

穿心莲内酯影响猪链球菌生物被膜形成

王金玉¹, 姜晓文¹, 王娜¹, 王捷然¹, 于苗苗¹, 钟秋¹, 于文会^{1,2*}

(1. 东北农业大学动物医学院, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省教育厅动物普通疾病防治重点实验室, 哈尔滨 150000)

摘要: 旨在探究穿心莲内酯对猪链球菌生物被膜形成的抑制作用, 为猪链球菌病的耐药性提供替代疗法。试验采用微量稀释法测定穿心莲内酯对猪链球菌的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC); 利用结晶紫染色(CV)和扫描电镜(SEM)检测穿心莲内酯对猪链球菌生物被膜形成的影响。结果表明: 1) 穿心莲内酯对猪链球菌的MIC和MBC分别为0.25和0.5 mg·mL⁻¹; 2) 扫描电镜观察可见阴性对照组细菌镶嵌于生物被膜中, 而穿心莲内酯在亚抑菌浓度下(1/2MIC、1/4MIC、1/8MIC)能使细菌生物被膜中的细菌数量和生物被膜形成量均减少, 并呈剂量依赖性; 3) *luxS* 基因和毒力基因的RT-PCR检测显示亚抑菌浓度(1/2MIC、1/4MIC)的穿心莲内酯明显降低*gapdh*、*sly*、*fbps*、*ef*和*luxS*基因的转录, 显著增加*cps2J*、*mvp*和*gdh*基因的转录; 4) 哈维氏弧菌生物发光法测定细菌培养液显示穿心莲内酯在亚抑菌浓度下(1/2MIC、1/4MIC、1/8MIC)对猪链球菌AI-2信号分子的产生有抑制作用, 呈剂量依赖性。穿心莲内酯亚抑菌浓度的干预可抑制猪链球菌生物被膜的形成, 并且可致毒力基因表达水平差异。

关键词: 猪链球菌; 生物被膜; 毒力基因; AI-2; 穿心莲内酯

中图分类号: S853.7

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)03-0629-08

Effect of Andrographolide on the Biofilm Formation of *Streptococcus suis*

WANG Jin-yu¹, JIANG Xiao-wen¹, WANG Na¹, WANG Jie-ran¹,

YU Miao-miao¹, ZHONG Qiu¹, YU Wen-hui^{1,2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. The Key Laboratory for the Prevention and Control of Common Animal Diseases in the Education Department of Heilongjiang Province, Harbin 150000, China)

Abstract: The aim of this study was to evaluate the inhibitory effect of Andrographolide on the *Streptococcus suis*. The dilution method was conducted to determine the minimum inhibitory biofilm formation of *S. suis* and to provide an alternative therapy for the drug resistance of concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of Andrographolide on *S. suis*; The effects of Andrographolide on the biofilm formation of *S. suis* were detected by crystal violet staining (CV) and scanning electron microscopy (SEM). Result were as follows: 1) The MIC and MBC of Andrographolide on *S. suis* were 0.25 and 0.5 mg·mL⁻¹, respectively. 2) Scanning electron microscopy showed that the bacteria were embedded in the biofilm in the blank control group. Andrographolide(1/2MIC, 1/4MIC, 1/8MIC) can make the number of bacteria in the bacterial biofilm and the morphology of the biofilm changed greatly. According to the dose of the trend changed, bacterial biofilm gradually reduced. The results showed that Andrographolide had inhibitory effect on the formation of *S. suis* biofilm in a dose-dependent manner. 3) Through quantitatively detected the expression of *luxS* gene and virulence gene in *S. suis* by RT-PCR, we can see the sub-MICs (1/2MIC, 1/4MIC) of Andrographolide can respectively reduce the expression of *gapdh*, *sly*, *fbps*, *ef* and *luxS* genes and significantly increase the expression of *cps2J*,

收稿日期: 2017-08-07

作者简介: 王金玉(1992-), 女, 吉林德惠人, 硕士生, 主要从事中兽医方面的研究, Tel: 0451-55190941, E-mail: 690603367@qq.com

* 通信作者: 于文会, E-mail: yuwenhui@neau.edu.cn

mrp, and *gdh* genes. 4) Detected the bacterial culture medium by Bioluminescence of *Vibrio harveyi* showed that Andrographolide (1/2MIC, 1/4MIC, 1/8MIC) had inhibitory effect on the production of AI-2 signal molecule in *S. suis*, in a dose-dependent manner. Intervention of Andrographolide can inhibit the formation of biofilm in *S. suis*, and can cause the difference of virulence gene expression levels.

