

基于代谢组学及分子对接探究雀石蕊抗 MRSA 的分子机制

朱家娜, 田红巧, 刘梦龙, 丁海燕*

大理大学公共卫生学院, 大理 671000

摘要:雀石蕊具有良好的体外抗菌活性,为明确其抗菌分子机制,本文以耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)为指示菌,利用代谢组学获取雀石蕊处理 MRSA 后其胞内差异代谢物变化,并结合分子对接验证差异代谢物相关蛋白酶与雀石蕊抗菌成分的亲和力,分析雀石蕊抗菌机理。体外抗菌实验显示,雀石蕊甲醇提取物抗菌谱广,且对 MRSA 表现为高度敏感。代谢组学和分子对接结果表明,雀石蕊作用于组氨酸激酶、青霉素结合蛋白 PBP2A、喹诺酮类耐药蛋白 NorA 和 S-腺苷甲硫氨酸合成酶 4 个潜在不同抗菌靶点,增强与 MRSA 细胞膜黏附且抑制外排泵 NorA 作用、干扰组氨酸和甲硫氨酸等代谢而发挥抗菌作用。本文结果为后续深入探究雀石蕊抗 MRSA 分子机制提供依据。

关键词:雀石蕊;MRSA;抗菌机制;代谢组学;分子对接

中图分类号:TQ465.92

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)10-1732-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.10.010

Molecular mechanism of *Cladonia stellaris* against MRSA based on metabolomics and molecular docking

ZHU Jia-na, TIAN Hong-qiao, LIU Meng-long, DING Hai-yan*

School of Public Health, Dali University, Dali 671000, China

Abstract: The extract of *Cladonia stellaris* has good *in vitro* antimicrobial activity. To clarify its antibacterial molecular mechanism, this study used methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as the indicator bacterium. Metabolomics were used to obtain the changes in intracellular differential metabolites of MRSA treated with *C. stellaris*, and molecular docking was used to verify the affinity of differential metabolites with relevant proteins and antibacterial components of *C. stellaris*, analyzing the antibacterial mechanism of *C. stellaris*. *In vitro* antibacterial experiments showed that the methanol extract of *C. stellaris* had a broad antibacterial spectrum and was highly sensitive to MRSA. Metabolomics and molecular docking results indicated that *C. stellaris* acted on four potential different antibacterial targets: histidine kinase, penicillin-binding protein PBP2A, quinolone resistance protein NorA and S-adenosylmethionine synthetase, enhancing adhesion to MRSA cell membrane and inhibiting the action of efflux pump NorA, interfering with histidine and methionine metabolism to exert antibacterial effects. This study provides a basis for exploring the molecular mechanism of *C. stellaris* against MRSA.

Key words: *Cladonia stellaris*; MRSA; antimicrobial mechanism; metabolomics; molecular docking

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)是重要的食源性致病菌之一,具有较强的耐药性,感染后可导致皮肤及软组织感染、肺炎、化脓性关节炎和毒性休克综合征等^[1],致死率高达 63.1%^[2]。近年来,MRSA 在各类食品中被检出,严重威胁着食品安全与人类健康^[3]。开发新型抗菌活性物质以应对食源性 MRSA

感染刻不容缓。地衣是新型活性化合物的重要资源库,超过 50% 的地衣被证实具有良好的抗菌活性,且富含多种独有的结构新颖的抗菌化合物^[4]。地衣具有悠久的药食同源史,其中石蕊属地衣“青雪茶”作茶饮用,可起到消炎镇痛的作用^[5]。雀石蕊(*Cladonia stellaris*),隶属于真菌界子囊菌门石蕊属地衣,广泛分布于云南、甘肃、黑龙江等地,是抗菌素的重要来源^[5],其富含的松萝酸^[6]、珠光酸^[7]、黑茶渍素^[8]及去甲环萝酸^[9]等,均被证实是良好的抗菌物质。然而,这些物质的抗菌机制并未阐明。我们

前期抗菌活性筛查结果证实,雀石蕊提取物对多种食源性致病菌具有较好的体外抗菌活性,尤其对 MRSA 展现出高度敏感的抗菌活性,具有进一步开发为新型抗耐药化合物的潜能,然而目前并无文献揭示雀石蕊抗 MRSA 作用机制,因此,本文以 MRSA 为指示菌,利用代谢组学和分子对接初步探索雀石蕊抗 MRSA 的机理,为后续探究雀石蕊抗 MRSA 机制和应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

雀石蕊 (*Cladonia stellaris*) (果柄高度约 2.5 cm,表面呈灰白色至浅黄灰色;果柄分枝稠密,近顶端以三叉、四叉至五叉分枝常见;子囊盘稀见,暗褐色,顶生;分生孢子器顶生,内含红色物质)。采集于云南大理苍山,经中科院植物所王立松研究员进行形态学鉴定后,保存于大理大学公共卫生学院实验中心 4 °C 冰箱。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA ATCC 43300,北京北纳创联生物技术研究院);金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923)、斯氏李斯特菌 (*Listeria seeligeri* CICC 21671)、单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes* CMCC 21633)、甲型副伤寒杆菌 (*Salmonella paratyphi-A* BNCC 336664)、大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli* CMCC(B)441027)、福氏志贺菌 (*Shigella flexneri* CMCC 21534)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352)由大理州质量技术监督综合检测中心提供;营养琼脂(批号:240228A10,北京陆桥技术股份有限公司);胰酪大豆胨琼脂培养基、LB 肉汤(批号:230207A10、1102841,广东环凯微生物科技有限公司);乙酸乙酯、二甲基亚砜(纯度 $\geq 99.9\%$,批号:240104E1、67-68-5,上海麦克林生化科技有限公司);甲醇、乙腈、氨水、异丙醇(色谱级,批号 67-56-1、75-05-8、1336-21-6、67-63-0,CNW Technologies 公司);乙酸铵、乙酸(色谱级,批号:631-61-8、64-19-7,Sigma-Aldrich 公司);屈臣氏超纯水;盐酸左氧氟沙星片(批号:6210250121,山东罗欣药业集团股份有限公司)。

