

陈璐, 邓翔文, 郑婷婷, 黄小红, 邓辉. 4种中药单体对IncX4型质粒pSD11稳定性的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2023, 29 (1): 57-63
Chen L, Deng XW, Zheng TT, Huang XH, Deng H. Effects of four traditional Chinese medicine monomers on stability of IncX4 plasmid pSD11 [J].
Chin J Appl Environ Biol, 2023, 29 (1): 57-63

4种中药单体对IncX4型质粒pSD11稳定性的影响

陈璐¹ 邓翔文² 郑婷婷² 黄小红^{1,2} 邓辉^{1,2}

¹中西兽医结合与动物保健福建省高等学校重点实验室 福州 350002

²福建农林大学福建省兽医中药与动物保健重点实验室 福州 350002

摘要 以携带多重耐药基因*cfr*的IncX4型质粒pSD11为试验材料, 研究小檗碱、黄芩苷、芦荟大黄素、姜黄素4种中药单体对耐药质粒稳定性的影响, 为中药单体消除病原菌耐药性提供理论依据. 通过测定最小抑菌浓度(MIC)及药物作用下携带质粒pSD11的大肠杆菌的生长曲线和生长动力学参数, 分析中药单体的抑菌效果. 结合实时荧光定量PCR(RT-PCR)及平板计数研究药物对质粒稳定性的影响, 同时检测胞外乳酸脱氢酶和碱性磷酸酶的含量分析中药单体对细胞壁、细胞膜的影响. 结果显示, 小檗碱、黄芩苷、芦荟大黄素对大肠杆菌MG1655/pSD11(*Escherichia coli* MG1655/pSD11)的MIC均为1 280 µg/mL, 姜黄素> 160 µg/mL. 4种中药单体对*E. coli* MG1655/pSD11具有一定的抑菌效果, 生长动力学参数结果表明1/2 MIC小檗碱和黄芩苷显著延长*E. coli* MG1655/pSD11的滞后期; 1/2 MIC姜黄素和1/2、1/4 MIC芦荟大黄素显著降低*E. coli* MG1655/pSD11的最大生长速率、延长时代时间. 经1/2和1/4 MIC的小檗碱和黄芩苷处理后, 质粒pSD11的稳定性极显著降低, 且细菌胞外乳酸脱氢酶和碱性磷酸酶含量增加. 本研究表明, 4种中药单体均能有效抑菌, 且小檗碱和黄芩苷能够降低IncX4型质粒pSD11的稳定性. (图5 表3 参25 附图1)

关键词 中药单体; 稳定性; IncX4型质粒; 质粒pSD11; 大肠杆菌

Effects of four traditional Chinese medicine monomers on stability of IncX4 plasmid pSD11

CHEN Lu¹, DENG Xiangwen², ZHENG Tingting², HUANG Xiaohong^{1,2} & DENG Hui^{1,2}

¹University Key Laboratory for Integrated Chinese Traditional and Western Veterinary Medicine and Animal Healthcare in Fujian Province, Fuzhou 350002, China

²Fujian Key Laboratory of Traditional Chinese Veterinary Medicine and Animal Health, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract The IncX4 plasmid pSD11, which carries the multidrug resistance gene *cfr* was used to study the effects of berberine, baicalin, aloe-emodin, and curcumin on stability of drug-resistant plasmids, thus providing a theoretical basis for the elimination of drug resistance in pathogenic bacteria by traditional Chinese medicine (TCM) monomers. The antibacterial effect of the four TCM monomers was analyzed by measuring the minimum inhibitory concentration (MIC), growth curve, and growth kinetic parameters of *Escherichia coli* strain MG1655/pSD11 (*E. coli* MG1655/pSD11) while exposed to drugs. Real-time Quantitative PCR (RT-PCR) and plate counting were used to investigate the effects of the four TCM monomers on plasmid stability. Additionally, the extracellular levels of lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase were determined in order to investigate the monomer's effects on the cell wall and cell membrane. Results suggest that the four TCM monomers have an antibacterial effect on *E. coli* MG1655/pSD11 with an MIC value of 1 280 µg/mL for berberine, baicalin, and aloe-emodin and >160 µg/mL for curcumin. Meanwhile, investigation of growth kinetic parameters of *E. coli* MG1655/pSD11 indicated that berberine and baicalin (1/2 MIC) significantly prolonged the lag time, whereas curcumin (1/2 MIC) and aloe-emodin (1/2, 1/4 MIC) significantly reduced the maximum growth rate and prolonged the generation time. After treatment with 1/2 and 1/4 MIC of berberine and baicalin, the stability of plasmid pSD11 in *E. coli* MG1655/pSD11 was significantly reduced, while the extracellular levels of lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase increased. In summary, our findings indicate that the TCM monomers effectively inhibit bacteria, while berberine and baicalin were shown to reduce stability of the IncX4 plasmid pSD11.

Keywords traditional Chinese medicine monomer; stability; IncX4 plasmid; plasmid pSD11; *Escherichia coli*

收稿日期 Received: 2021-10-19 接受日期 Accepted: 2022-01-27

国家自然科学基金青年科学基金项目(31602106)、福建省重大专项专题项目(2021NZ029008)和福建农林大学科技创新专项基金项目(CXZX2020062A, CXZX2020063A)资助 Supported by the Youth Fund of National Natural Science Foundation of China (31602106), Major Special Project in Fujian Province (2021NZ029008), and Science and Technology Innovation Fund of Fujian Agriculture and Forestry University (CXZX2020062A, CXZX2020063A)

通信作者 Corresponding authors (E-mail: xhhuang138@hotmail.com; 568028667@qq.com)

抗菌药在畜禽养殖行业的使用会导致动物病原菌耐药性,在抗生素选择压力下细菌获得性耐药水平不断提高,耐药基因通过质粒、整合子和转座子等转移元件在不同菌属间广泛传播^[1]。其中,IV型分泌系统(type IV secretion system, T4SS)介导的质粒接合转移是耐药基因水平传播的重要方式。具有T4SS的IncX4型质粒在面临外部环境压力下,依旧能够在不同宿主间传播并表现出较高水平的接合转移效率^[2]。这引发我们对携带多重耐药基因的IncX4型质粒的高度关注。如何降低携带多重耐药基因的IncX4型质粒的稳定性,恢复细菌对抗生素的敏感性,对病原菌耐药性的消除意义重大。

