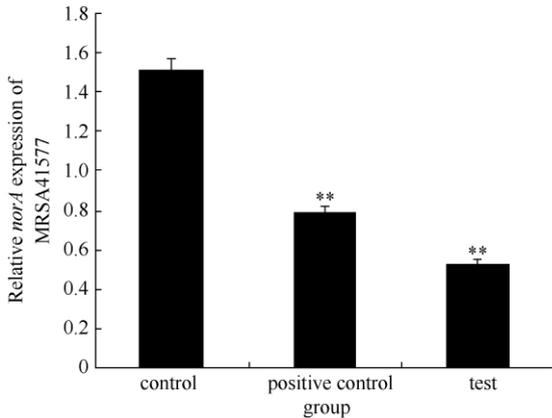


图 4. 鹰嘴豆芽素 A 对 MRSA41577 *norA* 表达量的影响

Figure 4. Effect of biochanin A on relative *norA* expression of MRSA41577. ** $P < 0.05$ when compared with the control.

2.6 鹰嘴豆芽素 A 对其他外排蛋白的影响

鹰嘴豆芽素 A 作用 MRSA41577 16h 后, 与对照组相比, 菌体的蛋白谱带发生了明显的变化 (图 5), 运用 Gel-Pro Analyzer 蛋白分析软件, 对加药后蛋白含量显著减少的蛋白条带进行质谱鉴定, 结果显示, 与外排有关的蛋白只检测到 ABC 转运蛋白 (表 2), 其分子量为 27.9kDa, 与对照组相比, ABC 转运蛋白减少了 43% ($P < 0.01$)。

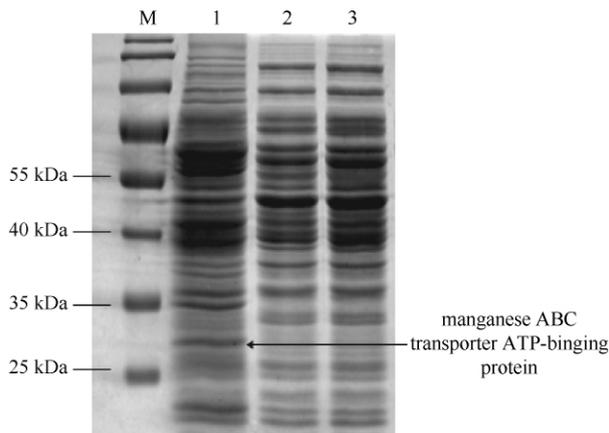


图 5. 鹰嘴豆芽素 A 作用 MRSA41577 后的蛋白谱带

Figure 5. Protein bands of MRSA41577 after treatment by biochanin A. M: Mark; lane 1: control; lane 2: 10 μg/mL biochanin A; lane 3: 20 μg/mL biochanin A.

表 2. ABC 转运蛋白质谱鉴定结果

Table 2. LC-MS result of ABC transporter protein

Protein	Manganese ABC transporter ATP-binding protein (<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Mu50)
accession	gi 16080128
database	NCBI nr
Seq. coverage	9.6%
score	72.27
MW	27.90 kDa
pI	9.58
No. of peptides	2

3 讨论

MRSA 具有传播速度快、影响范围大、耐药谱广等特点, 是目前临床抗感染治疗的难点, 已成为全球关注的重点问题^[19-20]。近年的研究发现, 外排泵是金黄色葡萄球菌产生耐药性的主要原因。外排泵是指细菌将胞内的药物或毒性物质排出胞外的蛋白转运系统, 由细菌细胞膜上具有特殊结构的一类膜转运蛋白所介导, 一般由外膜通道蛋白、融合蛋白和胞质膜外排蛋白组成。目前, 通过筛选和研发外排泵抑制剂来解决细菌耐药问题已成为有效方法之一^[21]。

mecA 基因是 MRSA 特有的外来基因, 在敏感株中不存在, 所以临床上分离的 MRSA 均含有 *mecA* 基因。目前, PCR 法检测 *mecA* 基因已成为 MRSA 鉴定的金标准。本研究所用的供试菌株 MRSA41577, 经头孢西丁纸片法和基因型鉴定均为耐药菌株且为高耐药菌株。能显著降低耐药菌的 MIC 是主动外排系统存在的标志, 因此, 为了确定该菌株的耐药作用机制是否与细菌中存在的主动外排系统有关, 本文测定了鹰嘴豆芽素 A 与环丙沙星协同作用后, 环丙沙星对 MRSA41577 MIC 的影响。试验结果显示, 鹰嘴豆芽素 A 本身对 MRSA41577 无抑菌作用, 但与环丙沙星联用之后, 能使环丙沙星对 MRSA41577 的 MIC 由 64 μg/mL 降低到 8 μg/mL, 该结果与体外杀菌曲线的结果一致。由此可推测鹰嘴豆芽素 A 能抑制 MRSA41577 对环丙沙星的外排作用。

