

三硫烷二丁烯酸对金黄色葡萄球菌抑菌的研究

黄益娜, 吴涛, 刘锐, 张民

(天津科技大学新农村发展研究院, 食品生物技术教育部工程研究中心, 天津科技大学食品生物技术与食品工程学院, 天津 300457)

摘要: 本文研究一种新型化合物三硫烷二丁烯酸(2E, 2E)-4,4-trisulfaneylbis(but-2-enoic acid) (TSDB) 对食品中常见金黄色葡萄球菌的抑菌机理。通过蛋白质十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 法, 观察在 TSDB 作用下菌体蛋白质的变化; 高效液相色谱测定有机酸变化; AnnexinV 单染色法观察细胞凋亡情况。结果表明: TSDB 处理后金黄色葡萄球菌胞内蛋白质 44.3~200 ku 之间的条带变模糊或消失; 菌体胞内苹果酸、柠檬酸含量均显著减少(分别平均下降了 65.16%、56.18%) ($p < 0.05$), 而草酸和乳酸未检测到相对于空白对照组; 细胞凋亡时, 细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸外翻到细胞表面, 与带有绿色荧光探针 FITC 的 AnnexinV 高度结合, 使菌体细胞呈苹果绿。结论: TSDB 处理后造成菌体细胞膜通透性改变, 引起细胞有机酸代谢紊乱, 抑制蛋白质合成, 从而导致细胞凋亡或坏死。这一研究发现对开发食品防腐剂具有指导意义。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 有机酸; 凋亡; 抑菌机理

文章编号: 1673-9078(2018)01-57-61

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.1.010

Antimicrobial Mechanism of (2E, 2E)-4,4-trisulfaneylbis(but-2-enoic acid) against *Staphylococcus aureus*

HUANG Yi-na, WU Tao, LIU Rui, ZHANG Min

(Tianjin University of Science and Technology, Institute for New Rural Development; Engineering Research Center of Food Biotechnology, Ministry of Education; College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The antibacterial mechanism of a novel compound (2E, 2E)-4,4-trisulfaneylbis (but-2-enoic acid) (TSDB) against *Staphylococcus aureus* in foods was investigated in this study. The changes of bacterial protein, organic acids, and bacteria cell apoptosis were evaluated by SDS-PAGE, HPLC, and AnnexinV, respectively. The results suggested that bacterial protein in *Staphylococcus aureus* between 44.3 and 200 ku became blurred or disappeared with TSDB treatment. The content of intracellular malic acid and citric acid significantly decreased by 65.16% and 56.18%, respectively ($p < 0.05$), while oxalic acid and lactic acid were not detectable. Phosphatidylserine on the inside of spoilage bacteria turned to cell surface when the cells apoptosed, which integrated with AnnexinV with a green fluorescent probe FITC, and then led the bacterial cells to be apple green. In conclusion, cell membranes permeability changes, organic acid metabolism disorders, and the synthesis of proteins are inhibited after the treatment with TSDB, which lead apoptosis or necrosis. Therefore, it plays an important significance for food preservatives development.

Key words: *Staphylococcus aureus*; organic acid; apoptosis; antimicrobial mechanism

大蒜属多草本植物, 蕴含着大量的多功能硫化化合物, 具有广谱抑菌、抗肿瘤、保护心血管系统、调节血糖和提高免疫等多种生物活性^[1-6], 目前, 对其研究大部分集中在大蒜素上, 但是, 由于大蒜素的不稳定

收稿日期: 2017-06-29

基金项目: 天津市高等学校基本科研业务费重点资助项目 (2017KJZD02); 天津科技大学新农村发展研究院开放基金资助项目 (XNC002); 食品生物技术教育部工程研究中心应用项目 (SPZX005)

作者简介: 黄益娜 (1991-), 女, 硕士, 研究方向: 食品添加剂与功能配料

通讯作者: 张民 (1972-), 男, 博士, 研究方向: 食品化学与食品营养学

及其提取分离纯化难度大, 价格昂贵, 导致其市场应用价值低, 大蒜类生物医药制品等高端产品国内未见报道^[7]。因此, 工作者对其含硫化物中 S-S(S=O)键为母体进行了修饰合成、寻找合适的化合物成为当今研究的热点。Hisae 等通过比较大蒜素(Allicin)、S-甲基亚磺酸硫代丙烯酯(AlIS(O)Sme)、Z,E-亚硫酰基异丙烯酯 (AlIS(O)SPn-(Z,E)) 得出 AlIS(O)SMe、AlIS(O)SPn-(Z,E)均有明显的抑菌作用, 最小抑菌浓度 (MIC 值) 分别为 5 mg/mL、80 mg/mL、20 mg/mL, 但是抑菌效果较大蒜素 Allicin 弱^[8]。任方奎发现大蒜

