

三七对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌细胞壁的作用及机制

冯小玉¹ 杨伟峰² 夏玉文¹ 温博¹ 张璐璐¹ 安洪萨¹ 葛锋³ 谭勇¹

(1. 中国中医科学院中医临床基础医学研究所, 北京 100700; 2. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700;

3. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650500)

【摘要】目的 探究三七(PN)对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)细胞壁的作用及机制。**方法** 实验分对照组(Control组)和PN组, Control组MRSA未干预, PN组MRSA被2 mg/mL PN干预24 h。酶联免疫吸附试验(ELISA)检测PN对MRSA细胞壁肽聚糖(PGN)和脂磷壁酸(LTA)的影响; 透射电镜(TEM)观察MRSA细胞壁厚度; 转录组测序技术(RNA-Seq)筛选PN干预MRSA的药效相关基因, 通过基因本体(GO)与京都基因与基因组百科全书(KEGG)对其进行富集分析; 实时荧光定量PCR技术验证PN干预MRSA的细胞壁相关基因。**结果** 与Control组比较, PN组PGN、LTA降低($P < 0.05$); PN组处于分裂期的细菌数量增多, 体积变大, 细菌分裂隔膜模糊, 细胞壁厚度薄($P < 0.05$)。2组间有552个差异基因, 相较于Control组, PN组285个基因上调、267个基因下调; 差异基因涉及的生物过程(BP)主要富集在氧化还原、前体代谢产物和能量产生、细胞氨基酸分解代谢、有氧呼吸过程, 细胞组分(CC)主要富集在细胞解剖实体、细胞器、非膜界细胞器, 分子功能(MF)主要富集在氧化还原酶活性、结构分子活性、电子转移活性; 差异基因共富集85条信号通路, 其中包括脂肪酸、赖氨酸降解; 差异基因MraY、MurD、MurC、FemA、FemB、sgtB与MRSA细胞壁相关。与Control组比较, PN组MraY、MurD、FemA、FemB表达降低($P < 0.05$), MurC、sgtB表达升高($P < 0.05$)。**结论** PN可抑制MRSA细胞壁, 与降低细胞壁相关基因表达和促进脂肪酸、赖氨酸降解等有关。

【关键词】 三七; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 细胞壁; 抑制作用; 肽聚糖; 脂磷壁酸

DOI: 10.16025/j.1674-1307.2024.06.015

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)是一种临床常见的多重耐药菌, 可引起肺炎、败血症、心内膜炎等多系统严重病变^[1]。四环素类、氟喹诺酮类和 β 内酰胺类抗生素能够治疗MRSA感染, 但疗效一般并存在抗菌谱窄、不良反应大等缺点。为了更好地治疗MRSA感染, 当前亟待寻找新的药物。细菌感染属于中医外感病。中医治疗外感病疗效确切。中药通过多成分、多靶点、多途径发挥抗细菌感染作用^[2]。多重耐药菌感染常缠绵难愈, 其病机有久病入络、气血瘀滞的特点, 因此在其治疗中酌情使用活血化瘀药为常用治法。三七(*Panax Notoginseng*, PN)是临床常用的活血化

瘀药, 可单独使用, 也可与其他药配伍形成复方使用。现代药理学研究^[3]发现, PN具有抗菌抗炎活性。临床上PN被用于MRSA感染的治疗, 但其具体药效及机制尚不清楚。细菌细胞壁具有防止由于渗透胁迫而导致细菌裂解的作用, 主要由肽聚糖(peptidoglycan, PGN)、脂磷壁酸(lipoteichoic acid, LTA)组成。PN的皂苷类成分具有破坏细菌细胞壁的作用。本研究观测PN对MRSA细胞壁的影响, 并探索其作用机制, 期冀为PN治疗MRSA感染提供依据。

1 实验材料

1.1 菌株

MRSA购自美国模式培养物库(ATCC43300)。

基金项目: 中国中医科学院自主选题项目(Z0735); 中国中医科学院科技创新工程中医临床基础学科创新团队项目(CI2021B003); 中国中医科学院科技创新工程中医临床基础学科重大攻关项目子课题(CI2021A00704-2); 云南省科学技术厅课题(Z0797)

作者简介: 冯小玉, 女, 26岁, 硕士研究生。研究方向: 中医药防治感染性疾病。

通信作者: 谭勇, E-mail: tcmtanyong@126.com

引用格式: 冯小玉, 杨伟峰, 夏玉文, 等. 三七对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌细胞壁的作用及机制[J]. 北京中医药, 2024, 43(6): 655-660.