药物外排泵是细菌将胞内的药物或毒性物质排出胞外的一组转运蛋白, 其过量表达可使药物不能

在菌体内蓄积而使菌体具有耐药性。本研究的双平板法和荧光分光光度法测定鹰嘴豆芽素 A 对 MRSA 体内环丙沙星蓄积量试验结果均显示, 鹰嘴豆芽素 A 可提高菌体对环丙沙星的敏感性, 能抑制 MRSA41577 对药物的外排作用, 增加环丙沙星在菌体内的蓄积量, 其作用效果与阳性对照利血平相当。利血平是目前已知的金黄色葡萄球菌外排泵抑制剂, 但由于其具有明显的神经毒性, 因此, 不能用于临床治疗上。本试验结果表明鹰嘴豆芽素 A 是 MRSA41577 的外排泵抑制剂。

主动外排系统是细菌的正常生理结构, 根据氨基酸序列的同源性可将细菌的外排系统分为五个超家族, 包括 SMR、RND、MFS、ABC 及 MATE 家族。其中 *norA* 是金黄色葡萄球菌主要的多药外排蛋白, 属于 MFS 家族。*norA* 蛋白通常由 12 - 14 个跨膜区域构成, 由 388 个氨基酸残基组成, 分子量为 42 kDa 左右, 可主动外排多种化学结构不相关的底物, 如环丙沙星、小檗碱、溴乙锭等^[22]。*norA* 蛋白由位于染色体上的 *norA* 基因编码^[23], 该基因是金黄色葡萄球菌的结构基因, 在正常表达情况下并不导致细菌耐药, 但当环境中受某些抗生素药物诱导时, 该基因被激活, 其表达量明显增加, 并由于具有外排功能的基因产物的增加, 致使菌体外排药物的功能大大增强而表现出耐药性^[24]。本试验结果显示, 鹰嘴豆芽素 A 可显著降低 MRSA41577 菌体内 *norA* 基因的相对表达量, 且作用效果优于阳性对照利血平。表明鹰嘴豆芽素 A 是通过抑制 MRSA41577 菌体内 *norA* 蛋白的表达量, 致使该菌不能将环丙沙星排出而恢复其对药物的敏感性。

此外, 本试验对加药前后菌体内蛋白含量明显减少的蛋白条带进行了质谱鉴定, 结果显示, 与主动外排系统有关的蛋白除 *norA* 蛋白外, 还检测到一种与外排有关的 ABC 转运蛋白, 该蛋白属于 ABC 家族, 广泛存在于真核生物和原核生物中。ABC 转运蛋白一般包含 2 个跨膜结构域和 2 个核酸结合域, 是膜整合蛋白, 能利用水解 ATP 释放的能量将菌体内各种药物或胞内毒素跨膜转运至胞外^[25]。本研究结果显示, 鹰嘴豆芽素 A 可通过抑制 ABC 转运蛋白的合成来抑制金葡菌对药物的外排作用。

综上所述, 鹰嘴豆芽素 A 是一种良好的 MRSA 外排泵抑制剂, 其作用机制是通过降低 MRSA 菌体内 *norA* 基因的表达量, 进而减少 *norA* 蛋白的表达

量, 抑制 MRSA 对环丙沙星等药物的排出而恢复其对药物的敏感性。此外, 鹰嘴豆芽素 A 也能抑制 ABC 转运外排蛋白的合成。由于 MRSA 的外排系统多种多样, 因此药物对外排蛋白的抑制作用应该是多方面综合作用的结果, 有关鹰嘴豆芽素 A 对 MRSA 外排蛋白的作用机制尚有待于进一步的研究。