素的不同衍生物抑菌活性随着结构的变化而改变,其中二(3-甲基-2-丁烯基)三硫醚比大蒜素效果好^[9]。Jay等^[10]通过比较不同含硫化物抑菌强弱表明:二烯丙基四硫化物>二乙基四硫化物>二甲基四硫化物>二烯丙基二硫化物>二乙基三硫化物>二甲基三硫化物>二丙基二硫化物>烯丙基二硫化物。这些研究表明了大蒜硫化物中 S-S(S=O)键是主要的抑菌结构,其抑菌活性大小受其基团结构的影响。

近年来计算机技术的迅速发展,通过统计学方法以及揭示活性和结构之间的关系变化,以数学模型或图形概况来表征量变规律,从而避免大量人力物力和财力的浪费,使其在化学、药物设计、农药领域、医药领域和食品中的应用越来越广泛。但是,利用计算机技术通过构效关系构建模型来设计大蒜衍生物未见报道。本论文是通过前期构建比较分子力场 Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA)模型,以二烯丙基三硫化物(DATS)为母体来改造、设计一种新的化合物 TSDB,其对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度(MIC值)为16 μg/mL,抑菌强度是DATS的3倍,很好的提高了抑菌活性,并测定了生长曲线、电导率、培养液中蛋白含量基础上,采用蛋白质十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法、高效液相色谱测定有机酸变化、AnnexinV单染色法观察细胞凋亡情况,重点研究了TSDB的抑菌机理,从而将TSDB开发成为抑菌剂提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

金黄色葡萄球菌,天津科技大学菌株保藏中心提供;95%三硫烷二丁烯酸(TSDB)、95%二烯丙基三硫化物(DATS),大连茵泰科技有限公司提供;NB营养肉汤,国药集团化学试剂有限公司;蛋白Marker, Takara Bio;十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液等蛋白电泳相关试剂,北京索来宝科技有限公司;色谱纯L-苹果酸、L-乳酸、柠檬酸、草酸;磷酸二氢钾;甲醇;冰乙酸;考马斯亮蓝;Tris;甘氨酸等其他的试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

高效液相,日本岛津公司;倒置荧光显微,CKX41-FL;垂直蛋白质电泳仪,北京六一仪器厂;凝胶成像系统,北京六一仪器,高速小型台式离心机, Thermo Fisher;无菌操作台,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;灭菌锅,上海博讯实业有限公司医疗

设备厂;生化培养箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂。

1.3 方法

1.3.1 菌悬液的制备

无菌操作条件下,将保藏中的菌种接种到肉汤(牛肉膏蛋白胨)培养基中,37℃培养箱中培养24h,重复两次。用接种环取活化后的菌液在斜面固体培养基上划线接种,37℃培养24h。活化后的受试菌液于NB液体培养基中37℃下培养8h,调整细菌的终浓度约为 10^5 CFU/mL。4℃保存备用。

1.3.2 SDS-PAGE 电泳

参照文献^[11],将细菌接种于6 mL NB营养肉汤中培养至对数生长期后的菌液,实验组中加入MIC浓度的TSDB和DATS,未处理组为对照组,于37℃培养10h,以4300 r/min离心10 min,去上清液,加入少量无菌PBS(pH=7.4)洗三次,加入300 μL的10 mg/mL溶菌酶溶液,37℃下放置20 min,4℃、4300 r/min离心5 min,取上清液30 μL加入10 μL Buffer,振荡,于100℃热水浴中10 min,15 μL上样进行SDS-PAGE电泳,染色、脱色、拍照观察菌体蛋白表达情况。

1.3.3 有机酸测定

按照文献^[12],取培养至对数生长期后的菌液,实验组中加入MIC浓度的TSDB和DATS,未处理组为对照组,于37℃培养10h,43000 r/min离心5 min,弃上清,沉淀用无菌生理盐水洗涤两次后沸水浴10 min,取出后剧烈震荡,并将其于10000 r/min离心5 min,取上清液过0.22 μm微孔膜过滤后测定上清液中有机酸生成情况。

