亚抑菌浓度痰热清注射液抑制金黄色葡萄球菌α-溶血素溶血活力

童倩[1]，王毅[2]，周金鹤[3]，崔开宇[2]，马卓[1*]，杨伟峰[2*]
（1. 湖北工业大学，武汉 430068；2. 中国中医科学院 医学实验中心，北京 100700；
3. 吉林农业大学，长春 130118）

［摘要］ **目的**：研究痰热清注射液（TRQ）在亚抑菌浓度下是否抑制金黄色葡萄球菌α-溶血素的产生、释放，进而缓解感染过程中机体损伤，为更好地指导临床用药提供实验依据。**方法**：微孔板法和时间-生长曲线首先测定TRQ对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度（MIC）和对细菌生长的影响；而后不同亚抑菌浓度TRQ与细菌或细菌上清共培养，再与脱纤维兔血共孵育，检测TRQ对金黄色葡萄球菌α-溶血素的抑制和中和作用；细胞增殖与活性检测（CCK-8）法检测TRQ对金黄色葡萄球菌感染介导的人肺泡上皮细胞（A549）损伤的保护作用；实时荧光定量聚合酶链式反应（Real-time PCR）检测亚抑菌浓度TRQ对金黄色葡萄球菌α-溶血素调控基因hla，agrA mRNA表达的影响。**结果**：TRQ对金黄色葡萄球菌的MIC为1/8原液，亚抑菌浓度（1/64MIC~1/16MIC）TRQ不影响细菌生长；1/64MIC~1/16MIC浓度TRQ具有抑制和中和α-溶血素溶血活力的作用，且对金黄色葡萄球菌感染介导的A549细胞损伤具有保护作用；其对α-溶血素的抑制作用与抑制hla，agrA mRNA表达密切相关。**结论**：亚抑菌浓度TRQ能抑制和中和金黄色葡萄球菌的α-溶血素溶血活力，对金黄色葡萄球菌感染介导的A549细胞损伤具有保护作用，其抑制α-溶血素的机制与干扰agr调控系统密切相关。

［关键词］ 金黄色葡萄球菌；α-溶血素；痰热清注射液；亚抑菌浓度
［中图分类号］ R2-0；R22；R285.5；R289；R33 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1005-9903（2021）09-0086-08
［doi］ 10.13422/j.cnki.syfjx.20210605
［网络出版地址］ https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210310.1154.001.html
［网络出版日期］ 2021-3-10 16:24

Study on Sub-minimal Inhibitory Concentration of Tanreqing Injection in Inhibiting Hemolytic Activity of *Staphylococcus aureus* α-hemolysin

TONG Qian[1], WANG Yi[2], ZHOU Jin-he[3], CUI Kai-yu[2], MA Zhuo[1*], YANG Wei-feng[2*]
(1. *Hubei University of Technology*, *Wuhan* 430068, *China*;
2. *Experimental Research Center*, *China Academy of Chinese Medical Sciences*, *Beijing* 100700, *China*;
3. *Jilin Agricultural University*, *Changchun* 130118, *China*)

［**Abstract**］ **Objective**: To study whether Tanreqing injection (TRQ) can alleviate the body injury in the process of infection by inhibiting the production and release of α-hemolysin of *Staphylococcus aureus* under sub-minimal inhibitory concentration, and to provide experimental basis for better guidance of clinical medication. **Method**: The effects of TRQ on the minimum inhibitory concentration (MIC) and bacterial growth of *S. aureus* were determined firstly by microplate method and time-growth curve. The different sub-minimal inhibitory concentrations of TRQ were co-cultured with bacteria or bacterial supernatants, and then co-incubated with defibrillated rabbit blood to detect the inhibitory and neutralizing effects of TRQ on *S. aureus* α-hemolysin.

［收稿日期］ 20201215（021）
［基金项目］ “中医药现代化研究”重点专项（2019YFC1709305）；李连达院士工作站专项经费项目（HX2017001）
［第一作者］ 童倩，在读硕士，从事中药抗菌机制研究，E-mail：bronze. tongqian@foxmail. com
［通信作者］ * 马卓，博士，教授，从事药物制剂及中药研究，E-mail：mazhuo@mail. hbut. edu. cn；
* 杨伟峰，博士，副研究员，从事中药抗菌机制研究，Tel：010-64789506，E-mail：452040236@qq. com

Cell counting kit-8 (CCK-8) cell viability assay was used to detect the protective effect of TRQ on *S. aureus*-mediated damage to human alveolar epithelial cells (A549). Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the effect of sub-minimal inhibitory concentration of TRQ on the mRNA expression of *S. aureus* α-hemolysin regulatory genes hla and agrA. **Result**: The MIC of TRQ to *S. aureus* was 1/8 of the stock solution, and the sub-minimal inhibitory concentration (1/64MIC-1/16MIC) TRQ used in this study did not affect the growth of bacteria. 1/64MIC-1/16 MIC TRQ had the effect of inhibiting and neutralizing the hemolytic activity of α-hemolysin, with a protective effect on *S. aureus* supernatant-mediated A549 cell damage, and its inhibitory effect on α-hemolysin was closely related to the inhibition of hla and agrA mRNA expression. **Conclusion**: The sub-minimal inhibitory concentration TRQ can inhibit and neutralize the hemolytic activity of α-hemolysin of *S. aureus*, with a protective effect on A549 cell damage mediated by *S. aureus* infection, and its mechanism of inhibiting α-hemolysin is closely related to the interference with agr regulatory system.