参考文献

- [1] Yang C. New Progress of MRSA resistance mechanisms and molecular biology detection methods. *Chinese Journal Nosocomiol*, 2007, 17(3): 356-358. (in Chinese)
杨长顺. MRSA 耐药机制与分子生物学检测方法研究新进展. 中华医学感染学杂志, 2007, 17(3): 356-358.
- [2] Gu X, Jin L, Cai J, Liu Y, Wang B. Discussion and suggestion on the national antimicrobial resistance monitoring and surveillance program in Animals. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2009, 43(7): 45-50. (in Chinese)
顾欣, 金凌艳, 蔡金华, 刘雅妮, 王蓓. 国家动物源细菌耐药性监测工作的探讨和建议. 中国兽药杂志, 2009, 43(7): 45-50.
- [3] Rao Y, Zeng Z, Chen Z. The active efflux mechanism of antibiotic resistance. *World Notes on Antibiotics*, 2002, 23(3): 109-114. (in Chinese)
饶勇, 曾振灵, 陈杖榴. 抗生素耐药性的主动外排机制. 国外医药抗生素分册, 2002, 23(3): 109-114.
- [4] Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005, 56(1): 20-51.
- [5] Cui L, Iwamoto A, Lian J, Neoh H, Maruyama T, Horikawa Y. Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, 50(2): 428-438.
- [6] Truong-Bolduc QC, David C. The transcriptional regulators NorG and MgrA modulate resistance to both quinolones and β -lactams in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(8): 2996-3005.
- [7] Deng S, Wu X, Zhong H, Peng S. Active efflux pump genes encoding detection and analysis of multi-drug resistant acinetobacter baumannii clinical strains. *New Medicine*, 2011, 42(9): 608-610. (in Chinese)
邓思建, 伍晓峰, 钟海波, 彭双明. 多重耐药鲍曼不动杆菌临床株的主动外排泵编码基因检测及分析. 新医学,

- 2011, 42 (9) :608-610.
- [8] Molnar J, Engi H, Hohmann J, Molnar P, Deli J, Wesolowska O, Michalak K, Wang Q. Reversal of multidrug resistance by natural substances from plants. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2010, 10 (17) : 1757-1768.
- [9] Morris ME, Zhang S. Flavonoid-drug interactions: Effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Sciences*, 2006, 78 (18) : 2116-2130.
- [10] van Zanden ZZ, Anika de Mul, Wortelboer HM, Usta M, van Bladeren PG, Rietjens LMCM, Cnubben NHP. Reversal of in vitro cellular MRP1 and MRP2 mediated vincristine resistance by the flavonoid myricetin. *Biochem Pharmacol*, 2005, 69 (11) :1657-1665.
- [11] Kuete V, Alibert-Franco S, Eyong KO, Ngameni B, Folefoc GN, Nguemaving JR, Tangmouo JG, Fotso GW, Komguem J, Ouahouo BMW, Bolla JM, Chevalier J, Ngadiui BT, Nkengfack AE, Pages JM. Antibacterial activity of some natural products against bacteria expressing a multidrug-resistant phenotype. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2011, 37 (2) : 156-161.
- [12] Hendrich AB, Zugaj J, Michalak K. Biochanin A similarly influences the fluidity of liposomes formed from charged and zwitterionic lipids. *Cell Molecular Biological Letters*, 2002, 7 (2) :284.
- [13] Ying C, Hsu JT, Shieh SC. Growth inhibition of human endothelial cells by the phytoestrogen biochanin A, a metabolite of genistein. *British Journal of Nutrition*, 2001, 85 (5) :615-620.
- [14] Zhang SZ, Morris ME. Effects of the flavonoids biochanin A, morin, phloretin, and silymarin on P-glycoprotein-mediated transport. *Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2002, 304 (3) : 1258-1267.
- [15] Ben CL, Margaret I, Clara BSL, Lui SL, Claude J, Carine GE, Marc L, Neil ER, Huansheng G, Raymond HS, Fung KP, Leung PC. Synergistic effects of baicalein with ciprofloxacin against NorA over-expressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and inhibition of MRSA Pyruvate kinase. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 137 (1) :767-773.
- [16] Yang Z, Yang X, Niu Y. Screening for and bioassay-guided isolation of bacterial efflux pump inhibitors by control method based on double plates. *Natural Product Research and Development*, 2010, 22 (1) :277-280. (in Chinese)
杨再昌, 杨小生, 牛玉乐. 双平板对照筛选跟踪分离细菌外排泵抑制剂. *天然产物研究与开发*, 2010, 22 (1) : 277-280.
- [17] Mao C, Li W, Wang Y, He J. The mechanism of resistance inhibition of baical skullcap root extracts to *Staphylococcus aureus*. *Lishizhen Medicine and Material Medica Research*, 2012, 12 (23) : 3018-3021. (in Chinese)
毛春季, 李伟奇, 王一帆, 贺建华. 黄芩提取物的耐药抑制作用机理初步研究. *时珍国医国药*, 2012, 12 (23) : 3018-3021.
- [18] Du R, Han W, Lei L. The relation between fluoroquinolones-resistant and mRNA expression level of *NorA* gene in *Staphylococcus aureus*. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2006, 26 (1) :66-68. (in Chinese)
杜锐, 韩文瑜, 雷连成. 金黄色葡萄球菌氟喹诺酮耐药性与 *norA* 基因 mRNA 表达水平的关系. *中国兽医学报*, 2006, 26 (1) :66-68.
- [19] Boubaker BBI, Abbes BR, Abdallah BH, Mamlouk K, Mahjoubi F, Kammoun A, Hammami A, Redjeb BS. Evaluation of a cefoxitin disk diffusion test for the routine detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, 2004, 10 (8) : 762-765.
- [20] Deng X, Sun F, Ji QJ, Liang HH, Missiakas D, Lan LF, He C. Expression of multidrug resistance efflux pump gene *norA* is iron responsive in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194 (7) : 1753-1762.
- [21] Xian R, Ma S. Research Progress of the inhibitors of *norA* multidrug resistance efflux pump. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2007, 42 (17) : 1045-1120. (in Chinese)
咸瑞卿, 马淑涛. *norA* 多药耐药外排泵抑制剂研究进展. *中国药学杂志*, 2007, 42 (17) : 1045-1120.
- [22] Song Z, Feng X, Han W, Ding Z, Chen A, Lei L. Selection of Chinese herbal medicine *Staphylococcus aureus norA* efflux pump inhibitor. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2007, 29 (3) : 329-333. (in Chinese)
宋战昉, 冯新, 韩文瑜, 丁壮, 陈敖第, 雷连成. 金黄色葡萄球菌 *norA* 外排泵中药耐药抑制剂的筛选. *吉林农业大学学报*, 2007, 29 (3) : 329-333.
- [23] Zhou X, Yu L, Li Q, Deng X, Zhang Y. Prokaryotic expression of the multi-drug resistant *norA* gene of *Staphylococcus aureus* and its antibody preparation. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2005, 30 (10) : 604-607. (in Chinese)
周学章, 于录, 李乾学, 邓旭明, 张艳萍. 金葡菌多重耐药基因 *norA* 的原核表达及其抗体制备. *中国抗生素杂志*, 2005, 30 (10) :604-607.