Key words: *Streptococcus suis*; biofilm; virulence gene; AI-2; Andrographolide

猪链球菌是一种人畜共患菌,猪链球菌按荚膜抗原被分为 33 种血清型,其中猪链球菌 2 型是最常见、危害最大的,可以通过接触直接传染给人^[1]。猪链球菌很容易在自然环境或动物体内形成生物膜,使猪链球菌难以去除,增加了感染的危险性^[2]。细菌生物被膜(bacterial biofilm, BF),是细菌或真菌特有的生命现象,主要是为了适应自然环境,有利于生存。当细菌在活组织或非活性组织表面吸附时,它们能够分泌多种多糖复合物,如脂蛋白、纤维蛋白和多糖基质,它们通过黏性物质将细菌结合在一起,互相包裹缠绕形成的一种膜样物质^[3-7]。已经形成生物被膜的细菌比游离的细菌对抗生素的耐受力会增加到近 1 000 倍^[8]。治疗猪链球菌病的一个重要手段就是干预猪链球菌生物被膜的形成^[9]。研究发现猪链球菌中含有多种毒力基因,例如猪溶血素(SLY)、溶菌酶释放蛋白(MRP)、荚膜多糖(CPS)、胞外因子(EF)、谷氨酸脱氢酶(GDH)等,均与致病性相关^[10-17]。

大多数现有的抗菌剂是天然化合物,如青霉素、链霉素和 β -内酰胺类的提取物。由于耐药细菌的大量出现,新的抗菌药在市场上有很大的需求^[18]。穿心莲内酯(Andrographolide, AG)被誉为天然抗生素药物,是一种二萜内酯类化合物,爵床科植物穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm. f) Ness 的全草或叶中的一种活性物质,是穿心莲的有效成分之一,AG 和它的衍生物具有抗炎、抗感染、抗肿瘤、免疫调节等广泛的药理作用,特别是在一些抗感染作用更加明显,比如对细菌、真菌、病毒、原虫等^[19]。通过构建猪链球菌体外生物被膜模型,采用中药单体穿心莲内酯对其进行干预,为猪链球菌病的细菌耐药性寻找替代疗法提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

猪链球菌 2 型分离株^[20],由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所惠赠,具有良好的生物被膜形成能

力,菌种保存于含有 20% 甘油的 THB 培养基中, -80 °C 保存。

1.2 培养基及试剂

THB(Todd-Hewitt broth)培养基购于高科园海博生物技术有限公司;犊牛血清购于四季青有限公司;结晶紫染料、琼脂粉末、脑心浸液粉末均购于南京化学试剂有限公司;24 孔及 96 孔细胞培养板购于美国 Costar 公司;穿心莲内酯标准品购于中国食品药品检定研究院。

1.3 穿心莲内酯对猪链球菌的 MIC 和 MBC 测定

向 96 孔细胞培养板依次加入用 THB 培养基稀释的菌液,第 1 孔加入 160 μ L THB 稀释的菌液外,2~12 孔每孔加入 100 μ L THB 稀释的菌液。向第 1 孔加入 40 μ L 5 mg \cdot mL⁻¹ 的穿心莲内酯溶液,混匀后采取二倍稀释法逐一稀释每孔中的药物浓度至第 11 孔,并从第 11 孔吸取 100 μ L 弃去,第 12 孔为不加穿心莲内酯的阴性对照组。使每孔最终菌液浓度约为 1 \times 10⁶ cfu \cdot mL⁻¹。按上述方法做 3 组重复。于 37 °C 培养 24 h,以肉眼观察,无细菌生长为 MIC^[21]。从确定为 MIC 的孔到最后一孔中分别吸取 50 μ L 的液体涂布法接种于 THB 固体培养基上,37 °C 培养 24 h。接种平板中肉眼未见细菌生长的最低药物浓度为 MBC^[22]。

1.4 猪链球菌生长曲线的测定

将活化好的猪链球菌用 THB 液体培养基稀释到 1 \times 10⁸ cfu \cdot mL⁻¹,每个试管中加入一定量的 THB 培养基和穿心莲内酯,使菌液浓度为 1 \times 10⁶ cfu \cdot mL⁻¹,穿心莲内酯的浓度分别是 1/2MIC、1/4MIC、1/8MIC、阴性对照组为不加药物组,每个试管内总体积为 5 mL,每组 3 个重复。37 °C 恒温培养 12 h,每小时取 200 μ L 在 600 nm 处测定 OD 值,绘制生长曲线^[23]。

1.5 菌落计数法观察亚抑菌浓度的穿心莲内酯对猪链球菌生物被膜的影响

步骤:①将干净的盖玻片分割成合适的大小,放入无菌的锥形瓶中,分别放入 10 mL 含有 1/2MIC、

1/4MIC和 1/8MIC 穿心莲内酯的培养基中,然后每孔中加入 0.1 mL 稀释好的菌液,以不加穿心莲内酯的孔为空白对照组,37 °C 培养 48 h;②取出培养 48 h 生物膜模型,灭菌 PBS 轻轻冲洗两次,去除游离菌;锥形瓶中的菌液为悬浮菌组,两组分别进行如下操作;③将生物膜模型置于盛有 5 mL 无菌 THB 培养液的试管中,高速涡旋振荡 2 min,将细菌从玻璃片上振荡下来形成悬液;④采用梯度稀释法,分别稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} ;⑤取 0.1 mL 菌液到相应编号的 THB 平板中,垂直自流后置于 37 °C 恒温孵育箱培养 24 h;⑥到达规定时间后选取菌落在 30~300 之间的平板计数。菌落数与对应稀释倍数乘积即为原液细菌量,并换算成常用对数($\text{gcfu} \cdot \text{cm}^{-2}$)。

