

Inhibitory Effect of Allicin on the Secretion of *Staphylococcus aureus* Virulence Factors

Linqi Zhu, Shihe Shao

School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang Jiangsu
Email: 1030421039@qq.com

Received: May 31st, 2018; accepted: Jun. 14th, 2018; published: Jun. 21st, 2018

Abstract

Objective: To study the inhibitory effects of allicin on the proliferation of *Staphylococcus aureus* and the secretion of virulence factors *in vitro*. **Methods:** The allicin is diluted to different concentrations to act on *Staphylococcus aureus* at early stage of growth logarithm. The MIC and the MBC of allicin against *Staphylococcus aureus* were determined by tube method; the growth curves were measured to analyze the growth inhibition effect of allicin on *Staphylococcus aureus*; the effects of allicin on the secretion of virulence factors of *Staphylococcus aureus* were determined by coagulase and a-hemolysin assays, the changes of a-hemolysin gene under allicin were determined by sequencing technique and Blast-matched. **Results:** The MIC is 15.625 µg/mL; the MBC is 62.5 µg/mL; the titers of coagulase and the a-hemolysin activities decreased significantly ($P < 0.05$); The DNA sequence has no significant change. **Conclusion:** Allicin has significant inhibitory effects on the proliferation and the secretion of virulence factors of *Staphylococcus aureus*.

Keywords

Allicin, *Staphylococcus aureus*, Growth Curve, Coagulase, A-Hemolysin

大蒜素对金黄色葡萄球菌毒力因子分泌的抑制作用

朱琳琦, 邵世和

江苏大学医学院, 江苏 镇江
Email: 1030421039@qq.com

收稿日期: 2018年5月31日; 录用日期: 2018年6月14日; 发布日期: 2018年6月21日

摘要

目的: 研究大蒜素在体外对金黄色葡萄球菌的增殖以及毒力因子的分泌是否存在抑制作用。**方法:** 将大

蒜素稀释至不同浓度后, 分别作用于处于生长对数前期的金黄色葡萄球菌, 采用试管法测定大蒜素对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC); 采用生长曲线测定法分析大蒜素对金黄色葡萄球菌的生长抑制作用; 采用凝固酶, α -溶血素实验测定大蒜素对金黄色葡萄球菌毒力因子分泌的影响, 采用测序技术以及Blast比对的方法测定大蒜素作用下 α -溶血素基因的变化。结果: 大蒜素对金黄色葡萄球菌的MIC为15.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$, MBC为62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 大蒜素可以抑制金黄色葡萄球菌的生长, 并呈浓度依赖性; 凝固酶的效价和 α -溶血素的活性明显降低($P < 0.01$); α -溶血素的DNA序列无明显改变。结论: 大蒜素对金黄色葡萄球菌的增殖和毒力因子分泌具有明显的抑制作用。

关键词

大蒜素, 金黄色葡萄球菌, 生长曲线, 凝固酶, α -溶血素

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)为革兰阳性的球菌, 呈葡萄串状排列, 是人类化脓性感染最常见的病菌, 通过毒力因子引起食物中毒, 烫伤样皮肤综合症, 中毒性休克综合症等毒素性疾病[1]。由于耐药菌株的出现, 给金黄色葡萄球菌感染性疾病的治疗带来挑战。因此寻找治疗金黄色葡萄球菌感染性疾病中草药尤为重要。

大蒜素(Allicin)为三硫代烯丙醚类化合物, 是从大蒜的球形鳞茎中提取出来的挥发性油状物, 具有强烈的辛辣刺激味。大蒜素是大蒜中主要生物活性物质的总称, 具有抗菌, 抗肿瘤, 降低胆固醇, 抗血小板聚集等多种生理学作用, 并且在人和动物体内无残留, 不产生耐药性, 不造成污染, 价格低廉等优点, 备受国内外研究者关注[2]。

本研究主要采用检测凝固酶和 α -溶血素的分泌探讨了大蒜素对金黄色球菌的增殖及毒力因子分泌的抑制作用。

2. 材料和方法

2.1. 材料

金黄色葡萄球菌(ATCC25923)由本江苏大学医学院保存; 大蒜素(汇林生物有限公司); 血浆(江苏省溧阳市中医院); M-H 固体培养基(河南美凯生物有限公司); 去纤维兔血红细胞(南京茂捷微生物科技有限公司)。