用无菌接菌环从 MRSA 平板中挑取单菌落接种于 3 mL 水解酪蛋白肉汤培养基 (MH) 中, 于恒温摇床 (37 °C、280 r/min) 振摇, 培养 16~18 h 至对数期。测定其吸光度 A_{600} , 并将菌液在 MH 肉汤培养基中稀释至 $A_{600}=0.002$ (约 10^6 CFU/mL), 备用。

1.2 药物

PN 粉末由昆明理工大学生命科学与技术学院葛峰教授提供, 来源于云南七丹药业股份有限公司 (批号 2309003)。将 PN 粉末按照 4 mg/mL 浓度先溶解于无菌 MH 培养基中, 4 °C 下 2 500 r/min, $R=2.5$ cm, 离心 4 min, 定性滤纸粗滤, 粗滤后将上清液置于 0.22 μ m 的滤膜中过滤除菌, 备用。实验过程中排除中药溶液杂质、电解质等因素对实验的干扰。

1.3 试剂

MH 肉汤 CM0405 (英国 OXOID 公司, 批号 2963434), 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (武汉吉立德生物科技有限公司, 批号 J21950)。

1.4 仪器

生物安全柜购自西班牙 Telstar 公司 (型号 BIO II Advance); 空气振荡摇床购自苏州培英实验设备有限公司 (型号 THZ-D); 恒温恒湿箱购自德国 BINDER (型号 KBF-240); 紫外分光光度计购自上海美普达仪器公司 (型号 V-1100); 多功能酶标仪购自美国 Molecular Devices (型号 SpectraMax ID3); 高压灭菌锅购自日本三洋 (型号 770006); 微量台式离心机购自德国 WIGGENS (型号 BIOGEN 22R)。

2 实验方法

2.1 PN 干预浓度及实验分组

根据 CCK8 预实验, PN 对宿主细胞无影响的最大浓度为 2 mg/mL, 以此浓度开展后续实验。实验分对照组 (Control 组) 和 PN 组。Control 组 MRSA 不干预, PN 组 MRSA 被浓度为 2 mg/mL 的 PN 干预 24 h。给药干预方式参考既往研究^[4-5]。

2.2 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测 PN 对 MRSA 细胞壁 PGN、LTA 的影响

根据说明书要求分别设定空白孔 (只含 PGN 和 LTA 抗体)、标准孔 (标准品+HRP 酶+PGN 和 LTA 抗体) 和样品孔 (PN 样本+HRP 酶+PGN 和 LTA 抗体), 均设置 3 个复孔。于各孔分别加入稀释好的标准品和待测样品 100 μ L, 轻轻晃动混匀, 覆上板贴, 37 °C 温育 2 h。随后弃去液体, 加生物素标记抗体工作液 100 μ L, 覆上新的板贴, 37 °C

温育 1 h。依序每孔加终止溶液 50 μ L, 在酶标仪上波长设置 450 nm 测量每孔 A 值。

2.3 透射电镜 (TEM) 观察 MRSA 细胞壁厚度

MH 肉汤培养基中稀释菌液至 $A_{600}=0.002$, 加入 PN 使其终浓度为 2 mg/mL, 同时设置仅加 MH 肉汤培养基作空白对照组, 37 °C、80% RH 培养箱中培养 24 h; 而后 4 °C 下 3 000 r/min, $R=8.2$ cm, 离心 15 min 收集菌体。各组样本 4% 戊二醛过夜固定, 1% 锇酸固定 1 h, PBS 缓冲液漂洗 3 次, 5 min/次, 常规梯度丙酮脱水、包埋、超薄切片, 透射电镜下观察。细胞壁厚度测量参考文献 [6]。

