

黄连总生物碱对结核菌 PhoPR 双组份系统 基因转录水平影响的研究

曾范利¹, 于丹², 姜园园¹, 时坤¹, 李健明¹, 宗颖¹, 赵丹³, 杜锐^{1,4*}

(1. 吉林农业大学中药材学院, 长春 130118; 2. 长春市动物疫病预防控制中心, 长春 130061;

3. 吉林农业大学农业质量标准与检测技术研究中心, 长春 130118; 4. 吉林省梅花鹿生产与产品应用研究室, 长春 130118)

[收稿日期] 2016-08-08 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 09-0006-05 [中图分类号] S852.61

[摘要] 为研究黄连总生物碱对结核菌 PhoPR 双组份系统基因转录水平的影响, 对不同药物作用的菌液提取总 RNA 并进行反转录, 根据 GenBank 中 H37Rv 的 PhoP (0757) 基因、PhoR (0758) 基因和 SigA 的基因序列, 应用 Primer6.0 软件设计荧光定量引物并进行荧光定量 PCR 分析。结果显示: 在高浓度黄连生物碱作用时, 多药耐药结核菌 MT-7、MB-1 的 PhoP 和 PhoR 的基因的表达水平明显下降, 并且黄连总生物碱与 RFP 联合作用时, 多药耐药结核菌 MT-7、MB-1 的 PhoP 和 PhoR 的基因的表达水平明显下降, 表明黄连生物碱是 RFP 抗菌增效剂。本试验为结核菌抗菌增效作用机制研究奠定了理论基础。

[关键词] 黄连总生物碱; 结核菌; PhoPR 双组份系统; 转录水平

Study on the Effect of Transcriptional Level on PhoPR Two-component System Genes by *Coptis chinensis* Total Alkaloids

ZENG Fan-li¹, YU Dan², JIANG Yuan-yuan¹, SHI Kun¹,

LI Jian-ming¹, ZONG Ying¹, ZHAO Dan³, DU Rui^{1,4*}

(1. College of Chinese Medicine Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Changchun Prevention and Control Center of Animal Disease, Changchun 130061, China;

3. Research Center of Agriculture Quality Standard and Detecting Technique, Jilin Agriculture University, Changchun 130118, China;

4. Laboratory of Production and Product Application of Sika Deer of Jinlin Province, Changchun 130118, China)

Abstract: To study the effect of transcriptional level on PhoPR two-component system genes by *Coptis chinensis* total alkaloids, the different concentrations of *Coptis chinensis* total alkaloid or in combination with RFP were applied to detect sensitivity to MT-7, MB-1 and H37Rv. Then the total RNA was extracted and reverse transcribed. The expression level of PhoP and PhoR genes belonging to the PhoPR two-component system which was related to drug resistance were analyzed and compared by realtime fluorescence quantitative PCR. The results showed that the expression level of PhoP and phoR of MT-7, MB-1 was decreased significantly with the high

基金项目: 吉林省科技厅重点科技攻关项目(20150204028NY); 吉林省科技厅科技成果转化促进计划(20140309018YY)

作者简介: 曾范利, 讲师, 博士, 从事经济动物疫病与病原学研究。

通讯作者: 杜锐。E-mail: durui71@126.com

concentration of total alkaloids from *Coptidis rhizoma*. The expression of level of PhoP and phoR of MT-7 and MB-1 was decreased significantly by *Coptis chinensis* total alkaloid combined with RFP. The results showed that *Coptis chinensis* total alkaloid was antibacterial synerists of RFP. The result will provide a theoretical basis for mechanism of action of antibacterial synerists.

Key words: *Coptis chinensis* total alkaloids; tuberculosis bacteria; PhoPR two-component system; transcriptional level

鹿结核病是由结核分枝杆菌引起的鹿的慢性消耗性传染病,可侵犯全身各器官,但以肺结核为最多见,严重威胁着养鹿业的健康发展^[1]。病鹿尤其是具有开放性结核的病鹿是人类结核病的主要传染源之一。由于结核分枝杆菌为长期胞内寄生菌,可以长期处于休眠状态,没有有效的疫苗和药物进行控制,为降低结核病给公共卫生和人类带来的危害,大部分发达国家采用检疫和扑杀相结合的方式消除结核病^[2],但是检疫和扑杀不是根除动物结核病和人类结核病的长期有效方法。近年来随着耐药性结核菌株的增加,多药耐药结核病的防治已成为难题^[3]。