中草药提取物具有多靶点、广谱抗菌、低毒性、不易产生耐药性等优点能够消除耐药质粒,影响质粒稳定性^[3]。现有研究发现,常见中药单体小檗碱、黄芩苷、芦荟大黄素和姜黄素具有良好抑菌效果,能够影响细胞膜通透性并在一定程度上消除宿主菌体内的质粒^[4]。截至目前,相关报道多集中对临床菌携带的野生型质粒的消除作用,鲜见针对已知具体类型质粒的消除机制的研究。本实验室在前期工作中获得一个猪源大肠杆菌携带的介导多重耐药基因*cfr*的IncX4型质粒pSD11(GenBank: KM212169),通过高通量测序(质粒圈图见文献^[5])及质粒特征分析发现,该质粒具有T4SS和稳定性相关基因*stbD/E*、*hicA/B*是紧密型质粒^[6],能够将DNA转移到多种细菌体内,完成耐药基因的水平转移,并稳定存在。因此,本研究在检测4种中药单体对携带多重耐药基因*cfr*的IncX4型质粒pSD11的抑菌效果基础上,进一步探究其对质粒稳定性的影响及可能靶点,为中药单体作为新型抗菌药降低IncX4型质粒的稳定性,影响质粒介导的多重耐药基因的水平传播提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

携带IncX4型质粒pSD11的大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) MG1655/pSD11,由本实验室构建并保存。相应敏感菌*E. coli* MG1655,质控菌*E. coli* ATCC 25922,均由本实验室保存。小檗碱(纯度≥ 86.8%,批号为110713-201814)、黄芩苷(纯度≥ 93.3%,批号为110715-201821)、芦荟大黄素(纯度≥ 98.3%,批号为110795-201710)均购于中检所中国药物生物制品检定所。姜黄素(纯度≥ 99%,批号为08511)购于Sigma公司。氟苯尼考(纯度≥ 99%,批号为F8850)购于索莱宝科技有限公司。DMSO购于Sigma公司。实时荧光定量RT-PCR试剂盒GoTaq® qPCR Master Mix购于Promega公司。细菌基因组提取试剂盒购于天根生化科技有限公司。Luria-Bertani (LB) 琼脂、MacConkey琼脂、LB肉汤、Mueller-Hinton (MH) 肉汤均购于广东环凯微生物科技有限公司。乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒、碱性磷酸酶(AKP)检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.2 最小抑菌浓度

药液的配制:4种中药单体分别用少量DMSO(DMSO含量小于1%)溶解,氟苯尼考用少量甲醇(甲醇含量小于1%)溶

解,然后分别用双蒸水稀释成浓度为10 240 μg/mL的母液。姜黄素和氟苯尼考的母液再稀释10倍用作工作液,另外3种药物直接用母液作为工作液。采用CLSI(clinical and laboratory standards institute, CLSI)标准微量肉汤稀释法,使得96孔板中药液浓度依次为5 120、2 560、1 280、640、320、160、80、40、20、10 μg/mL(姜黄素和氟苯尼考的工作浓度依次为512、256、128、64、32、16、8、4、2、1 μg/mL),测定4种中药单体及氟苯尼考对*E. coli* MG1655/pSD11、*E. coli* MG1655的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC),*E. coli* ATCC 25922质控。

1.3 生长曲线的拟合及生长动力学参数的测定

含药肉汤的配制:4种中药单体分别用少量DMSO(DMSO含量小于1%)溶解后,加入含20 mL新鲜LB肉汤的100 mL锥形瓶中,使得LB肉汤中药液浓度依次为1/2、1/4、1/8 MIC。另设不添加药液的阴性对照及添加1% DMSO对照。

参考文献^[6]方法,复苏纯化*E. coli* MG1655/pSD11,分别测定4种中药单体作用下*E. coli* MG1655/pSD11的生长曲线。将过夜培养的菌液稀释至OD₆₀₀ ≈ 0.5后,按1%接种量将稀释后菌液接种至上述所配肉汤中,37 ℃、220 r/min摇育。每隔1 h取200 μL菌液至96孔板中测定OD₆₀₀。以时间(h)为横坐标,菌液OD₆₀₀值为纵坐标,根据修正后的Gompertz方程 $Y = A + C \times \exp\{-\exp[-B \times (t-M)]\}$ ^[7],在OriginPro 2018软件中拟合生长曲线并计算生长动力学参数。

1.4 4种中药单体对质粒pSD11稳定性的影响

1.4.1 连续传代 根据文献^[8-9]所述方法,将*E. coli* MG1655/pSD11复苏纯化后,挑单菌落于3 mL新鲜LB肉汤中,37 ℃,200 r/min,摇育12 h(此时定义为0代)。以1%接种量将该菌液分别接种至含1/2、1/4 MIC药液浓度的3 mL新鲜LB肉汤中37 ℃培养12 h,重复该操作进行连续传代培养(每传一次算1代),另设添加有1% DMSO及不含药液的阴性对照,分别收集0、1、3、5、7、9、11、13和15代的菌体。

1.4.2 质粒pSD11相对丰度的测定 抽提1.4.1中收集的菌体基因组,根据文献^[8-9]所述方法,采用实时荧光定量PCR(Real-time Quantitative PCR, RT-PCR)测定单个菌株内质粒与染色体的比率(plasmid/chromosome ratio, V:G)以评估质粒的相对丰度(relative abundance, RA)。以质粒pSD11上的目的基因*virB4*(V),*E. coli* MG1655上能够稳定表达的基因*galM*(G)为内参,通过软件Oligo 7和NCBI中的Primer Blast(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)设计RT-PCR特异性引物,具体引物见表1。

RT-PCR反应按照试剂盒GoTaq® qPCR Master Mix进行。以抽提的某一细菌基因组DNA作为模板,连续8个梯度10 ×倍比稀释后进行RT-PCR,绘制标准曲线,计算引物扩增效率(amplification efficiency, E)。采用以下公式(1)、(2),根据RT-PCR结果,计算某一时间点 T_n 相对于0代 T_0 时质粒pSD11的相对丰度^[9]。

$$V:G = \frac{(1+E_G)^{Cp_G} \times \frac{S_G}{S_V}}{(1+E_V)^{Cp_V} \times \frac{S_G}{S_V}} \quad (1)$$

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因 Gene	名称 Name	序列 Sequence (5'→3')	产物长度 Product length (bp)	扩增效率 Amplification efficiency (r%)
<i>virB4</i>	<i>virB4</i> -F	AGCCCGTTTCAGCTTACGAA	189	95.6
	<i>virB4</i> -R	CACCGAGTTTCTTGATGATCCG		
<i>galM</i>	<i>galM</i> -F	ACAATCTGCCAGCGACGTT	124	104.1
	<i>galM</i> -R	CCAACCGTATCGCCAATAGCC		