2.4 转录组测序技术 (RNA-Seq) 技术筛选 PN 干预 MRSA 的药效相关基因

2.4.1 样品检测: 在进行文库构建之前, 对 RNA 样品进行严格检测, 通过 Nanodrop 检测 RNA 纯度 ($A_{260/280}$ 、 $A_{260/230}$), 通过 Agilent 2100 对 RNA 片段长度进行检测。

2.4.2 文库构建: 样品检测合格后, 用去除 rRNA 的方法富集 mRNA。通过 AMPure XP beads 对双链 cDNA 进行片段大小选择, 进行 PCR 扩增以构建 cDNA 文库。

2.4.3 上机测序: 文库质检合格后, 按照文库有效浓度及期望数据量的需求对文库进行 pooling, 根据测序读长, 选择相应型号的测序仪上机测序。

2.4.4 数据过滤: 数据过滤标准为过滤带有测序接头* (adapter) 的 Reads; 过滤 N (不确定碱基) 含量比例大于 1% 的 Reads; 过滤低质量碱基 ($Q\leq 20$) 含量大于 50% 的 Reads。

2.4.5 表达分析: 采用 HTSeq 软件对各样品进行基因表达分析, 模型为 union。一般情况下, 使用 FPKM 值为 0.1 或 1 作为判断基因是否表达的阈值。

2.4.6 差异表达基因统计: 由于 DESeq 已经进行了实验误差的控制, 差异表达基因筛选的标准: $qvalue<0.05$ 、表达差异倍数 $|\log_2 FC|>1$ 。

2.5 差异表达基因功能分析

差异表达基因的基因本体 (GO) 富集分析采用 GOseq 软件, 差异表达基因的京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析采用 KEGG (<http://www.kegg.jp>) 数据库。

2.6 实时荧光定量 PCR 技术验证 PN 干预 MRSA 的药效基因

4 °C 下 12 000 r/min, $R=2.5$ cm, 离心 2 min 收集菌体, 用含有溶菌酶的 100 μ L TE 缓冲液彻底重悬菌体。使用 NanoDrop® ND-2 000 检测 RNA 浓度

和纯度。总 RNA 浓度= $A_{260} \times \text{稀释倍数} \times 40 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 进行 cDNA 反转录。将所有 cDNA 样品分别配置 RT-qPCR 反应体系: $10 \mu\text{L}$ 2×Master Mix, $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ PCR 上下游特异引物各 $0.5 \mu\text{L}$, 总体积为 $18 \mu\text{L}$, $5\ 000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 10 min 。将 $18 \mu\text{L}$ 混合液及对应的 $2 \mu\text{L}$ cDNA 加入 96 孔板中, 封口后短暂离心混合。PCR 反应: 将 96 孔板置于实时荧光定量 PCR 仪上进行反应。反应条件: 95°C 30 s ; 95°C 5 s ; 60°C 40 s 共 40 个循环。为建立 PCR 的熔解曲线, 扩增反应结束后, 最终从 60°C 缓慢加热到 99°C 。 $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ 计算目的基因相对表达量。引物序列见表 1。16 sRNA 为内参基因。

表 1 基因引物序列

基因	引物序列(5'to3')	产物大小 (bp)
MraY	上游引物 ACGAATGTAGCAATCCCACT	270
	下游引物 GCTACCTGTATCTCCCAT	
sgtB	上游引物 CAAGGAGGTAGCACGATT	103
	下游引物 CCTTGTTGGGCTACAAATAAC	
murC	上游引物 TCGGAATTAAAGGTTCTGGC	73
	下游引物 CGATCCTTGAACCTCATGTCTCT	
femA	上游引物 GCCATACAGTCATTTACAG	132
	下游引物 GGTACAGCAGTAAGTAAGCA	
murD	上游引物 CCAAAGCAACAAACACGC	200
	下游引物 GACCGATTTCCTTGACTAT	
femB	上游引物 GCCATACAGTCATTTACAG	132
	下游引物 GGTACAGCAGTAAGTAAGCA	
16s	上游引物 TTCTGCTCTGTAAGTACGCTG	299
	下游引物 CGAAGGGAAGGCTCTATCT	