[**Key words**] *Staphylococcus aureus*; α-hemolysin; Tanreqing injection; sub-minimal inhibitory concentration

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是一种医院获得性感染和社区获得性感染的常见致病菌,可引起皮肤及软组织感染、肺炎、心内膜炎、乳腺炎、败血症、脓毒血症等,具有高发病率、高致死率的特点[1]。对*S.aureus*致病机制的深入研究发现其分泌的毒力因子(如溶血素、表面蛋白、分选酶、杀白细胞素等)可在宿主-病原体相互作用的各个水平上发挥重要作用,包括允许细菌绕过宿主先天性和适应性免疫、保护细菌免于中性粒细胞杀菌活性、直接改变嗜中性粒细胞功能等,在疾病发展过程中发挥至关重要的作用。*S.aureus* α-溶血素能够破坏人和其他动物的血小板、红细胞、内皮细胞,并产生组织痉挛、局部缺血坏死等多种病理性损伤,是*S.aureus*最重要的毒力因子。当敲除*S.aureus* α-溶血素编码基因后细菌的致病性及感染动物的死亡率均显著降低,提示α-溶血素在*S.aureus*所致肺损伤中的重要性[2-5];当分选酶缺失时,细菌在小鼠感染模型中的毒力也显著下降[5-6]。不同于传统抗生素杀灭细菌时带来的抗生素选择压力易于诱导细菌耐药,基于药物抑制细菌毒力因子的抗毒力策略,通过对毒力因子的有效抑制给予宿主免疫系统包括正常的菌群足够的时间去限制细菌定植或清除任何已有的感染日益获得广泛的关注[7-10]。

临床感染性疾病治疗过程中,受药物的吸收、分布、代谢及排泄影响,体内药物的浓度总有部分时间低于最低抑菌浓度(MIC),即亚抑菌状态(sub-MIC),而亚抑菌浓度抗生素可影响细菌对药物的敏感性、诱导生物膜形成[11],影响细菌毒力因子α-溶血素等的表达,有研究表明β-内酰胺类抗生素可显著增加*S.aureus* α-溶血素产生[12-13]、氟喹诺酮类药物可增加*S.aureus* α-溶血素产生[13]。

痰热清注射液为国家二类新药,由黄芩、熊胆粉、山羊角、金银花和连翘5味中药组成,具有清热解毒、止咳化痰的功效,临床主要用于治疗肺炎早期、急性支气管炎、慢性支气管急性发作及上呼吸道感染等疾病[14]。课题组前期研究发现痰热清注射液对悬浮状态和生物膜状态的*S.aureus*具有显著的抑制作用[15],但sub-MIC状态下痰热清注射液对是否能有效抑制细菌毒力因子的产生、释放,进而缓解感染过程中机体损伤尚未见相关报道,因此本研究以*S.aureus*主要致病的毒力因子α-溶血素为研究对象,观察痰热清注射液在sub-MIC浓度下对α-溶血素的影响及作用机制所在。

1 材料

1.1 菌株、细胞 金黄色葡萄球菌购自美国模式培养物库(ATCC),批号25923;A549细胞(人肺泡上皮细胞)由中国中医科学院医学实验中心分子生物学实验室惠赠。

1.2 药物与试剂 TRQ(上海凯宝药业股份有限公司,批号1808320);无菌脱纤维兔血(上海福祥药业股份有限公司,批号20200803);DMEM培养基,胰酶,100×青霉素-链霉素(美国Gibco公司,批号分别为2186844,25200072,10378016);胎牛血清(美国HyClone公司,批号RB35935);活/死细胞双染试剂盒(北京百奥莱博科技有限公司,批号TJ221147);胰蛋白胨、酵母提取物(美国Oxoid公司,批号分别为LP0042,LP0021);琼脂粉、细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(美国Sigma公司,批号分别为

S-A1296, 17779-10)；细菌总RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司，批号分别为U8731, U8707]；StarLighter SYBR® Green实时荧光定量定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)Mix(北京启衡星生物科技有限公司，批号32536493)；LB培养(胰蛋白胨10 g·L^{-1}，酵母提取物5 g·L^{-1}，氯化钠10 g·L^{-1}，超纯水配制)；DMEM完全培养基(90%DMEM培养基，10%胎牛血清，1% 100×青霉素-链霉素)。