RA=V:G_{Tn} / V:G_{T0} (2)

式中，C_{P_G}和C_{P_V}分别表示内参基因和目的基因的C_q值。S_e和S_v分别表示内参基因和目的基因的RT-PCR产物长度。

1.4.3 质粒丢失率的测定 参照文献[10-11]的方法稍作改进，分组及菌株处理同1.4.1，取第0、1、3、5、7、9代菌液经梯度稀释后，取各稀释倍数菌液25 μL分别悬滴于含128 μg/mL氟苯尼考和无抗性的麦康凯琼脂培养基，培养10-14 h后选取菌落数在20-200个之间的稀释梯度进行细菌计数，试验重复3次取平均值。菌落总数(CFU/mL) = 计数结果× 40 × 稀释倍数。其中，在含药麦康凯琼脂上生长的菌落为耐药菌*E. coli* MG1655/pSD11，在无抗性麦康凯琼脂上生长的菌落为总菌落数(包含耐药菌*E. coli* MG1655/pSD11及质粒被消除的敏感菌*E. coli* MG1655)。质粒丢失率 = (总菌落数-耐药菌数) / 总菌落数× 100%。

1.5 黄芩苷和小檗碱对质粒拷贝数的影响

质粒拷贝数的测定方法同相对丰度，将单菌落*E. coli* MG1655/pSD11接种至3 mL新鲜LB肉汤中，37 ℃、200 r/min摇育12 h后，以1%接种量分别接种至含1/2、1/4、1/8和1/16 MIC小檗碱的3 mL LB肉汤中及1/2、1/4、1/8、1/16、1/32和1/64 MIC黄芩苷的3 mL LB肉汤中，37 ℃、200 r/min摇育12 h。收集各浓度处理组的菌体后抽提基因组，以1.4.2所述引物与方法进行RT-PCR并计算V:G值。V:G值乘以内参基因*galM*在*E. coli* MG1655染色体上的拷贝数*n* (*n* = 1)即为质粒拷贝数。

1.6 黄芩苷和小檗碱对大肠杆菌细胞壁、细胞膜的影响

依据文献[12-13]的方法，将*E. coli* MG1655/pSD11活化至对数生长期，以1%接种量分别接种至含黄芩苷、小檗碱药液1/2和1/4 MIC浓度的新鲜20 mL LB肉汤中，使菌液浓度为10⁷ CFU/mL、37 ℃、160 r/min摇育。另设置仅添加1% DMSO处理组及未添加任何药物的阴性对照。分别在0、1、2、4、6、8 h时间点取菌液1 mL离心(4 000 r/min, 10 min)取上清，分别按乳

酸脱氢酶和碱性磷酸酶检测试剂盒说明测定两种酶含量。

1.7 数据处理及分析

所有试验重复3次，结果以平均值±标准差表示。使用SPSS 20.0软件对试验数据进行统计分析，*P* < 0.05认为差异显著，用*或小写字母表示；*P* < 0.01认为差异极显著，用**或大写字母表示，竖条表示标准偏差。统计分析得到的结果用OriginPro 2018、GraphPad Prism 7.00等软件作图。

2 结果与分析

2.1 4种中药单体及氟苯尼考对各受试菌株的最小抑菌浓度

4种中药单体及氟苯尼考对各受试菌株的MIC见表2。氟苯尼考对*E. coli* MG1655/pSD11的MIC为256 μg/mL，较*E. coli* MG1655提高了64倍。小檗碱、黄芩苷和芦荟大黄素对*E. coli* MG1655/pSD11和*E. coli* MG1655的MIC均为1 280 μg/mL。姜黄素不溶于水，在其最大溶解度(160 μg/mL)时仍无法抑制菌株生长，因此姜黄素的MIC > 160 μg/mL，后续试验以该浓度为基础进行。

2.2 4种中药单体对受试菌株生长的影响

生长曲线拟合结果见图1。1% DMSO的添加未显著影响耐药株*E. coli* MG1655/pSD11的生长。4种中药单体对*E. coli* MG1655/pSD11有抑制作用，呈浓度依赖性，浓度越大抑制越明显。

表2 4种中药单体及氟苯尼考对各受试菌株最小抑菌浓度(ρ/μg mL⁻¹)
Table 2 The minimum inhibitory concentration of four TCM monomers and florfenicol against each tested strain (ρ/μg mL⁻¹)

药物 Drug	<i>Escherichia coli</i> MG1655/pSD11	<i>E. coli</i> MG1655	<i>E. coli</i> ATCC 25922
氟苯尼考 Florfenicol	256	4	2
小檗碱 Berberine	1280	1280	-
黄芩苷 Baicalin	1280	1280	-
芦荟大黄素 Aloe-emodin	1280	1280	-
姜黄素 Curcumin	> 160	> 160	-

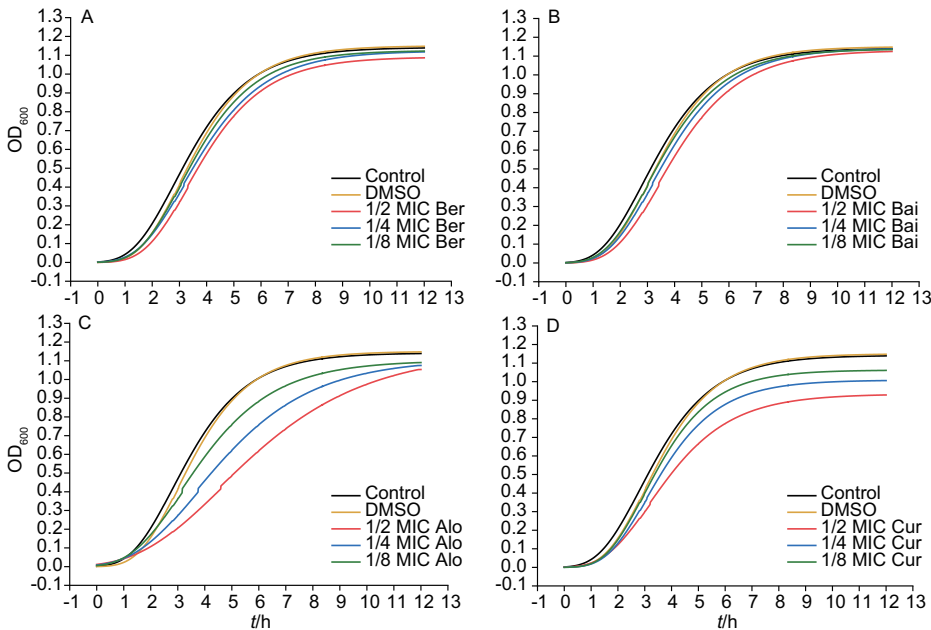


图1 受试大肠杆菌的拟合生长曲线。A: 不同浓度小檗碱(Ber)处理组; B: 不同浓度黄芩苷(Bai)处理组; C: 不同浓度芦荟大黄素(Alo)处理组; D: 不同浓度姜黄素(Cur)处理组。
Fig. 1 Fitted growth curves of tested *Escherichia coli*. A: Different concentrations of berberine (Ber) treatment group; B: Different concentrations of baicalin (Bai) treatment group; C: Different concentrations of aloe-emodin (Alo) treatment group; D: Different concentrations of curcumin (Cur) treatment group.

