

操庆国, 郭钦, 蔡佳惠, 等. 黄精与土霉素协同抑制副溶血弧菌研究 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(13): 141–148. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020100203

CAO Qingguo, GUO Qin, CAI Jiahui, et al. Synergistic Antibacterial Effects of *Polygonatum sibiricum* Red. with Oxytetracycline on *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(13): 141–148. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020100203

· 生物工程 ·

黄精与土霉素协同抑制副溶血弧菌研究

操庆国¹, 郭钦², 蔡佳惠², 陈会², 贾君¹

(1. 江苏农林职业技术学院茶与食品科技学院, 江苏句容 212400;

2. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013)

摘要: 为了抑制对虾养殖急性肝胰脏坏死病 (AHPND) 的主要病原菌副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*), 本论文用药食同源的天然草本黄精和 8 种水产用抗生素联合抑制副溶血弧菌, 通过棋盘法测定黄精和抗生素的最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 和联合抑菌效果, 研究了黄精等对细菌细胞膜电导率、膜电位和存活率的作用, 采用 RT-PCR 研究了黄精等对细菌外排泵相关基因表达的影响。结果表明, 黄精和土霉素具有较好的协同抑菌效果, 最佳配比为 1/8 MIC 黄精+1/4 MIC 土霉素, 此时分级抑菌浓度 (fractional inhibitory concentration, FIC) 为 0.38, 但在羧基氯化物间氯苯胺 (CCCP) 的存在下, 这种协同作用转为相加甚至无关作用。电导率、膜电位和碘化丙啶染色证明黄精能破坏副溶血弧菌细胞外膜, 提高其渗透性, 导致细胞内膜去极化, 膜两侧质子梯度消失。黄精显著抑制副溶血弧菌 5 个外膜蛋白、5 个反向协同运输子和 11 个 RND 外排转子的表达, 其中 *vpa0096* (OmpW) 下调 497.51 倍, *vp0425* (TolC)、*vp2072* (Na⁺/H⁺ 反向协同运输泵)、*vp2665* (Na⁺/Ca²⁺ 交换蛋白)、*vp1092*、*vp0941*、*vp1178*、*vpa0344* 和 *vpa0809* 分别下调 27.03 倍、73.53、55.56、100.00、35.71、37.74、49.02 和 56.18 倍。黄精降低 TCA 循环关键酶苹果酸脱氢酶 (MDH) 和琥珀酸脱氢酶 (SDH) 酶活, 从而抑制副溶血弧菌体内 TCA 循环。土霉素是 *vp0425* (TolC) 的底物之一, 黄精属于天然外排泵抑制剂, 能将土霉素阻留在细胞内, 提高土霉素的抑菌效果。黄精和土霉素协同作用于水产养殖的弧菌病, 大幅度缩减土霉素使用浓度、残留风险和耐药性弧菌的出现, 从而促进水产养殖的健康发展。

关键词: 黄精, 外排泵抑制剂, 协同抑菌, 抗生素, 副溶血弧菌

中图分类号: TS201.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)13-0141-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020100203

Synergistic Antibacterial Effects of *Polygonatum sibiricum* Red. with Oxytetracycline on *Vibrio parahaemolyticus*

CAO Qingguo¹, GUO Qin², CAI Jiahui², CHEN Hui², JIA Jun¹

(1. School of Tea and Food Science and Technology, Jiangsu Vocational College of Agriculture and Forestry, Jurong 212400, China;

2. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: In this paper, *Polygonatum sibiricum* Red. and 8 kinds of aquatic antibiotics were used to inhibit *Vibrio parahaemolyticus*, the main pathogen of acute hepatopancreas necrosis disease (AHPND) in shrimp culture. The minimum inhibitory concentration (MIC) of *P. sibiricum* Red. and antibiotics were determined by chessboard method. The effects of *Polygonatum* on the membrane conductivity, membrane potential and survival rate of bacteria were studied. The effects of *Polygonatum sibiricum* Red. on the expression of efflux pump related genes were studied by RT-PCR. The results showed that the combination of *P. sibiricum* Red. and oxytetracycline had the best synergistic antibacterial effect with the optimum combination of 1/8 MIC *P. sibiricum* Red.+1/4 MIC oxytetracycline and the FIC of 0.38. The synergy turned into additive or even irrelevant effects in the presence of CCCP. Conductivity, membrane potential and propidium iodide staining proved that *P. sibiricum* Red. could destroy the cell membrane of *V. parahaemolyticus*, improving its permeability, leading to the

收稿日期: 2020-10-26

基金项目: 江苏农林职业技术学院科技项目 (2018kj17); 国家自然科学基金资助项目 (31201373); 江苏省青蓝工程。

作者简介: 操庆国 (1979-), 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 食品安全, E-mail: 21226200@qq.com。

depolarization of the cell membrane and the disappearance of proton gradient on both sides of the membrane. *P. sibiricum* Red. significantly inhibited the expression of five outer membrane proteins, five reverse synergistic transporters and 11 RND efflux transporters of *V. parahaemolyticus*, of which *vpa0096* (OmpW) was down-regulated by 497.51 times, while *vp0425* (TolC), *vp2072* (Na^+/H^+), *vp2665* ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger), *vp1092*, *vp0911*, *vp1178*, *vpa0344*, and *vpa0809* were down-regulated by 27.03, 73.53, 55.56, 100.00, 35.71, 37.74, 49.02, and 56.18 times, respectively. *P. sibiricum* Red. reduced the activities of malate dehydrogenase (MDH) and succinate dehydrogenase (SDH) of TCA cycle, thereby inhibiting the TCA cycle of *V. parahaemolyticus*. Oxytetracycline is one of the substrates of *vp0425* (TolC). *Polygonatum sibiricum* Red. is a natural efflux pump inhibitor, which can keep oxytetracycline in cells and improve the antibacterial effect of oxytetracycline. The synergistic effect of *Polygonatum sibiricum* Red. and oxytetracycline on vibriosis in aquaculture can greatly reduce the concentration of oxytetracycline, residual risk and the emergence of drug-resistant *Vibrio*, thus promoting the healthy development of aquaculture.

