

小檗碱抑制金黄色葡萄球菌诱导的人静脉内皮细胞凋亡作用研究

熊传银^{1△} 傅泳航² 胡汉斌¹ 毕爱芬¹ 裴德翠¹

摘要 **目的** 探讨小檗碱(Berberine, BBR)对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)诱导人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 凋亡的抑制作用。**方法** BBR 预处理 ECV-304 细胞 2 h 后,按细胞与细菌比例为 1:100 感染复数的 *S. aureus* 感染细胞,MTT 法检测细胞活性,采用 Hoechst 33258 染色观察细胞形态学变化, DNA Ladder 检测 BBR 对感染细胞的保护作用。**结果** ECV-304 细胞活性受 BBR 影响不明显, *S. aureus* 感染可显著降低 ECV-304 细胞活性($P < 0.05$), 128 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的 BBR 可更好的保护细胞免受 *S. aureus* 的影响。用 BBR 预处理 ECV-304 后再感染 *S. aureus* 可抑制 *S. aureus* 诱导的细胞活性的降低($P < 0.05$), 并减少细菌诱导的细胞凋亡, 凋亡小体明显减少, 并且 DNA 降解不明显。**结论** BBR 可以抑制 *S. aureus* 诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡。

关键词 小檗碱;金黄色葡萄球菌;人脐静脉内皮细胞;凋亡

Berberine Inhibited Apoptosis of Human Umbilical Vein Endothelial Cells Induced by *Staphylococcus aureus*: an Experimental Research XIONG Chuan-yin¹, FU Yong-hang², HU Han-bin¹, BI Ai-fen¹, and PEI De-cui¹ 1 Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Guangzhou (510800), China; 2 Department of Clinical Laboratory, The 458th PLA Hospital, Guangzhou (510600), China

ABSTRACT **Objective** To study the inhibition of berberine (BBR) against ECV-304 apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). **Methods** ECV-304 cells were pre-treated with 128 $\mu\text{g/mL}$ BBR for 2 h and then *S. aureus* was added (1:100). The viability of cells was detected by MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. The morphological changes were observed by Hoechst 33258 staining. The protection of BBR for infected cells was detected by DNA Ladder. **Results** ECV-304 cells' viability were not obviously affected by berberine. But *S. aureus* induced ECV-304 cells' viability could be significantly inhibited by pre-treatment of BBR ($P < 0.05$). Besides *S. aureus*-induced ECV-304 apoptosis could be reduced, with significantly lessened apoptotic body and unobvious DNA degradation. **Conclusion** BBR could significantly inhibit *S. aureus* induced ECV-304 apoptosis.

KEYWORDS berberine; *Staphylococcus aureus*; human umbilical vein endothelial cell; apoptosis

金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)是一类能引起人与动物皮肤黏膜及多组织化脓性炎症及中毒性疾病的主要病原菌,它可能黏附并进入多种细胞诱导细胞发生凋亡,从而引起组织损伤及感染的扩散而致病^[1]。*S. aureus* 是宫内感染常见的病原菌,研究表明,它可

以通过引起内皮细胞微管和微丝两种细胞骨架形态的动态变化而侵袭内皮细胞,导致内皮细胞凋亡及宫内感染的发生,从而影响胎儿的生长发育^[1,2],抑制 *S. aureus* 对细胞的凋亡作用并对其引起的感染具有一定的治疗价值。小檗碱(Berberine, BBR)又名黄连素,是一种异喹啉类生物碱,它具有抗分泌、抗炎、抗微生物和抗肿瘤特性,其抗菌作用显著,抗菌谱广,对葡萄球菌属、链球菌属、炭疽芽孢杆菌、痢疾志贺菌均有强的抑制作用^[3]。研究表明,BBR 能改善炎症细胞因子诱导的肠上皮细胞内质网压力,下调细胞内 JNK 的磷酸化及 caspase-12 和 caspase-3 水平,从而抑制炎症细胞因子诱导的细胞凋亡^[4]。本研究旨

基金项目:广东省中医药管理局科研课题资助项目(No. 20121029)

作者单位:1. 广东省广州市中西医结合医院检验科(广州 510800);2. 解放军第四五八医院检验科(广州 510600)

[△] 现在广东省广州市花都区人民医院(广州 510800)