生长动力学参数测定结果见表3。1/2 MIC小檗碱和黄芩苷显著延长*E. coli* MG1655/pSD11的滞后期; 1/2 MIC姜黄素和1/2、1/4 MIC芦荟大黄素极显著降低*E. coli* MG1655/pSD11的最大生长速率、延长世代时间。除1/8 MIC芦荟大黄素极显著降低*E. coli* MG1655/pSD11的最大生长速率外, 1/8 MIC的4种药物未明显改变菌株的生长动力学参数。1% DMSO处理组的菌株生长动力学参数与阴性对照组相比无明显变化, 表明1% DMSO的添加量对菌株的生长无明显影响。因此, 4种中药单体能够影响*E. coli* MG1655/pSD11的生长, 给细菌生长带来适应性成本。

2.3 4种中药单体对质粒pSD11相对丰度的影响

如图2所示: 质粒pSD11在未添加任何药物的空白肉汤中连续传代后, 其相对丰度无显著变化, 表明该质粒稳定性较好。在1/2和1/4 MIC小檗碱和黄芩苷连续作用下, 与0代相比, 第1代菌株中质粒pSD11的相对丰度极显著下降(1/2 MIC浓度小檗碱处理组的相对丰度下降率为49.33%; 1/2 MIC黄芩苷处理组的相对丰度下降率为51.28%), 质粒的稳定性降低。但在随后的传代过程中, 质粒pSD11的相对丰度无明显变化。1% DMSO的添加及芦荟大黄素和姜黄素对质粒的稳定性无明显影响。

2.4 黄芩苷和小檗碱对质粒pSD11的丢失率

如图3所示: 1/2 MIC和1/4 MIC黄芩苷和小檗碱对质粒pSD11具有一定消除作用, 1/2 MIC作用下的质粒丢失率高于1/4 MIC。随作用时间延长, 质粒丢失率先增后趋于平稳。小檗碱的质粒消除能力明显优于黄芩苷, 在1/2 MIC和1/4 MIC药物浓度下, 小檗碱处理组的质粒丢失率分别为25.46%和23.15%, 黄芩苷处理组的质粒丢失率分别为14.66%和12.75%。1% DMSO处理组与阴性对照组相比无明显变化, 排除DMSO的影响。

2.5 黄芩苷和小檗碱对质粒pSD11拷贝数的影响

亚抑菌浓度小檗碱处理12 h后质粒的拷贝数呈下降趋势, 1/2和1/4 MIC极显著降低质粒的拷贝数(图4A)。在受试浓度范围内黄芩苷均能降低质粒的拷贝数, 1/2-1/32 MIC显著降低

拷贝数(图4B)。两种药物的其他浓度能够降低质粒拷贝数, 但作用效果不明显。

2.6 黄芩苷和小檗碱对大肠杆菌细胞壁、细胞膜的影响

如图5A、B所示: 与阴性对照相比, 经小檗碱作用后胞外乳酸脱氢酶和碱性磷酸酶含量显著升高, 后趋于平稳。且呈浓度依赖型, 药物浓度越高酶含量越高。处理8 h后, 1/2 MIC处理组胞外2种酶含量仍高于对照组, 1/4 MIC和对照组无明显差异。表明小檗碱能够影响受试菌株细胞膜、细胞壁的通透性。由图5C、D可知, 与阴性对照相比, 在黄芩苷作用下, 随时间推延, 胞外2种酶含量显著增加, 且药物浓度越高酶含量越高。其中, 碱性磷酸酶含量增加到一定程度后趋于平稳。表明黄芩苷能够破坏受试菌株的细胞膜、细胞壁。阴性对照组2种酶含量有少量增加。

3 讨论

为维持正常生理活动, 环境的变化(pH、温度或抗菌药等)通常会给细菌带来代谢负担, 产生适应性成本, 其中反映适应性成本的指标之一即细菌生长速度^[14-15]。因此, 常通过延滞期、最大生长速率及世代时间3个生长动力学参数分析药物作用对产生细菌的适应性成本。延滞期是细菌为适应环境变化而停止增殖、降低代谢的阶段^[16]。延滞期结束后细菌进入对数生长期, 期间最大生长速率能够反映基因和环境对细菌生长的影响。在这期间, 使初始细菌数量翻倍所需的时间称为世代时间^[17]。本研究通过分析4种中药单体影响下*E. coli* MG1655/pSD11的生长动力学参数, 结果显示1/2 MIC小檗碱和黄芩苷显著延长菌株的延滞时间。表明该浓度下小檗碱和黄芩苷抑制细菌生长, *E. coli* MG1655/pSD11为适应环境延长延滞期, 生长缓慢, 推迟进入对数期。1/2、1/4 MIC芦荟大黄素和1/2 MIC姜黄素极显著降低细菌的最大生长速率, 延长世代时间。世代时间的延长表明细菌增殖受抑制。由此可见, 1/2和1/4 MIC的4种中药单体能够使*E. coli* MG1655/pSD11的生长速率减慢, 并产生适应性代价。

表3 中药单体作用下*Escherichia coli* MG1655/pSD11生长动力学参数

Table 3 Growth kinetic parameters of resistant *Escherichia coli* MG1655/pSD11 under the action of TCM