Key words: *Polygonatum sibiricum* Red.; efflux pump inhibitor; synergistic antibacterial; antibiotic; *Vibrio parahaemolyticus*

2013年,全球甲壳类水产养殖产值已超过130亿美元^[1]。然而,甲壳类水产养殖业却面临着巨大的风险。来自海洋的弧菌,如副溶血弧菌、创伤弧菌(*V. vulnificus*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)和鳃弧菌(*V. anguillarum*)等,能引起11种细菌性疾病,从而给水产养殖尤其是对虾养殖业造成巨大的损失。其中,副溶血弧菌是急性肝胰脏坏死病(acute hepatopancreatic necrosis, AHPND)或早期死亡综合征(early mortality syndrome, EMS)的主要病原菌,可使对虾发生组织病理学改变,包括肝胰脏功能障碍、空腹和空肠、软壳和萎缩的肝胰脏等。从2009年开始,AHPND每年造成全球将近10亿美元的损失,目前有11个国家已经加入“降低和管理养殖虾的AHPND风险”计划。

由于水产弧菌病频发,为了杀灭副溶血弧菌,许多抗菌药物被开发和应用,包括抗生素类、阳离子抗菌肽、益生菌和中草药复方制剂等^[2]。然而这些都只能作为辅助手段,单独应用效果较差。到目前为止,抗生素仍然是治疗AHPND最为广泛和最有效的措施,但抗生素滥用带来的残留风险和多重耐药性菌株的出现对环境造成恶劣的影响,并对人类健康带来极为严重的威胁。据报道,副溶血弧菌的抗药谱非常广,并随国家和地区的不同而有所区别,其主要耐受的抗生素包括氯霉素类、 β -内酰胺类、四环素类、氨基糖苷类和喹诺酮类等,其中, β -内酰胺类耐受性将近100%^[3]。近年来世界各地出现多重耐药副溶血弧菌,对全球对虾养殖产业和人类健康带来巨大威胁,因此开发环境友好的、安全无毒的杀菌剂势在必行。已有多种天然产物被开发,如中草药复方制剂、壳聚糖、 β -葡聚糖、大蒜和洋葱提取物、海藻提取物、混合植物精油等^[4-6]。由于天然产物在实际应用中单独抑菌效果较弱,因此寻找能和抗生素协同作用、降低抗生素使用浓度,缩小抗性风险的天然产物成为研究热点。国内外已报道多种可以和抗生素联用协同抑菌的天然植物,其中绝大部分属于外排泵抑制剂,如胡椒碱、防己碱、茶多酚、植物精油、氧化白藜芦醇、香芹酚和水飞蓟等^[7-9]。它们以外排泵为靶

点,如NorA、MexAB-OprM、Msr(A)、Tet(K)等,降低细菌对抗生素的外排,从而增强细菌对抗生素的敏感性,抑制多重耐药金黄色葡萄球菌(MRSA)、鲍曼不动杆菌、多重耐药假单胞菌和大肠杆菌等致病菌的生长^[10](Bucar 2015)。

细菌有多种对抗抗生素压力的机制,如抗生素酶降解、核糖体保护蛋白、细胞膜渗透性屏障、外排泵作用和可移动基因元件等。其中,外排泵作用是研究最为广泛的一种耐药机制^[7]。细菌通常都具有一个或多个外排泵,能将抗生素排出体外,主要包括耐药结节分裂子(resistance-nodulation-division, RND)、主要促进者超级家族(major facilitator superfamily, MFS)、多重药物和毒物排出(multidrug and toxic compound extrusion, MATE)、小的多重药物抗性(small multidrug resistance, SMR)以及ATP结合盒膜转运蛋白(ATP-binding cassette transporter, ABC转运子)五种类型^[5]。目前,寻找细菌外排泵抑制剂已成为研究热点,安全无毒、药食同源的天然植物是外排泵抑制剂(EPIs)的最佳来源,已经有多篇相关研究报道^[11-13]。

黄精(*Polygonatum sibiricum* Red.)是我国传统中药,其化学成分包括多糖、皂苷、黄酮、生物碱、醌类化合物、木脂素和多种人体必需氨基酸,具有抗衰老、降血糖、降血脂、改善记忆力、调节免疫和抗肿瘤等作用^[14-15]。

天然产物由于成分复杂,单独作用效果较差,因此本文通过黄精和抗生素联用抑制副溶血弧菌,研究其协同机制,发现其可作为外排泵抑制剂,降低抗生素杀菌浓度,减少副溶血弧菌抗药性的产生,从而降低水产养殖中抗生素残留风险,为对虾的健康养殖提供科学数据和理论基础,保证对虾食品安全。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

副溶血弧菌 RIMD2210633 实验室保存;黄精 镇江存仁堂;中国《水产养殖用药指南》规定可以在水产养殖中应用的八种抗生素,分别为氨基糖苷类

(硫酸新霉素)、喹诺酮类(诺氟沙星、恩诺沙星和噁喹酸等)、酰胺醇类(氟苯尼考和甲砒霉素)、四环素类(土霉素和盐酸多西环素)、羰基氰化物间氯苯胺(CCCP) 上海源叶生物科技有限公司; RNAprep Pure 细菌总 RNA 提取试剂盒 天根生化科技(北京)有限公司; PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)、DNA Maker 宝日医生物技术(北京)有限公司; 碱性磷酸酶试剂盒 碧云天生物公司; LB 肉汤、TCBS 琼脂 北京陆桥技术有限责任公司; MH 肉汤 青岛海博生物技术有限公司; 苹果酸脱氢酶(MDH)试剂盒、琥珀酸脱氢酶(SDH)试剂盒 南京建成生物工程研究所; 其他试剂 皆为分析纯, 上海国药集团。

Infinite 200 多功能酶标仪 瑞士 Tecan 公司; TCS SP5 II 激光共聚焦显微镜 德国 Leica 公司; DDS-11A 数显电导率仪 上海雷磁·创益仪器仪表有限公司; CFX96 实时荧光定量 PCR 仪 美国宝特公司(Bio-Rad)。

