

研究报告

水飞蓟素对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 25923 的体外抑菌机制

王嘉康, 唐浩国*, 陈静, 司启贺, 申茹晓, 杨同香

河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023

王嘉康, 唐浩国, 陈静, 司启贺, 申茹晓, 杨同香. 水飞蓟素对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 25923 的体外抑菌机制[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2494-2507.

WANG Jiakang, TANG Haoguo, CHEN Jing, SI Qihe, SHEN Ruxiao, YANG Tongxiang. Silymarin inhibits the food-borne pathogen *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *in vitro*[J]. Microbiology China, 2024, 51(7): 2494-2507.

摘要:【背景】金黄色葡萄球菌作为一种常见的食源性致病菌, 能够对食品安全和人类健康造成危害。化学防腐剂虽然能有效抑制食源性致病菌的生长, 但也对人体健康和环境造成一定的威胁。【目的】为了进一步开发应用植物源抑菌剂, 研究水飞蓟素对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 25923 的抗菌机制。【方法】通过测定碱性磷酸酶活性、 β -半乳糖苷酶活性和 PI 染色研究水飞蓟素对细菌壁膜结构的影响, 通过 DNA 电泳、测定细菌 DNA 和蛋白质浓度探究水飞蓟素对细菌生物大分子的影响, 同时研究水飞蓟素对多糖黏附素(polysaccharide adhesin, PIA)的合成、细菌生物膜内细菌、成熟生物膜中蛋白质和多糖的影响, 使用傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectrometry, FT-IR)分析细菌成分的变化, 阐明水飞蓟素对金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 抗菌机制的多样性。【结果】水飞蓟素对金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 的最低抑菌浓度(MIC)为 0.5 mg/mL, 可以通过破坏细菌的膜结构降低 DNA 和蛋白质的含量, 抑制生物膜中 PIA 的合成, 破坏成熟的生物膜成分, 从而达到抑制细菌生长的目的。【结论】水飞蓟素能够从多方面抑制金黄色葡萄球菌的生长, 可为植物源天然产物的进一步应用提供理论基础。

关键词: 水飞蓟素; 金黄色葡萄球菌 ATCC 25923; 抑菌机制; 生物膜

*Corresponding author. E-mail: tanghaoguo@126.com

Received: 2023-10-07; Accepted: 2023-12-07; Published online: 2024-02-05

Silymarin inhibits the food-borne pathogen *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *in vitro*

WANG Jiakang, TANG Haoguo^{*}, CHEN Jing, SI Qihe, SHEN Ruxiao, YANG Tongxiang

College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China

Abstract: [Background] As a common food-borne pathogen, *Staphylococcus aureus* can do harm to food safety and human health. Although chemical preservatives can inhibit the growth of food-borne pathogens, they pose a threat to human health and the environment. [Objective] To decipher the mechanism of silymarin in inhibiting *S. aureus* ATCC 25923 for the development of plant-derived bacteriostatic agents. [Methods] We investigated the effects of silymarin on the membrane structure of bacteria by measuring alkaline phosphatase, β -galactosidase activities, and PI staining. The effects of silymarin on the macromolecules of bacteria were explored by DNA electrophoresis and determination of DNA and protein concentrations in bacteria cells. Furthermore, the effects of silymarin on the synthesis of polysaccharide intercellular adhesion (PIA), bacteria in biofilms, and the proteins and polysaccharides in mature biofilms were explored. Fourier transform infrared spectrometry was employed to reveal the changes of bacterial composition. On the basis of the results, the diversity of the mechanisms of silymarin in inhibiting *S. aureus* ATCC 25923 was expounded. [Results] The minimum inhibitory concentration (MIC) of silymarin against *S. aureus* ATCC 25923 was 0.5 mg/mL. Silymarin can inhibit the growth of bacteria by destroying the membrane structure of bacteria cells, reducing the concentrations of DNA and protein, Inhibit the synthesis of PIA in biofilm, and degrading the mature biofilm components. [Conclusion] Silymarin can inhibit the growth of *S. aureus* in multiple ways, which is expected to provide a theoretical basis for the further application of natural products from plants. **Keywords:** silymarin; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; bacteriostatic mechanism; biofilm

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)作为一种常见的食源性致病菌,可引起人类和动物的食物性中毒和感染^[1]。随着近年来抗生素的不断使用,多重耐药性金黄色葡萄球菌的传播正在以惊人的速度增加^[2]。化学防腐剂虽能够有效抑制食源性致病菌的生长,但它同时也对人体健康和环境造成一定威胁。因此,植物源天然防腐剂的开发和应用成为当下研究的热点之一^[3-5]。

水飞蓟素(silymarin, Sily)是从水飞蓟果实和种子中提取并与苯丙素类衍生物缩合的一种

黄酮类木脂素,可促进肝细胞再生,因此作为治疗肝病的有效药用成分而受到广泛关注^[6]。同时有研究表明,水飞蓟素具有良好的抗氧化活性、抗炎、抗癌、抗心血管疾病及免疫调节等生物活性^[7-9]。

当前关于水飞蓟素抑菌方面的研究进展主要是针对其对不同致病菌的抑菌活性探究,如 de Oliveira 等^[10]测定了水飞蓟素对一些常见菌株的最小抑菌浓度(MIC)以及其与抗菌药物联合使用时表现出的协同作用,结果表明水飞蓟素对大肠杆菌的 MIC 为 64 μ g/mL,并且当水飞

蓟素与抗生素阿米卡星联合使用时对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 1.22 $\mu\text{g/mL}$, 与庆大霉素联合使用时其 MIC 为 9.76 $\mu\text{g/mL}$ 。Evren 等^[11]的研究中评估了水飞蓟素对几种革兰氏阳性标准菌株和革兰氏阴性标准菌株的抗菌作用, 其 MIC 均为 60–241 $\mu\text{g/mL}$, 且水飞蓟素对革兰氏阴性菌的抑制作用要小于革兰氏阳性菌, 而关于水飞蓟素抑菌机制的研究却鲜有报道, 这极大地限制了水飞蓟素的应用, 针对这种不足, 本研究旨在从金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 膜结构的完整性和通透性、细菌 DNA 和蛋白质的含量、对生物膜的影响等方面评价水飞蓟素对金黄色葡萄球菌的抗菌活性和作用方式, 为进一步利用植物源活性物质对抗食源性致病菌提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 25923 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。

1.2 主要试剂和仪器

水飞蓟素, 西安云悦生物科技有限公司; 二甲基亚砜(DMSO 分析纯), 天津市科密欧化学试剂有限公司; 碱性磷酸酶检测试剂盒, 南京城建生物工程研究所; 细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; BCA 蛋白质定量检测试剂盒和 PI 染料, 北京索莱宝科技有限公司; 脑心浸液琼脂, 青岛海博生物技术有限公司; 刚果红, 阿拉丁试剂有限公司; 异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC), 飞净生物科技有限公司; 荧光增白剂, 西格玛奥德里奇贸易有限公司。

紫外-可见分光光度计, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; 超声细胞破碎仪, 宁波新芝生

物科技股份有限公司; 真空冷冻干燥机, Christ 公司; 荧光显微镜, ZEISS 公司; 傅里叶变换中远红外光谱仪, Bruker 公司; 多功能酶标仪, 上海 Tecan 实验器材有限公司; 超微量分光光度计, 赛默飞世尔科技公司。

1.3 培养基

胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA)和胰酪大豆胨肉汤培养基(TSB), 北京奥博星生物技术有限责任公司; 刚果红培养基(g/L): 脑心浸液琼脂 53.0, 刚果红 4.0, 蔗糖 36.0; M9 乳糖诱导培养基(g/L): 磷酸氢二钠 12.80, 磷酸二氢钾 3.00, 氯化钠 0.50, 氯化铵 1.00, 硫酸镁 0.50, 氯化钙 0.01, 乳糖 5.00。