组别 Group	最大生长速率 Maximum growth rate ($u_{\max}/h^{-1}$)	延滞时间 Lag time (h/h)	世代时间 Generation time (G/h)
对照组 Control	0.2792 ± 0.0238 ^{Aa}	1.2941 ± 0.1855 ^a	1.0862 ± 0.0925 ^{Aa}
1% DMSO	0.2873 ± 0.0347 ^{Aa}	1.5268 ± 0.2577 ^{ab}	1.0632 ± 0.1283 ^{Aa}
小檗碱处理组 Berberine treatment group			
1/2 MIC	0.2473 ± 0.0238 ^{Aa}	1.6794 ± 0.2188 ^b	1.2285 ± 0.1181 ^{Aa}
1/4 MIC	0.2486 ± 0.0209 ^{Aa}	1.4950 ± 0.1954 ^a	1.2196 ± 0.1026 ^{Aa}
1/8 MIC	0.2708 ± 0.0273 ^{Aa}	1.5033 ± 0.2205 ^a	1.1232 ± 0.1131 ^{Aa}
黄芩苷处理组 Baicalin treatment group			
1/2 MIC	0.2492 ± 0.0211 ^{Aa}	1.7378 ± 0.1956 ^b	1.2167 ± 0.1028 ^{Aa}
1/4 MIC	0.2601 ± 0.0227 ^{Aa}	1.5553 ± 0.1988 ^{ab}	1.1663 ± 0.1020 ^{Aa}
1/8 MIC	0.2678 ± 0.0254 ^{Aa}	1.4423 ± 0.2113 ^{ab}	1.1341 ± 0.1075 ^{Aa}
芦荟大黄素处理组 Aloe-emodin treatment group			
1/2 MIC	0.1400 ± 0.0149 ^{Bb}	1.5735 ± 0.3741 ^a	2.1745 ± 0.2307 ^B
1/4 MIC	0.1717 ± 0.0112 ^{BbC}	1.3988 ± 0.1939 ^a	1.7613 ± 0.1154 ^{Cc}
1/8 MIC	0.2127 ± 0.0132 ^{Cc}	1.2748 ± 0.1591 ^a	1.4209 ± 0.0883 ^{AbC}
姜黄素处理组 Curcumin treatment group			
1/2 MIC	0.2039 ± 0.0101 ^{Bb}	1.5109 ± 0.1162 ^a	1.4799 ± 0.0736 ^B
1/4 MIC	0.2496 ± 0.0126 ^{AaB}	1.5772 ± 0.1073 ^a	1.2092 ± 0.0608 ^{Aa}
1/8 MIC	0.2757 ± 0.0190 ^{Aa}	1.5340 ± 0.1421 ^a	1.0971 ± 0.0756 ^{Aa}

与对照组相比, 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$) and different capital letters indicate extremely significant differences ($P < 0.01$) compared to the control.

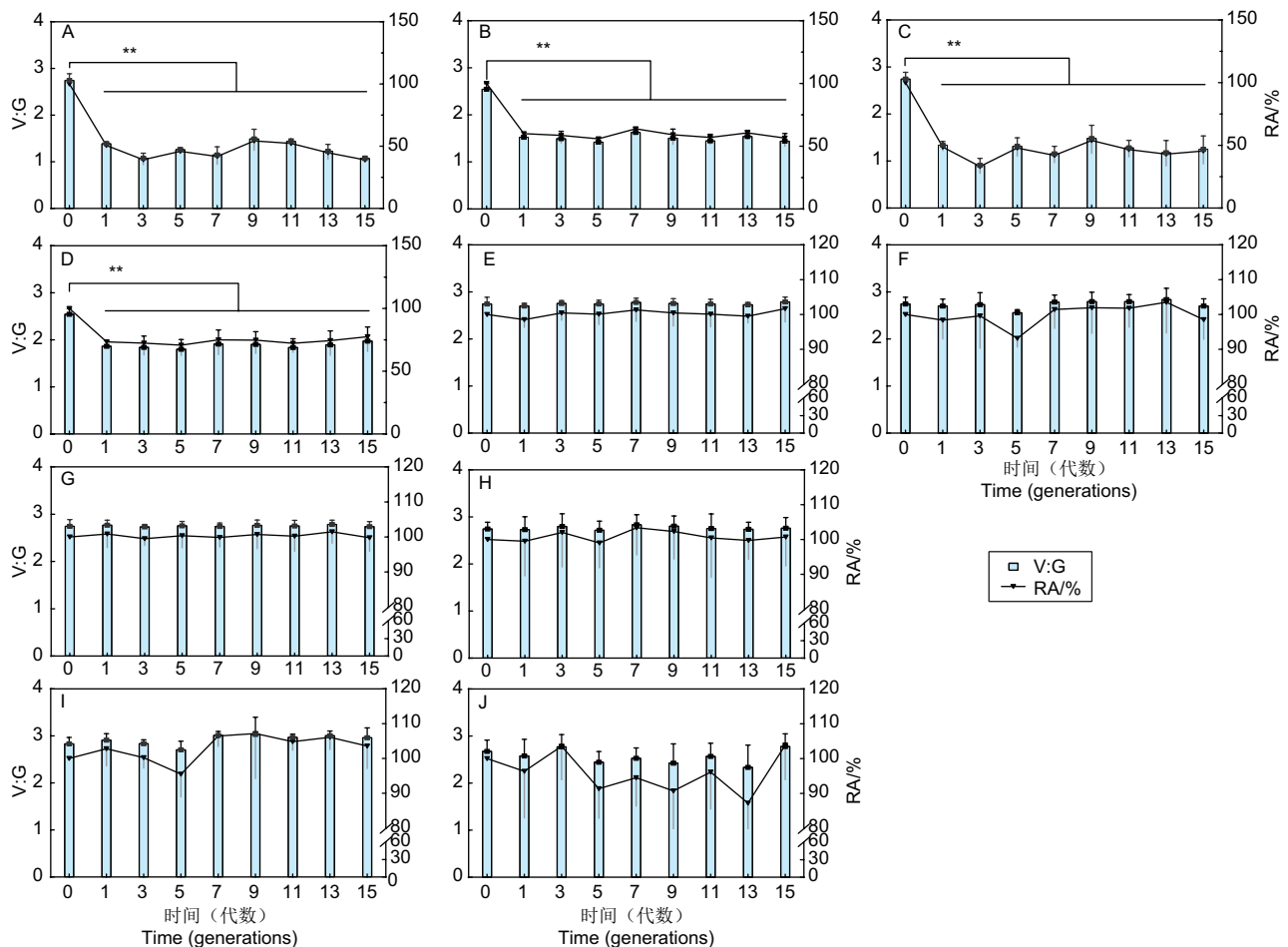


图2 4种中药单体1/2 MIC和1/4 MIC浓度作用下质粒的相对丰度。A: 1/2 MIC小檗碱处理组; B: 1/4 MIC小檗碱处理组; C: 1/2 MIC黄芩苷处理组; D: 1/4 MIC黄芩苷处理组; E: 1/2 MIC芦荟大黄素处理组; F: 1/4 MIC芦荟大黄素处理组; G: 1/2 MIC姜黄素处理组; H: 1/4 MIC姜黄素处理组; I: 阴性对照组; J: 1% DMSO组。V/G表示单个菌株内质粒与染色体比率; RA表示某一时间点相对于0代时质粒pSD11的相对丰度。