1.6 亚 MIC 穿心莲内酯干预猪链球菌培养对生物被膜形成影响

取无菌的 96 孔板,同菌液浓度的猪链球菌放入含有 1/2MIC、1/4MIC 和 1/8MIC 的 96 孔板中,以不加穿心莲内酯的孔为阴性对照组,氨苄西林抑制组为阳性对照,每组 3 个重复,培养 72 h。然后将上层悬浮的猪链球菌吸走,用等量的无菌 PBS 清洗三

次。再向每孔加入 99% 甲醇 200 μL ,固定 15 min,晾干。每孔加入 2% 结晶紫 200 μL 染色 5 min 后,将染色液用无菌 PBS 冲洗掉。晾干,将结合染料的贴壁细菌及多糖等用 33% 冰醋酸 200 μL 溶解。用酶标仪 (595 nm) 测量 OD 值^[24]。

1.7 RNA 提取和定量 RT-PCR

取处在对数生长期的猪链球菌 100 μL ,分别放入 5 mL 含有 1/2MIC、1/4MIC 和 1/8MIC 穿心莲内酯的培养基中,在 37 °C 的环境下进一步孵化 72 h。阴性对照组培养基中不加穿心莲内酯。提取猪链球菌生物被膜的 mRNA 后用试剂盒进行 cDNA 的合成^[25]。RT-PCR 用来测量 *gdh*、*mrp*、*gapdh*、*sly*、*fbps*、*ef*、*cps2J* 和 *luxS* mRNA 的转录量,16S rRNA 为内参基因。引物由上海生工设计并合成(表 1)。准备 20 μL PCR 预混液,包括 12.5 μL 的 IQ SYBR Green Supermix,1 μL 的基因特异性引物(上下游引物总和)和 6.5 μL 的 Rnase- and DNase-free water;最后加入 5 μL 的 cDNA。RT-PCR 的反应条件:94 °C 10 min,以下进行 35 个周期:94 °C 15 s,60 °C 60 s,72 °C 20 s;72 °C 10 min^[26]。

表 1 用于定量分析的引物

Table 1 Primers for quantitative analysis

基因 Gene	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	
	正向引物 Forward	反向引物 Reverse
<i>gdh</i>	ACCTCTTGGCTTTGGTGGT	TGAAGGATTTACCGTTTGCTG
<i>mrp</i>	TGGCACAGTTATCAAGGAACC	TACCGTCAACACGAACCAAT
<i>gapdh</i>	GCTGAAGAAGTAAACGCTGCT	GTCGCATCAAACAATGAACC
<i>sly</i>	AGTCAGTTTGGCACTCGTAGG	TTGTGGCTCGTAAGTCAAGC
<i>fbps</i>	GCTCCTGACCACCTATCTGC	TCAAAGCCACATCCAACCTCA
<i>ef</i>	GAACCCAAGGAACCAATCG	AACATTCTGACCACTCGCATC
<i>cps2J</i>	TTGGAATACGCAGAGCAAGA	TAACCTCCCGACAAATCAC
<i>luxS</i>	CGAGTTTGGAAAGAAATTGCAG	AGCTGAATGAAGGCTGTGGT
16S rRNA	TGCTAGTCACCGTAAGGCTAAG	GGCTGCAAGATTCCTTGAT

1.8 亚 MIC 穿心莲内酯干预猪链球菌生物被膜形态的观察

步骤:①固定,将干净的盖玻片分割成合适的大小,放入无菌的 24 孔板中,分别放入含有 2 mL 1/2MIC、1/4MIC 和 1/8MIC 穿心莲内酯的培养基中,然后每孔中加入 1 mL 稀释好的菌液,以不加穿心莲内酯的孔为空白对照组,37 °C 培养 72 h 后取出盖

玻片放入平皿中;用灭菌 PBS 洗涤两次,放入戊二醛中固定,置 4 °C 冰箱中 1 h。②冲洗,用灭菌 PBS 洗去戊二醛,轻轻洗涤两次,每次 10 min。③脱水,用 50%、70%、90% 乙醇各脱水一次,每次 10 min;用 100% 乙醇脱水 2 次,每次 10 min。④置换,无水乙醇:叔丁醇=1:1,叔丁醇各 1 次,每次 15 min。⑤干燥,将样品放入 -20 °C 冷冻室 30 min,取出后