1.4 MIC 的测定

MIC 的测定采用 Fei 等^[12]的方法并稍作修改。准备足够的经灭菌后冷却至 50 $^{\circ}\text{C}$ 的 TSA 培养基, 加入不同质量浓度水飞蓟素(1% DMSO 溶解)并调整终浓度分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 和 1.0 mg/mL , 每个平板终体积为 30 mL, 对照组只加入等量 DMSO 而未经水飞蓟素处理。培养基凝固后, 在各平板对应区域接种浓度为 1×10^8 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌 ATCC25923 菌悬液(使用 TSB 培养基在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、100 r/min 条件下过夜培养, 通过麦氏比浊法确定菌悬液浓度), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 h 后观察细菌生长情况, MIC 值为肉眼看不见细菌菌落生长的最低浓度, 所有实验重复 3 次。

1.5 傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectrometry, FT-IR)分析菌株 ATCC 25923 成分变化

参考柴瑞娟等^[13]的方法并稍作修改, 将金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 接种至含有质量浓度为 1/2 MIC 和 MIC 的水飞蓟素溶液的 TSB 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 培养过夜(6–8 h), 未用

水飞蓟素处理的细菌为对照组。之后在 4 °C、8 000 r/min 条件下离心 5 min, 用 PBS 重悬 3 次, 再次离心后放入 -80 °C 冰箱冷冻 2–4 h, 放入真空冷冻干燥机冷冻成粉末。最后, 将冻干粉末样品和在马弗炉中高温干燥的溴化钾粉末在干燥条件下按照 100:1 的质量比充分混合均匀, 然后用压片机将混合物制成圆形薄膜。采用 FT-IR 对水飞蓟素处理后的金黄色葡萄球菌成分变化进行测定。

1.6 Sily 处理对菌株 ATCC 25923 壁膜结构的影响

1.6.1 Sily 处理对碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP) 活性的影响

参照肖怀秋等^[14]的方法并稍作修改。取培养过夜的菌液, 10 000 r/min 离心 5 min。用 PBS 缓冲液清洗 3 次, 重新悬浮后将菌悬液调整至 OD_{600} 为 0.5, 分别取等体积的菌悬液并加入含有不同浓度的水飞蓟素溶液的 TSB 中。使其终浓度为 1/4 MIC、1/2 MIC 和 MIC。以不含水飞蓟素含有等体积 DMSO 的菌悬液作为对照(下同)。在 37 °C、100 r/min 分别培养 4 h 和 8 h 后取样并调整至相同吸光度($OD_{600}=1.0$), 按照碱性磷酸酶试剂盒步骤进行操作。

1.6.2 Sily 处理对 β -半乳糖苷酶活性的影响

参照蒋思雨等^[15]的方法并稍作修改。将浓度为 1×10^8 CFU/mL 的菌悬液接种到含有不同浓度水飞蓟素的 M9 乳糖诱导培养基中, 37 °C、100 r/min 分别诱导培养 4 h 和 8 h 后取样并调整至相同吸光度($OD_{600}=1.0$), 4 °C、10 000 r/min 离心 5 min 后取上清, 加入 1 mg/mL 邻硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷 (2-nitrophenyl β -D-galactopyranoside, ONPG) 溶液并于 37 °C 水浴 40 min 后加入 5 mL 0.5 mol/L Na_2CO_3 溶液终止反应, 测定 OD_{405} 值。

1.6.3 荧光显微镜观察细胞膜完整性

参照 Han 等^[16]的方法, 将水飞蓟素以 0 MIC

(对照组)、1/4 MIC、1/2 MIC 和 MIC 的终浓度分别加入金黄色葡萄球菌菌悬液(1×10^8 CFU/mL)中, 37 °C、100 r/min 培养 4 h 后 8 000 r/min 离心 10 min, 将所得的菌体用 PBS 缓冲液洗涤 3 次并重悬, 随后向其中加入 2 μ L PI 染液, 室温下避光孵育 30 min。最后, 取 10 μ L 处理后的样品进行制片, 置于荧光显微镜下观察。

1.7 Sily 处理对菌株 ATCC 25923 DNA 和蛋白质的影响

1.7.1 细菌 DNA 含量的测定

参照 Guo 等^[17]的方法并稍作修改, 在含有 0 MIC (对照组)、1/4 MIC、1/2 MIC 和 MIC 水飞蓟素的 TSB 培养基中接种 25 μ L 菌悬液 (1×10^8 CFU/mL), 在 37 °C、100 r/min 分别培养 6 h 和 12 h 后取样, 8 000 r/min 离心 10 min, 将所得的菌体用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 重悬后调整至相同的吸光度($OD_{600}=1.5$)。根据细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒步骤进行操作, 得到的样品采用超微量分光光度计测定 DNA 含量并进行琼脂糖凝胶电泳。

1.7.2 细菌蛋白质含量的测定

参照 Deng 等^[18]的方法并稍作修改, 菌液的制备同 1.6.1, 经超声细胞破碎仪在 300 W、工作 3 s 暂停 10 s、4 °C 条件下处理 20 min, 得到的样品采用多功能酶标仪测定 OD_{562} , 蛋白质浓度的测定根据 BCA 蛋白质定量检测试剂盒步骤进行操作, 并根据试剂盒中公式计算蛋白质浓度。

1.8 水飞蓟素对菌株 ATCC 25923 生物膜的影响

1.8.1 Sily 处理对生物膜多糖黏附素 (polysaccharide adhesin, PIA) 的影响

参照纠敏等^[19]的方法, 将浓度为 1×10^8 CFU/mL 的菌悬液接种到刚果红培养基上。刚果红平板中水飞蓟素的含量分别为 1/8 MIC、1/4 MIC 和 1/2 MIC 和 MIC。同时以不含水飞蓟素平板作

为阳性对照, 37 °C 静置培养 16 h, 观察菌落颜色, 其中菌落颜色呈黑色的为 PIA 阳性菌株, 菌落呈红色的为 PIA 阴性菌株。

1.8.2 Sily 处理对生物膜内活菌数的影响

将含有不同浓度水飞蓟素的菌悬液接种于 24 孔板中, 每孔 2 mL, 37 °C 培养 24 h 后去掉上清液, 加入 PBS 缓冲液小心清洗 3 次, 最后加入 2 mL PBS, 混匀后进行 10^2 – 10^8 系列 10 倍梯度稀释。取不同稀释倍数的液体 100 μ L 涂布于 TSA 培养基上, 37 °C 培养 24 h 后进行菌落计数。

1.8.3 Sily 处理对成熟生物膜内细菌的影响

将无菌盖玻片放入装有 TSB 培养基的 6 孔板, 接种浓度为 1×10^8 CFU/mL 的菌悬液, 37 °C、100 r/min 培养 24 h, 待盖玻片上生物膜成熟后移除菌悬液, 用 PBS 轻柔漂洗 3 次, 加入含有不同浓度水飞蓟素的 PBS 溶液, 37 °C 孵育 4 h 后用 PI 染液染色, 放入荧光显微镜下观察。

1.8.4 Sily 处理对成熟生物膜内蛋白质组分的影响

采用 Li 等^[20]的方法, 用 FITC 染色成熟生物膜(成熟生物膜的制备同 1.6.3)后放入荧光显微镜下观察。

1.8.5 Sily 处理对成熟生物膜内多糖组分的影响

成熟生物膜的制备同 1.6.3, 用荧光增白剂染色成熟生物膜后, 放入荧光显微镜下观察。

1.9 数据处理

所有试验重复 3 次, 试验结果使用 SPSS 19.0 统计软件分析和处理数据, 采用 Tukey 法进行差异显著性检验。采用 image J 对荧光图进行定量分析。

2 结果与分析

2.1 最小抑菌浓度(MIC)的测定结果

实验结果中对照组均有菌落生长, 且在含

水飞蓟素浓度为 0.1–0.4 mg/mL 的培养基上有菌落生长, 但在水飞蓟素浓度为 0.5–1.0 mg/mL 的培养基上, 均无菌落生长, 证明水飞蓟素对金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 的 MIC 为 0.5 mg/mL。

2.2 FT-IR 分析结果

实验结果如图 1 所示。与对照组相比, 水飞蓟素各浓度处理组红外吸收峰强度均明显下降, 1 650 cm^{-1} 附近的谱峰由 C=O 的伸缩振动产生, 1 550 cm^{-1} 附近的谱峰由 N-H 弯曲振动和 C-H 的伸缩振动产生, 这两处吸收峰分别代表细菌细胞中的蛋白质和多肽的酰胺带, 1 500–1 200 cm^{-1} 是复合区域, 包括细菌中蛋白质和脂肪酸中化学键的振动, 在 1 080 cm^{-1} 处的谱峰则由核酸分子内的磷酸二酯基团的对称和反对称伸缩振动产生^[25]。