Fig. 2 Effect of four TCM monomers on plasmid stability under the action of 1/2 MIC and 1/4 MIC concentration. A: 1/2 MIC berberine treatment group; B: 1/2 MIC baicalin treatment group; C: 1/2 MIC aloe-emodin treatment group; D: 1/2 MIC curcumin treatment group; E: 1/4 MIC berberine treatment group; F: 1/4 MIC baicalin treatment group; G: 1/4 MIC aloe-emodin treatment group; H: 1/4 MIC curcumin treatment group; I: negative control group; J: 1% DMSO treatment group. V/G indicates the plasmid to chromosome ratio within a single strain; RA indicates the relative abundance of plasmid pSD11 at a given time point relative to generation 0.

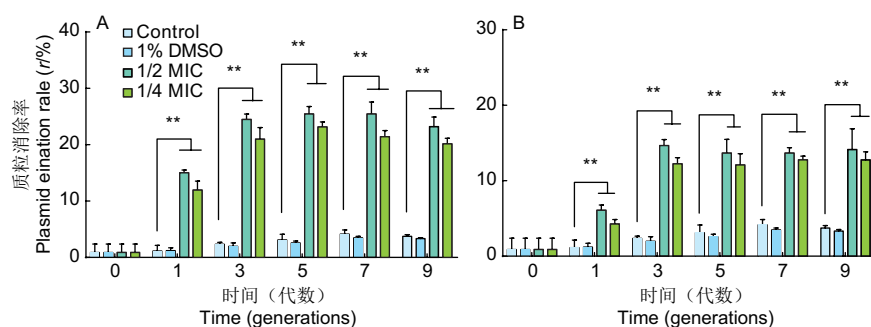


图3 1/2和1/4 MIC浓度小檗碱和黄芩苷作用下质粒丢失率。A: 小檗碱处理组; B: 黄芩苷处理组。与对照组相比, *表示差异显著, $P < 0.05$; **表示差异极显著, $P < 0.01$ 。

Fig. 3 Plasmid elimination rate under the action of 1/2 and 1/4 MIC concentration of berberine and baicalin. A: Berberine treatment group; B: Baicalin treatment group. Compared with the control group, * means significant difference, $P < 0.05$; ** means extremely significant difference, $P < 0.01$.

由于携带耐药基因的质粒能够通过垂直和水平传播在细菌间进行转移,因而在细菌耐药性演变过程中起关键作用^[18]。为降低耐药质粒的影响,寻找有效机制消除细菌中的耐药质粒,降低质粒稳定性,恢复细菌对抗生素的敏感性至关重要。本研究结合质粒相对丰度及丢失率的测定试验,发现1/2、1/4 MIC小檗碱和黄芩苷极显著降低质粒的相对丰度,且质粒丢

失率也逐渐升高。但在随后传代过程中,质粒的相对丰度及丢失率未出现明显变化。表明小檗碱和黄芩苷能够一定程度降低质粒pSD11的稳定性。其可能原因是,小檗碱对质粒有倾向性,能够和质粒结合形成复合体^[19],影响拓扑异构酶活性^[20],从而抑制质粒的复制而降低质粒稳定性。黄芩苷能够破坏细胞膜及细胞壁的通透性,导致菌体内蛋白质和质粒等大分子

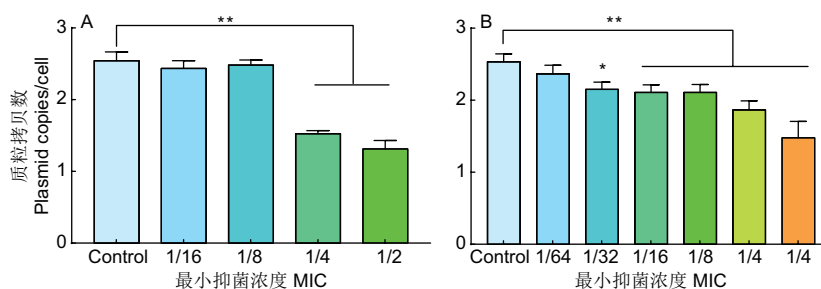


图4 亚抑菌浓度小檗碱和黄芩苷对质粒拷贝数的影响。A: 小檗碱处理组; B: 黄芩苷处理组。与对照组相比, *表示差异显著, $P < 0.05$; **表示差异极显著, $P < 0.01$ 。

Fig. 4 Effects of subinhibitory concentrations of berberine and baicalin on plasmid copy number. A: Berberine treatment group; B: Baicalin treatment group. Compared with the control group, * means significant difference, $P < 0.05$; ** means extremely significant difference, $P < 0.01$.

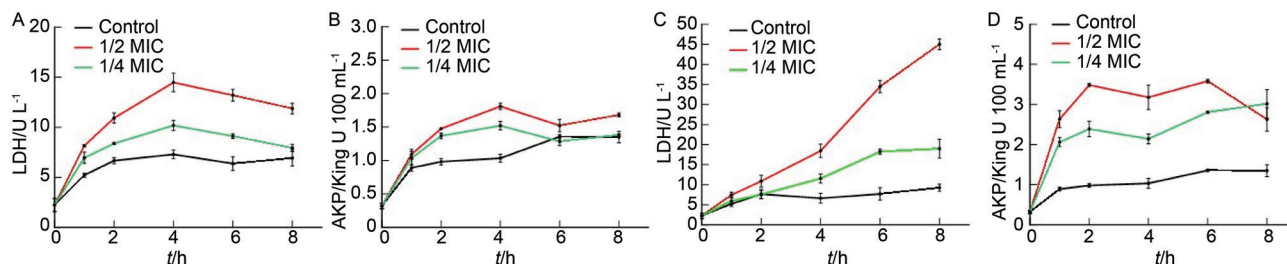


图5 不同浓度小檗碱和黄芩苷作用下受试菌株胞外乳酸脱氢酶 (LDH) 及碱性磷酸酶 (AKP) 活力。A: 小檗碱作用下胞外乳酸脱氢酶含量; B: 小檗碱作用下胞外碱性磷酸酶含量; C: 黄芩苷作用下胞外乳酸脱氢酶含量; D: 黄芩苷作用下胞外碱性磷酸酶含量。

Fig. 5 The activity of extracellular lactic dehydrogenase (LDH) and alkaline phosphatase (AKP) of the tested strain under the action of different concentrations of berberine and baicalin. A: Content of extracellular LDH under the action of berberine; B: Content of extracellular AKP under the action of berberine; C: Content of extracellular LDH under the action of baicalin; D: Content of extracellular AKP under the action of baicalin.

