

一种新型仿生抗菌剂的功能研究

赵彪¹ 高杨¹ 周华锋^{1,2} 段明星^{1*}

(1 清华大学生命科学学院 生物膜与膜生物工程国家重点实验室 北京 100084)

(2 江苏隆力奇生物科技股份有限公司 江苏 215555)

摘要 抗菌剂 α -炔丙基- γ -亚甲基- γ -丁内酯是以天然抗菌物质原白头翁素为基础,利用仿生技术合成出的新型抗菌剂。通过悬液杀菌法进行最小抑菌浓度测定、悬液定量法及活体菌落计数法进行最小杀菌浓度测定等生化试验对其抗菌效果进行了检验;通过细胞壁结构的完整性实验及透射电镜观察等理化实验对其抗菌机理做初步研究,为其应用于实践提供依据。抗菌剂 α -炔丙基- γ -亚甲基- γ -丁内酯对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌及马拉色菌均具有良好的抑菌作用,对马拉色菌的抑菌作用尤为突出,并对其具有良好的杀菌作用。其对马拉色菌的最小抑菌浓度为 0.5mg/ml,当其浓度在 10mg/ml 时,对马拉色菌具有瞬杀作用(作用 1min 对球形马拉色菌的杀灭率可达到 99.99%)。通过胞壁完整性实验以及电镜观察实验表明该抗菌剂的抑菌机制并不是完全破坏胞壁结构,但是对细胞壁有一定影响。

关键词 仿生合成 球形马拉色菌 抑菌作用 抑菌机制

中图分类号 Q93

迄今为止,人们已经研制出了多种多样的抗菌药物。然而,据统计截至上世纪末,全球每年仍有约 2000 万人死于病菌性感染^[1],这是 40 年前的 3 倍。造成这一现象的主要原因是对抗菌药物的长期滥用,导致出现了很多的耐药性病菌,使得现有的一些抗菌药物作用能力大大下降,起不到治病救人的作用。另外目前市面上应用较为广泛的杀菌剂大多数都含有氯等有害物质(如常用的咪唑类抗真菌药物酮康唑及广泛应用与日化产品中的三氯生等),导致其副作用也很大。因此,研制安全环保的全新类型的抗菌药物就成了当今抗菌研究的热点之一。

仿生合成是指模仿天然物结构进行合成的过程,由于其来源出自于天然产物,具有低毒、低残留、与环境相容性好等特点,正逐步成为市场的主流。仿生抗菌剂正是利用仿生合成技术仿制自然界化合物而制成的。郑昌戈等^[2]发现,从毛茛科植物中提取的原白头翁素对农作物病菌如小麦赤霉病菌有较强的抑菌活性,伍越环等^[3]发现原白头翁素的活性中心位于丁内

酯环上的 γ -亚甲基;但是原白头翁素在室温下极不稳定,使其应用受到了很大的限制。本实验室以此为依据,以原白头翁素生物活性物质为抗菌活性位点,以天然植物活性分子为基础,通过分子结构与药效间^[4]的关系研究,采用仿生合成技术得到了一种安全且稳定的新型环保抗菌剂 α -炔丙基- γ -亚甲基- γ -丁内酯,实验表明其对马拉色菌有较好的抑菌作用。

马拉色菌是一种寄生于人和动物正常皮肤表面的真菌^[5],目前大多数学者认为,马拉色菌可以引起花斑癣、马拉色菌毛囊炎等多种皮肤性疾病,而球形马拉色菌则被认为是主要致病菌种^[6-7]。我们以 α -炔丙基- γ -亚甲基- γ -丁内酯为实验对象,以金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、白色念珠菌、球形马拉色菌为代表菌种,对该抗菌剂的抑菌效果及机制进行了实验室观察。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