对照组与水飞蓟素处理组相比, 在上述几处区域内的吸收峰强度明显减弱, 说明细菌的脂肪酸、蛋白质、多糖以及 DNA 的合成受到严重影响, 膜蛋白与细菌壁膜结构的完整性和通

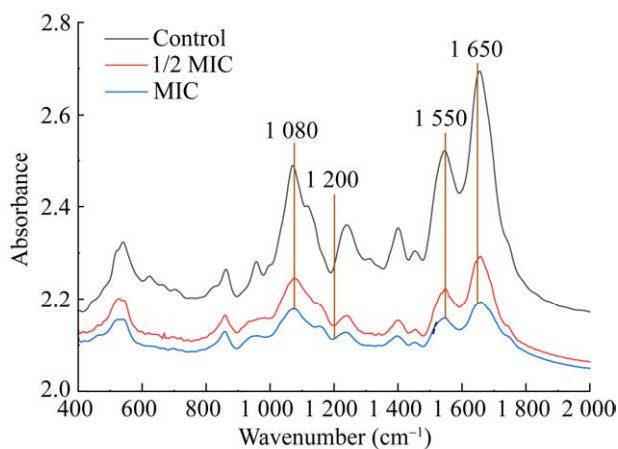


图 1 不同浓度的水飞蓟素处理的金黄色葡萄球菌的傅里叶变换红外光谱分析

Figure 1 Fourier transform infrared spectrometry analysis of *Staphylococcus aureus* treated with different concentrations of silibinin.

透性密切相关,胞外蛋白与胞外多糖共同构成细菌生物膜骨架,胞内蛋白与 DNA 对细菌的生长繁殖必不可少,以这些抑菌靶点为基础进一步探究水飞蓟素对金黄色葡萄球菌具体的抑菌机制。

2.3 Sily 处理对细菌壁膜结构的影响结果

细菌的碱性磷酸酶(AKP)位于其细胞壁与细胞膜之间,只有细胞壁受到破坏或通透性发生改变时,AKP 才会从细胞内流出,其胞外活性可以间接反映出水飞蓟素对金黄色葡萄球菌细胞壁的影响^[21]。AKP 胞外活性测定结果如图 2A 所示,经水飞蓟素处理 4 h 后,对照组 AKP 活性为 0.18 金氏单位,1/4 MIC 组的 AKP 活性为 0.757 金氏单位,1/2 MIC 和 MIC 组的 AKP 活性分别为 1.793 和 2.453,相比于对照组均显著提高($P<0.01$)。水飞蓟素处理 8 h 后 MIC 组的 AKP 活性达到 3.697,对照组仅为 0.333,为 MIC 组的 9% ($P<0.01$)。由此推断水飞蓟素可以破坏金黄色葡萄球菌的细胞壁结构,增加细胞壁的通透性,且呈现一定的剂量依赖性。

β -半乳糖苷酶普遍存在于细菌的细胞质

内,乳糖可诱导 β -半乳糖苷酶的产生,邻硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷(ONPG)可被 β -半乳糖苷酶水解为黄色的邻-硝基苯酚,如果细胞膜遭到破坏,ONPG 可进入细胞与 β -半乳糖苷酶反应,通过测定其 OD_{405} 值能够反映细胞膜的完整性^[22]。结果如图 2B 所示。水飞蓟素处理 4 h 后,各处理组吸光值显著增加($P<0.01$),对照组无明显变化,水飞蓟素的处理 8 h 后,与对照组相比,MIC 组的吸光值上升明显($P<0.01$), β -半乳糖苷酶活性最高,结果说明水飞蓟素可以破坏细菌细胞膜的完整性。

PI 是一种常见 DNA 荧光染料,但其无法进入活细胞,只有细胞膜受损使细胞死亡时,PI 才能进入细胞与 DNA 结合,在荧光显微镜下显示红色。为进一步探究水飞蓟素对菌株 ATCC 25923 细胞壁膜结构的影响,使用 PI 对其进行染色,荧光显微镜观察结果如图 3 所示,对照组几乎无红色荧光,细菌死亡量较少,随着水飞蓟素浓度增大,红色荧光逐渐增多,细菌因细胞膜破损造成死亡量增加。

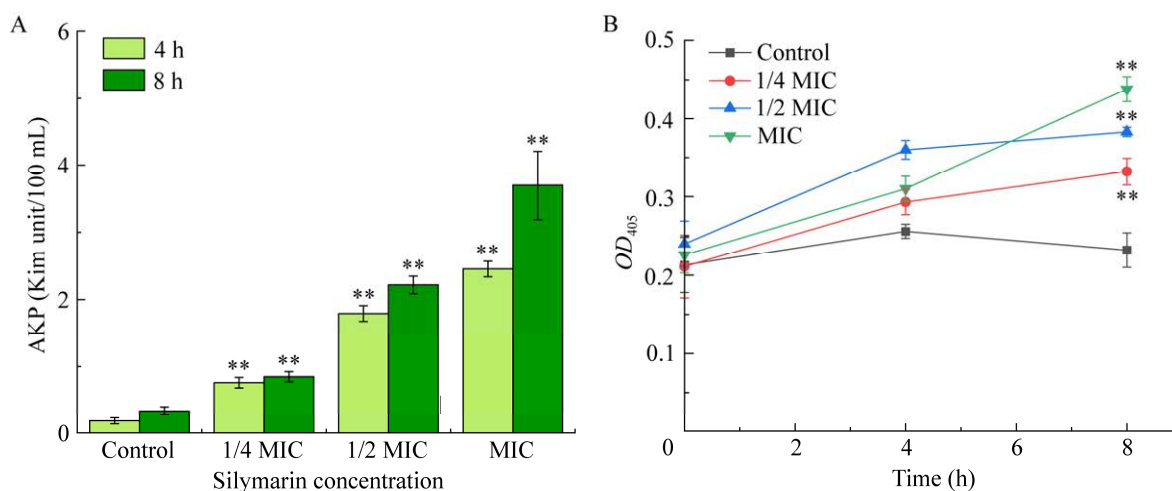


图 2 水飞蓟素对菌株 ATCC 25923 细胞壁膜结构的影响($n=3$) A: AKP 活性. B: β -半乳糖苷酶活性
Figure 2 Effect of silymarin on cell wall membrane structure of strain ATCC 25923 ($n=3$). A: AKP activity. B: β -galactosidase activity. **: $P<0.01$.