1.2 实验方法

1.2.1 黄精水提取制备 黄精打粉, 过 100 目筛。取 25 g 粉末, 200 mL 蒸馏水浸泡过夜, 55 ℃、180 W 超声 1 h, 静置至室温, 4 层纱布过滤药液, 200 mL 蒸馏水清洗 3 遍残渣, 过滤后与滤液合并, 旋转蒸发仪 55 ℃、60 r/min 加热浓缩滤液至约 20 mL, 定容, 浓度为 1 g/mL, 4 ℃ 保存备用。

1.2.2 CCCP 的配制 取 1.5 mL 的离心管一只, 称取 10 mg 的 CCCP 粉末溶解于 1 mL 的甲醇中, 混匀, 配制成浓度为 10 mg/mL 的 CCCP 溶液。

1.2.3 抗生素的配制 取 1.5 mL 离心管, 分别标记 8 种抗生素, 各自称取 12.8 mg 的相应抗生素, 溶解于 1 mL 的相应溶剂中, 配制成最终浓度为 12.8 mg/mL 的抗生素溶液, 0.22 μm 过滤除菌, 4 ℃ 保存备用。

1.2.4 黄精和抗生素单独抑制副溶血性弧菌的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)测定 通过肉汤微量稀释法评估黄精和抗生素单独抑菌效果, 采用 96 孔板法测定 MIC。副溶血弧菌在 LB+3% NaCl 液体培养基(LBNB)中 37 ℃ 培养过夜, 0.5 麦氏比浊管校正浓度。含有副溶血性弧菌的 Mueller-Hinton+3% NaCl 液体培养基(MHB)用作阳性对照, 仅含有黄精或抗生素或 CCCP 的 MHB 作为阴性对照。在 96 孔板中, 对药物用 MHB 进行连续两倍的梯度稀释, 使抗生素含量为 128~0.25 μg/mL; 羰基氰化氯苯胺(CCCP)浓度为 10~1.25 μg/mL, 黄精水提物浓度分别为 200000~195.31 μg/mL, 每个孔中加入 90 μL 菌液, 使总体积为 200 μL, 菌液浓度为 5×10⁵ CFU/mL, 37 ℃ 摇床振荡培养 24 h, 观察副溶血性弧菌的生长情况。无细菌生长的最低浓度定义为 MIC。

1.2.5 黄精和抗生素联合抑制副溶血性弧菌的抑菌浓度指数(Fractional Inhibitory Concentration, FIC)测定 采用棋盘微量肉汤稀释法测定黄精和抗生素的联合抑菌效果。以土霉素和黄精为例, 96 孔板纵排依次为 MHB 稀释后浓度为 MIC~1/16 MIC 黄精, 横排依次为 MIC~1/16 MIC 土霉素, 使得每孔中都有不同浓度的黄精水提物和土霉素混合溶液, 之后每孔中加入 90 μL 菌液, 使总体积为 200 μL, 细菌终浓度为 5×10⁵ CFU/mL, 分别设置无药物只含有细菌的培养基和空白培养基作为阴性对照和空白对照, 37 ℃ 培养 24 h 观察结果, 以细菌无生长的最低浓度定义为协同 MIC(S_{MIC})。其他抗生素采用相同步骤进行。

$$FIC = MIC_{\text{协同}} / MIC_{\text{黄精单用}} + MIC_{\text{协同}} / MIC_{\text{抗生素单用}}$$

式中, FIC ≤ 0.5 为协同作用; 0.5 < FIC ≤ 1 为相加作用; 1 < FIC ≤ 2 为两者无关作用; FIC > 2 为拮抗作用。

1.2.6 黄精对副溶血弧菌细胞膜的影响

1.2.6.1 电导率检测 副溶血性弧菌在 LBNB 中 37 ℃ 培养过夜, 取 100 μL 菌液移至含有 1/2 MIC 黄精的 5 mL LBNB 试管中, 加菌和空白不加菌的 LBNB 作为对照, 37 ℃ 下培养 8 h, 分别在 0、1、2、4、6 和 8 h 取出 500 μL 培养物, 5000 r/min 离心 10 min, 取上清液 100 μL 加 3.9 mL 水进行稀释, 测定上清液的电导率。

菌液电导率的变化率 R(%) 计算如下:

$$R(\%) = \frac{R_s - R_c}{R_c} \times 100\%$$

式中: R_c-无菌对照组电导率; R_s-试验组(对照组)电导率。

1.2.6.2 膜电位检测 副溶血性弧菌在 LBNB 中 37 ℃ 培养过夜, 取 500 μL 菌液转移至含有 1/2 MIC 黄精提取物的 LBNB 中。将 100 μL 混合物加入到 96 孔板中, 加菌和空白不加菌的 LBNB 作为对照, 培养过夜, 用 5 μmol/L Bis(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol(DiBAC4(3))的 HEPES 检测缓冲液洗涤 96 孔板三次, 再加入 180 μL DiBAC4(3)的 HEPES 检测缓冲液进行碘化丙啶(Propidium iodide, PI)染色, 37 ℃ 孵育 30 min, 每 3 min 测量一次荧光强度。

1.2.6.3 细菌存活检测 采用 PI 染色法进行。副溶血性弧菌在 LBNB 中 37 ℃ 培养过夜, 取 50 μL 菌液转移至 5 mL LBNB 试管中, 37 ℃、180 r/min 下培养 12 h。将 100 μL 培养液转移至含有 1/2 MIC 黄精的 LBNB 中, 37 ℃ 振荡培养 3 h, 加菌的 LBNB 为对照。取 1 mL 液体 5000 r/min 离心 5 min, 收集细胞, 用 PBS 洗涤细胞并重悬于 200 μL PBS 中, 加入 10 μL PI(1 mg/mL), 混合均匀, 37 ℃ 避光孵育 20 min。将染色的细胞滴在盖玻片上, 激光共聚焦

显微镜下进行观察。

1.2.7 CCCP对黄精和土霉素联合抑菌的影响

CCCP溶解在丙酮中,浓度为12.5 μg/μL,0.22 μm滤膜过滤除菌。用MHB制备1/2MIC~1/16MIC浓度的CCCP,参照1.2.2和1.2.3在不同CCCP条件下评估黄精和抗生素的单独和联合抑菌效果。将无细菌生长的最低浓度分别定义为CCCP-单独MIC(C_{MIC})和CCCP-协同MIC(CS_{MIC})。