金黄色葡萄球菌(ATCC6538)、白色念珠菌(ATCC10231)、大肠杆菌(8099)、球形马拉色菌(菌种由国家菌种保藏中心提供)。

1.2 培养基

营养琼脂培养基:蛋白胨 10g,牛肉膏 5g,氯化钠 5g,琼脂 15g,加蒸馏水至 1 000ml,灭菌前调 pH 至 7.2。
沙堡琼脂培养基:葡萄糖 40g,蛋白胨 10g,琼脂 20g,加蒸馏水至 1 000ml,灭菌前调 pH 至 5.6。
橄榄油琼脂培养基:葡萄糖 20g,蛋白胨 20g,酵母浸膏 2.0g,橄榄油 20 ml,Tween80 2.0 ml,单硬脂酸甘油酯 2.5g,氯霉素 0.05g,加蒸馏水至 1 000ml,灭菌前调 pH 至 7.2。

1.3 实验器材

透射电子显微镜(日本日立公司 H-7650B)、隔水式恒温培养箱(GRP-9050)、超净工作台(苏州净化设备公司)、高压灭菌锅(北京发恩科贸公司)、电子天平、紫外分光光度计(日本日立公司 u-2001 型)、恒温水浴箱、微型移液器(finnpipette)。

1.4 菌悬液的制备

取菌种活化后培养至第 3 代~第 14 代的活化菌,用胰蛋白胨生理盐水(Tps)洗下适量菌苔,吸取 1ml 混合液转移入新的试管中振荡均匀,用分光光度计粗测其含菌浓度,然后用稀释液稀释至含菌量约为 10^7 CFU/ml 后备用。

1.5 最小抑菌浓度(MIC)测定

参照 2008 年版《消毒技术规范》,采用营养肉汤稀释法检测合成抗菌剂对金黄色葡萄球菌(ATCC6538)、白色念珠菌(ATCC10231)、大肠杆菌(8099)、球形马拉色菌进行 MIC 测定。将不同浓度合成抗菌剂溶液 2.5ml 加入到含 2.5ml 双倍浓度培养基的试管中,(阳性对照为不加抑菌剂的 5ml 培养基)震荡均匀。取 0.1ml 各不同菌种新鲜培养物制成的菌悬液接种于含不同浓度抗菌剂的试管中,于恒温培养箱中培养 48h 后观察结果。

1.6 中和剂鉴定试验

实验共分为 6 组:1)抗菌剂+菌悬液;2)(抗菌剂+菌悬液)+中和剂;3)中和剂+菌悬液;4)(抗菌剂+中和剂)+菌悬液;5)tps 稀释液+菌悬液;6)tps 稀释液+中和剂+培养基。实验结果第一组无菌或仅有少量菌生长,第二组菌数量比第一组多但比第 3,4,5 组菌落数少,第 3,4,5 组菌落数之间误差率在 15% 以内,且第六组无菌生长,则中和剂浓度符合实验要求。(实验均重复 3 次)

1.7 悬液定量杀菌实验

取球形马拉色菌新鲜培养物制备成的菌悬液 0.1ml(含菌量约为 10^7 CFU/ml)与 0.1ml 有机干扰物

(3%牛血清白蛋白)混匀,20℃水浴 5min 后加入 0.2ml 实验用抗菌剂溶液(阳性对照加入 0.2ml tps 稀释液),作用至预定时间后吸取 0.2ml 混合液加入到 0.2ml 中和剂(经中和剂鉴定实验为 5mg/ml 硫代硫酸钠)中,充分混匀。经过 10min 中和作用后,取 0.02ml 混合液或其稀释液,做活菌计数培养,计算杀灭率。实验均重复进行 3 次。

1.8 壁膜结构的完整性实验

如果菌体的壁膜结构完整性遭到了破坏,那么菌体内部的内容物就会流出,就可通过分光光度计检测释放出的 DNA、RNA 等。取培养的球形马拉色菌,用无菌水稀释至所需浓度,将菌悬液分装入试管中,加入两倍 MIC 浓度的抗菌剂(对照组加入等量 300ug/ml TritonX-100,空白对照组加入等量 PBS 溶液),每 10min 取出 1.2ml 用微孔滤膜过滤后于 260nm 处测定吸光度。取滤液培养,无菌生长表明实验有效。