逸出, 质粒稳定性下降^[12-13]。除此之外, 质粒拷贝数测定结果显示在受试浓度范围内小檗碱和黄芩苷能够降低质粒pSD11的拷贝数, 表明小檗碱和黄芩苷也可通过降低拷贝数影响质粒稳定性。而在传代后期质粒不再减少的原因可能是: (1) 药物阻碍质粒的分配导致质粒的丢失率升高, 待药物持续作用一段时间后, 菌株逐渐适应药物刺激, 质粒得以稳定存在宿主菌体内不再丢失。(2) 大质粒为维持自身稳定, 通常携带稳定性增强蛋白能“杀伤”分离后无质粒的细胞, 以确保在分离过程中每个子代细胞都能获得一份基因组^[21]。本研究中质粒pSD11是携带稳定性相关基因*stbD/E*、*hicA/B*的大质粒 (> 30 kb), 又为低拷贝质粒遵从主动分配机制^[22], 因此在适应药物后质粒能够通过细胞杀伤机制稳定存在于宿主菌体内。

为进一步探究小檗碱和黄芩苷是否影响大肠杆菌细胞膜或细胞壁通透性而降低质粒pSD11的稳定性, 本研究通过测定胞外乳酸脱氢酶和碱性磷酸酶含量来进行研究。碱性磷酸酶存在于细菌细胞壁和细胞膜之间, 是细菌的正常代谢产物^[23]。乳酸脱氢酶参与糖酵解和糖异生, 为胞浆内存在的一种重要物质^[24]。通常这2种酶只会伴随细菌裂解死亡少量出现在胞外培养液中, 只有当细胞膜或细胞壁受到损伤通透性发生改变时, 2种酶才会大量泄漏至培养液中。因此, 胞外培养液中碱性磷酸酶和乳酸脱氢酶含量的变化常作为细胞壁和细胞膜受到损伤, 通透性发生变化的标志。本研究发现, 在1/2

MIC小檗碱作用8 h后, 胞外乳酸脱氢酶和碱性磷酸酶含量明显增加。表明高浓度小檗碱影响大肠杆菌细胞膜和细胞壁通透性。这一结果与华国强等人发现小檗碱对大肠杆菌表面结构无明显影响, 而是改变细胞膜上的 Ca^{2+} 通道来发挥抑菌功效^[25]的结论相近。在1/2 MIC和1/4 MIC黄芩苷作用8 h后, 乳酸脱氢酶和碱性磷酸酶含量显著增加。表明黄芩苷能够破坏大肠杆菌细胞壁和细胞膜的完整性, 导致乳酸脱氢酶和碱性磷酸酶不断泄漏。这与刘昊等人得出的结果^[12-13]相符, 黄芩苷能够对大肠杆菌细胞壁及细胞膜造成损伤而发挥抑菌作用。综上所述, 小檗碱和黄芩苷能够通过改变细胞壁、细胞膜通透性而使得质粒pSD11泄露至胞外。

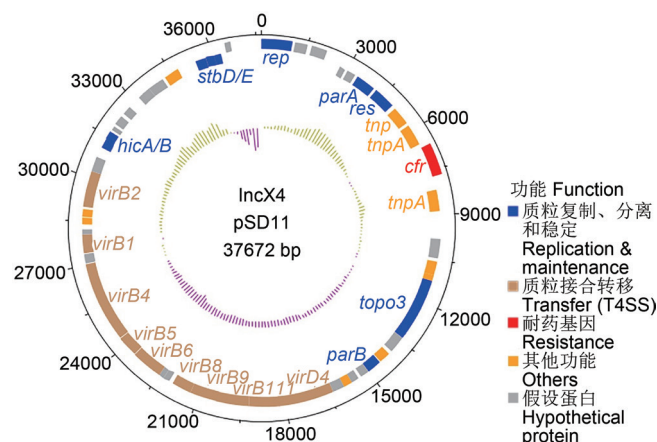
4 结论

小檗碱、黄芩苷、芦荟大黄素和姜黄素4种常见中药单体对*E. coli* MG1655/pSD11具有一定抑菌效果。其中, 小檗碱和黄芩苷可通过增加质粒丢失率并降低质粒拷贝数, 从而降低质粒pSD11在宿主菌中的稳定性。改变细胞壁、细胞膜通透性是小檗碱和黄芩苷降低质粒pSD11稳定性的机制之一。综上, 小檗碱和黄芩苷能够作为有效IncX4型质粒pSD11的消除剂, 降低质粒稳定性, 结果可为中药单体消除质粒介导的细菌耐药性提供理论依据。

参考文献 [References]

- Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses [J]. *Nat Med Supp*, 2004, 10 (S12): 122-129
- Lo WU, Chow KH, Law PY, Ng KY, Cheung YY, Lai EL, Ho PL. Highly conjugative IncX4 plasmids carrying *bla*_{CTX-M} in *Escherichia coli* from humans and food animals [J]. *J Med Microbiol*, 2014, 63 (6): 835-840
- 朱利霞, 王洪彬, 史秋梅, 高光平. 中草药对细菌耐药质粒的消除作用研究[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52 (11): 72-79 [Zhu LX, Wang HB, Shi QM, Gao GP. Study on elimination of bacterial drug resistant plasmids by Chinese herbs [J]. *Chin J Vet Drug*, 2018, 52 (11): 72-79]