放入冷冻干燥仪干燥 4 h 以上。⑥点样,将制备好的样品观察面朝上,用导电胶带粘附于扫描电镜样品台上,进行标记、观察。⑦镀膜,用 E-1010 型离子溅射镀膜仪,在真空条件下将样品表面镀一层厚 150Å 的金属膜;⑧观察,将制备好的样品粘在样品台上,扫描电镜下进行观察^[27]。

1.9 AI-2 的测定

将哈维氏弧菌接种于海生菌肉汤培养基中,于 8 °C 120 r · min⁻¹ 摇床培养 24 h。600 nm 测其 OD 值范围在 0.7~1.2 均可。用新鲜的海生菌肉汤培养基以 1:5 000 稀释,随后振荡摇匀。用 12 孔板培养猪链球菌,第 1 孔加入 2 mL 含穿心莲内酯 1 mg · mL⁻¹ 的 THB 液体培养基,第 2、3、4 孔每孔加入 1 mL 普通 THB 培养基,从第 1 孔吸出 1 mL 加入到第 2 个孔依此类推,至第 4 孔吸出 1 mL 弃去,然后每孔加入 1 mL 普通 THB 培养基。第 5 孔加入 2 mL 普通 THB 培养基作为空白对照。最后每孔加入 100 μL 稀释好的猪链球菌。37 °C 恒温培养 24 h。

表 2 穿心莲内酯对猪链球菌的 MIC 和 MBC

Table 2 MIC and MBC of Andrographolide against *Streptococcus suis*

	0.125 mg · mL ⁻¹	0.25 mg · mL ⁻¹	0.5 mg · mL ⁻¹	1 mg · mL ⁻¹
MIC	+	-	-	-
MBC	+	+	-	-

2.2 猪链球菌生长曲线

穿心莲内酯在 1/2MIC、1/4MIC、1/8MIC 时对猪链球菌的生长无明显抑制作用,试验结果见图 1。

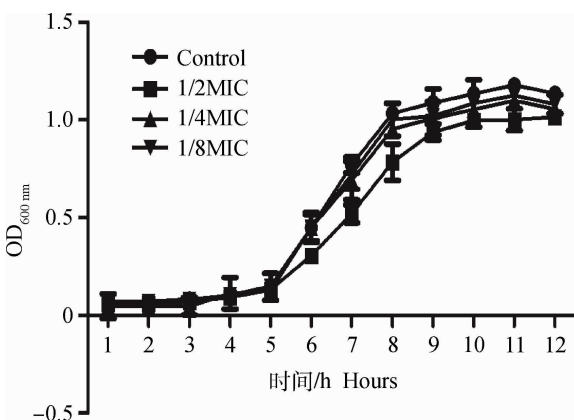


图 1 穿心莲内酯亚 MIC 浓度下猪链球菌的生长曲线
Fig. 1 Growth curve of *Streptococcus suis* at sub-MIC concentration of Andrographolide

24 h 后,将之前培养过的液体 12 000 r · min⁻¹,离心 10 min,取上清液。将上述上清液放到试管中,以 1:9 的体积比与哈维氏弧菌的稀释菌液混合。每个试管做 2 组平行。28 °C 4 h 摇床振荡培养。4 h 后每个试管取出 200 μL 加入到黑色 96 孔酶标板内,每个试管取 3 组做平行。荧光酶标仪测定其化学荧光^[28]。

1.10 统计学处理

采用 SPSS 18.0 软件对相关数据进行统计分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计资料的比较采用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 穿心莲内酯抗猪链球菌 MIC 和 MBC 测定

从表 2 可知穿心莲内酯对猪链球菌的最低抑菌浓度(MIC)为 0.25 mg · mL⁻¹,最低杀菌浓度(MBC)为 0.5 mg · mL⁻¹。

2.3 菌落计数法观察亚抑菌浓度的穿心莲内酯对猪链球菌生物被膜的影响

由表 3 可知在 1/2MIC、1/4MIC、1/8MIC 时生物被膜中细菌数量明显降低。

表 3 药物作用后对其细菌数的影响($\bar{x} \pm s$)

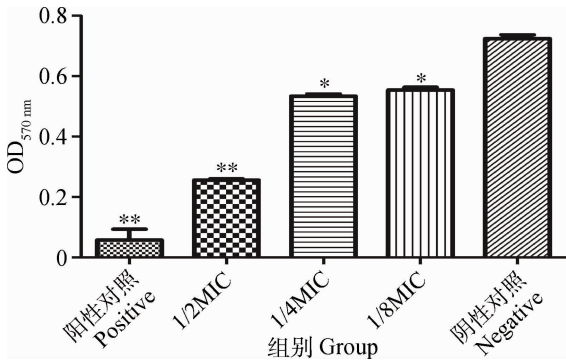
Table 3 The number of *Streptococcus suis* supplement with sub-MIC concentration of Andrographolide ($\bar{x} \pm s$)

	gcfu · cm ⁻²	
	悬浮菌细菌对数 Logarithm of bacteria of suspended bacteria	生物被膜细菌对数 Logarithm of bacteria in the biofilm
1/2MIC	3.345 ± 0.012	1.196 ± 0.018
1/4MIC	3.423 ± 0.014	2.134 ± 0.016
1/8MIC	3.452 ± 0.011	2.257 ± 0.012
Control	3.456 ± 0.010	3.069 ± 0.012