Vanquish 型超高效液相、Orbitrap Exploris 120 型高分辨质谱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);JXFSTPRP-24 型匀浆机(上海净信 VS 科技有限公司);Scientz-ND 型系列冷冻干燥机、SB-5200DTDN 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);RE-3000 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);-1300L-U 型超净工作台(净集团泰安公司制

造);GHP-9270 型隔水式恒温培养箱、DKZ-3 型振荡水槽、HWS-28 型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司);GZX-9160MBE 型数显鼓风干燥机(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 雀石蕊甲醇提取物的体外抗菌活性

1.2.1.1 雀石蕊甲醇提取物制备

雀石蕊清洗后,放置烘箱中于 50 °C 下烘干,粉碎后过 60 目筛,按料液比 1:10(g/mL)加入 75% 甲醇溶液超声浸提 30 min 后抽滤,重复上述提取步骤三次后收集上清液,45 °C 条件下旋蒸浓缩,真空冷冻干燥 12 h(冷阱温度降至-25 °C,真空度设置为 50 Pa)成粉末,置于-20 °C 冰箱避光密封保存备用。

1.2.1.2 菌液制备

刮取斜面保存的菌种于生理盐水中,采用麦氏比浊法将菌液接种于 LB 肉汤(2%),37 °C 振荡培养过夜,次日收集菌液,4 500 r/min 离心 15 min,弃去上清液,用无菌生理盐水制备菌悬液 1×10^5 CFU/mL 备用。

1.2.1.3 雀石蕊甲醇提取物体外抗菌活性及最小抑菌浓度的测定

采用平板打孔法^[10]探究雀石蕊甲醇提取物的体外抗菌活性,雀石蕊甲醇提取物用 DMSO 溶解为 100 mg/mL 备用。将营养琼脂和 1×10^5 CFU/mL 的菌液,按 20:1 比例混匀倒板冷却备用。使用 100 μ L 无菌枪头于平板上打孔并挑出孔内的琼脂,每个孔中加入 20 μ L 的雀石蕊甲醇提取物,阳性对照用 5 mg/mL 的左氧氟沙星,阴性对照为 DMSO,37 °C 培养 24 h 后观察抑菌圈大小。参考 Li 等^[11]方法对雀石蕊抗菌活性结果进行判断;应用常量肉汤法^[12],对 MRSA 进行最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)测定,将雀石蕊提取物用 3% DMSO 复溶,无菌 MH 肉汤稀释样品至一定浓度梯度(10.000、5.000、2.500、1.250、0.625、0.313、0.156、0.078、0.039、0.020 mg/mL)。不同浓度样品接种 2% (V/V)活化后的菌液(1×10^5 CFU/mL),置于 37 °C 恒温培养箱培养 24 h,以加入等体积的 3% DMSO 代替提取物作为空白对照,培养 18 h 后加入 TTC 显色,将不显色的样品浓度确定为 MIC。

1.2.2 雀石蕊甲醇提取物处理 MRSA 后的代谢物分析

1.2.2.1 MRSA 处理及胞内代谢物的提取

分别吸取 2% 菌液(1×10^5 CFU/mL)和 3% 雀石蕊提取物(1/2MIC)于 50 mL MHB 肉汤中,置于

37 °C 摇床振荡至生长对数期,离心收集菌体沉淀,液氮速冻 10 s,于冰上解冻,加入 PBS 缓冲液,冷冻离心后收集菌体沉淀,-80 °C 保存备用^[13]。不含雀石蕊提取物的分组为对照组,每组样品制备三个生物学重复。低温称取 25 mg 样品于 EP 管中,加入匀浆珠,加入 500 μ L 提取液(甲醇:乙腈:水=2:2:1)(V/V),含同位素标记内标混合物,涡旋混匀 30 s,放入匀浆仪中匀浆(35 Hz,4 min),再转移至冰水中超声 5 min,此步骤重复 3 次。-40 °C 静置 1 h,将样品 4 °C,12 000 r/min(离心力 13 800 \times g,R=8.6 cm)离心 15 min,取上清于进样瓶中上机检测。

1.2.2.2 LC-MS 检测

使用 Vanquish(Thermo Fisher Scientific)超高效液相色谱仪,通过 Waters ACQUITY UPLC BEH Amide(2.1 mm \times 50 mm,1.7 μ m)液相色谱柱对目标化合物进行色谱分离。液相色谱 A 相为水相,含 25 mmol/L 乙酸铵和 25 mmol/L 氨水,B 相为乙腈。样品盘温度:4 °C,进样体积:2 μ L。Orbitrap Exploris 120 质谱仪能够在控制软件(Xcalibur,版本:4.4,Thermo)控制下进行一级、二级质谱数据采集。详细参数如下:鞘气流速 50 Arb,Aux 气流速 15 Arb,毛细管温度 320 °C,全 MS 分辨率 60 000,MS/MS 分辨率 15 000,碰撞能量:SNCE 20/30/40,喷雾电压分别为 3.8 kV(正)或-3.4 kV(负)。

1.2.2.3 代谢物的统计学分析及差异代谢物的 KEGG 富集分析

采用 SIMCA 16.0.2 软件分析处理组与对照组的 MRSA 差异代谢物,通过主成分分析(principal component analysis,PCA)观察各样本间的总体分布和分析过程的稳定性,并采用正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal projections to latent structures-discriminant analysis,OPLS-DA)处理组和对照组的差异代谢物,并根据分析结果得到各代谢物的变量投影重要性(variable importance in the projection,VIP)和 P -value 值,以 VIP > 1 且 P -value < 0.05 为标准筛选差异代谢物。另外,运用 R 语言分析软件进行京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)通路富集分析,注释差异代谢物所参与的代谢通路,并基于其分析结果获取差异代谢物的上下游蛋白。