1.3 仪器 SW-CJ-1FD型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)；THZ-D型恒温振荡培养箱(苏州培英实验设备有限公司)；KBF-240型恒温培养箱(德国Binder公司)；V-1100型紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司)；TG16-W型微量高速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)；MLS-3750型高压灭菌锅(日本三洋)；CFX ConnectTM型Real-time PCR仪(美国Bio-Rad公司)；NanoDrop One型超微量分光光度计(美国Thermo公司)；Synergy H1型酶标仪(美国BioTek公司)；170L型CO_2培养箱(新加坡ESCO公司)；FV1000型激光共聚焦显微镜(日本Olympus公司)。

2 方法

2.1 TRQ对*S.aureus* MIC的测定[16] 挑取*S.aureus*单菌落37 ℃，280 r·min^{-1}恒温振荡培养16 h，LB稀释菌液至吸光度$A_{600\,nm}$=0.02备用。无菌96孔板连续倍比稀释药物使TRQ浓度梯度为1/256～1/2原液(1 L TRQ溶液的恒质量约为33 000 mg[12])，每孔100 μL，再加入菌液100 μL，37 ℃培养24 h后每孔加入0.25%四唑红(TTC) 20 μL，继续培养30 min，孔内溶液变红即为有菌生长，读取溶液未变红的最小浓度即为MIC值，重复3次。

2.2 亚抑菌浓度TRQ对*S.aureus*时间-生长曲线的测定 参考**2.1**项实验结果，挑取*S.aureus*单菌落37 ℃，280 r·min^{-1}恒温振荡培养16 h，次日将菌液用LB稀释100倍，在225 r·min^{-1}扩大培养2.5 h。取扩大培养后的菌液，分别加入TRQ使药物终浓度依次为1/16MIC, 1/32MIC, 1/64MIC，空白组加入等量LB培养基，225 r·min^{-1}下继续培养，每隔30 min取100 μL菌液用酶标仪检测600 nm处*A*，绘制不同浓度药物作用8 h内的细菌时间-生长曲线。实验重复3次。

2.3 亚抑菌浓度TRQ对*S.aureus*上清液α-溶血素活力影响的测定[17] 挑取*S.aureus*单菌落扩大培养至$A_{600\,nm}$=0.3，分别加入TRQ使药物终浓度为1/16MIC, 1/32MIC, 1/64MIC，模型组加入等量LB培养基，继续培养至对数生长期后期，4 ℃离心取上清，0.22 μm滤膜过滤除菌。取PBS 775 μL，200 μL *S.aureus*上清，再加入脱纤维兔血25 μL，混匀，37 ℃孵育30 min。9 000 r·min^{-1}离心1 min(离心半径8 cm)，取上清于96孔板中，酶标仪检测543 nm处*A*，以不加药的模型组为100%溶血。

2.4 亚抑菌浓度TRQ对*S.aureus*上清液α-溶血素中和作用的测定 取**2.3**项中不加药的细菌上清100 μL，而后分别加入终浓度为1/16MIC, 1/32MIC, 1/64MIC的TRQ100 μL，模型组加入等量LB培养基，37 ℃孵育5 h，再加入PBS 775 μL，脱纤维兔血25 μL，混匀，37 ℃孵育30 min。9 000 r·min^{-1}离心1 min，取上清于96孔板中，酶标仪检测543 nm处*A*，以不加药的模型组为100%溶血。

2.5 亚抑菌浓度TRQ对*S.aureus*感染介导的A549细胞损伤的保护实验

2.5.1 亚抑菌浓度TRQ对A549细胞毒性检测 将对数生长期A549细胞经胰酶消化后重悬，调整细胞浓度为约1×10^{5}个/mL，接种到96孔细胞培养板中，37 ℃ 5%CO_2条件下培养24 h。而后每孔加入终浓度1/16MIC, 1/32MIC, 1/64MIC的TRQ，每个浓度设3个平行孔，37 ℃ 5%CO_2条件下继续培养24 h。24, h后取出培养板按照CCK-8试剂盒说明书加入CCK-8染液反应，全波长酶标仪上读取各孔490 nm处*A*。计算各药物浓度下细胞相对存活率。实验重复3次。细胞相对存活率=($A_{给药组}-A_{空白组}$)/($A_{正常组}-A_{空白组}$)×100%

2.5.2 亚抑菌浓度TRQ对*S.aureus*感染介导的A549细胞损伤的保护实验[18] 挑取*S.aureus*单菌落扩大培养至$A_{600\,nm}$=0.5，离心收集菌体，PBS洗涤3次后，重悬于DMEM培养基。A549细胞调整至密度2×10^{4}个细胞每孔于96孔板中。培养过夜后依次加入菌液50 μL和DMEM(模型组)50 μL或各浓度TRQ(给药组)，使TRQ终浓度为1/16MIC, 1/32MIC, 1/64MIC。正常组不加菌液，加入DMEM 100 μL，给药组和模型组校零孔除了无细胞外，其他加样均与对应组一致，每组设3个平行孔。培养5 h，而后每孔加入CCK-8 10 μL，孵育3 h后用酶标仪检测490 nm处*A*。细胞活力=($A_{实验组}-A_{实验组校零}$)/$A_{正常组}$×100%。并按活/死细胞双染试剂盒说明书对各组细胞染色，于激光共聚焦显微镜下观察细胞形态和活死情况。