1.9 电子显微镜观察抗菌剂作用后球形马拉色菌形态的变化

取球形马拉色菌新鲜培养物,1 000r/min 离心 10min,用 PBS 溶解沉淀并加入 2 倍 MIC 抗菌剂(对照组加入同体积 PBS)稀释至 10^7 CFU/ml,置于恒温摇床 150r/min 过夜,离心收集沉淀,经 3% 戊二醛固定 2h 后树脂包埋,经超薄切片后置于铜网中,透射电镜观察结果。

2 结 果

2.1 最小抑菌浓度(MIC)测定结果

如表 1 所示,结果表明, α -炔丙基- γ -亚甲基- γ -丁内酯这种抗菌剂的抑菌效果良好,对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及白色念珠菌都有很好的抑菌效果。其中,对于马拉色菌的抑菌效果达到了 0.5mg/ml(表 1)。

与市售酮康唑相比,二者对真菌的最小抑菌浓度值相同(表 2),然而酮康唑药物具有肝毒性、胃肠道反应如呕吐等不良反应,相较而言,本抑菌剂显示出了良好的抑菌效果。

2.2 中和剂鉴定实验

实验结果显示用 5mg/ml 硫代硫酸钠作为中和剂,其 3,4,5 组组间平均误差为 4.84%,(表 3)符合规范要求,表明 5mg/ml 硫代硫酸钠可以有效中和实验药物对马拉色菌的抑菌作用,且中和剂自身对球形马拉色菌的生长及培养基无明显影响。

表 1 抑菌药物对不同菌种的最小抑菌浓度

Table1 The minimum inhibitory concentration of antimicrobial agent to different microorganisms

菌种名称	抑菌药物浓度 (mg/ml)							阳性对照
	2	1	0.5	0.25	0.062	0.031	0.015	
大肠杆菌	-	-	+	+	+	+	+	+
金黄色葡萄球菌	-	-	+	+	+	+	+	+
白色念珠菌	-	-	-	+	+	+	+	+
球形马拉色菌	-	-	-	+	+	+	+	+

- Stands for no visible microorganisms growth; + Stands for visible microorganisms growth

表 2 酮康唑对不同菌种的最小抑菌浓度

Table 2 The minimum inhibitory concentration of ketoconazole to different microorganisms

菌种名称	抑菌药物浓度 (mg/ml)							阳性对照
	2	1	0.5	0.25	0.062	0.031	0.015	
大肠杆菌	-	-	-	-	+	+	+	+
金黄色葡萄球菌	-	-	-	-	-	-	-	+
白色念珠菌	-	-	-	-	+	+	+	+
球形马拉色菌	-	-	-	+	+	+	+	+

- Stands for no visible microorganisms growth; + Stands for visible microorganisms growth

表 3 中和剂鉴定实验结果

Table 3 The result of Neutralizer identification experiment

中和剂	各组平均回收菌数 (CFU/ml)					
	1	2	3	4	5	6
5mg/ml 硫代硫酸钠	0	478	37×10^5	34×10^5	39×10^5	0

2.3 悬液定量杀菌试验结果

结果表明,当 α -炔丙基- γ -亚甲基- γ -丁内酯的浓度为 6mg/ml 时,与球形马拉色菌作用 5min 其杀灭率即

可达到 98.55%,而当抗菌剂浓度达到 10mg/ml 时,仅作用 1min 对球形马拉色菌的杀灭率即可达到99.99%。(表 4)

表 4 球形马拉色菌悬液定量杀菌试验结果

Table 4 The result of Suspension quantitative germicidal test to Malassezia globosa