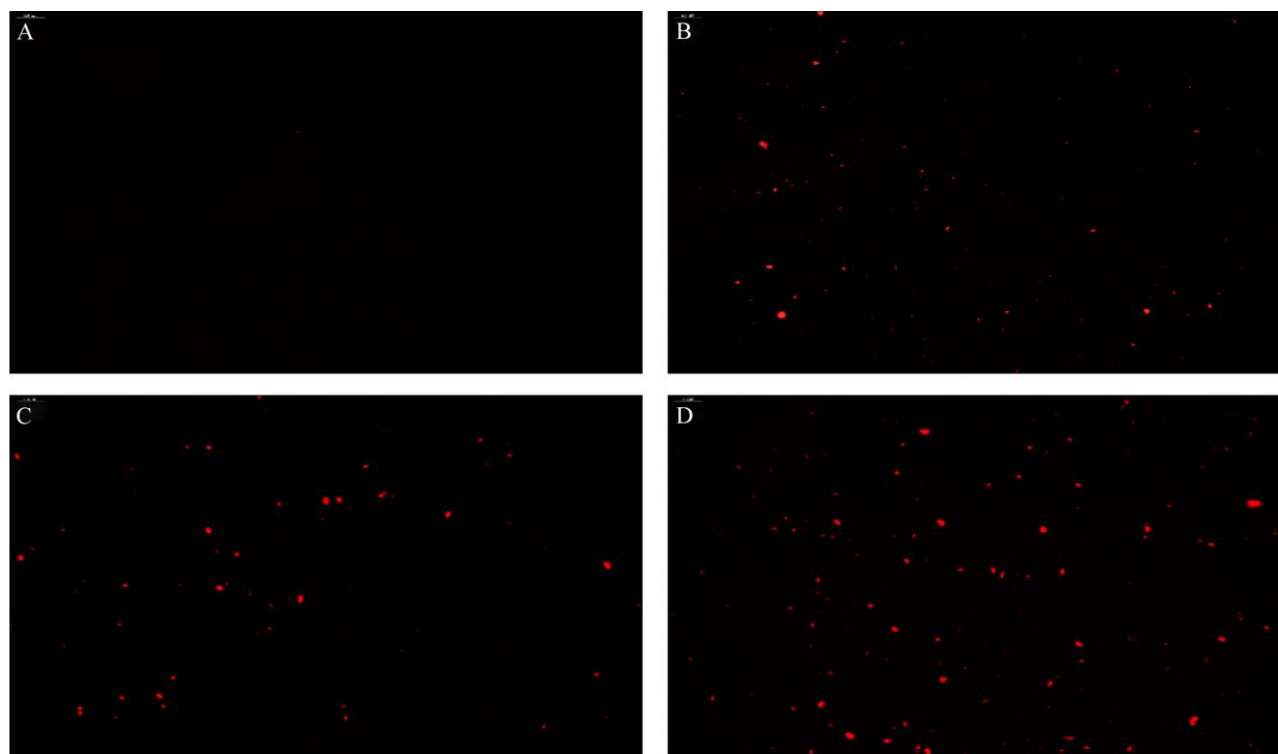


图 3 荧光显微镜观察水飞蓟素对菌株 ATCC 25923 细胞膜的影响($n=3$)

Figure 3 Effect of silymarin on cell membrane of strain ATCC 25923 was observed by fluorescence microscope ($n=3$). A: The control group. B, C and D are 1/4 MIC, 1/2 MIC and MIC groups, respectively.

2.4 Sily 处理对细菌 DNA 的影响

DNA 作为生物的主要遗传物质,对细菌的生长繁殖必不可少。本研究通过琼脂糖凝胶电泳和超微量分光光度计探究水飞蓟素对菌株 ATCC 25923 DNA 的影响,实验结果如图 4、图 5 所示,电泳结果显示不同浓度水飞蓟素分别培养细菌 6 h 和 12 h 后,其 DNA 荧光亮度均有不同程度的减弱,其中 MIC 组的荧光条带几乎不可见,超微量分光光度计的测定结果同样显示 MIC 组的 DNA 含量最低($P<0.01$)。

2.5 Sily 处理对细菌蛋白质的影响

蛋白质是细胞的重要组成部分,生命活动离不开蛋白质的参与。本研究通过 BCA 蛋白定量试剂盒来测定水飞蓟素对细菌蛋白质的影响,实验结果如图 6 所示。细菌在含有不同浓

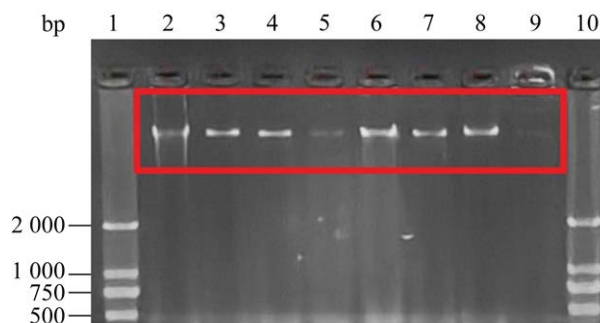


图 4 不同浓度水飞蓟素处理的菌株 ATCC 25923 的 DNA 电泳分析($n=3$)

Figure 4 DNA electrophoresis analysis of strain ATCC 25923 treated with silymarin at different concentrations. Electrophoretic bands 2, 3, 4 and 5 were 6 h treatment groups of 0 MIC, 1/4 MIC, 1/2 MIC and MIC. Electrophoretic bands 6, 7, 8 and 9 were treated with 0 MIC, 1/4 MIC, 1/2 MIC and MIC for 12 hours.

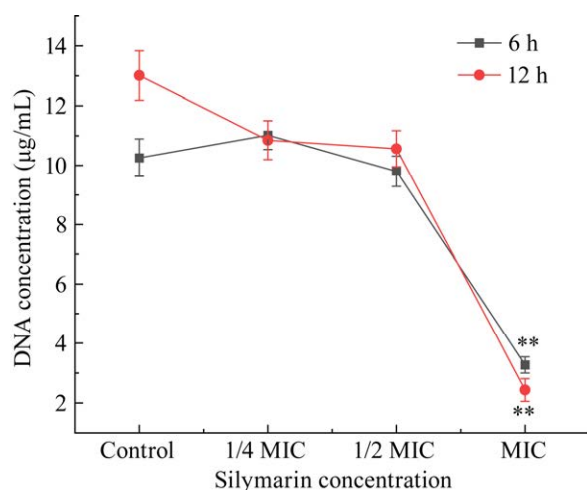


图 5 水飞蓟素对菌株 ATCC 25923 DNA 的影响($n=3$)

Figure 5 Effect of silymarin on DNA of strain ATCC 25923 ($n=3$). **: $P<0.01$.

度水飞蓟素培养基中培养 6 h 后, 低浓度的水飞蓟素对其蛋白质含量影响较弱, MIC 组与对照组相比蛋白质含量下降显著($P<0.01$), 12 h 后各浓度处理组蛋白质含量均有不同程度的下降($P<0.01$), 且 MIC 组含量最低。结果证明水飞蓟素可以影响 *S. aureus* ATCC 25923 蛋白质的合成。

2.6 Sily 处理对细菌生物膜的影响

2.6.1 Sily 处理对生物膜内 PIA 的影响

生物膜主要由细菌胞外基质(extracellular matrix, ECM)以及聚集在其中的细菌组成, ECM 主要成分为 PIA, 它可以直接介导细菌对物体

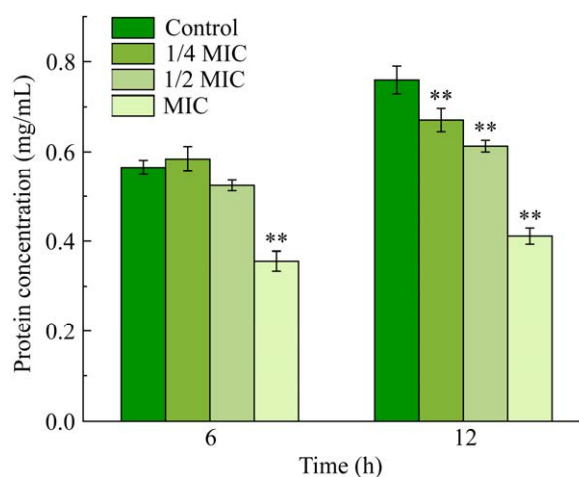


图 6 水飞蓟素对菌株 ATCC 25923 蛋白质的影响($n=3$)

Figure 6 Effect of silymarin on protein of strain ATCC 25923 ($n=3$). **: $P<0.01$.