2.6 Real-time PCR 测定亚抑菌浓度 TRQ 对 *S. aureus* α-溶血素调控基因 hla, agrA mRNA 含量 将 **2.3** 项实验中离心所得菌体用 PBS 漂洗，4 000 r·min^{-1}离心 10 min，收集菌体。液氮研磨，按照细菌总 RNA 提取试剂盒和逆转录试剂盒说明书，提取样本 RNA 和获得 cDNA。目的基因 hla, agrA 和内参基因 16S rRNA 扩增引物参照文献[19]，引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。Real-time PCR 反应体系为 cDNA 1 μL，SYBR® Green Mix（2×）10 μL，10 μmol·L^{-1}正向引物 0.5 μL，10 μmol·L^{-1}反向引物 0.5 μL，ddH_2O 8 μL。反应条件为 95 ℃酶激活 3 min，95 ℃变性 20 s，hla 在 43 ℃，agrA 在 50 ℃退火 30 s，共 39 个循环。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$法分析目的基因相对表达量，引物序列见表 1。

表 1　PCR 引物序列

Table 1　Primer sequences of PCR

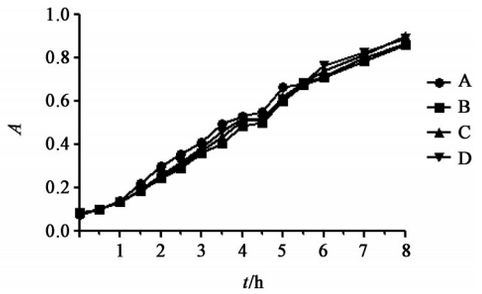
引物	序列（5'-3'）	长度/bp
16S rRNA	上游 GCTGCCCTTTGTATTGTC	179
	下游 AGATGTTGGGTTAAGTCCC	
hla	上游 TTGGTGCAAATGTTTC	102
	下游 TCACTTTCCAGCCTACT	
agrA	上游 TGATAATCCTTATGAGGTGCTT	164
	下游 CACTGTGACTCGTAACGAAAA	

2.7 统计学分析　采用 SPSS 软件对其进行单因素方差分析，用 $\bar{x}\pm s$ 来表示每组所得的实验数据，方差齐者用 LSD 进行两两比较，方差不齐的用 Dunnett'*T*3 分析，以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3　结果

3.1 TRQ 的 MIC 及亚抑菌浓度 TRQ 对 *S.aureus* 的时间-生长曲线　微孔板法测定 TRQ 对 *S.aureus* 的 MIC 为 1/8 原液，而后分别用 1/16MIC，1/32MIC，1/64MIC 亚抑菌浓度的 TRQ 检测药物 8 h 对 *S.aureus* 生长的影响，其 8 h 内细菌的时间-生长曲线。与空白组比较，各亚抑菌浓度的 TRQ 对 *S.aureus* 的生长均无显著差异，表明亚抑菌浓度（1/64MIC~1/16MIC）的 TRQ 对 *S.aureus* 的生长无明显影响。见图 1。

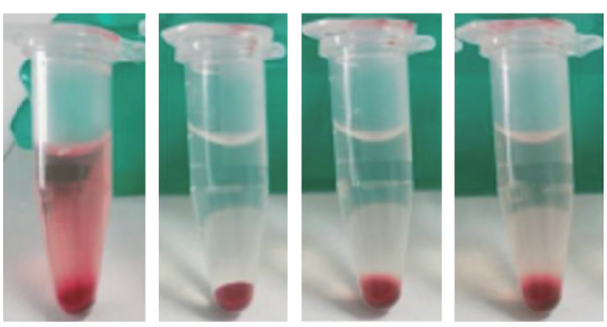
3.2 不同亚抑菌浓度 TRQ 对 *S.aureus* α-溶血素溶血活力的影响　与模型组比较，在不同亚抑菌浓度 TRQ 作用后兔红细胞上清液颜色接近澄清，且随着 TRQ 浓度的增加，兔红细胞上清颜色逐渐变浅；与模型组比较，随着 TRQ 浓度的增加，溶血率逐渐降低（$P<0.01$），表明亚抑菌浓度 TRQ 可抑制 *S.aureus* α-溶血素的溶血活力，且呈现量-效关系。见图 2，表 2。



A. 空白组；B. 1/16MIC 组；C. 1/32MIC 组；D. 1/64MIC 组

图 1　不同亚抑菌浓度 TRQ 对 *S. aureus* 的时间-生长曲线

Fig. 1　Time-growth curve of TRQ with different sub-minimal inhibitory concentrations against *S. aureus*



A. 模型组；B. 1/16MIC 组；C. 1/32MIC 组；D. 1/64MIC 组（图 3 同）

图 2　不同亚抑菌浓度 TRQ 处理后兔红细胞上清颜色

Fig. 2　Color of supernatant blood cells of rabbits treated with different sub-minimal inhibitory concentrations of TRQ

表 2　不同亚抑菌浓度 TRQ 对 *S.aureus* α-溶血素溶血活力的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