时间	抑菌剂浓度				阳性对照	阴性对照
	6mg/ml	8mg/ml	10mg/ml	12mg/ml		
1min	5733 ± 152 (× 10 ² 个/ml)	913 ± 15 (× 10 ² 个/ml)	0.7 ± 0.6 (× 10 ² 个 ml)	0	47.5 ± 0.7 (× 10 ⁵ 个/ml)	0
5min	717 ± 15.2 (× 10 ² 个/ml)	65 ± 2 (× 10 ² 个/ml)	0	0	46.5 ± 0.7 (× 10 ⁵ 个/ml)	0
10min	177 ± 7.5 (× 10 ² 个/ml)	48 ± 0.5 (× 10 ² 个/ml)	0	0	45 ± 0.7 (× 10 ⁵ 个/ml)	0
30min	122 ± 2.8 (× 10 ² 个/ml)	36 ± 2 (× 10 ² 个/ml)	0	0	44.5 ± 0.7 (× 10 ⁵ 个/ml)	0
60min	82 ± 2.6 (× 10 ² 个/ml)	29 ± 2 (× 10 ² 个/ml)	0	0	45.5 ± 0.7 (× 10 ⁵ 个/ml)	0

2.4 壁膜结构的完整性实验结果

由于 TritonX-100 能够破坏胞壁结构系统,使球形马拉色菌内容物如 DNA、RNA 等流出,而 DNA 和 RNA 在 260nm 处有较强的吸收^[8],所以经 TritonX-100 处理

的对照组其马拉色菌滤液 260nm 吸光度数值较高;而经过抗菌剂处理的实验组,与空白对照组相比(CK)其数值基本没有变化,表明菌体的内容物并没有析出,也即该抗菌剂并没有完全破坏菌体的壁膜结构。(图 1)

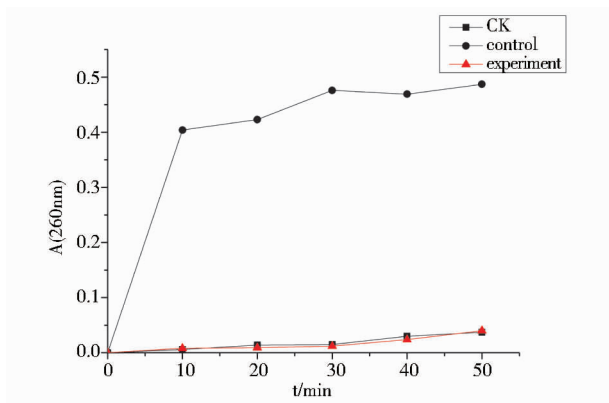


图1 抗菌剂处理对球形马拉色菌的紫外吸收物影响

Fig.1 Effect of antimicrobial agent on A(260nm) absorption to *Malassezia globosa*

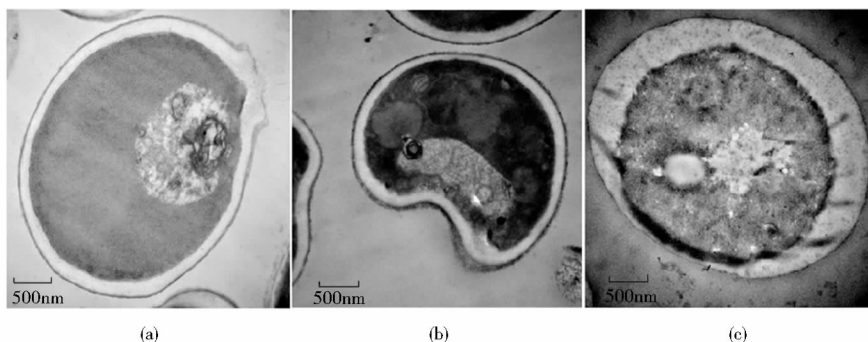


图2 抗菌剂作用于球形马拉色菌的透射电镜图

Fig.2 Transmission electron micrographs of *Malassezia globosa* untreated (a) treated with antimicrobial agent II (b) and treated with antimicrobial anget (c)