表面以及宿主细胞的黏附作用^[23]。刚果红染料可以与 PIA 结合, 利用这一特性可以探究水飞蓟素对细菌 PIA 合成的影响。实验结果如图 7 所示。对照组菌落呈现深黑色, 而含有水飞蓟素的刚果红培养基中黑色菌落逐渐变小变浅, MIC 组黑色完全消失, 说明水飞蓟素可以抑制 PIA 的合成, 并呈现一定的剂量依赖性。

2.6.2 Sily 处理对生物膜内活细菌数的影响结果

采用平板菌落计数法来探究水飞蓟素对菌株 ATCC 25923 生物膜内活菌数的影响, 以此来进一步探究水飞蓟素对生物膜的抑制作用, 实

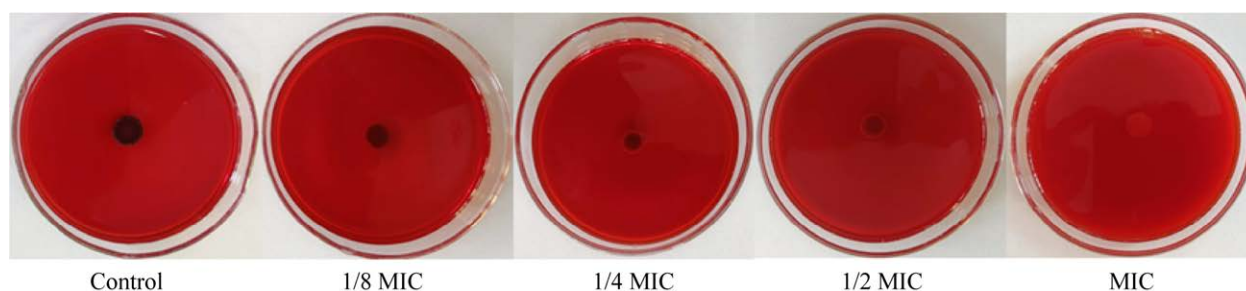


图 7 水飞蓟素对菌株 ATCC 25923 PIA 的影响($n=3$)

Figure 7 Effect of silymarin on PIA of strain ATCC 25923 ($n=3$).

验结果如图 8 所示。未加入水飞蓟素的对照组生物膜内活菌数大于 10^8 CFU/mL, 1/8 MIC 和 1/4 MIC 处理组活菌数为 10^6 – 10^7 CFU/mL, 抑制率达到 95.7%–98.8% ($P<0.01$), 1/2 MIC 处理组内活菌数为 10^5 – 10^6 CFU/mL, MIC 组内活菌数仅有 10^4 – 10^5 CFU/mL, 抑制率超过 99% ($P<0.01$)。

2.6.3 Sily 处理对成熟生物膜内细菌的影响结果

生物膜成熟后, 用不同浓度的水飞蓟素处理成熟生物膜, 之后用 PI 染料浸染, 在荧光显微镜下观察水飞蓟素对成熟生物膜内细菌的影响。实验结果如图 9 所示。对照组仅有少量红色荧光, 随着水飞蓟素浓度的增加, 红色荧光逐渐增多, 说明死菌数量逐渐增加。结果证明水飞蓟素能够以破坏或渗透生物膜的方式杀灭细菌。

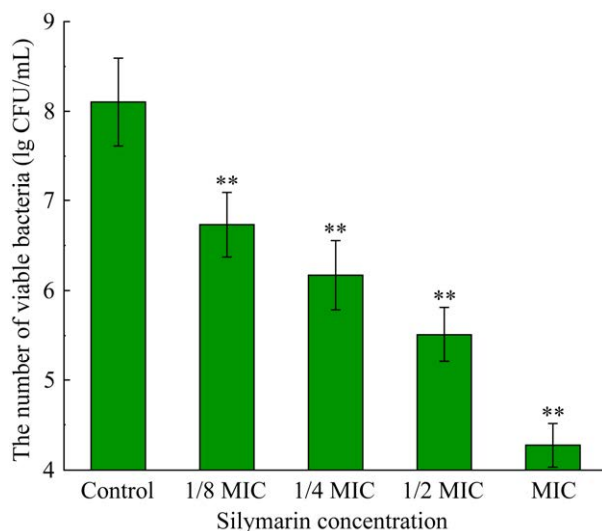


图 8 水飞蓟素对菌株 ATCC 25923 生物膜内活菌数的影响($n=3$)

Figure 8 Effect of silymarin on the number of viable bacteria in strain ATCC 25923 biofilm ($n=3$).

**: $P<0.01$.

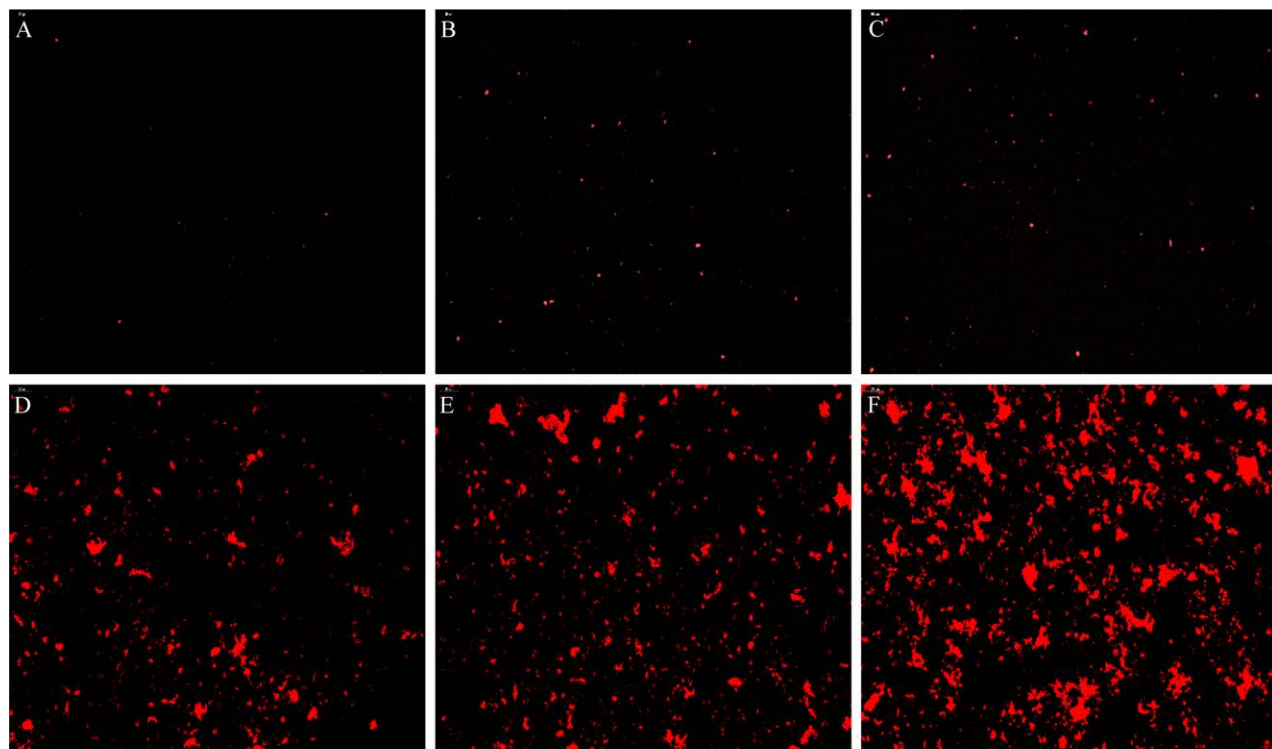


图 9 水飞蓟素对菌株 ATCC 25923 成熟生物膜内细菌的影响

Figure 9 Effect of silymarin on bacteria in mature biofilm of strain ATCC 25923. A: The control group. B, C, D, E and F are 1/16 MIC, 1/8 MIC, 1/4 MIC, 1/2 MIC and MIC groups, respectively.

2.6.4 Sily 处理对成熟生物膜组分的影响

细菌的生物膜由多种组分构成, 其中多糖和蛋白质含量较多, 二者能够相互结合, 对初期生物膜的形成、成熟生物膜结构的维持起着至关重要的作用^[24]。异硫氰酸荧光素(FITC)能够与多种蛋白相结合在荧光显微镜下显绿色, 荧光增白剂能够与胞外多糖相结合, 在荧光显

微镜下显蓝色, 根据这一特性来探究水飞蓟素对成熟生物膜组分的影响, 实验结果如图 10、图 11 所示。不同浓度的水飞蓟素处理成熟生物膜之后, 其蛋白质和多糖含量均显著减少($P<0.01$), 对照组生物膜经染色后骨架明显, 聚集程度高且生物膜较厚, 经水飞蓟素处理后的生物膜变薄且稀疏松散。