1.2.8 RT-PCR 将100 μL过夜培养物转移至5 mL含有1/2 MIC黄精的LBNB中,加菌的LBNB为对照,37℃、180 r/min振荡培养12 h。取出1 mL菌液,提取总RNA,并反转录为cDNA,进行RT-PCR检测。反应体系:10 μL SYBRPremix Ex Taq II(Tli RNaseH Plus),2 μL cDNA,6.4 μL无RNase ddH₂O,0.8 μL正向和反向引物,共25 μL。反应条件为:95℃ 30 s,95℃变性5 s,58℃退火30 s,72℃延伸30 s,40个循环。溶解曲线从65℃升至95℃,每5 s改变0.5℃。使用16S rRNA作为参比基因,计算目的基因的相对表达量。相对表达量=2^{-ΔCt}=2^{-(Ct(目的基因)-Ct(内参基因))}。引物如表1所示。

1.2.9 呼吸代谢途径抑制 参照云宝仪等^[16]的方法进行。将3.6 mL PBS(0.1 mol/L,pH 7.2),0.4 mL葡萄糖溶液(1%)和1 mL细菌悬浮液(10⁸ CFU/mL)分别加入到四个反应瓶中,振荡5 min,测量溶解氧含量(初始呼吸速率R₀);分别加入终浓度为500 μg/mL的碘乙酸、500 μg/mL磷酸钠、500 μg/mL丙二酸和1/2 MIC黄精,测量呼吸率R₁;最后,将终浓度为1/2 MIC的黄精分别加入到含有三种抑制剂的LBNB菌

液中,确定测量呼吸率R₂。整个系统在试验过程中完全封闭。

$$I_R(\%) = \frac{R_0 - R_1}{R_0} \times 100$$

$$D_R(\%) = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$

式中:I_R-呼吸抑制率;D_R-呼吸叠加率;R₀、R₁和R₂-对照组和试验组细菌的呼吸速率(μmol/g/min)。

1.2.10 关键酶活测定 苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase, MDH)和琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)酶活根据所购试剂盒说明进行检测。

1.3 数据处理

每个试验做三个平行,重复三次,所有数据为平均值加减标准差。实验数据用SPSS 19.0 t检验进行处理,计算方差和显著性。P<0.05表示差异显著,P<0.01表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 黄精和抗生素单独和联合抑制副溶血性弧菌的MIC

八种抗生素都能抑制副溶血弧菌的生长,其中,抑菌效果最好的是恩诺沙星、诺氟沙星和噁唑酸,MIC皆为0.25 μg/mL,而新霉素效果较差,MIC为16 μg/mL。黄精水提物有一定的抑菌能力,但MIC为50000 μg/mL,远高于抗生素(表2)。

当1/4MIC黄精和八种抗生素联用时,土霉素展现出较好的协同抑菌作用,MIC降低4倍,S_{MIC}变

表1 研究所用引物

Table 1 Primers used in the study

引物名称	引物序列
16rRNA-F16rRNA-R	TATCCTGTTTGGCCAGCGAGCATCGACGCACTTTTGGGA
vp0425-Fvp0425-R	CGAACATCTTTCACTACGCCACGACGGATAACTTCAATA
vp1060-Fvp1060-R	CGTCATACCCTCGCCATAAACACCTGTAGAGTGCCCGT
vp0096-Fvpa0096-R	TGACTTCGTTCTTCGTGTTTAGGCTGATGTTGCTGTG
vp0318-Fvpa0318-R	CGTTTTGTGTGCCCTTCGCATCAACTACCGCTTCTT
vp1186-Fvpa1186-R	AAAAACTGTCTGAGCGTCGGGATTCTTACCCATACT
vp0038-Fvp0038-R	GCTCCAAAGGCTGAGTAATAAACGTGAATACCTGAAATGACAA
vp0941-Fvp0941-R	GTATGGGCGGCAGTTATTTTATTGGCTGACATTCGGTT
vp1092-Fvp1092-R	GGTGGTGGCGGTTTATTCACACGGCTGATTGGGTCT
vp1178-Fvp1178-R	GGCGAGAAAATCAAGCAAGCGACGCATACAAAACCTA
vp2472-Fvp2472-R	TCGGTTCATCACTGTCTGCGCGTTTACTGTTCGTCTCT
vp0344-Fvpa0344-R	TTCGGCTTTGTAAACGGCAATCGCAGGTAATCGGT
vp0363-Fvpa0363-R	GGTTGACCGTGGCTTCTTTGTGTTTGTCTGTCTGGGA
vp0471-Fvpa0471-R	GATTCGCTTGAAGATGTGGCTCGTGTGCGCAACTGGTA
vp0480-Fvpa0480-R	TCACGGTAGTCTTTCGGGTTTCGGTGGTATGAATGTTGGAG
vp0809-Fvpa0809-R	ACCAATCGGCTTATCTCAGGTCTTCACCGTCTTGTCTT
vp0944-Fvpa0944-R	CGTTTCGCCATAGTCTCGTACCCAGCGGTGTTCAIT
vp1190-Fvpa1190-R	GTTAATGGTGTGCCCGTCGCAGTATGAAAGTTGGAGTA
vp1228-Fvp1228-R	ATTGCTTGTGCGCTTCGTGTTTCGCCCTGCTTTCCTT
vp2072-Fvp2072-R	CTCGTGATGACCTTGAAACACAGGAGACATACGGATT
vp2449-Fvp2449-R	TCGCCTTACTGCCTTTGTGTTTAGGTGGTGTGTGTTC
vp2665-Fvp2665-R	TTGCTTATCGTCGGTCTTCCATCATTCTGGTGCTG
vp2867-Fvp2867-R	AAGAAACGAGTCAGAGAGGCCAGGTTGGAAGAAGACGATA

表 2 黄精和抗生素单独抑制副溶血弧菌的 MIC

Table 2 MICs of *Polygonatum sibiricum* Red. and antibiotics against *V.parahaemolyticus* alone