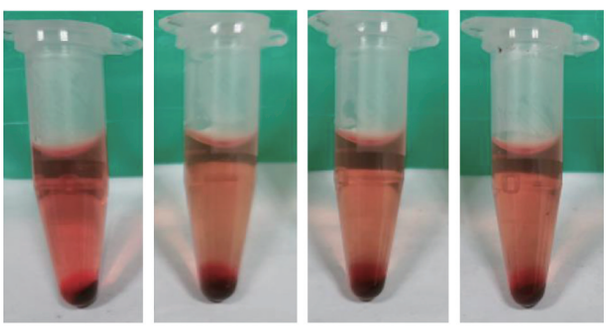
Table 2　Effect of different sub-minimal inhibitory concentrations of TRQ on hemolytic activity of *S.aureus* α-hemolysin（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	溶血率/%
模型	100.00
1/16MIC	7.43±0.24[1)]
1/32MIC	11.25±0.16[1)]
1/64MIC	45.11±0.74[1)]

注：与模型组比较 [1)] $P<0.01$（表 5 同）。

3.3 不同亚抑菌浓度 TRQ 对 *S.aureus* 上清液 α-溶血素的中和作用　与空白组比较，在不同亚抑菌浓度 TRQ 与 *S.aureus* 上清液作用 5 h 后兔红细胞上清液颜色均不同程度变浅，且随着 TRQ 浓度的增加，兔红细胞上清颜色逐渐变浅；与模型组比较，随着 TRQ 浓度的增加，溶血率逐渐降低（1/16 和 1/32MIC 组 $P<0.01$，1/64MIC 组 $P<0.05$），表明亚抑菌浓度 TRQ 可在一定程度上中和 *S.aureus* 上清液中的 α-溶

血素，且呈现量-效关系。见图 3，表 3。



A　　B　　C　　D

图 3　不同亚抑菌浓度 TRQ 处理后兔红细胞上清颜色

Fig. 3　Color of supernatant blood cells of rabbits treated with different sub-minimal inhibitory concentrations of TRQ

表 3　不同亚抑菌浓度 TRQ 对 *S.aureus* α-溶血素的中和作用（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Table 3　Neutralization effect of different sub-inhibitory concentrations of TRQ on *S.aureus* α-hemolysin（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	溶血率/%
模型	100.00
1/16MIC	75.63±2.16[2)]
1/32MIC	82.17±1.22[2)]
1/64MIC	92.46±1.37[1)]

注：与模型组比较 [1)]P<0.05，[2)]P<0.01。

3.4　不同亚抑菌浓度 TRQ 对 *S.aureus* 感染介导的 A549 细胞损伤的保护作用　1/16MIC，1/32MIC，1/64MIC 浓度的 TRQ 对 A549 细胞生长基本无影响，提示实验中的亚抑菌浓度 TRQ 对 A549 细胞无细胞毒性作用，与模型组比较，且 TRQ 增加了被 *S.aureus* 感染的 A549 细胞活力（P<0.01），见表 4。共聚焦显微镜观察到未感染的正常组细胞呈现 A549 细胞的梭形形态，被染成绿色，而模型组细胞无明显的梭形形态且大面积被染为红色，表现出明显的细胞损伤和死亡，TRQ 的作用则保护了 *S.aureus* 感染介导 A549 细胞损伤，可见细胞形态趋向正常且红色荧光减少。结果提示不同亚抑菌浓度的 TRQ 对 *S.aureus* 介导的 A549 细胞损伤具有不同程度的保护作用，且呈浓度依赖性。见图 4。

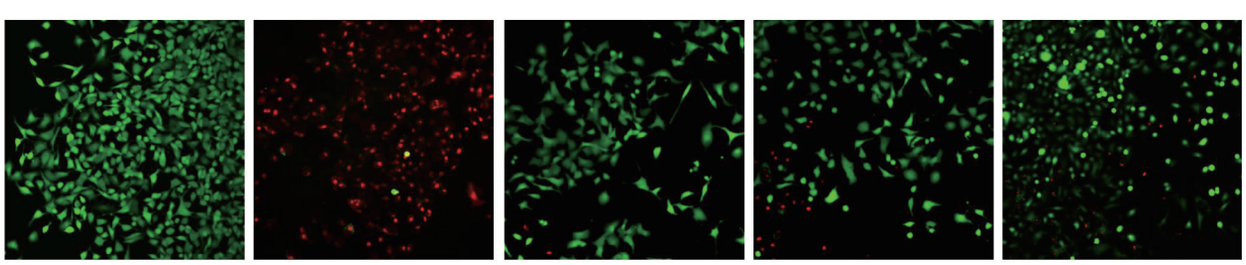
表 4　不同亚抑菌浓度 TRQ 对 A549 细胞的毒性和对 *S.aureus* 感染介导的 A549 细胞损伤的保护作用（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Table 4　Toxicity to A549 cells and protection against A549 cell damage mediated by *S.aureus* infection with different sub-minimal inhibitory concentrations of TRQ（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	细胞活力/%	
	细胞毒性	细胞保护
正常	100	100
模型	–	6.42±1.25[2)]
1/16MIC	99.30±0.90	17.12±0.57[1,2)]
1/32MIC	97.70±1.11	13.26±1.55[1,2)]
1/64MIC	99.77±1.55	12.70±0.49[1,2)]