1.2.3 雀石蕊抗菌化合物与差异代谢物相关蛋白的分子对接

选择差异代谢物的上下游蛋白及与 MRSA 耐药相关的青霉素结合蛋白 PBP2A(penicillin binding

protein PBP2A,PBP2A)和喹诺酮类耐药蛋白 NorA(quinolone resistance protein NorA,NorA)作为受体,雀石蕊中抗菌化合物为配体,利用 ChemOffice、AutoDock 软件及 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>),进行分子对接^[14],进一步验证雀石蕊可能的作用靶点及通路。具体的方法为:Uniprot 数据库中下载蛋白,利用 AutoDock Tools 进行处理后作为受体;使用 ChemOffice 及 AutoDock Tools 软件处理配体;利用 AutoDock vina 进行分子对接,以对接结合能最低筛选最优配体构象,用 PyMOL 软件进行对接结果可视化分析^[15]。

1.3 数据处理

数据的处理及显著性分析运用 SPSS 26.0 进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。采用 ProteoWizard 软件将代谢组学原始数据转换为 mzXML 格式,并使用基于 XCMS 的 R 开发内部程序进行峰值检测、提取、对齐和整合。采用 R 包和 Biotree DB(V3.0)进行代谢物鉴定。

2 结果与分析

2.1 雀石蕊甲醇提取物的体外抗菌活性

体外抗菌结果表明,雀石蕊对 4 种革兰氏阳性致病菌和 2 种革兰氏阴性致病菌都展现出抗菌活性(见表 1),其中,对甲型副伤寒杆菌最强,对 MRSA 的 MIC 为 0.156 mg/mL,说明雀石蕊具有较宽的抗菌谱,对 MRSA 有较好抗菌活性。

表 1 雀石蕊甲醇提取物体外抗菌活性

Table 1 *In vitro* antibacterial effect of methanol extract from *C. stellaris*

抗菌对象 Antibacterial object	革兰氏染色 Gram staining	抑菌圈直径 Diameter of the inhibitory zone (mm)
MRSA	G+	17.0 \pm 1.7 ^c
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>		12.8 \pm 0.4 ^{cd}
单增李斯特氏菌 <i>Listeria monocytogenes</i>		12.5 \pm 2.1 ^d
斯氏李斯特氏菌 <i>Listeria seeligeri</i>		20.3 \pm 1.8 ^b
甲型副伤寒杆菌 <i>Salmonella paratyphi-A</i>	G-	24 \pm 0.01 ^a
肺炎克雷伯杆菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>		20 \pm 0.00 ^b
福氏志贺菌 <i>Shigella flexneri</i>		-
大肠埃希氏菌 <i>Escherichia coli</i>		-

注:抑菌圈直径(diameter of the inhibitory zone,DIZ) \leq 6 mm 判断为无抗菌活性;6 < DIZ \leq 8 mm,低度敏感;8 < DIZ \leq 14 mm,中度敏感;14 < DIZ < 20 mm,高度敏感;DIZ \geq 20 mm,极度敏感。不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Note:Diameter of the inhibitory zone (DIZ) \leq 6 mm was considered as no antibacterial activity;6 < DIZ \leq 8 mm,low sensitivity;8 < DIZ \leq 14 mm,moderate sensitivity;14 < DIZ < 20 mm,highly sensitive;DIZ \geq 20 mm,extremely sensitive. Different lowercase letters indicate significant differences($P < 0.05$).

2.2 雀石蕊甲醇提取物处理 MRSA 后的代谢物分析

2.2.1 代谢物的总离子流图

雀石蕊甲醇提取物处理 MRSA 菌体后,经 LC-

MS 检测可获得胞内代谢物总离子流图。由图 1 可知,正离子模式(positive ion mode, POS)和负离子模式(negative ion mode, NEG)下,雀石蕊组与对照组