通讯作者:裴德翠, Tel: 13501529568, E-mail: peidecui999 @

163.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2014. 06. 0710

在观察 BBR 是否可以抑制 *S. aureus* 诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡, 了解 BBR 抗 *S. aureus* 感染机制, 为治疗其感染提供理论依据。

材料与方法

1 菌株与细胞系 *S. aureus* 标准菌株 ATCC25923 购自卫生部临床检验中心, 培养基为哥伦比亚血琼脂平板(梅里埃)及 LB 培养基(Oxoid)。ECV-304 由四川大学华西基础与法医学院微生物教研室保存并提供, 细胞培养基为 RPMI1640(Hyclone)。

2 试剂与仪器 盐酸小檗碱购自本院药房(康和药业, 产品批号: 120602), RPMI1640 培养基和胎牛血清(Hyclone, SH30809.01B), MTT 试剂(Sigma, M2128), 细胞凋亡-Hoechst33258 染色试剂盒(Beyotime, C0003), TRIzol 试剂(Invitrogen, 15596-026)。酶联免疫检测仪(DNM-9602, 北京普朗新公司), 全自动倒置荧光显微镜(Ti-E/U/S, NIKON), 凝胶成像仪(Bio-RAD, 美国)。

3 药物 盐酸小檗碱, 用无菌去离子水配制成 2 048 $\mu\text{g/mL}$ 的药液, 0.22 μm 滤膜过滤除菌后分装于灭菌的 EP 管中, 置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

4 细菌和细胞培养 将甘油保存的标准菌株转种血琼脂平板, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜培养, 取单菌落接种于 3 mL LB 液体培养基, 置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱, 200 r/min 振荡过夜, 至细菌生长平台期。ECV-304 在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养 24 h, 取对数生长期的细胞进行实验。

5 细胞分组及干预方法 细胞分组: 对照组(不加 *S. aureus* 及 BBR 处理); *S. aureus* 组(不加 BBR 预处理, 直接加入 *S. aureus* 诱导); BBR + *S. aureus* 组。铺 96 孔板, 每孔加入 200 μL 细胞稀释液, 使待测细胞调密度至 5 000 ~ 10 000 个/孔, 除对照孔外, 其他孔分别加入不同浓度(0、32、64、128、256、512 $\mu\text{g/mL}$) 的 BBR 作预处理。

6 检测指标及方法

6.1 细胞毒性的检测 采用 MTT 法检测。不同浓度(0、32、64、128、256、512 $\mu\text{g/mL}$) BBR 作用 ECV-304 细胞 48 h 后每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL (终浓度为 0.5% MTT), 继续孵育 4 h, 小心吸去孔内培养液, 每孔加入 150 μL DMSO, 置摇床上低速振荡 15 min, 使结晶物充分溶解, 在酶联免疫检测仪 OD 492 nm 处测量各孔的吸光值(OD)^[5]。分析 BBR 是否可以影响细胞活性并具有浓度依赖性。

6.2 细胞最佳保护浓度的检测 采用 MTT 法检

测。用不同浓度 BBR 处理细胞 2 h 后, 按细胞: 细菌为 1:100 的比例加入 *S. aureus*, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 条件下培养 24 h, 然后按 6.1 方法检测细胞活性和 BBR 预处理实验细胞的最佳保护浓度以备后续实验采用。

6.3 细胞形态学观察 采用 Hoechst 33258 染色方法。细胞 24 h 培养后吸尽培养液, 加入 Hoechst 试剂盒提供的固定液室温固定 30 min, PBS 洗 2 次, 避光加入 0.5 mL Hoechst33258 染色液染色 5 min, PBS 洗 2 次, 倒置荧光显微镜下观察细胞形态。计算凋亡细胞数, 随机选择 5 个 200 倍视野, 计数视野中凋亡细胞数目。

6.4 DNA Ladder 检测细胞凋亡 24 h 培养后用 1.5 mL EP 管收集 ECV-304 细胞, 冰冷的 PBS 洗 2 次, 加入 100 μL 裂解液(1% NP-40, 20 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris-Cl, 5% 葡萄糖, pH 7.5) 充分混匀, 室温 1 h 裂解细胞, 采用醋酸铵及无水乙醇抽提细胞 DNA, 80V 2% 的琼脂糖电泳 1 h, 凝胶成像分析仪观察并记录结果。