2.4 亚 MIC 穿心莲内酯对猪链球菌生物被膜的干预作用

1/2MIC 组、阳性对照与阴性对照组比较差异

极显著($P < 0.01$), 1/4MIC、1/8MIC 组与阴性对照组比较差异显著($P < 0.05$)。穿心莲内酯对猪链球菌有干预作用呈剂量依赖性。试验结果见图 2。



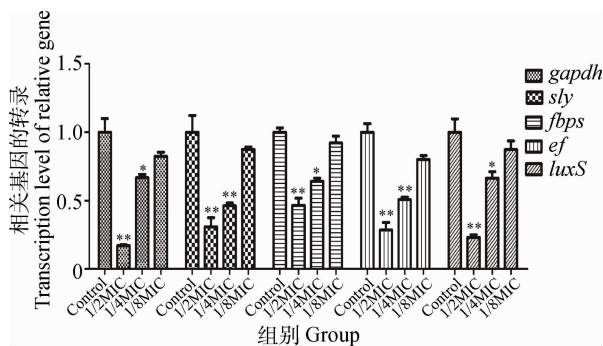
*. $P < 0.05$, **. $P < 0.01$

图 2 亚 MIC 浓度穿心莲内酯对猪链球菌生物被膜干预的作用 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Fig. 2 Effect of sub-MIC concentration of Andrographolide on the biofilm of *Streptococcus suis* ($n=5, \bar{x} \pm s$)

2.5 RT-PCR 检测结果

如图 3 所示,穿心莲内酯对猪链球菌的毒力因子 *gapdh*、*fbps*、*sly*、*ef*、*luxS* 的转录有抑制作用,在 1/2MIC、1/4MIC 时有显著的抑制作用 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),1/8MIC 时没有明显的抑制作用。

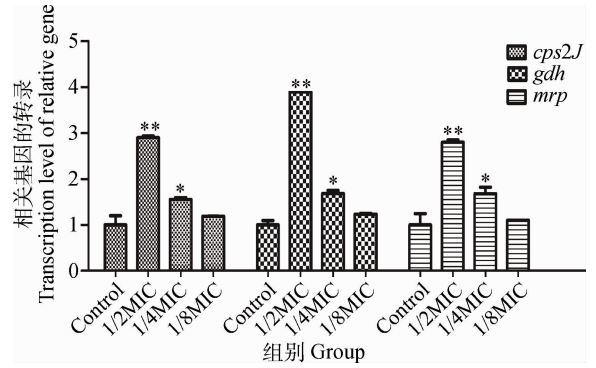


*. $P < 0.05$, **. $P < 0.01$

图 3 穿心莲内酯对猪链球菌 5 种毒力因子转录影响测定结果 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

Fig. 3 Effect of Andrographolide on the transcription of 5 virulence factors of *Streptococcus suis* ($n=4, \bar{x} \pm s$)

如图 4 所示,穿心莲内酯对猪链球菌的毒力因子 *cps2J*、*mrp*、*gdh* 的转录有促进作用,在 1/2MIC、1/4MIC 时有显著的促进作用 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),1/8MIC 时没有明显的促进作用。



*. $P < 0.05$, **. $P < 0.01$

图 4 穿心莲内酯对猪链球菌 3 种毒力因子转录影响测定结果 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

Fig. 4 Effect of Andrographolide on the transcription of 3 virulence factors of *Streptococcus suis* ($n=4, \bar{x} \pm s$)

2.6 亚 MIC 穿心莲内酯对猪链球菌生物被膜干预作用的形态学观察

扫描电镜结果显示,不加药物组中的细菌被镶嵌在生物被膜中,周围包裹着许多膜状物质,穿心莲内酯能够使细菌周围的膜状物质消失,细胞外基质大量减少,细菌生物被膜发生明显变化,细菌的数量明显下降;穿心莲内酯对生物被膜的形成有抑制作用,且随着剂量的增加这种抑制作用也随之明显增强,1/2MIC(图 5A)穿心莲内酯对生物被膜的干预作用最强,1/2MIC(图 5A)穿心莲内酯,1/4MIC(图 5B)穿心莲内酯,1/8MIC(图 5C)穿心莲内酯对生物被膜的干预作用依次减弱,图 5D 为不加穿心莲内酯的阴性对照组。