进样体积:10 μL;检测波长:210 nm;柱温:35℃;流动相:0.1 mol/L KH₂PO₄溶液(超纯水配制,pH 2.65)和乙腈,溶液比例采用程序梯度洗脱,流速0.5 mL/min。

1.3.4 AnnexinV 细胞凋亡测试

将培养至对数生长期的菌液,调节菌体浓度大约为 5×10^5 CFU/mL,43000 r/min离心5 min,弃上清,收集细胞,用PBS轻轻重悬细胞两次,加入500 μL结合液,加入5 μL Annexin V-FITC,轻轻混匀,室温避光孵育10 min,随后滴一滴上述细胞悬液于载玻片上,并用盖玻片盖上细胞,于荧光显微镜下检测。

1.4 统计分析结果

所有试验重复三次,结果以 $X \pm SD$ (平均值±标准偏差)表示。采用SPSS 19.0对试验数据进行方差分析,差异显著采用Duncan法进行比较, $p < 0.05$ 即认

为存在显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 TSDB 和 DATS 对蛋白质合成的影响

TSDB 和 DATS 对金黄色葡萄球菌胞内蛋白合成的影响如图 1 所示。可以看出：对照组和处理组菌株活性蛋白电泳条带有较大的差异。主要表现为分子质量在 44.3~200 ku 之间的条带变模糊或者消失，比较 TSDB 处理与 DATS 蛋白图谱可知 TSDB 条带明显较 DATS 消失。

蛋白质图谱可以反映出它的全部基因组，因此功能蛋白质的变化可以由凝胶电泳图谱表现出来，其条带深浅的改变、增加或缺失都表明蛋白表达量有所变化^[13]。SDS-PAGE 电泳蛋白条带明显改变的现象，说明了受试化合物 TSDB 和 DATS 可能影响了菌体蛋白的正常表达或影响了其功能，改变了细菌某些关键的结构或功能蛋白的合成。TSDB 条带明显较 DATS 消失，可能是因为新化合物 TSDB 比 DATS 多了功能团 -COOH，使其与蛋白受体结合更牢固或者接触面积增大，从而加强了抑菌活性。Ankri 等研究结果表明大蒜素主要抑菌机理是通过与巯基的化学作用（比如乙醇脱氢酶、硫氧还蛋白等还原酶和 RNA 聚合酶），从而影响半胱氨酸蛋白活性，抑制蛋白质合成来杀死细菌^[14]。Saeed 等人研究报道：蛋白质条带模糊和消失会随处理时间不同而不同，是由大蒜或其它植物提取物抑制了蛋白的合成、表达^[15]。张纬等研究发现在柠檬提取物作用下，蛋白质条带在分子量为 14.4~43.0 ku 之间缺失或变浅，表明柠檬提取物改变细菌蛋白组成和表达量^[16]。

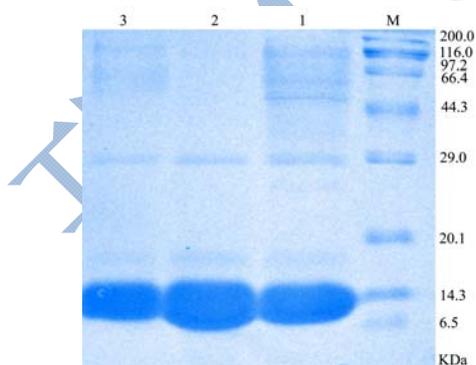


图 1 TSDB 和 DATS 处理下金黄色葡萄球菌胞内蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of proteins extracted from *S. aureus* treated with TSDB and DATS