37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱、超净工作台(苏州安泰空气有限公司); 紫外可见分光光度计(Biochrom 公司); 摇床(德国 Thermo Forma 公司); Biosceen 全自动生长曲线分析仪(上海谓载商贸发展有限公司)

2.2. 大蒜素对金黄色葡萄球菌的 MIC, MBC 的测定

将待测菌种接种于 LB 平板上置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱培养 24 h, 挑取新鲜单个菌落至无菌生理盐水中研磨制成菌悬液, 利用分光光度计调整至 $\text{OD}_{600} = 0.1$, 即 0.5 麦氏比浊度。取 12 支无菌试管, 第一管加入 2 mL 的 LB 培养液, 其余试管加入 1 mL。在第一支试管中加入大蒜素 4 μL , 即药物浓度为 1 mg/mL, 然后倍比稀释至第十管。在含药的试管中加入 5 μL 调整后的菌液使得菌液浓度为 5×10^5 CFU/mL。剩下的两

支试管分别做阴阳性对照, 其中阴性对照不加菌, 阳性对照不加药[3]。分装完毕后, 将试管放入 37°C 温箱中培养 16~18 h 后观察。使试管澄清透明的最小大蒜素浓度即为 MIC。从所有澄清透明的试管中吸取 100 μL 液体, 接种至 M-H 平板上, 37°C 培养 16~18 h, 菌落数 < 5 的最低浓度为 MBC [4]。

2.3. 大蒜素对金黄色葡萄球菌增殖的影响

取单个菌落至 3 mL 培养液中, 放至摇床 37°C 200 r/min 过夜, 次日取菌液 50 μL 加入 5 mL 的 LB 中扩大培养至 $\text{OD}_{600\text{ nm}} = 0.3$ 。通过倍比稀释使药的终浓度分别为 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.9025, 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 在 96 孔板中加入含有不同浓度大蒜素的菌液 400 μL , 放入生长曲线仪, 每 1 h 测量一次, 共检测 24 h。

2.4. 大蒜素对金黄色葡萄球菌凝固酶分泌的影响

金黄色葡萄球菌扩大培养至 $\text{OD}_{600\text{ nm}} = 0.3$ 后, 加入不同含量的药物, 使药的浓度分别为 500, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 继续扩大培养至 $\text{OD}_{600\text{ nm}} = 2.5$, 10,000 g 离心 10 min, 分离上清和菌体。用无菌的 LB 将收集的上清进行倍比稀释, 每个 Ep 管中 100 μL , 用 PBS 将血浆做 4 倍稀释, 每个 Ep 管中加入稀释后的血浆 0.5 mL, 混匀后置于温箱中 6 h, 以产生凝集的最高稀释倍数作为凝固酶的效价。

2.5. 大蒜素对金黄色葡萄球菌分泌溶血素的影响

在 Ep 管中加入 875 μL 的 PBS, 100 μL 菌上清, 25 μL 兔红细胞, 将 Ep 管放入 37°C 水浴箱中 30 min, 5500 g 离心 1 min, 取上清, 在波长 543 nm 处测量 OD 值[5]。

2.6. 大蒜素对金黄色葡萄球菌 hla 基因序列的影响

合成 16s rRNA、溶血素的引物(具体引物见表 1), 对分泌出的菌体进行总 DNA 的提取, 再利用普通 PCR 得到相应的条带, 胶回收后, 进行基因测序[6]。

2.7. 统计学分析

采用 SPSS22.0 软件处理实验数据, 金黄色葡萄球菌的生长曲线组间比较采用重复测量方差分析, 经过对数转换后的凝固酶效价和溶血素活性实验数据组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Dunnett-t 和 S-N-K 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 大蒜素对金黄色葡萄球菌的 MIC, MBC 的测定

大蒜素对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 15.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$, MBC 为 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3.2. 大蒜素对金黄色葡萄球菌增殖的影响