7 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 两两比较用 Turkey 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 BBR 的细胞毒性检测(图 1) 实验结果表明 ECV-304 细胞活性受 BBR 影响及浓度依赖性均不明显。

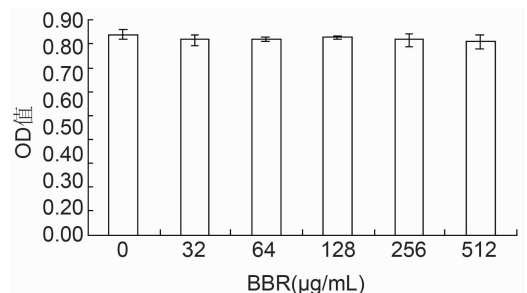
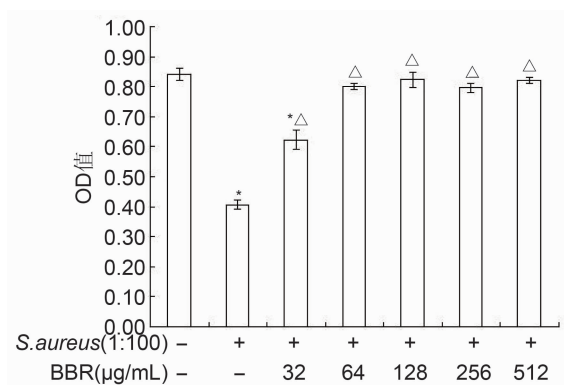


图 1 各浓度 BBR 的细胞毒性比较

2 BBR 最佳保护浓度(图 2) 实验结果表明 *S. aureus* 可显著降低细胞活性($P < 0.05$), 用 BBR 预处理 ECV-304 可明显恢复细胞活性($P < 0.05$), 128 $\mu\text{g/mL}$ (OD 值最大) 浓度的 BBR 可更好地保护细胞免受 *S. aureus* 的影响。后续实验均采用 128 $\mu\text{g/mL}$ BBR 预处理 ECV-304 细胞前后加入 1:100 感染复数的 *S. aureus* 感染细胞。



注:与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 *S. aureus* 组比较, $^{\Delta}P < 0.05$; - 表示不加 *S. aureus* 及 BBR 处理, “+ -” 表示直接加入 *S. aureus* 诱导, 不加 BBR 预处理

图2 BBR 对细胞的保护作用

3 各组细胞形态学变化比较(图3) 采用 Hoechst 33258 染色方法。对照组细胞无明显凋亡出现, *S. aureus* 感染细胞可诱导细胞凋亡, 细胞核呈致密浓染, 或呈碎块状致密浓染, 颜色有些发白, 凋亡小体明显, BBR 预处理细胞可显著性抑制 *S. aureus* 诱导的细胞凋亡, 只有少量细胞出现核浓缩现象。

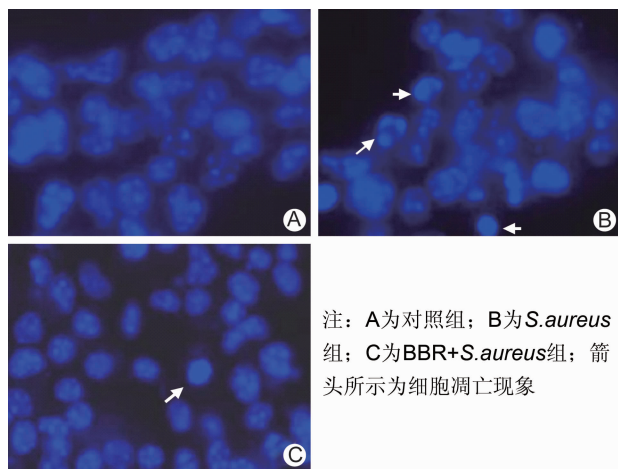
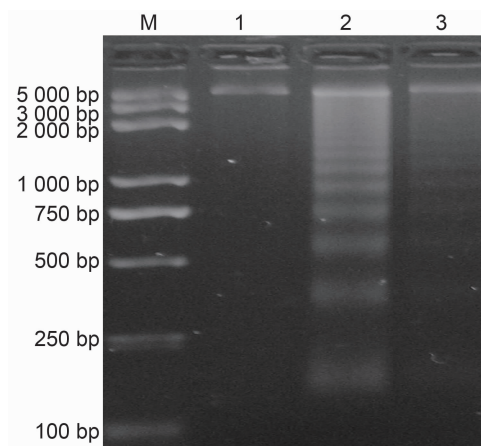