2.7 统计学方法

采用 Graphpad Prism 9.0 软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 2 组间比较用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 PN 对 MRSA 细胞壁 PGN 和 LTA 的影响

与 Control 组比较, PN 组 PGN、LTA 水平均低 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 2 组 PGN、LTA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	PGN($\mu\text{g}/\text{mL}$)	LTA($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Control 组	8 758.10±579.90	735.12±28.54
PN 组	7 090.92±931.19*	625.61±26.85*

与 Control 组比较, * $P < 0.05$

3.2 PN 对 MRSA 细胞壁形态的影响

与 Control 组比较, PN 组处于分裂期的细菌数量显著增多, 体积变大, 细菌分裂隔膜模糊。见图 1。Control 组、PN 组细胞壁厚度分别为 (48.09 ± 7.08)、(44.02 ± 3.35) nm, 2 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3.3 PN 对 MRSA 基因表达的影响

3.3.1 测序数据质控: 本实验数据 Q20 均在 98% 以上, Q30 均在 95% 以上, 表明测序数据质量较优, 可以应用于生物信息分析。见表 3。

表 3 测序数据统计

样本	碱基序列	错误率	Q20 (%)	Q30 (%)	GC 内容 (%)
Control 重复 1	23672782	0.02	98.13	96.91	41.00
Control 重复 2	16222276	0.02	98.12	96.89	40.81
Control 重复 3	17311070	0.02	98.16	96.96	40.99
PN 重复 1	18897522	0.02	98.19	97.01	41.32
PN 重复 2	18510406	0.02	98.25	97.10	41.02
PN 重复 3	15030210	0.02	98.17	97.00	41.33

3.3.2 差异表达基因: 与 Control 组比较, PN 组有 552 个显著差异表达基因, 其中表达上调基因 285 个, 表达下调基因 267 个。基因的表达量呈对称分布, 差异趋势不随基因表达量变化而发生偏

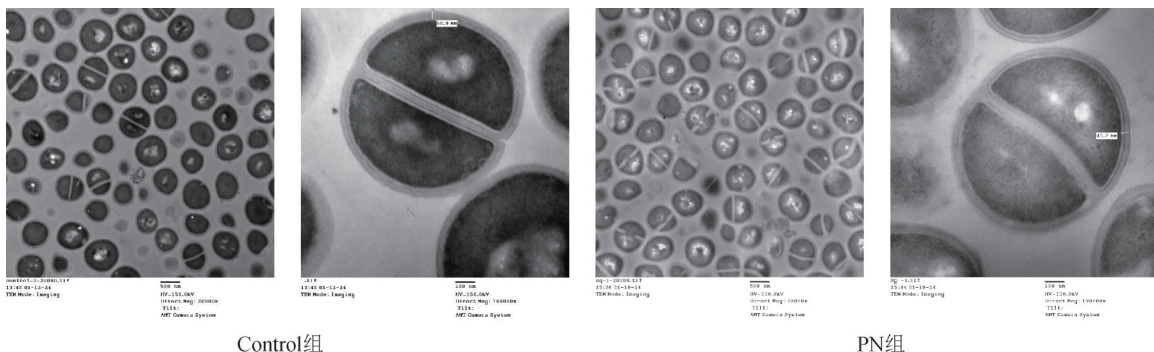
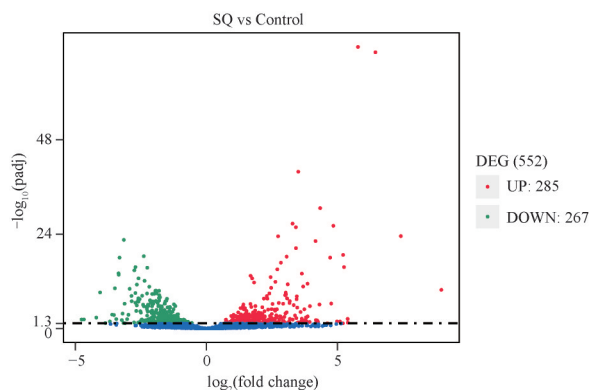