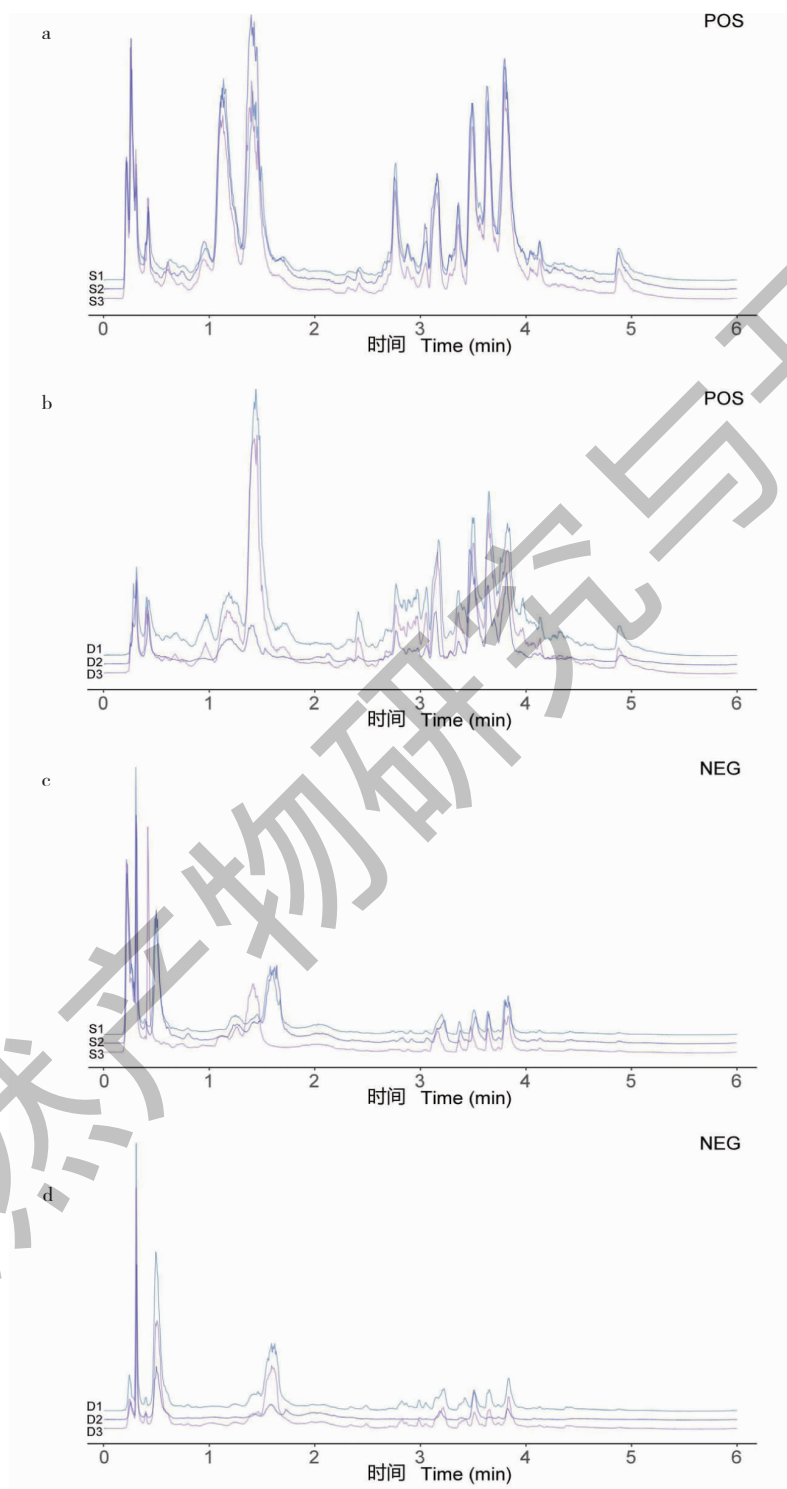


图 1 雀石蕊组与对照组 MRSA 代谢物总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of MRSA metabolites in *C. stellaris* group and control group

注:S1 ~ S3 代表雀石蕊组的 3 个平行重复样本,D1 ~ D3 代表对照组的 3 个平行重复样本。Note:S1-S3 represent three parallel replicate samples of *C. stellaris* group,while D1-D3 represent three parallel replicate samples of the control group.

代谢物的离子峰谱存在明显差异,通过使用基于XCMS的R开发内部程序进行峰值检测、提取、对齐、整合,并结合Biotree DB(V3.0)软件分析,共鉴定得到80种代谢物。

2.2.2 PCA和OPLS-DA分析

基于每个样本中MRSA胞内代谢物成分及含量进行PCA与OPLS-DA分析,PCA分析图中每个散点代表一个样本,散点的颜色和形状表示不同的分组,散点分布越靠近,说明样本中代谢物的种类和

含量越相似;反之,其整体代谢水平差异越大。从图2a中可以直观地发现各组内的3个样本得到了较好的聚集,说明组内同质性比较好,代谢物组成相似。雀石蕊提取物处理组与对照组间没有重叠和交叉,得到了有效区分,这说明两组存在差异。相比PCA,OPLS-DA得到更好分组结果,如图2b所示,雀石蕊提取物处理组与对照组的平行样本分别聚集在一定区域,且不同处理组得到了明显区分,表明雀石蕊提取物处理组与对照组的代谢成分上存在显著差异。

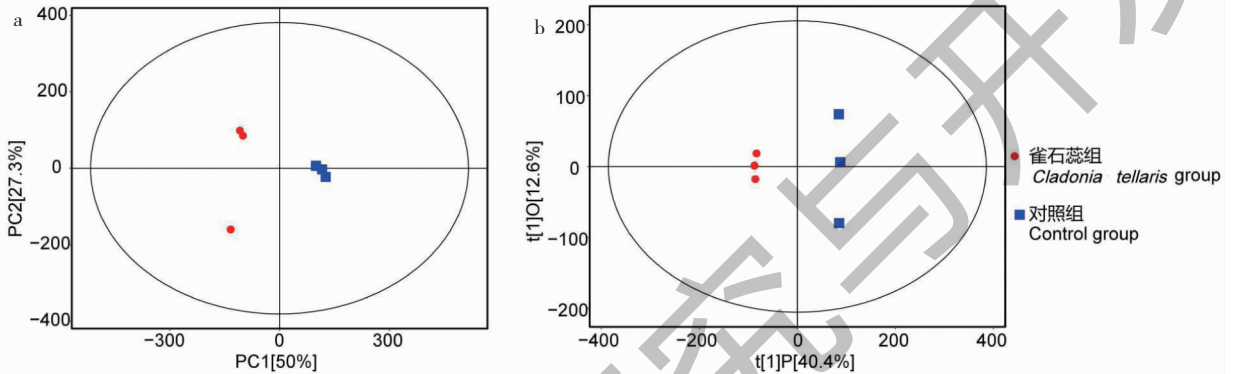


图2 雀石蕊提取物处理组和对照组MRSA代谢物的PCA(a)和PLS-DA(b)分析

Fig. 2 PCA (a) and PLS-DA (b) analysis of MRSA metabolisms in *C. stellaris* and control groups

2.2.3 差异代谢物筛选

根据筛选标准,共获得VIP > 1且P-value < 0.05的差异代谢物20种,与对照组相比,上调的差异代谢物13个,分别为亮氨酸、缬氨酸、甜菜碱、胱硫醚、尿刊酸、异亮氨酸、二十一碳酸、N-乙基甘氨酸、N-乙酰胞壁酸、3-磷酸甘油酸、5-磷酸甲羟戊酸、6-氨基己酸、硫鸟嘌呤,下调的差异代谢物7个,分别为组氨酸、精氨酸、S-腺苷甲硫氨酸、磷酸乙醇酸、磷脂酰胆碱、硫苷脂、3-氧代硬脂酸(见表2)。

酸、N-乙酰胞壁酸、3-磷酸甘油酸、5-磷酸甲羟戊酸、6-氨基己酸、硫鸟嘌呤,下调的差异代谢物7个,分别为组氨酸、精氨酸、S-腺苷甲硫氨酸、磷酸乙醇酸、磷脂酰胆碱、硫苷脂、3-氧代硬脂酸(见表2)。