3 讨论

通过实验结果可看出本实验室合成的抗菌剂 α -炔丙基- γ -亚甲基- γ -丁内酯对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌及球形马拉色菌均具有良好的抑菌作用,对球形马拉色菌的抑菌作用尤为突出,并对其具有良好的杀菌作用。该结果为其开发应用奠定了良好的实验基础,并使我们看到了其在具有抗菌作用的日化产品中的广阔应用前景,尤其是在缓解及治疗由球形马拉色菌引起的皮肤问题的应用上。

不过,对该抑菌剂的具体的抑菌机制目前还不是十分清楚。一般认为抑菌剂的抑菌机理主要可以归纳为如下几个方面:作用于细胞壁和细胞膜结构;作用于生化反应酶或者其他活性物质;作用于遗传物质或者遗传微粒结构^[9-11,14]。Mares^[12]认为,具有 -O-C(=O)-C(=O)-

2.5 透射电镜观察抑菌剂作用的马拉色菌形态变化

如图2所示,图2a是正常生长的球形马拉色菌,可以看出其结构完整,胞壁结构清晰可见。图2b是本实验室合成的另一种对球形马拉色菌具有抑菌作用的抑菌剂II处理电镜照片,处理后的马拉色菌形态皱缩、变形,显示出对马拉色菌具有致畸作用。而图2c是 α -炔丙基- γ -亚甲基- γ -丁内酯处理后的球形马拉色菌,与图2b相比其菌体切面仍呈现出一个完整的椭圆结构,其壁膜结构完整,并没有发生变形,而从图2c中看出菌体细胞壁结构上出现了一些颗粒状物质。因此我们推测抗菌剂对球形马拉色菌的细胞壁系统有一定影响,但并没有完全破坏其壁膜结构。

C(=O)-SH 的结构基团可以与分子中的-SH 进行 Michael 加成反应,从而使白头翁素具有了抑菌的作用,而本实验室得到的抑菌剂也具有类似结构,故推测该抑菌剂可能与具有外露的-SH 基团的部分关键功能蛋白结合导致它们丧失了正常的生理功能,已有实验表明抑菌剂可以与具有巯基的半胱氨酸进行结合;而壁膜结构完整性实验以及电镜观察结果表明该抗菌剂并未完全破坏菌体的壁膜结构,但是对菌体的细胞壁有一定影响,更为具体的抑菌机制还需要进一步的实验证实。

参考文献

- [1] 魏艳彬,王洪法,抗菌肽的研究进展. 中国现代医生,2009(15):76-78.
Wei Y B, Wang H F. The research progress on antimicrobial peptides. China Modern Doctor,2009(15):76-78.
- [2] 郑昌戈,王中夏,伍越寰,等. 拟原白头翁素的合成与杀菌活性