图 1 2 组细胞壁形态变化

向 (图 2)。MraY、MurD、MurC、FemA、FemB、sgtB 基因与 MRSA 细胞壁相关, 表达情况见表 4。



差异表达显著的基因用红点(上调)和绿点(下调)表示;差异表达不显著的基因用蓝点表示

图 2 差异表达基因火山图

表 4 PN 干预 MRSA 的部分基因表达

基因 ID	基因名称	Log ₂ 变化	P 值	Q value 值
KQ76_RS05590	mraY	-4.197 9	<0.01	<0.01
KQ76_RS05595	murD	-2.302 8	<0.01	<0.01
KQ76_RS06675	femB	-1.863 0	<0.01	<0.01
KQ76_RS09780	sgtB	-1.255 9	<0.01	<0.01
KQ76_RS06670	femA	-1.228 1	<0.01	<0.05
KQ76_RS08900	murC	-1.256 6	<0.01	<0.05

3.3.3 差异表达基因 GO 富集分析结果: 552 个差异表达基因 GO 分析结果包括生物过程 (BP)、细胞组分 (CC) 和分子功能 (MF), 选择富集程度前 30 的条目做柱状图 (图 3)。由图 3 可知, PN 干预 MRSA 后的差异表达基因的 BP 主要富集在氧化还原、前体代谢产物和能量的产生、细胞氨基酸分解代谢、有氧呼吸过程; CC 主要富集在细胞解剖实体、细胞器官、非膜界细胞器; MF 主要富集在氧化还原酶活性、结构分子活性、电子转移活性。

3.3.4 差异表达基因 KEGG 通路富集分析结果: 差异表达基因共富集 85 条信号通路, 差异有统计学意义 ($P<0.05$) 的前 20 条通路中的表达上下调基因主要富集在脂肪酸、赖氨酸的降解等通路上。见图 4。

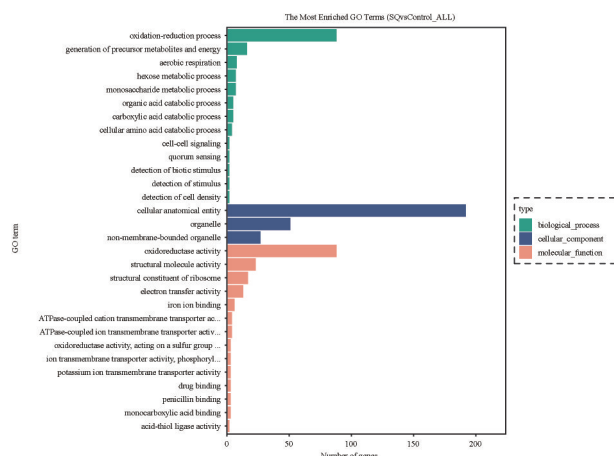


图 3 差异表达基因 GO 富集分析柱状图

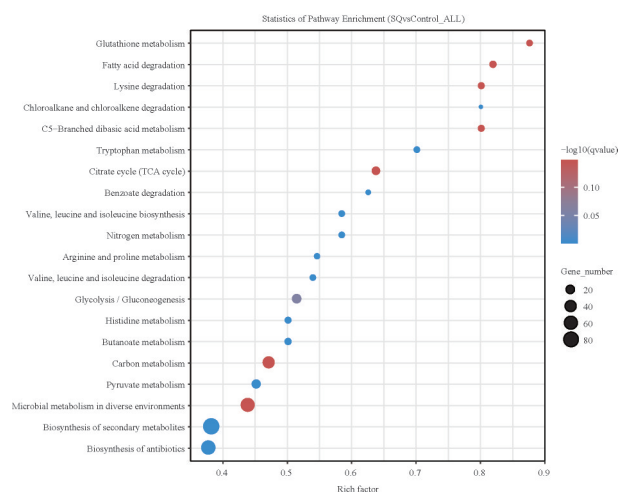


图 4 差异基因 KEGG 富集分析散点图

3.4 PN 对 MRSA 基因表达影响的验证

与 Control 组比较, PN 组 MraY、MurD、FemA、FemB 基因表达低 ($P<0.05$), MurC、sgtB 基因表达高 ($P<0.05$)。见表 5。