注：与模型组比较 [1)]P<0.01；与正常组比较 [2)]P<0.01。

3.5　不同亚抑菌浓度 TRQ 对 *S.aureus* α-溶血素调控基因 hla，agrA mRNA 表达的影响　与模型组比较，在 1/64MIC 浓度时 agrA mRNA 未出现下调，其他浓度 TRQ 组 hla，agrA mRNA 的表达均显著下调（P<0.01）。见表 5。



A　　B　　C　　D　　E

A. 正常组；B. 模型组；C. 1/16MIC 组；D. 1/32MIC 组；E. 1/64MIC 组

图 4　用激光共聚焦观察不同亚抑菌浓度 TRQ 对 *S. aureus* 感染介导 A549 细胞损伤的保护作用（免疫荧光，×200）

Fig. 4　Laser confocal observation was used to observe protective effects of different sub-minimal inhibitory concentrations of TRQ on A549 cell damage mediated by *S. aureus* infection（IF, ×200）

4　讨论

传统抗生素由于大多以抑菌或杀菌为目的，通过抑制细菌 DNA 复制、蛋白质合成和细胞壁生成等细菌生长的必须环节而发挥作用，在发挥杀菌抗感染治疗的同时也给予细菌较大的选择性压力，导致细菌极易产生耐药性。实际上细菌导致的感染很大程度上取决于其分泌的毒力因子，而不是细菌自身的生长繁殖，*S.aureus* 分泌的多种毒力因子同样

表5 不同亚抑菌浓度TRQ对*S.aureus* α-溶血素调控基因hla，agrA mRNA表达水平的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Table 5 Effect on different sub-minimal inhibitory concentrations of TRQ on regulation of *S.aureus* α-hemolysin gene hla and agrA mRNA expression levels（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	hla	agrA
1/16MIC	0.19±0.1[1)]	0.63±0.03[1)]
1/32MIC	0.19±0.03[1)]	0.64±0.02[1)]
1/64MIC	0.20±0.08[1)]	1.06±0.07

注：设模型组各组mRNA相对表达量为1。

也直接影响其致病力的强弱。临床的抗感染治疗过程中，抗生素受体内吸收、分布、代谢及排泄影响，其治疗剂量总有部分时间低于MIC，即处于sub-MIC状态。已有研究表明亚抑菌浓度的β-内酰胺类抗生素可诱导耐药甲氧西林金黄色葡萄球菌胞外DNA的释放、促进生物膜形成和毒力因子表达[20-21]，上调杀白细胞素（PVL）[20]，α-溶血素[22]，肠毒素[23]及免疫逃逸分子葡萄球菌A蛋白（SpA）等的表达而促进*S.aureus*的致病性[24]。然而部分中药及其有效成分则可在亚抑菌浓度下有效抑制*S.aureus*溶血毒素和肠毒素的分泌[25-27]，这也是中药抗菌作用的优势所在。因此，寻找能够有效抑制细菌毒力因子的药物对于控制感染，提高临床疗效有重要意义。

从结果中可以看出，亚抑菌浓度的TRQ并不能影响细菌的生长繁殖，但其无论与*S.aureus*共同培养还是作用于*S.aureus*培养上清，均能有效抑制*S.aureus*溶血毒素的溶血作用，该结果说明亚抑菌浓度TRQ不仅可抑制*S.aureus* α-溶血素的表达，同时还具有中和*S.aureus* α-溶血素的作用。进一步的实验证实，在对A549细胞株无毒性作用的前提下，亚抑菌浓度的TRQ对*S.aureus*介导的A549细胞损伤具有不同程度的保护作用，且呈浓度依赖性。

hla是α-溶血素编码的单个遗传位点，hla N端的26个残基是信号肽，在分泌的过程中会被切除从而形成成熟的α-溶血素[28]。其表达受到一个级联调控网络的控制，涉及agr，sar，sae和rot等调控子的相互作用，agr调控系统为主要调控系统，通过RNA Ⅲ调控α-溶血素蛋白的产生[29-32]，sae和sar调控系统也参与hla的调控[33-36]。本研究中的药理作用与TRQ抑制上游调控hla，agrA mRNA表达密切相关，其他抑制调控环节尚需进一步深入研究。