表2 差异代谢物的筛选

Table 2 Screening of differential metabolites

差异代谢物表达量变化 Changes in the expression levels of differential metabolites	差异代谢物 Differential metabolite	VIP	P值 P-value
上调代谢物 Up-regulated metabolites	胱硫醚 Cystathionine	1.32	0.01
	尿刊酸 Urocanic acid	1.32	0.02
	亮氨酸 Leucine	1.22	0.01
	缬氨酸 Valine	1.29	0.01
	异亮氨酸 Isoleucine	1.36	0.00
	甜菜碱 Betaine	1.22	0.02
	N-乙酰胞壁酸 N-Acetylmuramic acid	1.39	0.00
	二十一碳酸 Heneicosanoic acid	1.51	0.00
	N-乙基甘氨酸 N-Ethylglycine	1.38	0.02
	3-磷酸甘油酸 3-Phosphoglyceric acid	1.48	0.01
	5-磷酸甲羟戊酸 Mevalonic acid 5-phosphate	1.50	0.04

续表 2(Continued Tab. 2)

差异代谢物表达量变化 Changes in the expression levels of differential metabolites	差异代谢物 Differential metabolite	VIP	P 值 P-value
上调代谢物 Up-regulated metabolites	6-氨基己酸 Caplamin	1.36	0.00
	硫鸟嘌呤 Thioguanine	1.40	0.00
下调代谢物 Down-regulated metabolites	S-腺苷甲硫氨酸 S-Adenosylmethionine	1.36	0.02
	磷酸乙醇酸 Phosphoglycolic acid	1.49	0.00
	硫甘脂 Sulfatide	1.46	0.00
	精氨酸 Arginine	1.28	0.02
	组氨酸 Histidine	1.45	0.00
	3-氧代硬脂酸 3-Oxostearic acid	1.53	0.00
	磷脂酰胆碱 Phosphatidylcholine	1.51	0.00

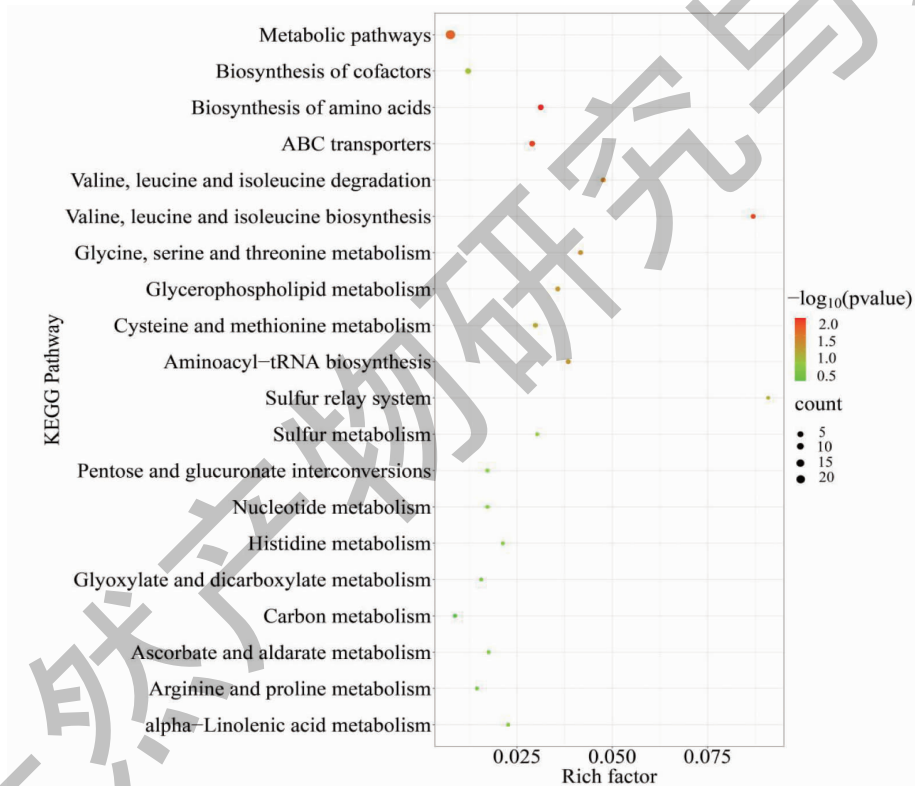


图 3 差异代谢物 KEGG 通路富集分析

Fig. 3 The KEGG pathway enrichment analysis of differential metabolites

2.2.4 差异代谢物的 KEGG 富集分析及其相关蛋白酶

差异代谢物的 KEGG 富集分析结果显示, 20 种差异代谢物中有 16 个物质注释到 KEGG 数据库中, 共参与 35 条代谢通路, 主要涉及甘油磷脂代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、半胱氨酸和甲硫氨酸代谢、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成与降解、

氨酰-tRNA 生物合成、碳代谢、核苷酸代谢、戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化、抗坏血酸与醛酸代谢、乙醛酸和二羧酸代谢、硫代谢、 α -亚麻酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、组氨酸代谢等, 选择前 20 条代谢通路绘制气泡图(见图 3)并分析前 20 条代谢通路涉及的差异代谢物上下游蛋白, 包括 S-腺苷甲硫氨酸合成酶(S-adenosylmethionine synthetase, SAM)、组氨酸

激酶 (histidine kinase, HK)、GTP3', 8-环化酶 (GTP3', 8-cyclase, GTPC)、磷酸乙醇酸磷酸酶 (phosphoglycolate phosphatase, PP)、组氨酸水合酶 (urocanate hydratase, UH)、甜菜碱醛脱氢酶 (betaine-aldehyde dehydrogenase, BD)、组氨酸解氨酶 (histidine ammonia-lyase, HA)、环吡喃蝶呤单磷酸合成酶 (cyclic pyranopterin monophosphate synthase, CPMS)。其中组氨酸在 HA 作用下形成尿刊酸, 进一步在 UH 作用下形成 4-咪唑啉酮-5-丙酸酯富集于组氨酸代谢通路。另外, HK 使组氨酸磷酸化, 进而调节细菌的毒力和耐药性表达。甜菜碱可由甜菜醛在 BD 作用下形成, 富集于代谢通路、ABC 转运蛋白、甘氨酸、丝氨酸及苏氨酸代谢通路。S-腺苷甲硫氨酸由 SAM 催化合成, 富集于氨基酸的生物合成、辅因子的生物合成、硫代谢、半胱氨酸和甲硫氨酸代