抗生素	MIC($\mu\text{g/mL}$)
土霉素	2
多西环素	0.5
恩诺沙星	0.25
诺氟沙星	0.25
新霉素	16
甲矾霉素	2
氟苯尼考	2
噻啶酸	0.25
黄精水提物	50000

为 1/4MIC(0.5 $\mu\text{g/mL}$), FIC 为 0.5; 其他七种抗生素的 MIC 均没有变化, FIC 皆为 1.25, 表明缺乏协同抑菌能力(表 3)。因此, 不同浓度土霉素和黄精组合的协同抑菌能力被进一步研究。表 4 表明, 随着黄精水提物浓度的降低, 协同抑菌所需土霉素浓度逐渐增大, 具有最佳协同抑菌效果的配比为 1/8 MIC 黄精+1/4 MIC 土霉素, 此时 FIC 最小, 为 0.38。

表 3 抗生素联合 1/4MIC 黄精对副溶血弧菌的协同 S_{MIC} 和 FIC

Table 3 FIC and S_{MICs} of *P.sibiricum* Red. in combination with antibiotics against *V.Parahaemolyticus*

药物($\mu\text{g/mL}$)	黄精							
	土霉素	甲矾霉素	诺氟沙星	氟苯尼考	多西环素	恩诺沙星	新霉素	噻啶酸
S_{MIC}	0.5	2	0.25	2	0.5	0.25	16	0.25
FIC	0.5	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25

表 4 不同浓度土霉素和黄精联合抑制副溶血弧菌的 MIC 和 FIC

Table 4 FIC and S_{MICs} of *P.sibiricum* Red. in combination with oxytetracycline against *V.Parahaemolyticus*

黄精提取物	土霉素 S_{MIC} ($\mu\text{g/mL}$)					FIC
	MIC	1/2MIC	1/4MIC	1/8MIC	1/16MIC	
MIC	-	-	-	-	-	
1/2MIC	-	-	-	-	+	0.63
1/4MIC	-	-	-	+	+	0.5
1/8MIC	-	-	-	+	+	0.38
1/16MIC	-	-	+	+	+	0.56

注: “+”代表长菌, “-”代表不长菌。

2.2 黄精对副溶血弧菌细胞膜的影响

副溶血弧菌属于革兰氏阴性菌, 由于外膜的存在, 与革兰氏阳性菌相比, 更容易产生耐药性。本实验选择电导率、膜电位和 PI 染色试验来评估黄精对副溶血弧菌细胞膜的影响。细胞外膜可以转运多种离子和无机盐, 当外膜受损时, 渗透性变大, 电解质溢出胞外, 因此可以通过测量电导率的变化来判断细胞膜的损伤程度。与对照组相比, 黄精组相对电导率明显升高, 8 h 升为 5.547 ms/cm, 而对照组仅仅略微升高(图 1A), 表明黄精可导致细菌膜受损, 电解质被释放到培养液中。

膜电位是细胞膜内部和外部之间的电位差, 膜电位的上升和下降分别称为超极化和去极化。作为膜电位敏感的亲脂性阴离子荧光染料, DiBAC4(3) 本身没有荧光, 进入细胞后可与胞浆内蛋白质结合, 发出荧光, 去极化时, DiBAC4(3) 进入细胞量增多, 荧光强度随之增加, 反之, 超极化时荧光强度降低。图 1B 表明 1/2MIC 黄精使副溶血性弧菌细胞膜发生去极化现象, 此时 Na^+ 通道被激活, 大量内流, 膜两侧电位差急剧变小。

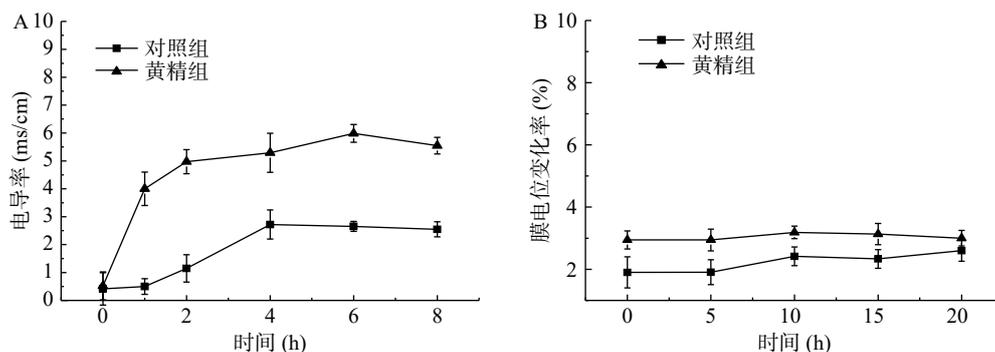


图 1 黄精对副溶血弧菌细胞膜的影响

Fig.1 Effects of *P.Rhizoma* on the cell membrane of *V.Parahaemolyticus*

注: A:电导率变化; B: 膜电位变化。

PI 是一种核染色试剂, 只能通过受损的细胞膜插入双链 DNA 中, 与之结合后并发出荧光, 白光下对照组和试验组的细菌数目几乎相同, 而荧光下黄精组的细胞数远高于对照组(图 2), 表明黄精使得细菌细胞膜严重受损, 从而导致 PI 大量进入。

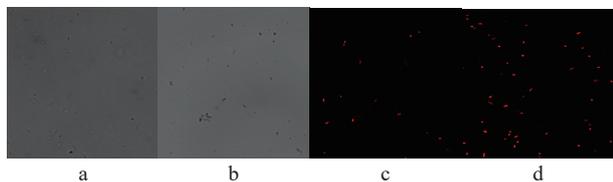


图 2 PI 染色图
Fig.2 PI staining

注: a、b、c 和 d 分别为空白和黄精组在白光下和荧光下的观察结果。

2.3 CCCP 对黄精和土霉素联合抑菌的影响

上述研究结果表明, 细胞膜也许是黄精抑菌的主要作用靶点。副溶血弧菌外膜上有多种外膜蛋白和药物外排泵, 能够单独或相互结合控制小分子物质如抗生素的进出。为了进一步阐明黄精对细胞外膜的作用, 本研究进行了 CCCP 试验。CCCP 是一种强电子解偶联剂, 可以破坏细胞膜内外跨膜质子梯度, 因此抑制大部分依赖质子梯度作为能量的外排泵的表达, 属于外排泵抑制剂^[17]。