4 讨论

中药材 PN 为五加科植物 PN 的干燥根, 产于云南文山州者称为“文三七”, 为著名的道地药材。PN 具有化瘀止血、活血定痛的功效。现代药理研究^[7]发现, PN 具有抗菌、抗疲劳、抗肿瘤、增强机体免疫力等作用。本研究发现, PN 能抑制 MRSA 细胞壁, 降低细胞壁相关成分 PGN 和 LTA 水平, 调控细胞壁相关基因 MraY、MurD、MurC、FemA、FemB、sgtB 表达, 与氧化还原反应、氧化

表 5 2 组细胞壁相关基因表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	MraY	MurD	MurC	femA	sgtB	femB
Control 组	1.09±0.08	0.95±0.09	0.94±0.05	1.00±0.07	0.94±0.07	1.02±0.01
PN 组	0.56±0.02	0.47±0.03	2.12±0.09	0.91±0.03	2.44±0.13	0.89±0.02
P 值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

还原酶活性和脂肪酸的代谢有关。

细菌细胞壁是细菌存活的重要屏障,保护细菌免受外界环境刺激,影响细菌的毒力和耐药性。PGN 约占细胞壁干重的 50%,对于维持细胞形态、大小、渗透压稳定以及细胞存活至关重要^[8]。LTA 是 MRSA 的黏附分子,促进细菌与细胞的结合,使细菌定殖并侵袭组织^[9]。当 PGN 和 LTA 水平下降时,细胞壁完整度下降,本研究发现,PN 组 PGN 和 LTA 水平降低,提示 PN 可通过抑制 PGN 和 LTA 影响细胞壁的合成。此外,在革兰阳性细菌细胞分裂时,在细胞中部的分裂隔膜处形成分裂隔膜,隔膜沿着细胞的中点从质膜向内生长,分裂隔膜界限模糊会影响细菌正常分裂。本研究发现,PN 组细菌分裂隔膜模糊,提示 PN 不仅可以抑制细胞壁合成,还可通过抑制细菌分裂发挥抗菌作用。

细菌转位酶(MraY)是一种参与细菌细胞壁肽聚糖生物合成的完整膜蛋白,由肽基-脯氨酰异构酶发挥作用,是细菌细胞壁主要成分肽聚糖合成的重要酶,可作为细胞壁合成的标志^[10]。MraY 是对细菌存活至关重要的整合膜酶,可催化细菌 PGN 形成的第一个脂质循环反应^[11]。MurD 是 PGN 合成第一阶段的重要催化酶,连接 N-乙酰胞壁酸(MurNAc),形成牢固的细胞壁分子骨架,MurD 是合成新型抗菌剂的靶标^[12]。MurC 存在于肽聚糖合成途径的第一阶段,催化形成五肽尾。sgtB 是肽聚糖合成的关键酶之一,也是金黄色葡萄球菌耐药的直接相关基因。当 MurD 和 MraY 表达下调,提示细菌细胞壁主要成分肽聚糖的合成受到抑制。但 MurC 和 sgtB 基因表达上调原因尚不清楚,需进一步探索。femA、femB 分别编码蛋白 FemA、FemB,可将甘氨酸添加到五甘氨酸肽间桥,参与细胞壁 PGN 的合成。当 femA 和 femB 失活时,五甘氨酸被单甘氨酸取代,使细胞壁 PGN 成分发生改变,还可使 MRSA 对抗生素的耐药水平明显下降,并且 femA 和 femB 是提高 MRSA 对 β -内酰胺类抗生素耐药性的辅助基因,与细菌肽聚糖的合成、细胞分裂和细胞壁的代谢相关^[13]。提示 PN 可能是通过抑制 fem 基因表达抑制细胞壁合成和代谢,影响细菌分裂。

氧化还原酶可以帮助细菌在缺氧环境下生存,破坏宿主细胞的氧化还原平衡,导致细胞死亡,从而提升细菌毒力^[14]。氧化还原酶的催化、聚合、解聚等作用直接或间接调节细胞壁的结构。细菌生物膜内部存在着相对稳定的微环境,包括一定