2.7 AI-2 的测定结果

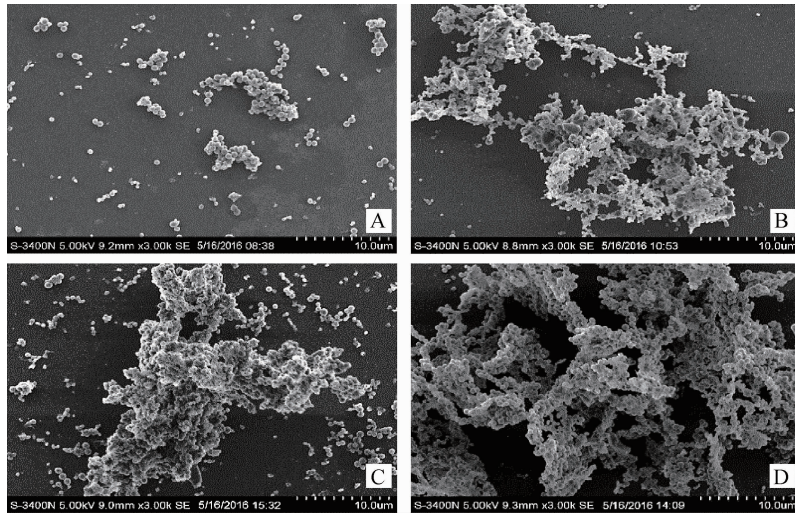
使用哈维氏弧菌生物发光法测定细菌培养液中 AI-2 活性。AI-2 活性测定表示为相对光单位和阴性组比较差异性。如图 6 所示,1/2MIC、1/4MIC、1/8MIC 组与阴性对照组比较均有显著性差异 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),说明穿心莲内酯对猪链球菌 AI-2 信号分子的产生有抑制作用,并且有剂量依赖性。

3 讨论

汪洋已经研究出猪链球菌在体内定植常以生物被膜形式生存,生物被膜可以阻止和抑制巨噬细胞、白细胞、抗体及抗生素进入生物被膜中清除或杀灭细菌,导致链球菌反复感染,难以控制^[29]。从本研究中的猪链球菌对照组结晶紫染色结果可知,猪链球菌形成生物被膜的能力较强,在电镜图片中可看

到猪链球菌被胞外基质包绕,层层排布在菌体的周围,形成塔型或蘑菇型的生物被膜^[30]。如何能够抑制或清除生物被膜,防止其反复感染已成为国内、外学者关注的焦点。目前有研究结果表明十四、十五

元环大环内酯类药物对抑制细菌生物被膜形成有一定的作用^[31]。本研究采用 1/2MIC、1/4MIC、1/8MIC 浓度的穿心莲内酯对猪链球菌生物被膜形成进行干预,可见穿心莲内酯能够有效抑制猪链球菌

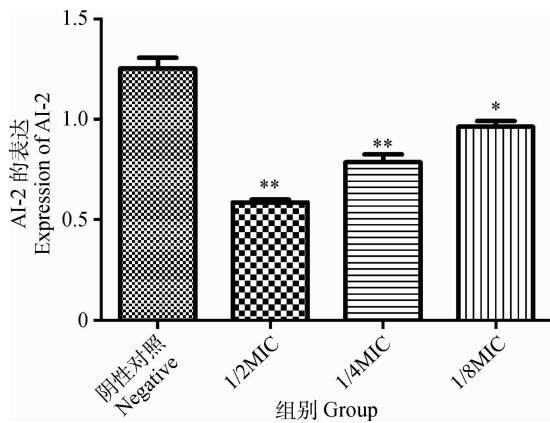


A. 1/2MIC 穿心莲内酯; B. 1/4MIC 穿心莲内酯; C. 1/8MIC 穿心莲内酯; D. 阴性对照

A. 1/2MIC Andrographolide; B. 1/4MIC Andrographolide; C. 1/8MIC Andrographolide; D. Negative control

图 5 扫描电镜观察亚 MIC 浓度穿心莲内酯对猪链球菌生物膜的形态学观察 (3 000×)

Fig. 5 Observation the effects of sub-MICs concentration of Andrographolide on the morphology of *Streptococcus suis* biofilm by scanning electron microscopy (3 000×)



*. $P < 0.05$, ** . $P < 0.01$

图 6 穿心莲内酯对猪链球菌 AI-2 的信号分子影响测定结果 ($n=4$, $\bar{x} \pm s$)

Fig. 6 Effects of Andrographolide on *Streptococcus suis* AI-2 signals ($n=4$, $\bar{x} \pm s$)

生物被膜的形成,这种抑制作用随药物剂量的增加而增强。这一结果与上文提到的结果相似。从扫描电镜试验结果可知,穿心莲内酯能使细菌生物被膜中的细菌数量和生物被膜的形态发生明显变化,可见穿心莲内酯对生物被膜的干预作用确实存在剂量依赖性。