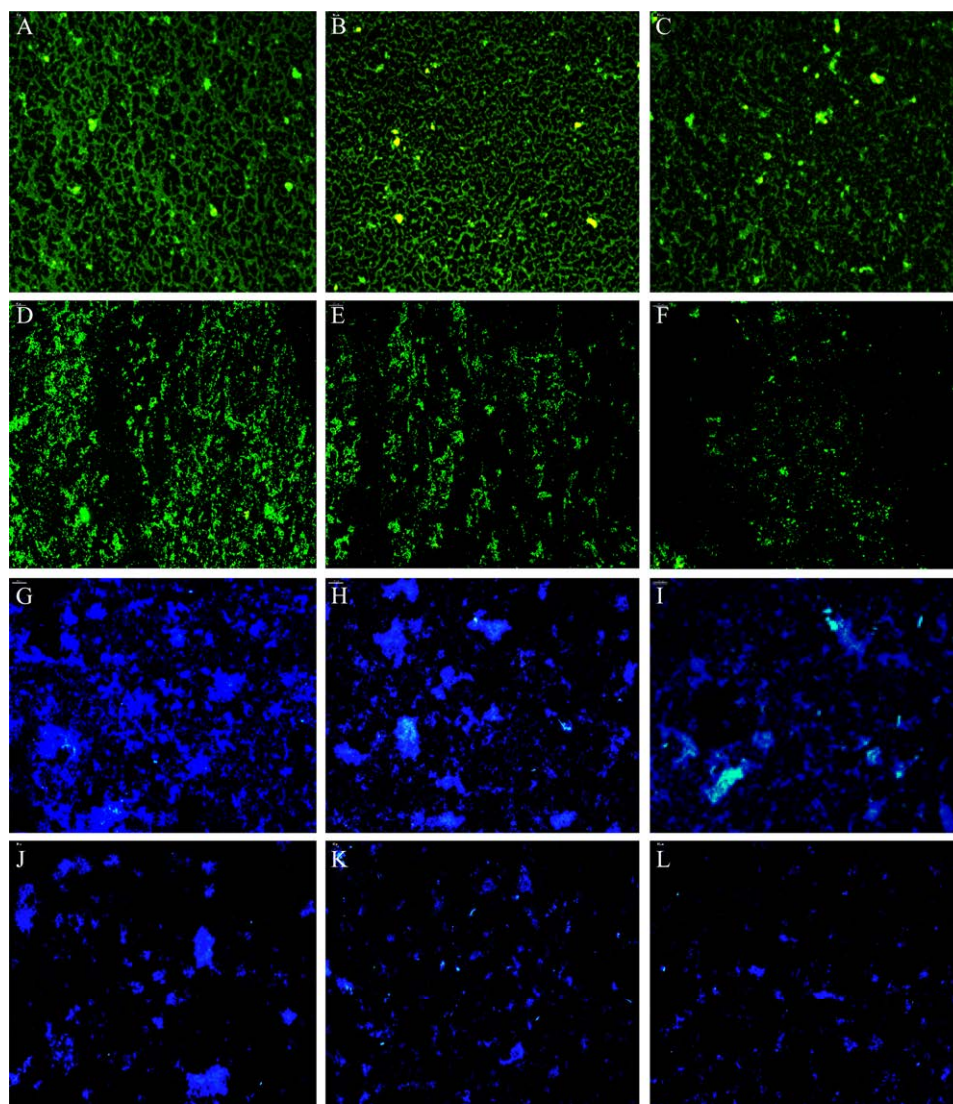


图 10 水飞蓟素对菌株 ATCC 25923 成熟生物膜内组分的影响

Figure 10 Effect of silymarin on components in mature biofilm of strain ATCC 25923. A, B, C, D, E and F are FITC staining groups of control, 1/16 MIC, 1/8 MIC, 1/4 MIC, 1/2 MIC and MIC, respectively. G, H, I, J, K and L are fluorescent brightener staining groups of control, 1/16 MIC, 1/8 MIC, 1/4 MIC, 1/2 MIC and MIC, respectively.

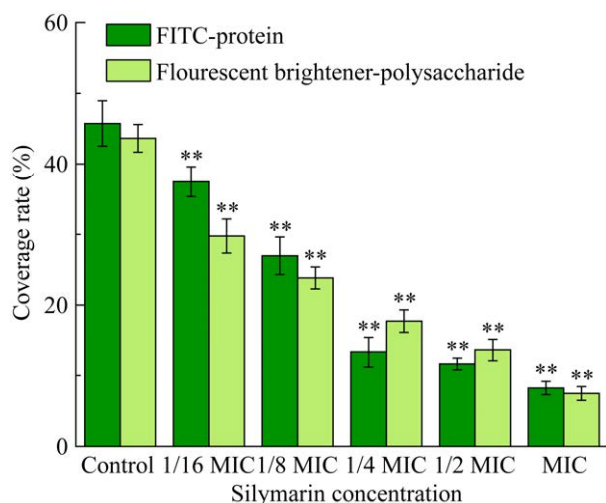


图 11 水飞蓟素对菌株 ATCC 25923 成熟生物膜内组分的荧光定量图分析($n=3$)

Figure 11 Fluorescence quantitative diagram analysis of silymarin on components in mature biofilm of ATCC 25923 ($n=3$). **: $P<0.01$.

FITC 荧光图定量分析结果(图 11)显示, 对照组蛋白质覆盖率为 45.733%, MIC 组蛋白质覆盖率为 8.233%, 下降 82%。荧光增白剂荧光图定量分析结果显示, 对照组多糖覆盖率为 43.633%, MIC 组多糖覆盖率为 7.467%, 下降 82.9%。

3 讨论与结论

本研究从多方面研究水飞蓟素对 *S. aureus* ATCC 25923 的抑菌机制, 首先从 FT-IR 结果筛选出水飞蓟素可能的抑菌靶点, 并以此为基础进一步探讨水飞蓟素对金黄色葡萄球菌的抑菌机制, 从水飞蓟素对细菌壁膜结构影响的实验结果来看, 经水飞蓟素处理后的细菌碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶活性均显著高于对照组。PI 染料染色后, 水飞蓟素处理组的红色荧光明显多于对照组, 说明水飞蓟素可以破坏细菌的壁膜结构, 使壁膜的通透性发生改变, 细菌运输物质的能力降低, 甚至失去选择透过性功能, 导致细菌死亡。Wang 等^[26]同样根据碱性磷酸

酶、 β -半乳糖苷酶活性两个指标测定了黄原胶低聚糖对金黄色葡萄球菌壁膜结构的影响, 结果发现黄原胶低聚糖可以改变细菌细胞膜通透性, 但对细胞壁无影响。Zhou 等^[27]使用荧光强度作为指标来检测细胞外膜通透性的改变, 以 β -半乳糖苷酶浓度来观察内膜通透性是否受损, 结果表明绿茶多糖(green tea polysaccharides, gTPC)可提高大肠杆菌的外膜通透性, 但对大肠杆菌细胞内膜通透性无显著影响。相较于黄原低聚糖和 gTPC, 水飞蓟素对金黄色葡萄球菌壁膜结构的破坏程度较强。

从 DNA 电泳与 DNA 浓度测定结果来看, 低浓度水飞蓟素对细菌 DNA 影响较小, MIC 浓度下的 DNA 含量显著降低, 从蛋白质浓度测定结果来看, 随着水飞蓟素浓度的增加、作用时间的延长, 蛋白质含量逐渐降低。该结果说明水飞蓟素可以影响金黄色葡萄球菌的 DNA 和蛋白质的含量, 使细菌正常的生长繁殖受到限制, 从而导致细菌的死亡。这可能是细胞壁膜通透性增加导致 DNA 和蛋白质泄露至细胞外, 或者是 DNA 和蛋白质的合成途径被抑制导致其含量下降。连凯琪等^[28]探究 4-萜烯醇对沙门氏菌的抗菌机制, 发现不同浓度 4-萜烯醇处理组 DNA 条带的亮度与对照组相比未发生降解和拖带, 这说明 4-萜烯醇不具有降解沙门氏菌 DNA 的作用, 并且也不与沙门氏菌的 DNA 结合。高蕊等^[29]探讨了癸酸锌对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌机制, 发现癸酸锌并不能显著抑制菌体 DNA 和蛋白质的合成。然而本研究中发现不同浓度的水飞蓟素均可在一定程度上影响金黄色葡萄球菌 DNA 和蛋白质的合成, 且呈现一定的剂量依赖性。