[24] Kaatz GW, Thyrajan RV, Seo SM. Effect of promoter region mutations and *mgrA* overexpression on transcription of *norA*, which encodes a *Staphylococcus aureus* multidrug efflux transporter. *Antimicrobial Agents and*

Chemotherapy, 2005, 49 (1) :161-169

[25] Locher KP. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 2009, 364 (1514) :239-245.

Inhibitory effects of biochanin A on the efflux pump of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Dan Zou, Kunpeng Xie, Haiting Wang, Yuxian Chen, Mingjie Xie*

College of Life Science, Liaoning Normal University, Laboratory of Biotechnology and Molecular drug development in Liaoning Province, Dalian 116081, Liaoning Province, China

Abstract: [Objective] To study the inhibitory effect of biochanin A on efflux system of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). [Methods] Inhibitory effects of biochanin A on efflux system of Strain MRSA41577 were evaluated using double dilution method, two plate method and fluorescence spectrophotometry. Real time PCR and SDS-PAGE were applied to detect the expression of MRSA41577 *norA* and to analyze the changes of MRSA41577 efflux protein before and after dosing biochanin A in association with liquid chromatography mass spectrometry to determinate protein variation. [Results] Biochanin A alone had no inhibitory effect on MRSA41577, but it showed synergy effect with ciprofloxacin in inhibition MRSA41577 in which 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ biochanin A decreased the minimum inhibitory concentration (MIC) value of ciprofloxacin from 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Biochanin A significantly increased the accumulation of ciprofloxacin in MRSA41577 in a time-dependent manner. At 15 min, biochanin A increased ciprofloxacin in MRSA41577 by 83%, which is similar to that of reserpine (positive control). Further mechanism studies indicated that biochanin A could reduce the expression of *norA* in ciprofloxacin-treated MRSA41577. After incubated with biochanin A and ciprofloxacin for 16 h, the relative expression of *norA* of MRSA41577 was reduced by 65%. SDS-PAGE analysis showed that the total protein profiles of MRSA41577 were significantly changed after treatment with biochanin A for 16h, in which both *norA* protein and efflux system ABC transporter ATP-binding protein were significantly decreased. [Conclusion] Biochanin A could inhibit Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* efflux system through reducing pathogen's expression of *norA* and *norA* protein.

Keywords: Biochanin A, MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), *norA* gene, efflux protein

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Liaoning Provincial Department of Education science general project (L2013412) and by the Dalian Science and Technology Project (2013E13SF108)

* Corresponding author. Tel: +86-411-85827068; E-mail: xmj1222@sina.com

Received: 7 March 2014 / Revised: 12 May 2014