在不同 CCCP 浓度下, 黄精抑菌的 MIC 没有变化, 但土霉素的 C_{MIC} 下降为 1/2~1/4MIC, 表明副溶血弧菌体内确实存在药物外排泵(表 5)。当 CCCP 浓度降低到 1/8 MIC 以下, 对土霉素 MIC 已经没有影响, 所以数据未呈现。由于 1/4MIC 的 CCCP 对土霉素的外排影响较小, 因此选其作为测试黄精和土霉素联合抑菌的 CCCP 浓度。受 CCCP 的影响, 黄精和土霉素的联合抑菌能力下降, FIC 在 0.63~1.06 之间, 此时由协同抑菌变为相加甚至无关作用, 说明黄精和土霉素的联合抑菌机制可能和外排泵相关(表 6)。

表 5 不同浓度 CCCP 条件下土霉素和黄精水提物单独抑制副溶血弧菌的 MIC

Table 5 C_{MIC} of oxytetracycline and *P.Rhizoma* against *V.Parahaemolyticus* under different concentrations of CCCP

CCCP浓度(μg/mL)	C_{MIC} (μg/mL)	
	土霉素	黄精
0	MIC	MIC
1/2MIC	1/4 MIC	MIC
1/4MIC	1/2 MIC	MIC

2.4 黄精对副溶血弧菌外膜蛋白和外排泵表达的影响

通过文献 [18-21], 副溶血弧菌外膜上 21 个相关基因被选择, 包括离子泵相关基因 *vp1228* (*nhaA*, Na^+/H^+ 反向协同运输泵)、*vp2072* (Na^+/H^+ 反向协同运输泵)、*vp2449* (*VmrA*, Na^+ /药物反向协同运输泵)、*vp2665* (Na^+/Ca^{2+} 交换蛋白)和 *vp2867* (*curA*,

表 6 1/4 MIC CCCP 条件下黄精水提物和土霉素联合抑菌的 FIC 和 MIC

Table 6 FIC and CS_{MIC} of oxytetracycline in combination with *P.Rhizoma* against *V.Parahaemolyticus* under 1/4 MIC CCCP

药物(μg/mL)	土霉素 CS_{MIC} (μg/mL)					FIC
	MIC	1/2MIC	1/4MIC	1/8MIC	1/16 MIC	
MIC	-	-	-	-	-	
1/2MIC	-	-	-	+	+	0.75
1/4MIC	-	-	+	+	+	0.75
1/8MIC	-	-	+	+	+	0.63
1/16MIC	-	+	+	+	+	1.06

注: “+”代表长菌, “-”代表不长菌。

K^+/H^+ 泵), 外膜蛋白相关基因 *vp0425* (*TolC*)、*vp1060* (*TolB*)、*vpa0096* (*OmpW*)、*vpa0318* (*OmpV*) 以及 *vpa1186* (*OmpA*), RND 外排泵相关基因 *vp0038*、*vp0941*、*vp1092*、*vp1178*、*vp2472*、*vpa0344*、*vpa0363*、*vpa0471*、*vpa0480*、*vpa0809* 和 *vpa1190*。

结果表明, 21 个基因的表达全被黄精抑制, 调控趋势和土霉素截然相反, 却和 CCCP 完全一致。其中, *vpa0096* (*OmpW*) 下调 497.51 倍, *vp0425* (*TolC*)、*vp2072* (Na^+/H^+ 反向协同运输泵)、*vp2665* (Na^+/Ca^{2+} 交换蛋白)、*vp1092*、*vp0941*、*vp1178*、*vpa0344* 和 *vpa0809* 分别下调 27.03、73.53、55.56、100.00、35.71、37.74、49.02 和 56.18 倍(图 3)。黄精也许和 CCCP 类似, 具有外排泵抑制剂功能, 通过下调副溶血弧菌细胞外膜上的 *vpa0096* (*OmpW*) 等基因的表达, 达到联合抑菌的目的。

2.5 黄精对副溶血弧菌呼吸代谢途径的影响

黄精作为一种外排泵抑制剂, 可以下调 RND 外排泵的表达, 本文猜测它和 CCCP 类似, 也破坏了跨膜质子梯度, 对氧化磷酸化进行解偶联, 从而反馈抑制呼吸代谢, 因此检测了黄精对副溶血弧菌呼吸代谢途径的影响。

结果表明, 黄精可以抑制副溶血弧菌的呼吸代谢作用, 抑制率为 $41.6\% \pm 0.036\%$, 与丙二酸的呼吸叠加率最小, 为 $11.3\% \pm 0.027\%$ (表 7)。呼吸叠加率反映了黄精与三种典型抑制剂共作用时的结果, 叠加率越小, 说明两者抑制同一条呼吸代谢途径的可能性越大, 可以推测黄精主要可能通过抑制三羧酸循环(TCA)途径而起作用。

TCA 循环是指丙酮酸在反应中彻底被氧化脱羧生成能量的过程, TCA 循环是微生物体内一切代谢的枢纽, 不仅可以产生大量的还原力 H 和能量, 而且能产生多种碳架原料以供给微生物体内的生物合成^[22]。MDH 和 SDH 是 TCA 循环的关键酶, MDH 能催化苹果酸变成草酰乙酸, 后者是 TCA 循环的起始的必需物质; SDH 则能催化琥珀酸脱氢生产延胡索酸, SDH 活性可作为评价 TCA 循环运行程度的指标。与空白组相比, 黄精组 MDH 和 SDH 的酶活分