生物膜泛指微生物附着于接触表面, 通过分泌多糖、脂质、蛋白质、多肽和胞外 DNA 等组成细胞外聚合物基质(extracellular polymeric

substrates, EPS), 并将自身包裹在其中的一种群落聚集体, 它能够帮助细菌更好地适应外界环境, 增加细菌对传统抑菌剂的抗性^[30], 其中 PIA 作为细菌生物膜主要成分之一, 对细菌黏附在食物以及其他物体表面形成生物膜这一过程起着至关重要的作用。在本研究中发现, 水飞蓟素可以显著抑制细菌 PIA 的合成, 从而降低细菌的黏附能力, 并且这种抑制能力呈现一定的剂量依赖性。袁中伟^[31]在关于百里香酚抗金黄色葡萄球菌生物被膜的研究中发现 128 $\mu\text{g/mL}$ 的百里香酚就可以显著抑制金黄色葡萄球菌 PIA 的合成。本研究在菌落计数与 PI 染色实验结果中发现, 水飞蓟素处理后的细菌生物膜内活菌数大幅减少且充斥着大量死菌, 由此推测水飞蓟素能够破坏或渗透到成熟生物膜内杀灭细菌, 为证实这一结果, 采用 FITC 与荧光增白剂对生物膜进行染色, 结果发现水飞蓟素处理后的成熟生物膜内蛋白质与多糖含量大量减

少, 且生物膜变得稀疏松散, 这也证明水飞蓟素可以清除成熟生物膜内的蛋白质和多糖组分, 破坏成熟生物膜骨架。Kim 等^[32]在对丁香酚对大肠杆菌的抑菌机制研究中发现丁香酚可以抑制生物膜的形成并对成熟生物膜具有一定的清除作用。Yuan 等^[33]发现百里香酚同样可以清除金黄色葡萄球菌成熟生物膜, 且 512 $\mu\text{g/mL}$ 的百里香酚对成熟生物膜的清除率达到 82.92%, 而本研究中发现 0.5 mg/mL 的水飞蓟素对成熟生物膜的清除率也达到 82.9%, 与其研究结果一致。

不同天然产物对不同致病菌的抑菌机制不尽相同, 本研究从 *S. aureus* ATCC 25923 的壁膜结构, DNA 和蛋白质以及对生物膜的抑制作用等方面探讨水飞蓟素对金黄色葡萄球菌的抑菌机制, 如图 12 所示。水飞蓟素可以破坏金黄色葡萄球菌的壁膜结构, 影响其 DNA 和蛋白质含量, 抑制和清除其生物膜的形成。在今后的

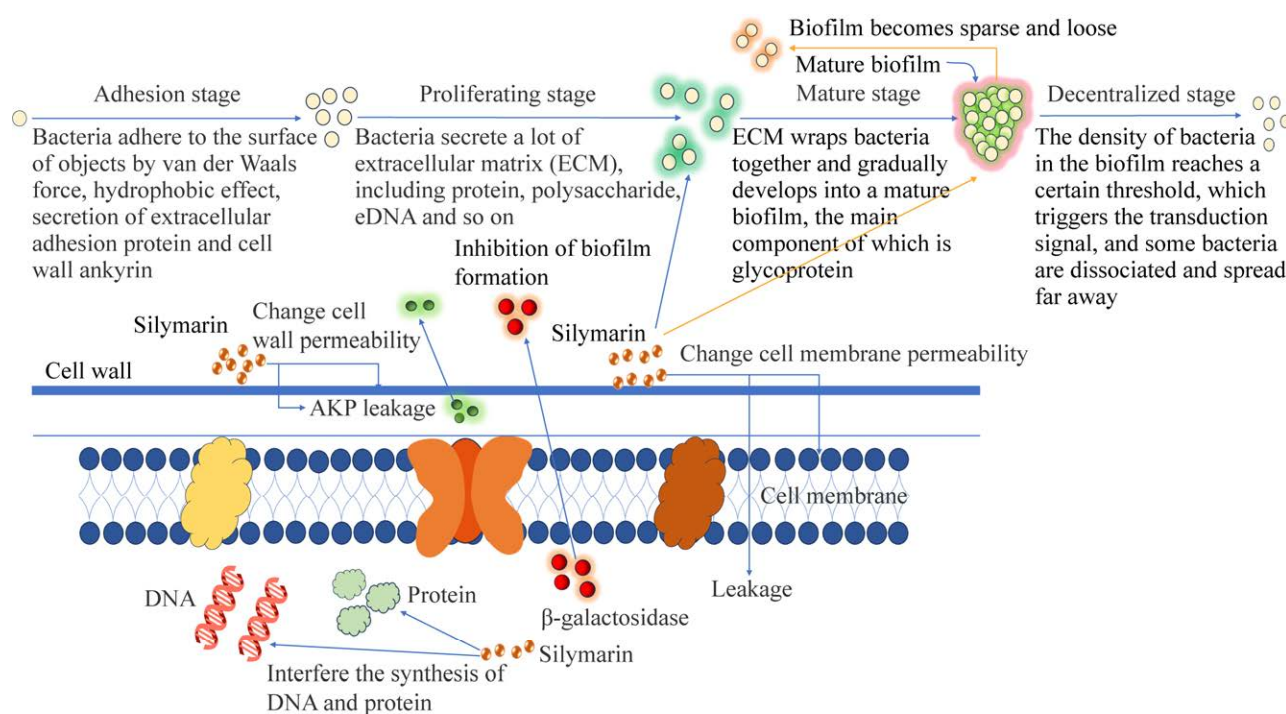


图 12 水飞蓟素抑菌机制

Figure 12 Bacteriostatic mechanism of silymarin.

研究中可以从分子水平, 利用蛋白质组学、转录组学等方法深入探讨水飞蓟素抑菌机制的多样性, 并利用其他天然产物的抑菌特性, 如壳聚糖、茶多酚等与水飞蓟素相结合制成复合保鲜剂系统评价其对不同种类食物营养与感官的影响, 推动水飞蓟素在食品保鲜领域的实际应用。