根据生长曲线可知(见图 1), 加入大蒜素后金黄色葡萄球菌的生长受到明显的抑制。当药物浓度达到 MIC 时, 加入药物后金黄色葡萄球菌的生长相对于对照组明显缓慢, 在 4~8 h 后恢复生长但总体生长比对照组慢很多。同时时间点不同浓度组之间的增殖抑制作用的差异存在统计学意义($P < 0.01$), 处理组与对照组分别进行两两比较, 增殖抑制作用的差异均有统计学意义($P < 0.05$), 处理组之间进行两两比较, 增殖抑制作用的差异仍有统计学意义($P < 0.05$)。并且, 根据生长曲线可知, 大蒜素浓度越高, 抑制作用越强, 这表明大蒜素在体外以浓度依赖性的形式抑制金黄色葡萄球菌的生长。

3.3. 大蒜素对金黄色葡萄球菌凝固酶分泌的影响

不同浓度的大蒜素处理金黄色葡萄球菌, 金黄色葡萄球菌分泌蛋白的浓度无明显改变, 差别无统计学意义。

在组间比较时, 效价差异存在统计学意义, 而在处理组与对照组两两比较时, 除了 7.8125 组以外, 其余各组与对照组的差异存在统计学意义($P < 0.01$, 见表 2)。

3.4. 大蒜素对金黄色葡萄球菌溶血素分泌的影响

金黄色葡萄球菌在血平板中生长时, 出现了明显的溶血环, 故有 α -溶血素产生。加入大蒜素作用后, 金黄色葡萄球菌的溶血活性受到抑制, 且呈浓度依赖性(见图 2)。群组之间差异具有统计学意义($P < 0.01$)在与对照组两两比较的结果中, 除 7.8125 组外, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

3.5. 大蒜素对金黄色葡萄球菌 hla 基因序列的影响及比对分析

测序结果经过 Blast 比对, 加药前后的金黄色葡萄球菌 16s rRNA 与基因库中覆盖度均为 99%, 加药前金黄色葡萄球菌 hla 基因序列覆盖率为 99%, 加药后 hla 基因序列覆盖率为 98%。说明大蒜素不能引起 hla 基因的变化, 不易产生基因突变从而产生耐药性[7]。

Table 1. Common PCR primers

表 1. 普通 PCR 引物

基因	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
16s rDNA-F	GGCGTTGCTCCGTCAGGCTT	420
16s rDNA-R	CGCTGGCGGCGTGCCTAAT	
hla-F	GAAGTCTGGTGAAAACCTGA	704
hla-R	TGAATCCTGTCGCTAATGCC	

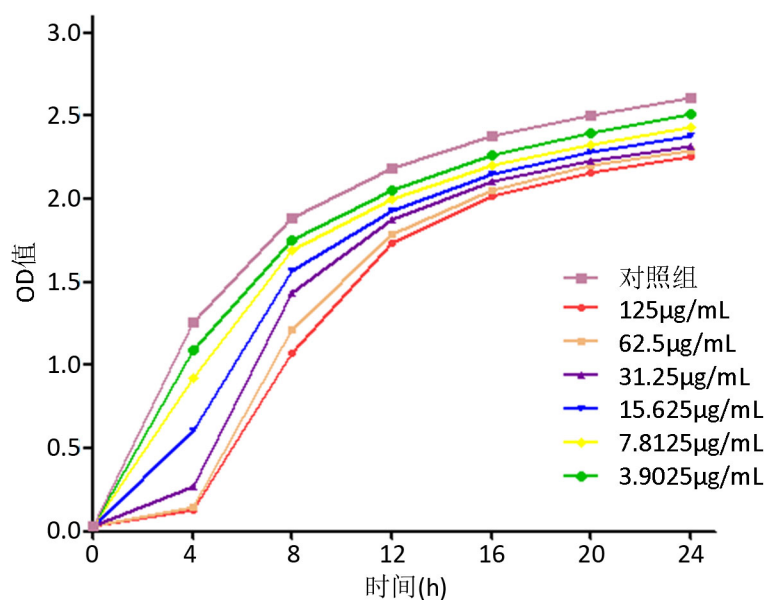


Figure 1. Growth curves of *Staphylococcus aureus* under different concentrations of allicin