目前以α-溶血素为治疗靶点的药物研究分为两个方向，①减少*S.aureus* hla的表达；②拮抗/中和*S.aureus* α-溶血素的作用。*S.aureus*分泌α-溶血素对肺泡上皮细胞的损伤起决定作用，缺乏hla表达的菌株与A549细胞体外共培养时不引起A549细胞的死亡；0.1 mg·L^{-1}纯化的α-溶血素可导致接近50%的A549细胞死亡，提示α-溶血素在*S.aureus*所致的肺损伤中的重要性[3-5,36]。此外α-溶血素还可干扰集体固有免疫系统，能提高中性粒细胞对内皮细胞的黏附能力，在局部化脓性感染以及引发心功能障碍的发病机制中起重要作用[36]；刺激机体产生血小板-中性粒细胞聚合物，使炎症反应失调导致组织损伤，在*S.aureus*引起出血坏死性肺炎中发挥关键作用[37]。由前期课题组研究可知，TRQ药物质量浓度为33 000 mg·L^{-1}，其体内药物血浆质量浓度为165~330 mg·L^{-1}[15]，本研究TRQ的MIC值为1/8原液（即4 125 mg·L^{-1}），在亚抑菌浓度（1/64MIC-1/16MIC）时TRQ即可对*S.aureus*感染介导的A549细胞损伤有很好的保护作用，而此时TRQ的质量浓度仅为64.5~257.8 mg·L^{-1}，即在低于药物血浆浓度时TRQ就可产生较好的抑制溶血素保护肺泡上皮细胞，该结果也从机制上阐述了TRQ在临床治疗细菌引起的呼吸道感染的良好疗效。

中医药在防治细菌感染性疾病中有显著疗效，而且在疾病治疗方面表现出异于西药的特点和优势[38-41]。与传统抗生素相比，中药在发挥抗菌作用的时候并非是要完全杀灭和/或抑制细菌，其还可通过提高人体的免疫力促进机体菌群“失衡状态”的恢复，抑制和（或）中和细菌毒素缓解细菌毒力因子对机体的损伤、减轻药物对细菌的压力诱导减缓耐药产生等多种途径产生治疗作用，本研究为阐述中药抗菌作用机制、找到中药的作用环节，更好地指导临床用药提供基础实验依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] LOWY F D. *Staphylococcus aureus* infections[J]. N Engl J Med, 1998, 339(27): 2026.

[2] BRAMLEY A J, PATEL A H, O'REILLY M, et al. Roles of alpha-toxin and beta-toxin in virulence of *Staphylococcus aureus* for the mouse mammary gland[J]. Infect Immun, 1989, 57(8): 2489-2494.

[3] O'CALLAGHAN R J, CALLEGAN M C, MOREAU J M, et al. Specific roles of alpha-toxin and beta-toxin during *Staphylococcus aureus* corneal infection[J]. Infect Immun, 1997, 65(5): 1571-1578.

[4] BARTLETT A H, FOSTER T J, HAYASHIDA A, et al.

Alpha-toxin facilitates the generation of CXC chemokine gradients and stimulates neutrophil homing in *Staphylococcus aureus* pneumonia[J]. J Infect Dis, 2008, 198(10): 1529-1535.

[5] WARDENBURG B J, PATEL R J, SCHNEEWIND O. Surface proteins and exotoxins are required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* pneumonia[J]. Infect Immun, 2007, 75(2): 1040-1044.

[6] MAZMANIAN S K, LIU G, JENSEN E R, et al. *Staphylococcus aureus* sortase mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(10): 5510-5515.

[7] LEE Y M, ALMQVIST F, HULTGREN S J. Targeting virulence for antimicrobial chemotherapy [J]. Curr Opin Pharmacol, 2003, 3(5): 513-519.

[8] RASKO D A, MOREIRA C G, LI DE R, et al. Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development [J]. Science, 2008, 321 (5892): 1078-1080.

[9] CEGELSKI L, MARSHALL G R, ELDRIDGE G R, et al. The biology and future prospects of antivirulence therapies[J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(1): 17-27.

[10] RASKO D A, SPERANDIO V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease[J]. Nat Rev Drug Discov, 2010, 9(2): 117-128.

[11] HOFFMAN L, D'ARGENIO D, MACCOSS M, et al. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation[J]. Nature, 2005, 436(7054): 1171-1175.

[12] KERNODLE D S, MCGRAW P A, BARG N L, et al. Growth of *Staphylococcus aureus* with nafcillin in vitro induces alpha-toxin production and increases the lethal activity of sterile broth filtrates in a murine model[J]. J Infect Dis, 1995, 172: 410-419.

[13] OHLSEN K, ZIEBUHR W, KOLLER K P, et al. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (hla) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42: 2817-2823.

[14] 王亮, 陶玉龙, 陈万生. 痰热清注射液化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 中草药, 2020, 51(12): 3318-3328.

[15] WANG Y, WANG T, HU J J, et al. Anti-biofilm activity of TanReQing, a traditional Chinese medicine used for the treatment of acute pneumonia [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 134(1): 165-170.

[16] 马建凤, 刘华钢, 朱丹. 中药体外抑菌研究的方法学进展[J]. 药物评价研究, 2010, 33(1): 42-45.

[17] ROWE G E, WELCH R A. Assays of hemolytic toxins [J]. Methods Enzymol, 1994, (235)235: 657-670.