已经被证实了的早期猪链球菌经典的毒力及与毒力相关的基因有 CPS、MRP、IgG 结合蛋白、GAPDH、分泌型核酸酶 A、透明质酸酶、EF、SLY、GDH、GDH、FBPS、精氨酸氨基肽酶、精氨酸氨基肽酶等。虽然对于猪链球菌的了解还不是非常的全面,但是经过了前人 20 多年的研究,已经鉴定出了一些公认的毒力基因及毒力的相关基因,在很大程度上提升了我们对于潜在毒力基因的认知度^[10-12]。在相关研究报道中指出^[29],猪链球菌的毒力因子 *gapdh*、*sly*、*fbps*、*cps2J*、*mrp* 与猪链球菌的侵袭及黏附有关,从而能够达到调节生物被膜形成的作用。本研究荧光定量 PCR 结果发现阴性对照组和加药组相比, *gapdh*、*sly*、*fbps*、*ef* 基因表达下调,而 *cps2J*、*mrp* 和 *gdh* 基因表达上调,并呈剂量依赖性。这说明穿心莲内酯有可能影响相关黏附基因的表达,从而抑制了猪链球菌生物被膜的形成。与此同时,我们发现 *luxS* 基因表达下调,而且在使用哈维氏弧菌生物发光法测定细菌培养液中 AI-2 活性试验时,我们发现穿心莲内酯对猪链球菌 AI-2 信号分子的产生有抑制作用,并且有剂量依赖性。众所周知^[29],*luxS* 基因 AI-2 信号分子是调节密度感应

系统的重要因子,密度感应系统(QS)是生物群体调节生命活动一种重要的调节系统,它可以使生物群体在达到一定的密度时调节诸如发光、产气、耐药及生物被膜形成等生命活动。在本研究中显示,穿心莲内酯能够下调表达 *luxS* 基因及抑制 AI-2 信号分子活性,说明穿心莲内酯能够干预猪链球菌的 QS 系统,从而对猪链球菌生物被膜的形成产生了抑制作用。从以上结果我们发现,穿心莲内酯能很好地抑制猪链球菌形成生物被膜,并初步阐述其抑制的机制,然而猪链球菌生物被膜的产生和抑制机制还需要我们进一步的研究,希望本试验可以为预防和治疗猪链球菌病提供一些具体有意义的数据。

4 结 论

亚抑菌浓度的穿心莲内酯能够干预猪链球菌生物被膜形成,并影响猪链球菌相关毒力基因及 AI-2 信号分子的表达。

参考文献(References):

- [1] LUN Z R, WANG Q P, CHEN X G, et al. *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen[J]. *Lancet Infect Dis*, 2007, 7(3): 201-209.
- [2] ZHANG Y Y, DING D D, LIU M L, et al. Effect of the glycosyltransferases on the capsular polysaccharide synthesis of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. *Microbiol Res*, 2016, 185: 45-54.
- [3] MOHAMMADI Z, PALAZZI F, GIARDINO L, et al. Microbial biofilms in endodontic infections: an update review[J]. *Biomed J*, 2013, 36(2): 59-70.
- [4] 尤理想, 赵青, 周敏, 等. 细菌生物膜检测方法改进与应用[J]. *实验技术与管理*, 2015, 32(3): 72-76.
- YOU L X, ZHAO Q, ZHOU M, et al. Improved method of bacterial biofilm detection and its application[J]. *Experimental Technology and Management*, 2015, 32(3): 72-76. (in Chinese)
- [5] MAN N K, DEGREMONT A, DARBORD J C, et al. Evidence of bacterial biofilm in tubing from hydraulic pathway of hemodialysis system[J]. *Artif Organs*, 1998, 22(7): 596-600.
- [6] SERRA D O, RICHTER A M, KLAUCK G, et al. Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm[J]. *mBio*, 2013, 4(2): 00103-13.
- [7] DE LA FUENTE-NÚÑEZ C, REFFUVEILLE F, FERNÁNDEZ L, et al. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation; antibiotic resistance and new therapeutic strategies[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2013, 16(5): 580-589.
- [8] CASTELO-BRANCO D S C M, RIELLO G B, VASCONCELOS D C, et al. Farnesol increases the susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* biofilm to antimicrobials used to treat melioidosis[J]. *J Appl Microbiol*, 2016, 120(3): 600-606.
- [9] WANG S, YANG Y B, ZHAO Y L, et al. Sub-MIC tylosin inhibits *Streptococcus suis* biofilm formation and results in differential protein expression[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 384.
- [10] CALZAS C, LEMIRE P, AURAY G, et al. Antibody response specific to the capsular polysaccharide is impaired in *Streptococcus suis* serotype 2-infected animals[J]. *Infect Immun*, 2015, 83(1): 441-453.
- [11] SANTHAKUMARI S, KANNAPPAN A, PANDIAN S K, et al. Inhibitory effect of marine cyanobacterial extract on biofilm formation and virulence factor production of bacterial pathogens causing vibriosis in aquaculture[J]. *J Appl Phycol*, 2016, 28(1): 313-324.
- [12] HUSAIN F M, AHMAD I. Doxycycline interferes with quorum sensing-mediated virulence factors and biofilm formation in Gram-negative bacteria[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2013, 29(6): 949-957.
- [13] ALASIL S M, OMAR R, ISMAIL S, et al. Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by culture extract from novel bacterial species of *Paenibacillus* using a rat model of chronic lung infection[J]. *Int J Bacteriol*, 2015, 2015: 671562.
- [14] KIM B S, PARK S J, KIM M K, et al. Inhibitory effects of *Chrysanthemum boreale* essential oil on biofilm formation and virulence factor expression of *Streptococcus mutans* [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 616309.
- [15] ZIUZINA D, BOEHM D, PATIL S, et al. Cold plasma inactivation of bacterial biofilms and reduction of quorum sensing regulated virulence factors[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138209.
- [16] KASIMANICKAM V R, OWEN K, KASIMANICKAM R K. Detection of genes encoding multidrug resistance and biofilm virulence factor in uterine pathogenic bacteria in postpartum dairy cows[J]. *Ther-*