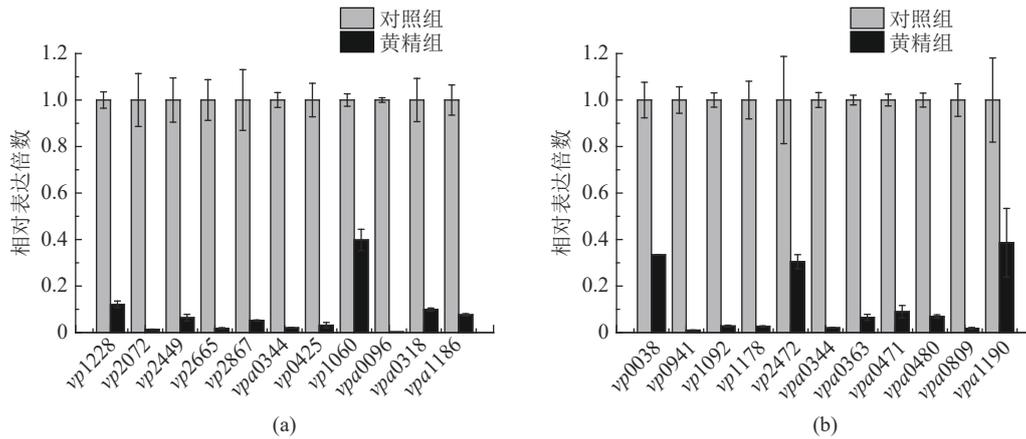


图 3 相关基因的相对表达倍数

Fig.3 Relative expression multiple of related genes

注: A: 离子泵和外膜蛋白相关基因; B: RND 外排泵相关基因。

表 7 黄精对副溶血性弧菌呼吸代谢的抑制作用

Table 7 Inhibitory effect of *P.Rhizoma* on respiratory metabolism of *V.Parahaemolyticus*

药物	浓度(mg·mL ⁻¹)	抑制率(%)	叠加率(%)
黄精	25.0	41.6±0.036	-
丙二酸	0.50	14.2±0.027	11.3±0.027
磷酸钠	0.50	16.2±0.078	17.6±0.031
碘乙酸	0.50	7.7±0.032	16.3±0.036

别下降为 (0.27±0.04) U/mg 和 (16.70±0.31) U/mg, 降低 55.30% 和 33.26%($P<0.05$)(表 8)。黄精显著抑制副溶血弧菌 TCA 循环关键酶 MDH 和 SDH 的酶活, 导致细菌无法得到充足的物质和能量供应, 从而加速细菌的死亡。

表 8 黄精对副溶血性弧菌 TCA 关键酶酶活的影响

Table 8 Effects of *P.Rhizoma* on the activities of MDH and SDH of *V.Parahaemolyticus*

组别	平均酶活力(U·mg ⁻¹)	
	MDH	SDH
对照组	0.61±0.08 ^a	25.00±2.87 ^a
黄精组	0.27±0.04 ^b	16.70±0.31 ^b

注: 具有不同字母上标的数值之间存在显著性差异($P<0.05$)。

3 讨论与结论

探讨黄精水提物和八种水产抗生素协同抑制副溶血弧菌的作用, 并研究了协同抑菌机制。研究发现, 黄精和土霉素联用协同抑菌效果最佳, 可使黄精抑菌 MIC 和土霉素抑菌 MIC 分别缩减 8 倍和 4 倍, 但这种协同作用在 CCCP 的影响下趋于消失, 变成相加甚至无关, 由此本文推断黄精可能也是一种天然外排泵抑制剂。通过检测筛选的 22 个基因的表达, 发现黄精和 CCCP 类似, 能显著抑制外膜蛋白和 RND 外排泵的表达, 其中 8 个基因下调倍数大于 30 倍, 尤其是 *vpa0096* (OmpW), 其表达下调 497.51 倍。

副溶血弧菌有 6 个外膜蛋白, 分别为 OmpW、

OmpU、OmpV、OmpA、OmpK 和 TolC^[23]。*vpa0096* (OmpW) 位于细菌细胞外膜上, 为 β 桶状结构, 属于多功能蛋白, 主要涉及小分子疏水性物质和铁离子的运输以及调节对外界高盐浓度的抗性, 是副溶血弧菌的毒力贡献基因之一, 同时还参与细菌对抗生素和不利环境的耐受^[24-25]。黄精破坏副溶血弧菌细胞膜, 增加细胞膜渗透性, 导致细胞去极化, 导致 Na^+ 大量回流, 同时又显著抑制 *vp2072* (Na^+/H^+ 反向协同运输泵) 和 *vp2665* ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换蛋白) 的表达, 使得胞内 Na^+ 无法被细菌排出体外, 而细菌又无法通过提高 *vpa0096* (OmpW) 的表达来适应胞内急剧升高的盐浓度, 因此容易死亡。

RND 外排泵是一个三聚体, 由外排转运子、膜融合蛋白和外膜蛋白组成, 其中 TolC 是最常见的组成多个 RND 外排泵的外膜蛋白之一^[26]。RND 外排泵是副溶血弧菌最主要的药物外排系统, 也是天然外排泵抑制剂主要靶点。副溶血弧菌共有 12 个 RND 外排转运子^[20], 黄精抑制其中 11 个转运子的表达, 其中 *vp1092*、*vp0941*、*vp1178*、*vpa0344* 和 *vpa0809* 的表达下降最为显著。当黄精和土霉素联用, 由于 RND 外排转运子的表达被显著抑制, 导致土霉素无法排出而在胞内大量聚集, 从而提高细菌对土霉素的敏感性, 降低土霉素抑菌浓度。同时, 土霉素是 TolC 的底物之一, *vp0425* (TolC) 表达明显下降, 也说明土霉素被阻留在胞内^[27-28]。

由于黄精导致细胞膜去极化, 同时抑制副溶血弧菌多个 Na^+/H^+ 反向协同运输泵, 导致胞内外质子梯度被破坏, ATP 无法生成, 能量以热量形式散失, 质子梯度是 RND 外排泵的动力来源, 这可能是黄精能抑制外排泵表达的原因。由于氧化磷酸化被解偶联, 那么相应的呼吸代谢必然受到影响, 黄精通过抑制 TCA 循环的关键酶 MDH 和 SDH, 从而抑制副溶血弧菌的 TCA 循环, 进一步加强细菌对抗生素的耐药性, 促进细菌死亡。