[18] WANG J, ZHOU X, LIU S, et al. Morin hydrate attenuates *Staphylococcus aureus* virulence by inhibiting the self-assembly of a-hemolysin[J]. J Appl Microbiol, 2015, 118(3): 753-763.

[19] LIU S, ZHOU X, LI W, et al. Diosmetin inhibits the expression of alpha-hemolysin in *Staphylococcus aureus*[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2015, 108(2): 383-389.

[20] DUMITRESCU O, CHOUDHURY P, BOISSET S, et al. Beta-lactams interfering with PBP1 induce Panton-Valentine leukocidin expression by triggering SarA and rot global regulators of *Staphylococcus aureus* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55 (7): 3261-3271.

[21] KAPLAN J B, IZANO E A, GOPAL P, et al. Low levels of beta-lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*[J]. MBio, 2012, 3(4): e00198-e00112.

[22] KERNODLE D S, MCGRAW P A, BARG N L, et al. Growth of *Staphylococcus aureus* with nafcillin in vitro induces alpha-toxin production and increases the lethal activity of sterile broth filtrates in a murine model[J]. J Infect Dis, 1995, 172(2): 410-419.

[23] HODILLE E, ROSE W, DIEP B A, et al. The role of antibiotics in modulating virulence in *Staphylococcus aureus*[J]. Clin Microbiol Rev, 2017, 30(4): 887-917.

[24] NIELSEN L N, ROGGENBUCK M, HAABER J, et al. Diverse modulation of spa transcription by cell wall active antibiotics in *Staphylococcus aureus* [J]. BMC Research Notes, 2012, 5(1): 457.

[25] LI J, DONG J, QIU J Z, et al. Peppermint Oil decreasesthe productio of virulence-associated exoproteins by *Staphylococcus aureus* [J]. Molecules, 2011, 16(2): 1642-1654.

[26] QIU J Z, WANG D C, XIANG H, et al. Subinhibitory concentrations of thymol reduce exterotoxins A and B and α-hemolysin production in *Staphylococcus aureus* isolates[J]. PLoS One, 2010, 5(3): e9736.

[27] 崔煦然, 赵京霞, 郭玉红, 等. 细菌耐药背景下中药抗菌作用研究进展[J]. 世界中医药, 2016, 11(10): 1940-1944.

[28] GRAY G S, KEHOE M. Primary sequence of the alpha-toxin gene from *Staphylococcus aureus* wood 46[J]. Infect Immun, 1984, 46(2): 615-618.

[29] NOVICK R P, ROSS H F, PROJAN S J, et al.

Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule[J]. EMBO J, 1993, 12(10): 3967-3675.

[30] PENG H L, NOVICK R P, KREISWIRTH B, et al. Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*[J]. J Bacteriol, 1988, 170(9): 4365-4372.

[31] CHEUNG A L, CHIEN Y T, BAYER A S. Hyperproduction of alpha-hemolysin in a sigB mutant is associated with elevated SarA expression in *Staphylococcus aureus*[J]. Infect Immun, 1999, 67(3): 1331-1337.

[32] CHEUNG A L, EBERHARDT K J, CHUNG E, et al. Diminished virulence of a Sar-/agr- mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis[J]. J Clin Invest, 1994, 94(5): 1815-1822.

[33] REYES D, ANDREY D O, MONOD A, et al. Coordinated regulation by agrA, SarA, and SarR to control agr expression in *Staphylococcus aureus*[J]. J Bacteriol, 2011, 193(21): 6020-6031.

[34] XIONG Y Q, WILLARD J, YEAMAN M R, et al. Regulation of *Staphylococcus aureus* alpha-toxin gene (hla) expression by agr, sarA, and sae *in vitro* and in experimental infective endocarditis[J]. J Infect Dis, 2006, 194(9): 1267-1275.

[35] LIANG X, YAN M, JI Y. The H35A mutated alpha-toxin interferes with cytotoxicity of staphylococcal alpha-toxin[J]. Infect Immun, 2009, 77(3): 977-983.

[36] KRULL M, DOLD C, HIPPENSTIEL S, et al. Escherichia colihemolysin and *Staphylococcus aureus* alpha-toxin potently induce netrohil adhesion to cultured human endothelial cells[J]. J Immunnol, 1996, 157(9): 4133-4140.

[37] PARIMON T, LI Z, BOLZ D D, et al. *Staphylococcus aureus* α -hemolysin promotes platelet-neutrophil aggregate formation[J]. J Infect Dis, 2013, 208(5): 761-770.

[38] 刘华钢, 申庆荣, 刘丽敏. 中药抗菌研究进展[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(2): 463-465.

[39] 迟戈夫. 异鼠李素抗金黄色葡萄球菌α溶血素和分选酶A作用研究[D]. 长春: 吉林大学, 2016.

[40] 车美垚. 盐酸小檗碱抑制金黄色葡萄球菌α-溶血素及其诱导的氧化损伤[D]. 长春: 吉林大学, 2018.

[41] 邱家章. 黄芩苷抗金黄色葡萄球菌α-溶血素作用靶位的确证[D]. 长春: 吉林大学, 2012.

[责任编辑　周冰冰]