的氧浓度、蛋白质、多糖等物质,这些物质共同维持着生物膜的功能,通过氧化还原作用,导致抗菌药物的失活,使细菌形成耐药^[15]。PN 破坏 MRSA 细胞壁的机制可能是通过一系列氧化还原反应,形成强氧化性的羟自由基和超氧自由基,作用于细胞壁中的肽聚糖、磷脂和脂肪酸,这些物质会破坏细菌的细胞壁,破坏细胞的氧化还原状态^[16]。

肽聚糖的短肽主要由丙氨酸、谷氨酸和赖氨酸 3 种氨基酸组成^[17]。合成脂肪酸链和胆固醇类物质是细菌细胞壁形成与细菌毒力产生的重要途径^[18]。细胞膜磷脂和脂肪酸含量的变化会影响药物的渗透,并有助于细菌产生耐药性^[19]。研究表明,赖氨酸对提高抗 MRSA、VRSA、VRSE、耐青霉素金黄色葡萄球菌和耐青霉素、红霉素和克林霉素金黄色葡萄球菌等耐药菌活性有利^[20]。PN 通过促进赖氨酸的降解,以抑制细菌细胞壁的合成,还通过抑制细菌合成脂肪酸,从而导致细菌细胞膜的破坏和细胞的分解,发挥体外抗菌作用。

综上,本研究发现 PN 能够抑制 MRSA 细胞壁,其机制与降低细胞壁相关基因表达和促进脂肪酸、赖氨酸降解等有关。以此为基础,下一步开展体内实验,通过 PN 及其主要成分的药效比较研究,深入探讨作用靶点和调控机制,为 PN 治疗多重耐药菌感染提供依据,为其深度开发利用奠定基础,拓展 PN 临床使用范围,丰富活血药治疗难治性细菌感染的理论内涵。

参考文献

- [1] TASCINI C, ATTANASIO V, RIPA M, et al. Ceftobiprole for the treatment of infective endocarditis: A case series [J]. J Glob Antimicrob Resist, 2020,20:56-59.
- [2] ZHANG L, WEN B, BAO M, et al. Andrographolide sulfonate is a promising treatment to combat methicillin-resistant staphylococcus aureus and its biofilms[J]. Front Pharmacol, 2021,12:720685.
- [3] 朱君,张鑫悦,崔敏,等. 4 种中草药提取液的工艺优化及抗菌效果对比研究[J]. 常熟理工学院学报,2023,37(2):65-71.
- [4] 张璐璐,温博,吕诚,等. 基于代谢组学分析热炎宁合剂联合利奈唑胺对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌及其生物膜的抑制机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(13): 89-96.
- [5] 李露,刘爽,崔开宇,等. 痰热清注射液与头孢他啶联用对铜绿假单胞菌的体外耐药敏化作用研究[J]. 北京中医药,2023,42(8):824-830.