- iogenology*, 2015, 85(2): 173-179.
- [17] CHOI N Y, KANG S Y, KIM K J. *Artemisia princeps* inhibits biofilm formation and virulence-factor expression of antibiotic-resistant bacteria[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 239519.
- [18] AVIN S, AVINASH A, PATIL N, et al. Recent advances in the development of antibacterial agents [J]. *Res J Pharm Biol Chem Sci*, 2015, 6(5): 1220-1228.
- [19] HSU Y H, HSU Y L, LIU S H, et al. Development of a bifunctional andrographolide-based chemical probe for pharmacological study [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0152770.
- [20] 于文会, 许 晶, 魏庆微, 等. 蒲公英水提物对猪链球菌生物被膜体外干预作用[J]. *畜牧兽医学报*, 2015, 46(10): 1875-1881.
- YU W H, XU J, WEI Q W, et al. *Dandelion* aqueous extract affects biofilm formation by *S. suis*[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2015, 46(10): 1875-1881. (in Chinese)
- [21] CHOI S C. Effects of bacterial biofilms and iron oxide on copper distribution in a simulated marine environment: an implication to the sediments in the Pearl River estuary[D]. Hong Kong, China: The Hong Kong Polytechnic University, 2003: 189-230.
- [22] 张文元, 杨亚冬, 唐 靓. 十四元环大环内酯类对细菌生物被膜形成的影响及对环丙沙星的增效作用[J]. *中国卫生检验杂志*, 2005, 15(11): 1288-1289.
- ZHANG W Y, YANG Y D, TANG L. Effects of 14-membered macrolides on the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and synergism between macrolide and ciprofloxacin[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2005, 15(11): 1288-1289. (in Chinese)
- [23] VAN CALSTEREN M R, GAGNON F, LACOUTURE S, et al. Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 2 capsular polysaccharide [J]. *Biochem Cell Biol*, 2010, 88(3): 513-525.
- [24] DOBRETSOV S, QIAN P Y. The role of epibiotic bacteria from the surface of the soft coral *Dendronephthya* sp. in the inhibition of larval settlement [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2004, 299(1): 35-50.
- [25] 吴 恋, 王春艳, 吕 维, 等. 藏药大车前草中大车前苷的定性和定量分析[J]. *成都中医药大学学报*, 2014, 37(1): 48-50, 59.
- WU L, WANG C Y, LV W, et al. Qualitative and quantitative analysis of plantamajoside in *Plantago major* L. [J]. *Journal of Chengdu University of TCM*, 2014, 37(1): 48-50, 59. (in Chinese)
- [26] Vaccine composition against *Streptococcus suis* infection: EP, 2949340[P]. 2015-12-02.
- [27] HUANG Y H, CAI T G, XIA X, et al. Research advances in the intervention of inflammation and cancer by active ingredients of traditional Chinese medicine[J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2016, 19(1): 114-126.
- [28] CALLEJO R, PRIETO M, ROCCA F, et al. Molecular characterization of *Streptococcus suis* serotype 2 strains isolated from humans and diseased pigs in Argentina[C/OL]//Proceedings of Xix Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. Buenos Aires, Argentina, 2014. [2017-12-26]. https://www.researchgate.net/publication/268222687_MOLECULAR_CHARACTERIZATION_OF_STREPTOCOCCUS_SUIS_SEROTYPE_2_STRAINS_ISOLATED_FROM_HUMANS_AND_DISEASED_PIGS_IN_ARGENTINA
- [29] 汪 洋. 猪链球菌生物被膜形成及致病机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011: 1-10.
- WANG Y. Study on the mechanism of biofilm formation and molecular pathogenesis of *Streptococcus suis*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011: 1-10. (in Chinese)
- [30] SAHA M, WAHL M. Seasonal variation in the anti-fouling defence of the temperate brown alga *Fucus vesiculosus*[J]. *Biofouling*, 2013, 29(6): 661-668.
- [31] LUTZ L, PEREIRA D C, PAIVA R M, et al. Macrolides decrease the minimal inhibitory concentration of anti-pseudomonal agents against *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients in biofilm[J]. *BMC Microbiol*, 2012, 12: 196.