结核菌 PhoPR 双组份系统是对外环境变化作出感知的重要系统,在外界环境变化时,PhoPR 双组份系统会对结核分枝杆菌做出相应的调控,使结核分枝杆菌更容易适应生长环境的变化^[4]。有报道表明,PhoPR 可能与结核分枝杆菌的致病力、毒性作用、细胞膜的通透性、外排泵、耐药性和新型疫苗的研制有关^[5]。PhoPR 双组分系在结核分枝杆菌的致病作用中扮演着重要的角色,而且是一个潜在的候选目标^[6]。因此本试验以标准人型结核分枝杆菌 H37Rv 为对照菌株,以鹿源多药耐药结核菌为试验模型菌,选择 PhoPR 双组份系统为研究对象,在国内率先研究本课题组前期筛选出的 RFP 的抗菌增效剂黄连总生物碱对 PhoPR 双组份系统基因表达的影响,初步探讨黄连总生物碱作为结核菌抗菌增效剂的作用机制并且为多药耐药结核病的防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株及试剂 标准人型结核分枝杆菌 H37Rv、鹿源耐药性牛型结核分枝杆菌(MB-1)和

耐药性人型结核分枝杆菌(MT-7)由吉林大学于录教授惠赠;黄连总生物碱为实验室提取保存;利福平(rifampicin, RFP)购于中国药品生物制品检定所;小檗碱(Berberine)购于成都普菲德生物技术有限公司;Middlebrook 7H9 肉汤和 Middlebrook-OADC 增菌液购于 BD Difco 公司; β -巯基乙醇购于 Sigma 公司;DEPC 和缓冲溶液(TE buffer)购于维特杰生物技术有限公司;细菌 RNA 提取试剂盒(RNAPure Bacteria Kit, CW0536)和溶解酶(Lysozyme, CW0887)购于康为世纪公司,SYBR[®] Premix EX Taq[™] II 和 Primescript[™] RT reagent Kit With gDNA Erase 购于大连 TaKaRa 公司。

1.2 菌液及药物菌液的制备 标准菌 H37Rv、鹿源耐药性结核分枝杆菌 MB-1、MT-7 以无菌 7H9 培养基培养 5~10 d 后,将菌液移至含有直径为 1 mm 玻璃珠的 10 mL 的离心管中,于漩涡震荡仪上震荡、打碎,取上层菌液加入与麦氏比浊管同样大小的试管中,以无菌 7H9 肉汤培养基稀释成 1 号麦氏比浊管浓度,并无菌稀释 20 倍制备成 20 mL 的菌液。

黄连总生物碱单用:分别向 H37Rv、MB-1、MT-7 的 20 mL 菌液加入黄连总生物碱,使黄连总生物碱的终浓度为 0、1/4、1/2、1 MIC ($\mu\text{g/mL}$)。加入之后 37 $^{\circ}\text{C}$, 无菌培养 5~10 d,至肉眼可见菌膜生成及对数生长期。

黄连总生物碱与 RFP 联用:分别向 H37Rv、MB-1、MT-7 的 20 mL 菌液加入黄连总生物碱和利福平,终浓度为黄连总生物碱_(单独):1/4MIC ($\mu\text{g/mL}$), RFP_(单独):1/4MIC ($\mu\text{g/mL}$), 黄连总生物碱 1/4MIC ($\mu\text{g/mL}$) + RFP 1/4MIC ($\mu\text{g/mL}$) 及无药空白培养基。加入之后 37 $^{\circ}\text{C}$,

无菌培养 5~10 d,至肉眼可见菌膜生成及对数生长期。

1.3 结核分枝杆菌总 RNA 的提取及反转录 将培养好的菌液移至 2 mL 的离心管中,4 ℃,10000 r/min 离心 4 min 收集菌体,清洗菌液 2 次,然后小心除净上清液,将菌体移至处理好的预冻研钵中,倒入液氮,快速研磨至白粉末状,重复 2 次,然后按照细菌 RNA 提取试剂盒 RNeasy Bacteria Kit – CW0536 说明书操作,获得结核分枝杆菌总 RNA,用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量并用超微量快速核酸测定仪检测总 RNA 含量。采用 Primescript™ RT reagent Kit With gDNA Erase 反转录试剂盒进行去除基因组 DNA 和反转录两步反

应。按照试剂盒说明书进行操作。

1.4 PhoPR 双组份系统的 PhoP、PhoR 基因和 SigA 内参基因的引物设计及荧光定量 PCR 根据 GenBank 中 H37Rv 的 PhoP (0757) 基因、PhoR (0758) 基因和 SigA 的基因序列,应用 Primer6.0 软件设计荧光定量引物如(表 1)并由大连宝生物公司合成。通过梯度 PCR 摸索,PhoP、PhoR 和 SigA 的基因引物的最适宜退火温度分别为 62 ℃、62 ℃、60 ℃。反应的条件为 95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 变性 5 s,60~62 ℃ 退火/延伸 30 s,总共进行 40 个循环,根据荧光信号获得扩增曲线;反应后进行溶解曲线的反应,反应条件为 95 ℃ 15 s,60 ℃ 持续 15 s,从 60 ℃ 增至 95 ℃ 保持 20 min。