REFERENCES

- [1] LI S X, WANG PP, ZHAO JL, ZHOU LH, ZHANG PF, FU CY, MENG JH, WANG X. Characterization of toxin genes and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* from retail raw chicken meat[J]. Journal of Food Protection, 2018, 81(4): 528-533.
- [2] ONICIUC EA, NICOLAU AI, HERNÁNDEZ M, RODRÍGUEZ-LÁZARO D. Presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the food chain[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 61: 49-59.
- [3] WANG ZY, JIA YT, ZHANG M. Effect of curcumin on the quality properties of millet fresh noodle and its inhibitory mechanism against the isolated spoilage bacteria[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(3): 1451-1460.
- [4] OLSZEWSKA MA, GEDAS A, SIMÕES M. Antimicrobial polyphenol-rich extracts: applications and limitations in the food industry[J]. Food Research International, 2020, 134: 109214.
- [5] OZOGUL Y, BOGA EK, AKYOL I, DURMUS M, UCAR Y, REGENSTEIN JM, KÖŞKER AR. Antimicrobial activity of thyme essential oil nanoemulsions on spoilage bacteria of fish and food-borne pathogens[J]. Food Bioscience, 2020, 36: 100635.
- [6] LEE JS, HONG DY, KIM ES, LEE HG. Improving the water solubility and antimicrobial activity of silymarin by nanoencapsulation[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2017, 154: 171-177.
- [7] ESMAEIL N, ANARAKI SB, GHARAGOZLOO M, MOAYEDI B. Silymarin impacts on immune system as an immunomodulator: one key for many locks[J]. International Immunopharmacology, 2017, 50: 194-201.
- [8] SHAH M, ULLAH M, DROUET S, YOUNAS M, TUNGUNNITHUM D, GIGLIOLI-GUIVARC'H N, HANO C, ABBASI B. Interactive effects of light and melatonin on biosynthesis of silymarin and anti-inflammatory potential in callus cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn[J]. Molecules, 2019, 24(7): 1207.
- [9] 陈江丽, 邱智东, 金媛媛, 周栩妍, 李弘鹏, 刘达, 金叶. 水飞蓟素脂质体的制备、质量评价及其对 HaCaT 细胞增殖和摄取的影响[J]. 中草药, 2022, 53(12): 3614-3624.
- CHEN JL, QIU ZD, JIN YY, ZHOU XY, LI HP, LIU D, JIN Y. Preparation and quality evaluation of silymarin liposomes and their effects on proliferation and uptake of HaCaT cells[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2022, 53(12): 3614-3624 (in Chinese).
- [10] de OLIVEIRA DR, TINTINO SR, BRAGA MFBM, BOLIGON AA, ATHAYDE ML, COUTINHO HDM, ALENCAR de MENEZES IR, FACHINETTO R. *In vitro* antimicrobial and modulatory activity of the natural products silymarin and silibinin[J]. BioMed Research International, 2015, 2015: 292797.
- [11] EVREN E, YURTCU E. *In vitro* effects on biofilm viability and antibacterial and antiadherent activities of silymarin[J]. Folia Microbiologica, 2015, 60(4): 351-356.
- [12] FEI P, FENG H X, WANG YY, CHANG YH, GUO L, CHEN JL. *Amaranthus tricolor* crude extract inhibits *Cronobacter sakazakii* isolated from powdered infant formula[J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(11): 9969-9979.
- [13] 柴瑞娟, 李露, 王玉良. La 和 Ce 对两种细菌抗性的影响及其细胞壁的红外光谱分析[J]. 稀土, 2014, 35(5): 50-54.
- CHAI RJ, LI L, WANG YL. Effects of REE on resistance and cell wall structure of bacteria[J]. Chinese Rare Earths, 2014, 35(5): 50-54 (in Chinese).
- [14] 肖怀秋, 李玉珍, 林亲录, 赵谋明, 刘军, 周全. 金属抗菌肽 SIF₄ 对金黄色葡萄球菌细胞通透性的影响机制[J]. 食品与生物技术学报, 2023, 42(2): 97-103.
- XIAO HQ, LI YZ, LIN QL, ZHAO MM, LIU J, ZHOU Q. Mechanism of metal antimicrobial peptide SIF₄ against *Staphylococcus aureus* cell permeability[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2023, 42(2): 97-103 (in Chinese).
- [15] 蒋思雨, 郝刚, 唐善虎, 李思宁, 孙栋, 张林. 月桂酰精氨酸乙酯的抑菌活性[J]. 现代食品科技, 2022, 38(10): 109-116.
- JIANG SY, HAO G, TANG SH, LI SN, SUN D, ZHANG L. Antibacterial activity of ethyl lauroyl arginine ester[J]. Modern Food Science & Technology, 2022, 38(10): 109-116 (in Chinese).
- [16] HAN YJ, CHEN WX, SUN ZC. Antimicrobial activity and mechanism of limonene against *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Food Safety, 2021, 41(5): e12918.
- [17] GUO L, WANG YY, BI X, DUO K, SUN Q, YUN XQ, ZHANG YB, FEI P, HAN JC. Antimicrobial activity and mechanism of action of the *Amaranthus tricolor* crude

- extract against *Staphylococcus aureus* and potential application in cooked meat[J]. *Foods* (Basel, Switzerland), 2020, 9(3): 359.
- [18] DENG HT, ZHU JY, TONG YQ, KONG YW, TAN C, WANG MY, WAN MZ, MENG XJ. Antibacterial characteristics and mechanisms of action of *Aronia melanocarpa* anthocyanins against *Escherichia coli*[J]. *LWT*, 2021, 150: 112018.
- [19] 纠敏, 闫鹏, 李晶晶, 汪伦记. 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌生物膜的抑制机制[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(5): 1565-1571.
- JIU M, YAN P, LI JJ, WANG LJ. Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm formation by oridonin[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(5): 1565-1571 (in Chinese).
- [20] LI PY, CHEN XN, SHEN YN, LI HT, ZOU YQ, YUAN G, HU P, HU HY. Mucus penetration enhanced lipid polymer nanoparticles improve the eradication rate of *Helicobacter pylori* biofilm[J]. *Journal of Controlled Release*, 2019, 300: 52-63.
- [21] TANG H, CHEN WX, DOU ZM, CHEN RH, HU YY, CHEN WJ, CHEN HM. Antimicrobial effect of black pepper petroleum ether extract for the morphology of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2017, 54(7): 2067-2076.
- [22] ZHANG Y, WU YT, ZHENG W, HAN XX, JIANG YH, HU PL, TANG ZX, SHI LE. The antibacterial activity and antibacterial mechanism of a polysaccharide from *Cordyceps cicadae*[J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 38: 273-279.
- [23] HEILMANN C. Adhesion mechanisms of staphylococci[M]//*Advances in Experimental Medicine and Biology*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011: 105-123.
- [24] IDREES M, SAWANT S, KARODIA N, RAHMAN A. *Staphylococcus aureus* biofilm: morphology, genetics, pathogenesis and treatment strategies[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2021, 18(14): 7602.
- [25] PADMAVATHI AR, ABINAYA B, PANDIAN SK. Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl) of marine bacterial origin inhibits quorum sensing mediated biofilm formation in the uropathogen *Serratia marcescens*[J]. *Biofouling*, 2014, 30(9): 1111-1122.
- [26] WANG ZC, YANG QQ, WANG XQ, LI RF, QIAO HZ, MA PG, SUN Q, ZHANG HR. Antibacterial activity of xanthan-oligosaccharide against *Staphylococcus aureus* via targeting biofilm and cell membrane[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 153: 539-544.
- [27] ZHOU Y, YAO QF, ZHANG T, CHEN XQ, WU ZQ, ZHANG N, SHAO YD, CHENG Y. Antibacterial activity and mechanism of green tea polysaccharide conjugates against *Escherichia coli*[J]. *Industrial Crops and Products*, 2020, 152: 112464.
- [28] 连凯琪, 孟蕊, 王梦婷, 张向丽, 王国栋, 张明亮, 张坤朋, 周玲玲. 4-萜烯醇对沙门菌的抗菌机制[J]. *中国兽医学报*, 2023, 43(8): 1684-1689.
- LIAN KQ, MENG R, WANG MT, ZHANG XL, WANG GD, ZHANG ML, ZHANG KP, ZHOU LL. Antibacterial mechanism of terpinen-4-ol against *Salmonella*[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2023, 43(8): 1684-1689 (in Chinese).
- [29] 高蕊, 李柯洁, 周佳乐, 祁丽雯, 黄小露, 高雨僮, 乔汉桢, 王金荣. 癸酸锌的合成及其对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌机制研究[J]. *饲料研究*, 2024, 47(2): 82-88.
- GAO R, LI K J, ZHOU J L, QI LW, HANG XL, GAO YT, QIAO HZ, WANG JR. Synthesis of zinc decanoate and its antibacterial mechanism against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*[J]. *Feed Research*, 2024, 47(2): 82-88 (in Chinese).
- [30] 罗欢, 王炜捷, 李玮玮, 郭银莉, 刘伟佳, 卢嵘, 薛云新, 王岱, 赵西林. 细菌生物膜抵抗消毒剂的研究进展[J]. *中国抗生素杂志*, 2023, 48(2): 133-143.
- LUO H, WANG WJ, LI WW, GUO YL, LIU WJ, LU R, XUE YX, WANG D, ZHAO XL. Research progress on the resistance of bacterial biofilms to disinfectants[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2023, 48(2): 133-143 (in Chinese).
- [31] 袁中伟. 百里香酚抗金黄色葡萄球菌生物被膜感染的药效学研究[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2022.
- YUAN ZW. Pharmacodynamics of thymol against *Staphylococcus aureus* biofilm infection[D]. Ya'an: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [32] KIM YG, LEE JH, GWON G, KIM SI, PARK JG, LEE J. Essential oils and eugenols inhibit biofilm formation and the virulence of *Escherichia coli* O157:H7[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 36377.
- [33] YUAN ZW, DAI YY, OUYANG P, REHMAN T, HUSSAIN S, ZHANG TY, YIN ZQ, FU HL, LIN JC, HE CL, LV C, LIANG XX, SHU G, SONG X, LI LX, ZOU YF, YIN LZ. Thymol inhibits biofilm formation, eliminates pre-existing biofilms, and enhances clearance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a mouse peritoneal implant infection model[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(1): 99.