图3 各组细胞形态学变化
(Hoechst 33258 染色, $\times 200$)

4 各组细胞凋亡比较(图4) 结果表明, 没感染细菌的细胞为一条明显的 DNA 带, 没出现核酸片段, 感染 24 h 后 DNA 被切割明显, 核酸片段增多, 出现 DNA ladder, 用 BBR 预处理 2 h 后可见 DNA 带不明显。

讨 论

本研究结果显示, BBR 对 *S. aureus* 诱导的 ECV-304 细胞凋亡具有保护作用, 当用 BBR 预处理细



注: M 为 DNA Marker; 1 为对照组; 2 为 *S. aureus* 组; 3 为 BBR + *S. aureus* 组

图4 各组 DNA Ladder 图

胞后再用 *S. aureus* 感染, 细胞活性显著性恢复, 细胞 Hoechst 33258 染色表明核致密浓染及凋亡小体显著性减少, DNA 降解比未用 BBR 预处理的细胞明显少见。有研究表明, *S. aureus* 可诱导 ECV-304 细胞凋亡^[6], 本实验结果也表明 *S. aureus* 能诱导 ECV-304 细胞凋亡, 这可能是导致其在机体内扩散, 引起组织器官感染的机制之一。抑制 *S. aureus* 诱导的 ECV-304 凋亡对治疗感染具有重大意义。有文献表明 BBR 能抑制肠上皮、胰岛及胸腺等细胞的凋亡^[6,7], 本实验表明 BBR 可以抑制 *S. aureus* 诱导的 ECV-304 细胞凋亡。

S. aureus 是医院感染和社区感染的重要病原菌之一, 该菌感染力强, 可引起局部化脓性感染、也可引起肺炎、伪膜性肠炎、心包炎等, 甚至可引起败血症、脓毒血症等全身感染及中毒性疾病, 如中毒性休克综合征、烫伤样皮肤综合征及食物中毒等^[8]。在医院获得性感染中, *S. aureus* 为最常见革兰阳性球菌之一, 侵袭性 *S. aureus* 感染常可导致患者死亡。上世纪 40 年代青霉素应用于临床后患者的预后获显著改善, 但不久便出现产青霉素酶的耐药菌株, 甲氧西林等耐青霉素酶能有效抑制该耐药株。随后迅即出现遍布世界各地医院的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA), 该菌对所有 β 内酰胺类抗生素耐药。MRSA 治疗难度大, 病死率高, 成为医院感染中的严重问题, 已与乙型肝炎、艾滋病并列为世界三大感染性疾病, 成为全球性公共卫生问题之一, 尤其是对万古霉素耐药的金黄色葡萄球菌 (vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, VRSA) 的出现使得抗生素的选择愈需谨

慎^[9]。以杀死耐药菌为目标是抗菌药物筛选研究的主要策略,但细菌很快又对新的抗菌药物产生耐药性。

BBR 是一种异喹啉类生物碱,它具有广泛的药理学和生物学活性^[10]。研究发现,BBR 能干扰细菌糖代谢中间环节丙酮酸的氧化脱羧过程,从而抑制细菌的生长;它可与细菌 DNA 结合,影响 DNA 的复制,干扰细菌生长繁殖;BBR 还可通过导致核糖体和细胞壁的改变干扰细菌蛋白质生物合成,发挥抗菌作用^[11,12]。BBR 可增加 MRSA 对 β -内酰胺类抗生素的敏感性,两者联用对 MRSA 有协同抗菌作用^[13]。