- 4 杨帆, 杨玉荣, 赵振升, 孔涛, 王国永. 中草药消除细菌耐药性质粒研究进展[J]. 动物医学进展, 2013 (12): 160-164 [Yang F, Yang YR, Zhao ZS, Kong T, Wang GY. Progress on antiplasmid effect of Chinese herbal medicine [J]. *Progr Veterin Med*, 2013 (12): 160-164]
- 5 Sun J, Deng H, Li L, Chen MY, Fang LX, Yang QE, Liu YH, Liao XP. Complete nucleotide sequence of *cfr*-carrying IncX4 plasmid pSD11 from *Escherichia coli* [J]. *Antimicrob Agents Chem*, 2015, **59** (1): 738-741
- 6 张姣惠, 胡可慧, 陈珍珍, 邓辉, 黄小红. 亚抑菌浓度氟苯尼考作用下质粒pSD11对大肠杆菌适应性的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2019, **25** (5): 1211-1214 [Zhang JH, Hu KH, Chen ZZ, Deng H, Huang XH. Effect of plasmid pSD11 on the fitness of *Escherichia coli* in sub-minimum inhibitory concentration of florfenicol [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2019, **25** (5): 1211-1214]
- 7 Liu HY, Chen N, Feng CP, Tong S, Li R. Impact of electro-stimulation on denitrifying bacterial growth and analysis of bacterial growth kinetics using a modified gompertz model in a bio-electrochemical denitrification reactor [J]. *Bioresour Technol*, 2017, **232**: 344-353
- 8 Ho PL, Cheung YY, Lo WU, Li Z, Chow KH, Lin CH, Chan JFW, Cheng CC. Molecular characterization of an atypical IncX3 plasmid pKPC-NY79 carrying *bla*_{KPC-2} in a *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Curr Microbiol*, 2013, **67** (4): 493-498
- 9 Loftie EW, Tucke RA, Norton A, Top EM. Flow cytometry and Real-Time Quantitative PCR as tools for assessing plasmid persistence [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2014, **80** (17): 5439-5446
- 10 Sun Y, Liu Q, Chen S, Song Y, Liu J, Guo XJ, Zhu LW, Ji X, Zhou W, Qian J, Feng SZ. Characterization and plasmid elimination of NDM-1-producing *Acinetobacter calcoaceticus* from China [J]. *PLoS ONE*, 2014, **9** (9): e106555
- 11 Sandegren L, Linkevicius M, Lytsy B, Melhus ÅM, Andersson DI. Transfer of an *Escherichia coli* ST131 multiresistance cassette has created a *Klebsiella pneumoniae*-specific plasmid associated with a major nosocomial outbreak [J]. *J Antimicrob Chem*, 2012, **67** (1): 74-83
- 12 刘昊, 赵自冰, 王新. 黄芩苷对大肠埃希菌的抗菌活性及其作用机制[J]. 中国生物制品学杂志, 2019, **32** (9): 983-986 [Liu H, Zhao ZB, Wang X. Antimicrobial activity of baicalin to *Escherichia coli* and relevant mechanism [J]. *Chin J Biol*, 2019, **32** (9): 983-986]
- 13 刘昊, 赵自冰, 吴丹丹, 王新. 黄芩苷对大肠杆菌细胞通透性的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2017, **44** (6): 1890-1894 [Liu H, Zhao ZB, Wu DD, Wang X. Effect of baicalin on cell permeability of *Escherichia coli* [J]. *Chin Anim Husb Vet Med*, 2017, **44** (6): 1890-1894]
- 14 LaMarre JM, Locke JB, Shaw KJ, Mankin AS. Low fitness cost of the multidrug resistance gene *cfr* [J]. *Antimicrob Agents Chem*, 2011, **55** (8): 3714-3719
- 15 Millan AS, MacLean RC. Fitness costs of plasmids: a limit to plasmid transmission [J]. *Microbiol Spectrum*, 2017, **5** (5): 1-12
- 16 François M, Carlin F, Broussolle V, Nguyen TC. *Bacillus cereus* *cshA* is expressed during the lag phase of growth and serves as a potential marker of early adaptation to low temperature and pH [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2019, **85** (14): e00486-e00519
- 17 Delignette MML. Relation between the generation time and the lag time of bacterial growth kinetics [J]. *Int J Food Microbiol*, 1998, **43** (1-2): 97-104
- 18 Millan AS. Evolution of plasmid-mediated antibiotic resistance in the clinical context [J]. *Trends Microbiol*, 2018, **26** (12): 978-985
- 19 Stermitz FR, Lorenz P, Tawara JN, Zenewicz LA, Lewis K. Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarbin, a multidrug pump inhibitor [J]. *PNAS*, 2000, **97** (4): 1433-1437
- 20 林媛, 司书毅, 蒋建东. 小檗碱的抗菌作用[J]. 药理学, 2018, **53** (2): 163-168 [Lin Y, Si SY, Jiang JD. Antibacterial activity of berberine [J]. *Acta Pharm Sin*, 2018, **53** (2): 163-168]
- 21 Sørensen SJ, Bailey M, Hansen LH, Kroer N, Wuertz S. Studying plasmid horizontal transfer *in situ*: a critical review [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, **3** (9): 700-710
- 22 Million WS, Camps M. Mechanisms of plasmid segregation: have multicopy plasmids been overlooked? [J]. *Plasmid*, 2014, **75**: 27-36
- 23 宋剑武, 吴永继, 孙燕杰, 刘增援, 赵雨川, 胡梅, 夏娟, 黄凯, 司红彬. 救必应水提取物对产ESBLs细菌的抑菌机理研究[J]. 中国畜牧兽医, 2016, **43** (6): 1536-1543 [Song JW, Wu YJ, Sun YJ, Liu ZY, Zhao YC, Hu M, Xia J, Huang K, Si HJ. Study on the bacteriostatic mechanism of the water extracts of holly bark on ESBLs-producing bacterial [J]. *Chin Anim Husb Vet Med*, 2016, **43** (6): 1536-1543]
- 24 冀瑞卿. 鳞柄白鹅膏抑菌成分及其对杨树烂皮病菌抑制机理[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2007 [Ji RL. Antibacterial components of amanita scabra and its inhibitory mechanism on poplar bark rot [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2007]
- 25 华国强. 小檗碱抑菌特点及抑菌机制的初步研究[D]. 济南: 山东大学, 2005 [Hua GQ. Preliminary study on the antibacterial characteristics and antibacterial mechanism of berberine [D]. Jinan: Shandong University, 2005]



附图1 质粒pSD11圈图(根据文献[5]分析信息绘制). 由外向内各个圈图代表: 第1圈, 序列大小刻度 (bp); 第2圈和第3圈, 顺时针方向和逆时针方向转录ORFs; 第4圈, GC含量变化 (G+C plot).

Fig. S1 Circular representation of *cfr*-carrying plasmid pSD11 (mapping based on the information of Ref [5]). The circles from outside inwards show separately as follow: (1) The size in base pairs (bp); (2) The coding sequences transcribed in the clockwise direction; (3) The coding sequences transcribed in the anticlockwise direction; (4) A plot of the GC content with step size of 200 bp.