谢、精氨酸和脯氨酸代谢通路。磷酸乙醇酸在 PP 作用下形成, 富集于乙醛酸、二羧酸代谢、碳代谢。

2.3 雀石蕊抗菌化合物与差异代谢物相关蛋白的分子对接

分子对接结合能越低, 表示亲和力越高, 一般认为对接结合能小于 -5 kcal/mol 判断为结合良好^[16,17]。本次对接结果显示 PBP2A、NorA 以及尿刊酸、组氨酸、甜菜碱、S-腺苷甲硫氨酸等差异代谢物涉及的蛋白酶分别与雀石蕊中的松萝酸、珠光酸、黑茶渍素、去甲环萝酸和亚油酸(分子式见表 3)均有结合潜力(见表 4), 初步验证了代谢组学的结果, 同时表明 PBP2A、NorA 可能是雀石蕊的抗菌靶点。选取结合能小于 -8.0 kcal/mol 的蛋白与配体构象进行分子对接结果可视化(见图 4), 结果显示各蛋白酶与化合物都能形成氢键相互作用。

表 3 雀石蕊中的抗菌化合物

Table 3 Antibacterial compounds in *C. stellaris*

序号 No.	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	参考文献 Reference
1	松萝酸 Unsic acid	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	18
2	珠光酸 Perlatolic acid	C ₂₅ H ₃₂ O ₇	18
3	黑茶渍素 Atranorin	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	18
4	去甲环萝酸 Evernic acid	C ₁₇ H ₁₆ O ₇	9
5	亚油酸 Linoleic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	19

表 4 分子对接结合能

Table 4 Molecular docking binding energies

蛋白名称 Protein name	结合能 Binding energy (kcal/mol)				
	去甲环萝酸 Evernic acid	松萝酸 Unsic acid	黑茶渍素 Atranorin	珠光酸 Perlatolic acid	亚油酸 Linoleic acid
NorA	-8.8	-7.0	-8.0	-6.4	-5.9
PBP2A	-7.9	-8.5	-7.3	-6.6	-5.5
SAM	-6.8	-6.9	-8.2	-6.3	-5.7
HK	-7.0	-6.0	-8.1	-7.0	-5.3
GTPC	-7.4	-8.0	-7.7	-7.4	-4.9
PP	-7.7	-8.0	-7.4	-7.8	-5.5
UH	-7.8	-6.6	-7.9	-7.8	-6.1
BD	-7.9	-7.1	-7.0	-6.2	-4.9
HA	-7.2	-7.0	-6.8	-6.7	-6.0
CPMS	-6.7	-6.2	-7.2	-6.7	-4.6

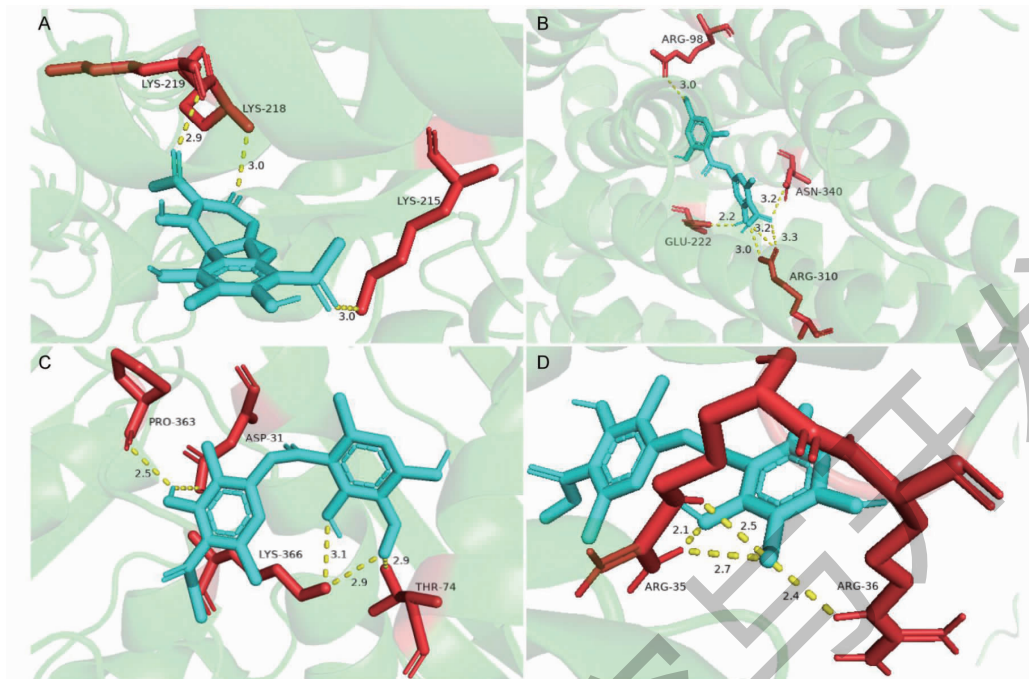


图4 雀石蕊抗菌成分与蛋白靶点分子对接可视化图

Fig. 4 Visualization of molecular docking between antibacterial components and protein targets of *C. stellaris*

注:A:PBP2A与松萝酸;B:NorA与去甲环萝酸;C:SAM与黑茶渍素;D:HK与黑茶渍素。Note:A:PBP2A and unsaturated fatty acid;B:NorA and evermic acid;C:SAM and atranorin;D:HK and atranorin.