S. aureus 感染导致炎症,炎症促进组织坏死,组织的损伤可能是细胞凋亡所致。研究表明,金黄色葡萄球菌可诱导上皮细胞,淋巴细胞和巨噬细胞凋亡^[14]。Wang JH 等^[14-16]的研究发现,*S. aureus* 诱导原始单核细胞和人单核细胞系 U937 细胞的凋亡,PI3K/Akt 途径及核转录因子- κ B (NF- κ B)与 *S. aureus* 诱导的细胞凋亡有关,感染细胞内磷酸化 Akt 及抗凋亡蛋白 NF- κ B 的表达下调,而促凋亡的细胞因子 Bax 和 caspase-3 表达上调且促进 caspase-3 的激活。调节宿主细胞凋亡是许多病原微生物逃避宿主免疫反应的一种重要方式,如沙门氏菌属、志贺氏菌属和耶尔森氏菌属通过诱导巨噬细胞凋亡来避免免疫细胞的打击^[13]。*S. aureus* 黏附并进入血管内皮细胞、多种上皮细胞、成骨细胞,发生内在化,并诱导细胞发生凋亡,从而引起组织损伤而致病,抑制 *S. aureus* 诱导的细胞凋亡对治疗其感染具有重要意义,特别是耐药性 *S. aureus* 的引起感染。BBR 作为传统的抗炎、抗菌中药成分,对 *S. aureus* 引起的细胞凋亡具有保护作用。

本研究采用 *S. aureus* 感染 ECV-304 为体外感染模型,观察中药抗菌成分 BBR 对 *S. aureus* 引起的脐静脉内皮细胞凋亡。结果表明 BBR 可以抑制 *S. aureus* 诱导的 ECV-304 细胞凋亡,但具体诱导凋亡的途径还有待进一步研究。本实验结果通过对 BBR 抗 *S. aureus* 凋亡的观察,为以后找到一种理想、有效而不会产生耐药性的预防及治疗 *S. aureus* 感染的中药成分提供实验依据,为形成具有我国特色的中药防治感染性疾病的体系提供支持。

参 考 文 献

- [1] 刘霞,苗正友,徐水凌,等. 金黄色葡萄球菌对人脐静脉内皮细胞、人羊膜细胞骨架重排及其诱导凋亡的作用[J]. 中华医学杂志, 2009, 89(45): 3215-3219.
- [2] 苗正友,徐营,李平,等. 金黄色葡萄球菌侵入人脐静脉

内皮细胞初期细胞骨架的动态变化[J]. 浙江医学, 2010, 32(3): 359-361.

- [3] 方波,周成合,周向东. 小檗碱类抗微生物化合物研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2010, 37(2): 105-109.
- [4] Hao XH, Yao AL, Gong JF, et al. Berberine ameliorates pro-inflammatory cytokine-induced endoplasmic reticulum stress in human intestinal epithelial cells *in vitro* [J]. Inflammation, 2012, 35(3): 841-849.
- [5] 王娟娟,贾山岭,万新军,等. MTT 法测定棉酚对多浪羊淋巴细胞生长的影响[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(5): 1098-1101.
- [6] 刘婷婷,刘从森,管俊昌,等. 金黄色葡萄球菌仅溶血素诱导脐静脉内皮细胞凋亡机制的研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26(6): 569-571.
- [7] Chueh WH, Lin JY. Berberine, an isoquinoline alkaloid, inhibits streptozotocin-induced apoptosis in mouse pancreatic islets through down-regulating Bax/Bcl-2 gene expression ratio [J]. Food Chem, 2012, 132(1): 252-260.
- [8] 谢旭华,王丽丽,龚凤云,等. 金黄色葡萄球菌诱导小肠上皮细胞炎性反应及凋亡作用的观察[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2011, 40(4): 379-384.
- [9] 马春花. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染的研究进展[J]. 中国实用医药, 2011, 6(17): 237-238.
- [10] 钟祥,李应东. 小檗碱药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2012, 8(3): 185-186.
- [11] 方波,周成合,周向东. 小檗碱类抗微生物化合物研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2010, 37(2): 105-109.
- [12] 郝乘仪,李妍,张秀荣. 小檗碱药理作用研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2008, 2(5): 295-297.
- [13] 陈广灿,周树勤,刘淑慧,等. 小檗碱与 β -内酰胺类抗生素对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的协同抗菌作用[J]. 广东医学, 2011, 32(14): 1812-1814.
- [14] Wang JH, Zhou YJ, Tian L, et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt and nuclear factor- κ B are involved in *Staphylococcus aureus*-induced apoptosis in U937 cells [J]. Chin Med Sci J, 2009, 24(4): 231-235.
- [15] Fraunholz M, Sinha B. Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2012, 2(43): 1-10.
- [16] Wang JH, Zhou YJ, He P. *Staphylococcus aureus* induces apoptosis of human monocytic U937 cells via NF- κ B signaling pathways [J]. Microbial Pathogenesis, 2010, 49(5): 252-259.

(收稿:2013-03-26 修回:2014-02-22)