- [6] 张彦霞, 乔海霞, 单永强, 等. 景天三七醇提物体外抗菌作用的研究[J]. 河北北方学院学报(自然科学版), 2011,27(5):78-80.
- [7] 楼洁, 胡晓, 梁延群, 等. 肽聚糖的生物合成及其调控机制研究进展[J]. 微生物学报, 2023,63(1):106-123.
- [8] 邓淞云. 金黄色葡萄球菌脂磷壁酸促进小鼠骨量增加的机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2020.
- [9] FER MJ, CORRE LL, PIETRANCOSTA N, et al. Bacterial transferase MraY, a source of inspiration towards new antibiotics[J]. Curr Med Chem, 2018,25(42): 6013-6029.
- [10] MASHALIDIS EH, LEE SY. Structures of bacterial MraY and human GPT provide insights into rational antibiotic design[J]. J Mol Biol, 2020,432(18):4946-4963.
- [11] G CB, SAHUKHAL GS, ELASRI MO. Role of the msaABCR operon in cell wall biosynthesis, autolysis, integrity, and antibiotic resistance in staphylococcus aureus[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63(10): e00680-19.
- [12] 邢龄艺, 荆瑶瑶, 冯京, 等. 细菌耐药机制研究进展及新药研发策略[J]. 天津中医药大学学报, 2023,42(1): 127-136.
- [13] 邓裕祺, 蔡燕. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药机制[J]. 甘肃医药, 2022,41(5):392-396.
- [14] 陈雯, 丁纯蕾, 孙旗, 等. 探讨中药及其成分对细菌生物被膜耐药抑制作用的研究进展[J]. 环球中医药, 2024, 17(1):144-149.
- [15] COLLET JF, CHO SH, IORGA BI, et al. How the assembly and protection of the bacterial cell envelope depend on cysteine residues[J]. J Biol Chem, 2020, 295 (34):11984-11994.
- [16] NOCEK BP, GILLNER DM, FAN Y, et al. Structural basis for catalysis by the mono- and dimetalated forms of the dapE-encoded N-succinyl-L,L-diaminopimelic acid desuccinylase[J]. J Mol Biol, 2010,397(3):617-626.
- [17] 胡筋冷. 分枝杆菌适应异烟肼药物和缺氧压力的分子机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
- [18] 魏思敏. 茶树油纳米乳液与抗生素联合抑制耐药大肠杆菌的作用及机制研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2023.
- [19] 武怀志, 沈勇, 罗雅妮, 等. 查耳酮杂合体的抗菌活性研究进展[J]. 国外医药(抗生素分册), 2023,44(5):前插 1-前插 2,289-296.
- [20] 刘晓霞, 陈剑华, 郭旭丽, 等. 痰热清与头孢曲松钠联用对巨噬细胞极化的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2023,39 (2):272-275,280.

Effect and mechanism of Panax Notoginseng on methicillin-resistant staphylococcus aureus cell wall

FENG Xiaoyu¹, YANG Weifeng², XIA Yuwen¹, WEN Bo¹, ZHANG Lulu¹, AN Hongsa¹, GE Feng³, TAN Yong¹

(1. Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Medical Experimental Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. School of Life Science and Technology, Kunming University of Technology Kunming 650500)

ABSTRACT Objective To explore the effect and mechanism of panax notoginseng (PN) on methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) cell wall. **Methods** There were PN treatment group and control group in this study. MRSA in control group was not intervened, while MRSA in PN group was intervened by 2 mg/mL PN for 24 hours. The effects of PN on wall peptidoglycan (PGN) and wall phosphate (LTA) in MRSA cells were detected using ELISA. The effect of PN on the thickness of MRSA cell wall was observed through transmission electron microscopy. Genes related to the efficacy of PN were screened using RNA Seq technology, then these genes were verified by RT-PCR. **Results** Compared with the control group, the levels of PGN and LTA in MRSA in PN group were significantly reduced ($P < 0.05$). In PN group, the number and volume of bacteria in dividing stage increased, the dividing membrane of bacteria was blurred and the cell wall thickness was thin ($P < 0.05$). There were 552 different genes between the two groups. Compared with the control group, 285 genes in PN group were up-regulated and 267 genes were down-regulated. Biological processes (BP) related to differential genes are mainly concentrated in redox, precursor metabolites and energy production, cellular amino acid catabolism and aerobic respiration, cellular components (CC) are mainly concentrated in cellular anatomical entities, cellular organs and non-membrane organelles, and molecular functions (MF) are mainly concentrated in redox enzyme activity, structural molecular activity and electron transfer activity. The differential genes enriched 85 signal pathways, including fatty acid and lysine degradation. The differential genes MraY, MurD, MurC, FemA, FemB and sgtB are related to MRSA cell wall. Compared with the control group, the expressions of MraY, MurD, FemA and FemB in PN group decreased ($P < 0.05$), while the expressions of MurC and sgtB increased ($P < 0.05$). **Conclusion** PN exerts the therapeutic effect on MRSA by inhibiting its cell wall which is related to reducing the expression of cell wall-related genes and promoting the degradation of fatty acids and lysine.

Keywords Panax notoginseng (PN); methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA); cell wall; inhibition; PGN; LTA

(收稿日期: 2024-02-20)