图 1. 不同浓度大蒜素作用下金黄色葡萄球菌的生长曲线

Table 2. Changes of secretory protein concentrations and coagulase titers of *Staphylococcus aureus* after allixin treatment
表 2. 大蒜素作用后金黄色葡萄球菌分泌蛋白浓度以及凝固酶效价的变化

大蒜素浓度($\mu\text{g/mL}$)	分泌蛋白浓度(mg/mL)	效价
500	12.40	1:16*
250	12.52	1:32*
125	12.14	1:32*
62.5	11.84	1:64*
31.25	11.81	1:256*
15.625	12.00	1:256*
7.8125	12.11	1:512
对照组	12.17	1:512

*与对照组比较, $P < 0.01$ 。

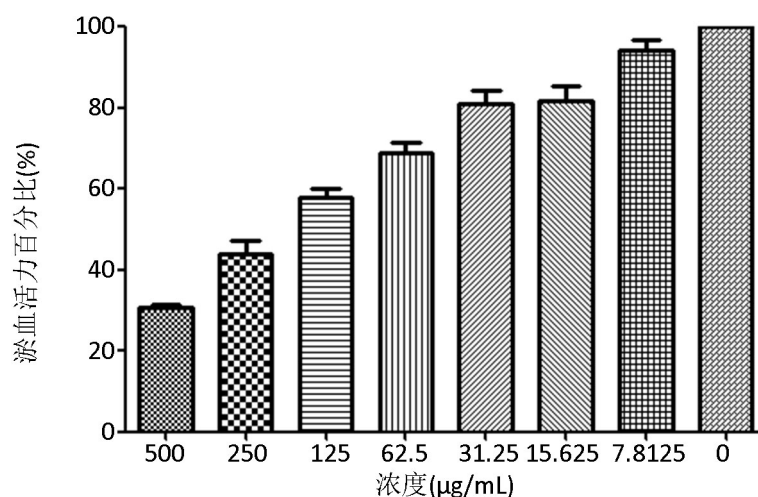


Figure 2. Changes of hemolytic activity under different concentrations of garlicin
图 2. 不同浓度大蒜素作用下溶血活力的变化

4. 讨论

金黄色葡萄球菌的致病物质分为三大类: ① 菌体: 荚膜, SPA, 胞壁肽聚糖等; ② 酶类: 血浆凝固酶, 纤维蛋白溶酶, 酯酶, 耐热核酸酶, 透明质酸酶等; ③ 毒素: 细胞毒素(溶血素, 杀白细胞素), 肠毒素, 毒性休克综合症毒素, 表皮剥脱毒素等。a-溶血素是金黄色葡萄球菌分泌的溶血素之一, 是一种具有细胞裂解、溶血和皮肤坏死活性的成孔毒素, 是金黄色葡萄球菌所分泌的毒素因子中最要的毒力因子之一。凝固酶能够阻碍吞噬细胞对金黄色葡萄球菌的吞噬及杀灭作用, 纤维蛋白还可沉积在病灶周围, 阻止药物及机体内杀菌物质与金黄色葡萄球菌接触, 利于其繁殖, 纤维蛋白的大量形成能限制金黄色葡萄球菌扩散, 并易使局部毛细血管栓塞, 导致组织坏死, 故葡萄球菌引起的化脓感染多为局限性[8]。

大蒜素主要含有大蒜辣素, 大蒜新素及多种烯丙基硫醚化合物等。是目前国内外较为热门的中草药。我们将大蒜素作用于金黄色葡萄球菌中, 通过生长曲线观察金黄色葡萄球菌增殖的抑制情况; 测定凝固酶的效价和溶血素的活性的变化分析大蒜素对金黄色葡萄球菌毒力因子分泌的影响; 并利用测序技术, 比较药物作用前后 *hla* 基因的变化从而判定大蒜素对金黄色葡萄球菌的基因序列是否存在影响[9]。