注：泳道 M 表示蛋白 Marker；泳道 1 表示对照组；泳道 2 表示 TSDB；泳道 3 表示 DATS。

2.2 TSDB 和 DATS 对有机酸代谢影响

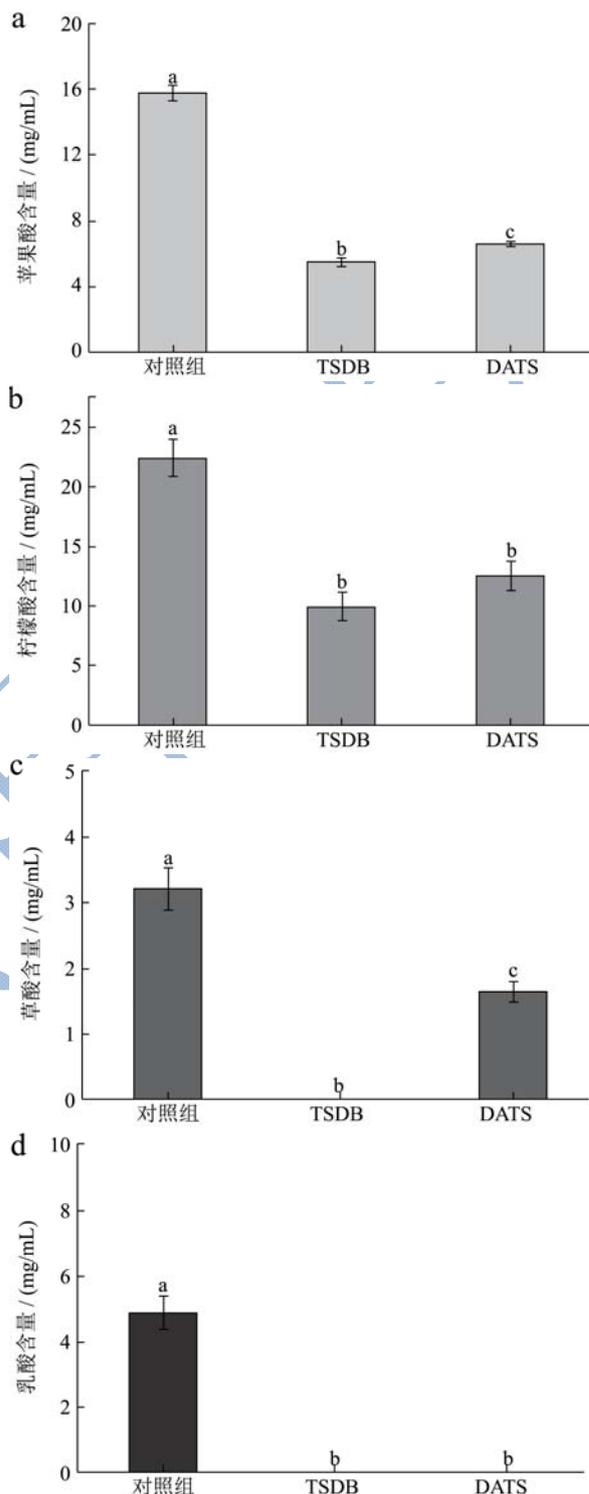


图 2 TSDB 和 DATS 对 *Saureus* 胞内有机酸代谢影响

Fig.2 Organic acids in the cell-supernatants after treating with the TSDB and DATS

注：同一列数据标注不同字母表示数据有显著性差异 ($p < 0.05$)。a 表示苹果酸含量；b 表示柠檬酸含量；c 表示草酸含量；d 表示乳酸含量。

代谢是一切生命形式活动的基本特征，微生物在

代谢过程中,会产生多种的代谢产物,如氨基酸、核苷酸、有机酸等^[17]。其代谢产物会受外界环境的变化而不同。

由图2中可知,实验组中苹果酸、草酸、柠檬酸和乳酸的含量相对于对照组明显下降,其TSDB处理组金黄色葡萄球菌胞内草酸和乳酸未检测到,而DATS组金黄色葡萄球菌胞内草酸含量下降至1.63 mg/L(降低了48.74%),是对照组的0.55倍;苹果酸含量分别下降至5.49 mg/L和6.62 mg/L(减少了65.16%和57.99%),呈显著差异($p < 0.05$)。此外,TSDB组和DATS组柠檬酸含量分别减少至9.79 mg/L和12.32 mg/L(下降了56.18%、44.85%),表明TSDB处理组能够改变金黄色葡萄球菌中有机酸代谢,其中对草酸和苹果酸含量的影响强于DATS组。

金黄色葡萄球菌胞内有机酸含量明显的减少,说明TSDB和DATS改变金黄色葡萄球菌的细胞代谢途径。柠檬酸、苹果酸是三羧酸循环中的代谢产物,其含量明显的减少,说明TSDB和DATS有可能抑制三羧酸循环中柠檬酸合成酶等关键酶的活性,导致代谢无法正常进行^[18,19]。同时,三羧酸循环中产生的苹果酸可以脱羧生成丙酮酸,并进一步参与其它代谢途径,由于TSDB和DATS处理使苹果酸含量显著降低,有可能导致中间代谢产物丙酮酸减少,进而对蛋白质、糖代谢造成一定影响。