土霉素属于四环素类抗生素, 其作用机制在于

能特异性地与核糖体 30S 亚基的 A 位置结合,阻止氨基酰-tRNA 在此位置上的连接,从而抑制细菌蛋白质的合成,达到抑菌的目的^[29]。黄精和土霉素拥有截然不同的抑菌机制,黄精更能阻留土霉素在细胞内,进一步增强土霉素的抑菌效果,因此能达到协同抑菌的良好效果。

作为和 CCCP 一样具有解偶联功能的外排泵抑制剂,黄精和土霉素联用能较好地协同抑制副溶血弧菌,与 CCCP 相比,黄精属于药食同源的天然草本,安全无毒,因此具有极具开发潜力,将来能被应用在水产养殖中,降低弧菌耐药风险,促进水产养殖的健康发展。

参考文献

- [1] Bondad-Reantaso, M G. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of penaeid shrimps: Global perspective[C]. Asean Regional Technical Consultation on Ems/ahpnd & Other Transboundary Diseases for Improved Aquatic Animal Health in Southeast Asia, February, Makati City, Philippines, 2016: 16-25.
- [2] Tassanakajon A, Amparyup P, Somboonwivat K, et al. Cationic antimicrobial peptides in penaeid shrimp[J]. *Marine Biotechnology*, 2011, 13(4): 639-657.
- [3] Jeyasanta K I, Lilly T, Patterson J. Prevalence of *Vibrio* species in the cultured shrimp and their antibiotic resistants[J]. *Asian Journal of Applied Science and Technology (AJAST)*, 2017, 1(8): 100-111.
- [4] Olusola S, Emikpe B, Olaiya F. The potentials of medicinal plant extracts as bio-antimicrobials in aquaculture[J]. *International Journal of Medicinal & Aromatic Plants*, 2013, 3(3): 404-412.
- [5] Vatsos I N, Rebours C. Seaweed extracts as antimicrobial agents in aquaculture[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2014, 27(5): 2017-2035.
- [6] Jha R K. Efficacy of natural herbal formulation against acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) causing *Vibrio parahaemolyticus* in *Penaeus vannamei* [J]. *Veterinary Medicine - Open Journal*, 2017, 2(1): 1-6.
- [7] Rao M, Padyana S, Dipin K M, et al. Antimicrobial compounds of plant origin as efflux pump Inhibitors: new avenues for controlling multidrug resistant pathogens[J]. *Journal of Antimicrobial Agents*, 2018, 4(1): 159.
- [8] Lee Y S, Han S H, Lee S H, et al. Synergistic effect of tetrandrine and ethidium bromide against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[J]. *Journal of Toxicological Sciences*, 2011, 36(5): 645.
- [9] Joung D K, Choi S H, Kang O H, et al. Synergistic effects of oxyresveratrol in conjunction with antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2015, 12(1): 663.
- [10] Bucar, S P. Plant derived inhibitors of bacterial efflux pumps: An update[J]. *Phytochemistry Reviews*, 2015, 14(6): 961-974.
- [11] Li X Z, Plesiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2015, 28(2): 337-418.
- [12] Gabriella S, Annamária K, Márió G, et al. New roads leading to old destinations: Efflux pumps as targets to reverse multidrug resistance in bacteria[J]. *Molecules*, 2017, 22(3): 468.
- [13] Zgurskaya H I, Ganesh K, Abigail N, et al. Mechanism and function of the outer membrane channel TolC in multidrug resistance and physiology of enterobacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2011(2): 189.
- [14] 姜程曦, 张铁军, 陈常青, 等. 黄精的研究进展及其质量标志物的预测分析[J]. *中草药*, 2017, 48(1): 1-16.
- [15] 董治程, 谢昭明, 黄丹, 等. 黄精资源、化学成分及药理作用研究概况[J]. *中南药学*, 2012, 10(6): 450-453.
- [16] 云宝仪, 周磊, 谢鲲鹏, 汪业菊, 谢明杰. 黄芩素抑菌活性及其机制的初步研究[J]. *药科学报*, 2012, 47(12): 1587-1592.
- [17] 李碗芯, 孙莉娜, 林向民. 革兰氏阴性细菌外膜蛋白耐药功能及其抑菌策略研究进展[J]. *福建农林大学学报(自然版)*, 2015, 44(6): 561-566.
- [18] Matsuo T, Nakamura K, Kodama T, et al. Characterization of all RND-type multidrug efflux transporters in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Microbiologyopen*, 2013, 2(5): 725-42.
- [19] Matsuo T, Ogawa W, Tsuchiya T, et al. Overexpression of vmeTUV encoding a multidrug efflux transporter of *Vibrio parahaemolyticus* causes bile acid resistance[J]. *Gene*, 2014, 541(1): 19-25.
- [20] Wang Y, Wang Q, Bai X, et al. Expression and immunological characterization of the OmpA protein from *Vibrio parahaemolyticus* strain SH112[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019.
- [21] J Lun, D Liu, T Liu, et al. Evaluation of outer membrane protein U (OmpU) as a novel capture target of *Vibrio parahaemolyticus* and rapid detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) using PCR combined with immunomagnetic separation[J]. *Aquaculture Amsterdam*, 2018, 485: 225-232.
- [22] 周德庆编著. 微生物学教程[M]. 第3版. 北京: 高等教育出版社, 2011: 107-108.
- [23] Zhijuan Mao, Lian Yu, Zhenqiang You, et al. Cloning, expression and immunogenicity analysis of five outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus* ZJ2003[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23(3): 567-575.
- [24] Xiuping Fu, Jingyun Zhang, Tianyi Li, et al. The outer membrane protein OmpW enhanced *V. cholerae* growth in hypersaline conditions by transporting carnitine[J]. *Front Microbiol*, 2017(8): 2703.
- [25] 叶智鸽. 铁离子对大肠杆菌外膜蛋白 OmpW 的调控机制研究[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2015.
- [26] Dijun Du, Hendrik Wvan Veen, Satoshi Murakami, et al. Structure, mechanism and cooperation of bacterial multidrug transporters[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2015, 33: 76-91.
- [27] Nikaido H. Multiple antibiotic resistance and efflux[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 1998, 1(5): 516-523.
- [28] Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2001, 65(2): 232-260.
- [29] Pioletti M. Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3[J]. *The EMBO Journal*, 2014, 20(8): 1829-1839.