3 讨论与结论

雀石蕊富含多种酚类、酚酸类和缩酚酸类化合物,是抗菌素的重要来源^[5],研究表明,酚酸类及缩酚酸类物质主要是通过破坏菌体包被结构、螯合金属离子、抑制多药外排系统、增强机体免疫力等^[20]而发挥抗菌作用,但具体的抗菌靶点及作用模式尚不清楚。为进一步探究雀石蕊抗菌作用机制,本文以 MRSA 为指示菌,利用代谢组学和分子对接研究雀石蕊抗 MRSA 的机理,为后续探究雀石蕊抗 MRSA 机制和应用提供依据,为地衣酚类、酚酸类、缩酚酸类抗菌物质的作用机制提供参考依据。

在探究雀石蕊抗 MRSA 机理之前,我们采用体外抗菌实验先明确其抗菌活性,结果表明,雀石蕊对多种革兰氏阳性菌如球菌,以及部分革兰氏阴性菌,如甲型副伤寒杆菌、肺炎克雷伯杆菌具有良好的体外抗菌活性,与其他地衣相比,它具有较宽的抗菌谱。与单增李斯特氏菌相比,雀石蕊对斯氏李斯特氏菌抑制作用更强,表现为极度敏感,这与单增李斯特氏菌更强的抵抗化学胁迫能力有关^[21]。对李斯特氏菌展现出良好的抗菌活性,表明雀石蕊具有开发为冷藏食品天然保鲜剂的潜能。值得关注的是,雀石蕊对 MRSA 的敏感性高于金黄色葡萄球菌,而

MRSA 耐药产生正是抗生素与其细胞膜上耐药蛋白 PBP2A 亲和力降低和或 MRSA 细胞膜上的多药外排泵把抗生素从细胞内部排出到细胞外,从而使抗生素失效等^[22],因此 PBP2A 和多药外排泵均可能作为雀石蕊的抗 MRSA 蛋白靶点。

明确雀石蕊对 MRSA 具有较好抗菌活性之后,运用代谢组学方法获取雀石蕊处理 MRSA 后的差异代谢物变化及其相关蛋白,以分析其抑菌机理。结果显示,雀石蕊处理 MRSA 菌体后,共检测到 20 种显著差异代谢物。与对照组相比,亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸显著上调,研究表明,较高含量的支链氨基酸会显著阻碍糖类的代谢,从而影响细菌的生命活动^[23]。尿刊酸上调,尿刊酸是组氨酸脱氨过程形成谷氨酸的代谢中间体,谷氨酸经谷氨酸脱氢酶转氨形成 α -酮戊二酸参与三羧酸循环,表明雀石蕊干扰组氨酸代谢从而影响三羧酸循环。值得关注的是,最近提出的抗菌策略是针对 MRSA 的“双组分系统”(two-component systems),MRSA 依赖它们的双组分系统来感应外界温度、PH 等各种胁迫,从而调节毒力因子及耐药性表达,这个双组分系统包括了组氨酸激酶感应器和一个效应调节蛋白(response regulator)^[24]。当 MRSA 感受到外界刺激时,细胞膜

上的 HK 使组氨酸磷酸化,随后,转运到效应调节蛋白上,从而调控细菌的响应。本研究中组氨酸下调,可能是细菌应对化学胁迫被大量消耗所致。与此同时,甜菜碱上调,甜菜碱又名三甲基甘氨酸,由甘氨酸甲基化形成,在细胞中具有调节渗透压,保护细胞结构的作用,而甜菜碱过多会导致细胞膜渗透性增加^[3]。另一方面,甜菜碱作为甲基供体,参与同型半胱氨酸代谢,与生物体氧化应激反应有关,表明雀石蕊处理 MRSA 后,导致菌体内部渗透压和氧化还原稳态失调。S-腺苷甲硫氨酸显著下调,S-腺苷甲硫氨酸是一种存在于所有生命体中的重要代谢中间体,由 SAM 催化腺苷三磷酸和甲硫氨酸合成,承担着转甲基、转硫和转氨丙基的作用^[25]。甲硫氨酸在比较组间并没有显著差异,但其产物 S-腺苷甲硫氨酸下调,说明雀石蕊可能抑制了 SAM 的活性或者限制了其生物合成,从而下调 S-腺苷甲硫氨酸。磷脂的甲基化反应以 S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体,将磷脂酰乙醇胺转换成卵磷脂,这种转换的比率决定了膜的流动性和黏性,在维持细胞膜的完整性中起着重要的作用^[26]。同时,二十一碳酸是饱和的脂肪酸,其含量显著上调,而膜脂质层中饱和脂肪酸含量升高可增加细胞膜的硬度,降低膜流动性^[27]。这些说明雀石蕊可抑制细胞膜成分合成,且通过干扰脂类代谢而影响菌体细胞膜功能。

代谢组学分析获取雀石蕊抗 MRSA 的潜在蛋白靶标,进一步采用分子对接进行初步验证,结果显示,以结合能小于-8.0 kcal/mol 为指标,筛选出结合潜能较大的 HK、PBP2A 和 NorA 均是目前研究热门的抗菌靶点, HK 是 MRSA 的“双组分系统”成员之一,参与调节细菌的毒力与耐药性^[24]; PBP2A 是 β -内酰胺类抗生素主要的耐药靶点, NorA 是金黄色葡萄球菌对喹诺酮类抗生素耐药靶点之一^[22]。另外, SAM 催化合成的 S-腺苷甲硫氨酸在细菌中参与转甲基、转硫等多种过程,是重要代谢中间体^[26]。这表明 HK、PBP2A、NorA 和 SAM 可为雀石蕊抗 MRSA 的 4 个潜在不同靶点。研究表明,单一靶点药物组合或多靶点药物是防止耐药性发展的最佳策略^[28],本研究中,雀石蕊具有多靶点抗菌的潜能。因此,后续课题组将采用靶向蛋白组学技术,验证雀石蕊抗菌成分对上述 4 个潜在抗菌靶点表达的影响。本研究为后期明确雀石蕊抗 MRSA 的分子机制提供了研究思路与方向。此外,也可以进一步探索地衣中其他潜在的抗菌成分,为开发新型抗菌剂