2.3 TSDB和DATS对细胞凋亡的影响

Annexin V是一种磷脂结合蛋白,能与细胞凋亡过程中翻转到膜外的磷脂酰丝氨酸(PS)高亲和力特异结合而呈现。PS外翻发生在细胞核破裂,DNA片段化出现之前,这使得Annexin V与PS的结合成为凋亡早期的一种重要检测手段。TSDB和DATS处理后金黄色葡萄球菌细胞凋亡情况如图3所示。可以看出,未经处理组图中细胞膜表面呈苹果绿色的圆点很少,而TSDB和DATS处理后细胞出现苹果绿的圆点急剧增加,且TSDB组苹果绿圆点比DATS组多,说明化合物TSDB和DATS处理使得细胞膜内磷脂酰丝氨酸外翻,细胞凋亡。

实验结果间接说明,TSDB和DATS主要是破坏金黄色葡萄球菌的细胞膜,其中TSDB对细胞膜的破坏效果要强于DATS,前期实验室研究也表明大蒜降解产物主要是破坏大肠杆菌细胞膜,影响其内环境的改变,进而引起细胞凋亡^[20]。研究报告大蒜素及其类似物对微生物的抑制机理一般为降解细胞壁,破坏细胞膜,内容物外漏,抑制蛋白质合成,导致细胞凋亡或坏死^[21]。因此,细胞膜通透性增大,进而改变胞内

外细胞正常代谢,最终导致细胞凋亡。

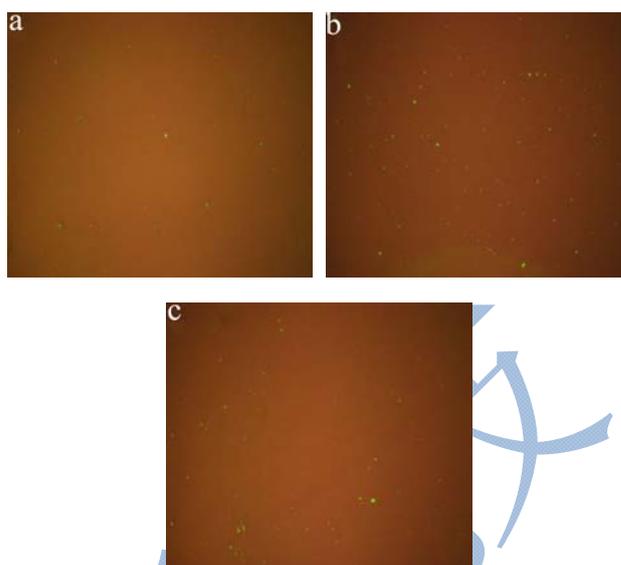


图3 TSDB和DATS处理后细胞凋亡情况

Fig.3 Apoptosis of cells treated with TSDB and DATS

注: a表示对照组; b表示TSDB; c表示DATS。

3 结论

TSDB对金黄色葡萄球菌SDS-PAGE电泳结果表明,TSDB影响细菌蛋白质代谢,可能促进代谢过程中蛋白质的降解;有机酸代谢实验发现,TSDB对金黄色葡萄球菌作用10 h后,胞内柠檬酸、草酸和苹果酸含量明显减少,表明此时的有机酸正常代谢受到影响;综上所述,TSDB主要是破坏细胞膜,扰乱了细胞的正常代谢,破坏蛋白质合成、有机酸代谢,从而导致细胞凋亡。因此,这一研究的发现为TSDB成为一种新型食品防腐剂提供理论支持。

参考文献

- [1] Herman-Antosiewicz A, Powolny A A, Singh S V. Molecular targets of cancer chemoprevention by garlic-derived organosulfides [J]. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2007, 28(9): 1355-1364
- [2] Ross Z M, Gara E A O, Hill D J, et al. Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(1): 475-480
- [3] Čolić M, Savić M. Garlic Extracts Stimulate Proliferation of Rat Lymphocytes in Vitro by Increasing IL-2 and IL-4 Production [J]. *Immunopharmacology & Immunotoxicology*, 2000, 22(1): 163-81
- [4] Ruddock P S, Liao M, Foster B C, et al. Garlic natural health