- 研究. 中国科学技术大学学报, 1999, 29(2): 168-174.
- Zheng C G, Wang Z X, Wu Y H, et al. A study on synthesis and bactericidal bioactivity of pseudoprotoanemonin. Journal of university of Science and Technology of China, 1999, 29(2): 168-174.
- [3] 伍越环, 朱肖远, 吴恭谦, 等. 原白头翁素生物活性中心的研究. 中国科学技术大学学报, 1991, 21(2): 163-170.
- Wu Y H, Zhu Z Y, Wu G Q, et al. Study on the bioactivity centre of protoanemonin. Journal of University of Science and Technology of China, 1991, 21(2): 163-170.
- [4] 郭宗儒, 天然产物的结构改造. 药化学报, 2012, 47(2): 144-157.
- Guo Z R. Modification of natural products for drug discovery. Acta Pharm Sin, 2012, 47(2): 144-157.
- [5] Ashbee H R, Scheynius A. Malassezia, in Pathogenic Yeasts. Springer Berlin Heidelberg, 2010. 209.
- [6] Gupta A K, kohli Y, Li A, et al. *In vitro* susceptibility of the seven Malassezia species to ketoconazole, voriconazole, itraconazole and terbinafine. Br J Dermatol, 2000, 142(4): 758-765.
- [7] 熊心猜, 冉玉平, 代亚林, 等. 球形马拉色菌是马拉色菌毛囊炎患者皮损毛囊内的主要菌种. 中华皮肤科杂志, 2004, 37(8): 463-465.
- Xiong X C, Ran Y P, Dai Y L, et al. Malassezia globosa is the main species found in hair follicles of patients with malassezia folliculitis. Chinese journal of Dermatology, 2004, 37(8): 463-465.
- [8] Chen C Z, Cooper S L. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes. Biomaterials, 2002, 23(16): 3359-3368.
- [9] Brogden K A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. Nat Rev Microbiol, 2005, 3(3): 238-250.
- [10] Kohanski M A, Dwyer D J, Hayete B, et al. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. Cell, 2007, 130(5): 797-810.
- [11] 翟培, 韩晋辉, 侯丽霞, 等. 家蝇抗菌肽的抑菌动力学研究及其机理初探. 中国生物工程杂志, 2006, 26(11): 33-39.
- Zhai P, Han J H, Hou L X, et al. Investigate antibiosis dynamics and antibacterial mechanisms of antibacterial peptides from musca domestica Larvae. China Biotechnology, 2006, 26(11): 33-39.
- [12] Mares D. Antimicrobial activity of protoanemonin, a lactone from ranunculaceous plants. Mycopathologia, 1987, 98(3): 133-140.
- [13] Faergemann J, Ausma J, Borgers M. *In vitro* activity of R126638 and ketoconazole against Malassezia species. Acta Derm Venereol, 2006, 86(4): 312-315.
- [14] Reeder N L, Xu J, Youngquist R S, et al. The antifungal mechanism of action of zinc pyrithione. Br J Dermatol, 2011, 165(2): 9-12.
- [15] Holm T, Bruchmann J, Scheynius A, et al. Cell-penetrating peptides as antifungals towards Malassezia sympodialis. Lett Appl Microbiol, 2012, 54(1): 39-44.
- [16] Hao G, Shi Y H, Tang Y L, et al. The membrane action mechanism of analogs of the antimicrobial peptide Buforin 2. Peptides, 2009, 30(8): 1421-1427.

A Study on a Novel Biomimetic Antimicrobial Agent

ZHAO Biao¹ GAO Yang¹ ZHOU Hua-feng^{1,2} DUAN Ming-xing¹

(1 School of Life Sciences, Tsinghua university, State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology Beijing 100084, China)

(2 Jiangsu longrich Biotechnology Co. Ltd, Jiangsu 215555, China)

Abstract Using biomimetic synthesis technology, we obtained a novel antimicrobial agent α -propargyl- γ -methylene- γ -butyrolactone on the basis of protoanemonin. We characterized bacteriostatic effect and antimicrobial mechanism of the agent using physical and chemical analysis. We carried out the minimum inhibitory concentration (MIC) determination, suspension quantitative germicidal test, and other tests to verify its antimicrobial effect, the mechanism of which were primarily studied through cell wall integrity test and transmission electron microscopy. We found that the novel agent α -propargyl- γ -methylene- γ -butyrolactone had a good inhibitory effect on various bacterial species, especially on *Malassezia globosa*. Its MIC to malassezia was 0.5mg/ml. Our suspension quantitative germicidal test, using Sodium thiosulfate as neutralizer, showed a high antibacterial efficiency that up to 99.99% of *Malassezia globosa* is killed after exposed to 10mg/ml agent for only 1min. Membrane integrity experiments and transmission electron experiment suggested that the antimicrobial effect is not due to destroying the cell wall system, but it may have some impact on the cell wall.

Key words Biomimetic synthesis *Malassezia globosa* Bacteriostatic effect Antimicrobial mechanism