本研究表明, 大蒜素对于金黄色葡萄球菌具有抑制作用, 且呈浓度依赖性。经过以上实验, 我们证

实了低浓度的大蒜素具有抑菌作用, 而高浓度的大蒜素具有杀菌效果。根据多种报道, 我们已知金黄色葡萄球菌的毒力因子可引起种特异性疾病, 其中凝固酶和溶血素是金黄色葡萄球菌最为重要的毒力因子。在大蒜素发挥作用后, 我们发现菌外分泌的蛋白总量没有明显变化, 但是凝固酶的效价明显受到抑制, 并且呈浓度依赖性, 说明大蒜素能够减少金黄色葡萄球菌纤维蛋白原凝集因子的产量, 而凝集因子的减少能够更好的抑制金黄色葡萄球菌的进一步感染和传染, 具有重要的临床价值。溶血素的分泌也受到了显著抑制, 且呈浓度依赖性, 说明大蒜素能够减少溶血素的生成, 具有重要的临床意义[10]。大蒜素对凝固酶和溶血素的抑制作用, 同时也间接地说明了大蒜素也可抑制其他毒力因子, 从而治疗相应的疾病, 如葡萄球菌肠毒素引起的食物中毒, 烫伤样皮肤综合症等[11]。

而在作用机制的研究中, 我们对溶血素的基因序列扩增后进行测序, 随后与 Genbank 内的序列进行 Blast 比对。我们发现, 基因无明显变化, 故大蒜素并不能直接导致基因突变, 作用机制需进一步研究[12]。

参考文献

- [1] 时威, 张岩, 白阳, 等. 大蒜素的抑菌作用及其稳定性研究[J]. 食品与发酵科学, 2010, 47(3): 76-79.
- [2] 梅四卫, 朱涵珍. 大蒜素的研究进展[J]. 中国农学通报, 2009, 25(9): 97-101.
- [3] Tsuji, B.T., Rybak, M.J., Lau, K.L., *et al.* (2007) Evaluation of Accessory Gene Regulator (*agr*) Group and Function in the Proclivity towards Vancomycin Intermediate Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **51**, 1089-1091. <https://doi.org/10.1128/AAC.00671-06>
- [4] 钱静漪, 王梦茹, 张宁宁, 等. 亚抑菌浓度茅苍术挥发油对金黄色葡萄球菌毒力因子表达的抑制作用初步研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 9(5): 408-411.
- [5] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [6] Rall, V.L., Vieira, F.P., Rall, R., *et al.* (2008) PCR Detection of Staphylococcal Enterotoxin Genes in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Raw and Pasteurized Milk. *Veterinary Microbiology*, **132**, 408-413. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.05.011>
- [7] 王飞, 刘代成, 杨宏军, 等. 应用双重 PCR 方法对奶牛乳腺炎金黄色葡萄球菌溶血毒素进行分型[J]. 家畜生态学, 2010, 31(6): 76-78.
- [8] Adriana, R., Patrice, F., Li, D., *et al.* (2004) Modulation of Fibronectin Adhesins and other Virulence Factors in a Teicoplanin-Resistant Derivative of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, **48**, 2958-2965. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.8.2958-2965.2004>
- [9] Lyon, G.J., Wright, J.S. and Muir, T.W. (2002) Key Determinants of Receptor Activation in the *agr* Auto Inducing Peptides of *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*, **41**, 10095-10104. <https://doi.org/10.1021/bi026049u>
- [10] 张鹏鹏, 李增顺, 宋繁, 等. 赤芍对金黄色葡萄球菌增殖和细菌毒力因子表达的影响[J]. 中国农学通报, 2016, 32(5): 28-32.
- [11] Bronner, S., Monteil, H. and Prevost, G. (2004) Regulation of Virulence Determinants in *Staphylococcus aureus*: Complexity and Applications. *FEMS Microbiology Reviews*, **28**, 183-200. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.09.003>
- [12] 王奇惠, 时永强, 祝宇, 等. 一株金黄色葡萄球菌小菌落突变株全基因组测序分析[J]. 动物医学进展, 2017, 38(5): 77-80.

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2327-0810，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：amb@hanspub.org