提供更广阔的空间。

参考文献

- Redelman CV, Chike M, Anderson GG. Alcohol treatment enhances *Staphylococcus aureus* biofilm development[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2012, 66: 411-418.
- Shen Y. Screening, identification and evaluation of biocontrol yeasts against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [D]. Changchun: Jilin University (吉林大学), 2022.
- Liu MM, Yang K, Wang J, et al. Young astringent persimmon tannin inhibits methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from pork[J]. LWT-Food Sci Technol, 2019, 100: 48-55.
- Zhou X, Yang CL, Meng QF, et al. Chemical constituents of an endolichenic fungus *Daldinia childiae* [J]. Mycosystema (菌物学报), 2021, 40: 40-47.
- Wang LS, Qian ZG. Illustrated Medicinal Lichens of China (中国药用地衣图鉴) [M]. Kunming: Yunnan Science and Technology Press, 2013.
- Noël A, Garnier A, Clément M, et al. Lichen-associated bacteria transform antibacterial usnic acid to products of lower antibiotic activity[J]. Phytochemistry, 2021, 181: 112535.
- Zhang SJ, Meng L, Ma L, et al. Chemical constituents of *Cladonia stellardis* (Opiz) [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2012, 34: 297-300.
- Manojlovic NTRA. Determination of chemical composition and antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of lichens *Parmelia conspersa* and *Parmelia perlata* [J]. J Food Meas Charact, 2021, 15: 686-696.
- Baris, Gökalsın, Nüzhet, et al. Lichen secondary metabolite evernic acid as potential quorum sensing inhibitor against *Pseudomonas aeruginosa* [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2016, 32: 150.
- Wang J, Zhao H, Guo Q, et al. Identification and antibacterial activity of *Thamnomia vermicularis* and *Thamnomia subuliformis* [J]. J Microbiol Methods, 2022, 203: 106628.
- Ze-Hua, Li, Ming, et al. Antibacterial activity and mechanisms of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* [J]. Molecules, 2019, 24: 1577.
- Liu GR, Gao YK, Wang X, et al. Antibacterial activity and mechanism of bifidocin A against *Staphylococcus aureus* [J]. Food Sci (食品科学), 2017, 38: 1-7.
- Alseekh S, Aharoni A, Brotman Y, et al. Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices [J]. Nat Methods, 2021, 18: 747-756.
- Yang P, Chai Y, Wei M, et al. Mechanism of salidroside in

- the treatment of endometrial cancer based on network pharmacology and molecular docking [J]. *Sci Rep*, 2023, 13: 14114.
- 15 Liu YY, Yu LH, Zhang J, et al. Network pharmacology-based and molecular docking-based analysis of suanzaoren decoction for the treatment of Parkinson's disease with sleep disorder[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021;1752570.
- 16 Wei X, Hu JH, Cheng M, et al. Mechanism of *Solanum nigrum* in treatment of breast cancer based on network pharmacology, molecular docking and *in vitro* experimental verification[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2023, 35:1782-1793.
- 17 Wu FX. Novel molecular modelling methods research for protein-protein/ligand interaction [D]. Wuhan: Central China Normal University(华中师范大学), 2019.
- 18 Zhao XF. Study on chemical constituents in two species of lichens plant from Heilong-Jiang[J]. *Bull Bot Res* (植物研究), 1999, 19:457-460.
- 19 Zhang TL. Research on antibacterial effect of extractive chemical compounds from coriander and its essential oil stability[D]. Yanji: Yanbian University(延边大学), 2017.
- 20 Wang J. Research progress on antibacterial effects of phenolic acid compounds[J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2022, 44:1906-1911.
- 21 Chai WQ. The investigation of survival rate and antibiotic resistance of *Listeria* spp. in response to the various environment stress during the food processing [D]. Hangzhou: Zhejiang University(浙江大学), 2022.
- 22 Shahkarami F, Rashki A, Rashki Ghalehnoo Z. Microbial susceptibility and plasmid profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-susceptible *S. aureus* [J]. *Jundishapur J Microbiol*, 2014, 7:e16984.
- 23 Newgard CB, An J, Bain JR, et al. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance [J]. *Cell Metab*, 2009, 9:311-326.
- 24 Espinasse A, Goswami M, Yang J, et al. Targeting multidrug resistant *Staphylococcus* infections with bacterial histidine kinase inhibitors[J]. *Chem Sci*, 2023, 14:5028-5037.
- 25 Li MJ, Mi ZY, Wang JH, et al. Microbial production of *S-adenosyl-L-methionine*: a review [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2023, 39:2248-2264.
- 26 Luo YX, Zhao FK, Luo GM, et al. Research and development of *S-adenosyl-L-methionine* [J]. *Ind Microbiol* (工业微生物), 2006, 36:54-59.
- 27 Liu MM. Transcriptome and metabolome revealed antibacterial mechanism of persimmon tannin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from pork [D]. Yangling: Northwest A&F University(西北农林科技大学), 2019.
- 28 Baym M, Stone LK, Kishony R. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance [J]. *Science*, 2016, 351: 40.
- (上接第 1678 页)
- 20 Chu R, Li N, Chen YL, et al. HPLC fingerprint and chemical composition analysis of *Gastrodia elata* produced in Chongqing by different processing method [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2021, 41:1621-1633.
- 21 Wen R, Li C, Yan LP, et al. Optimization of processing technology of *Sarcardra glabra* based on multi-index evaluation method [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2019, 50: 2868-2875.
- 22 Duan JA, Yan H, Su SL, et al. Establishment and practice for evaluating model of best harvest time of traditional Chinese medicinal materials [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2010, 41:1755-1760.
- 23 Dai Y, Li W, Liang SS, et al. Research on evaluating *Eucommia ulmoides* Oliv processing methods and harvesting period based on multiple indexes [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2022, 33:1727-1731.