- products exhibit variable constituent levels and antimicrobial activity against *neisseria gonorrhoeae*, *staphylococcus aureus* and *enterococcus faecalis*[J]. *Phytother. Res.*, 2005, 19(4): 327-334
- [5] Yun H, Ban J O, Park K, et al. Potential therapeutic effects of functionally active compounds isolated from garlic [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2014, 142(2): 183-195
- [6] Li X, Li C, Xiang Z, et al. Allicin ameliorates cardiac hypertrophy [J]. *Cardiovasc. Drugs Ther.*, 2012, 26(6): 457-465
- [7] 李伟才.金乡大蒜功能性食品产业发展存在的问题及对策[J].*财经界:学术版*,2016,9:30-31
LI Wei-cai. Problems and Countermeasures of garlic functional food industry development in Jinxiang [J]. *Financial Community: Academic Edition*, 2016, 9: 30-31
- [8] Yoshida H, Katsuzaki H, Ohta R, et al. Antimicrobial activity of the thiosulfates isolated from oil-macerated garlic extract [J]. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 1999, 63(3): 591-594
- [9] Ren F, He X, Deng L, et al. Synthesis and Antibacterial Activity of 1,3-Diallyltrisulfane Derivatives [J]. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2009, 30(3): 687-690
- [10] Kim J W, Huh J E, Kyung S H, et al. Antimicrobial activity of Alk(en)yl sulfides found in essential oils of garlic and onion [J]. *Food Sci. Biotechnol.*, 2004, 13(2): 235-239
- [11] 徐宗凯,林青青,周梦莹.三种李斯特菌菌体蛋白提取方法的比较[J].*生命科学研究*,2015,19(1):29-33
XU Zong-kai, LIN Qing-qing, ZHOU Meng-ying. Comparison of three methods for extraction of non-secreted proteins from *listeria* [J]. *Life Science Research*, 2015, 19(1): 29-33
- [12] 肖香,王瑶,姜松,等.大蒜乙醇提取物对几种腐败菌的抑制作用[J].*现代食品科技*,2013,29(12):2894-2900
XIAO Xiang, WANG Yao, JIANG Song, et al. Antibacterial mechanism of garlic extract against specific spoilage organisms [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(12): 2894-2900
- [13] Aksakal. Analysis of whole cell protein profiles of *Salmonella serovars* isolated from chicken, turkey and sheep faeces by SDS-PAGE [J]. *Vet Med-Czech*, 2010: 259-263
- [14] Ankri S, Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic [J]. *Microbes and Infection*, 1999, 1(2): 125-129
- [15] Rma S, Aa Z, Ah E N, et al. Biochemical studies on *Culex pipiens* (L.) (Diptera: Culicidae) exposed to *Allium sativum*, *Citrus limon* and *Bacillus thuringiensis* israelensis with reference to assessment of the biosafety on albino mice [J]. *Global Veterinaria*, 2010, 4: 22-23
- [16] 张纬,孙晓明,徐建设,等.柠檬提取物对耐药金黄色葡萄球菌[J].*中国病原生物学杂志*,2009,4(9):652-655
ZHANG Wei, SUN Xiao-ming, XU Jian-she, et al. Study of a lemon extracts mechanism of inhibition of drug-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2009, 4(9): 652-655
- [17] 刘毅,徐维家,李妍.利用抗生素对大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的影响进行菌株区分[J].*中国微生态学杂志*,2009, 21(4):332-334
LIU Yi, XU Wei-jia, LI Yan. Identification of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* by antibiotic perturbation [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2009, 21(4): 332-334
- [18] Angert E R, Losick R M. Propagation by sporulation in the guinea pig symbiont *Metabacterium polyspora* [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1998, 95(17): 10218-10223
- [19] 宋卫国.大蒜提取液有效成分抑菌活性及其作用机理研究[D].泰安:东农业大学,2004
SONG Wei-guo. The antimicrobial mechanism of inhibitory components in garlic extract [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2004
- [20] Wu T, Chen N. Investigating the chemical constituent and the suppressive effects of alliin hydrolysate on *E.coli* [J]. *Natural Product Research*, 2017: 1-4
- [21] Booyens J, Thantsha M S. Fourier transform infra-red spectroscopy and flow cytometric assessment of the antibacterial mechanism of action of aqueous extract of garlic (*Allium sativum*) against selected probiotic *Bifidobacterium* strains [J]. *BMC Complement Altern. Med.*, 2014, 14: 289