表 1 荧光定量 PCR 引物

基因引物	序列(5'→3')	长度/bp	退火温度(Tm)
PhoP – F	GACTATGTGACAAAGCCCTTCAGTT	25	62 ℃
PhoP – R	TGGTTCCTTGTTGCCCTTG	19	
PhoR – F	CGTACCCCGTTGACCACTATC	21	62 ℃
PhoR – R	GCTCGCTTCGCTCTCAATC	19	
SigA – F	TCGTGGAGATCAACTAGCTG	20	60 ℃
SigA – R	CTCGAGCAAAGTGAAGGACA	20	

1.5 数据处理及分析 基因表达量分析以内参为对照,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析方法进行数据的统计分析,通过 SPSS Statistics 17.0 进行差异性检验分析。

2 结果

2.1 总 RNA 的质量与含量的测定结果 H37Rv、MB – 1、MT – 7 的 RNA 的 OD260/OD280 比值均在 1.9~2.0 之间,表明总 RNA 的含量符合要求。通过 RNeasy Bacteria Kit 试剂盒获得 RNA,电泳之后可见两条明显的条带,分别为 16S、23S 条带(图 1),表明总 RNA 的质量符合后续试验的要求。

2.2 PhoP、PhoR 基因的 mRNA 相对表达量 耐药菌株 MB – 1、MT – 7 的 PhoP 的基因表达量分别是 H37Rv 的 16.7 倍和 7.5 倍, $P < 0.05$ 有统计学意义,耐药菌株 MB – 1、MT – 7 的 PhoR 的基因表达量分别是 H37Rv 的 4.7 倍和 8.2 倍,差异有统计学意义 $P < 0.05$ (图 2)。

2.3 黄连总生物碱作用下 PhoP、PhoR 基因的 mRNA 相对表达量 随着黄连浓度的增加,H37Rv 的 PhoP、PhoR 基因的表达处于上升趋势, $P > 0.05$

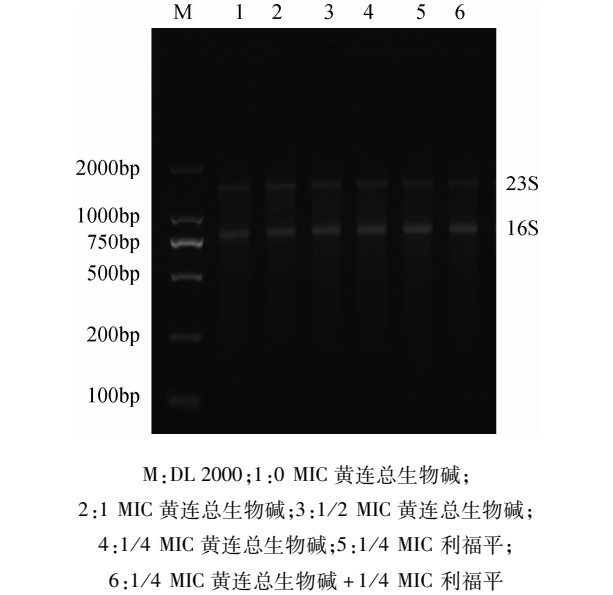


图 1 六个浓度药物作用结核分枝杆菌的 RNA 电泳图

无统计学意义;MB – 1、MT – 7 的 PhoP、PhoR 基因表达处于上升后下降的趋势, $P < 0.05$ 有统计学意义。黄连总生物碱浓度为 1/4 MIC 时 MT – 7 的

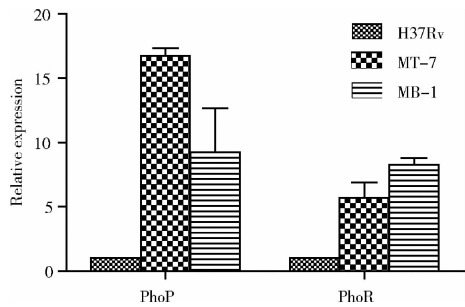


图2 H37Rv、MB-1、MT-7的PhoP和PhoR基因表达水平

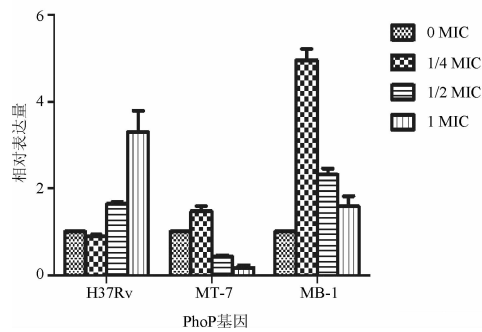
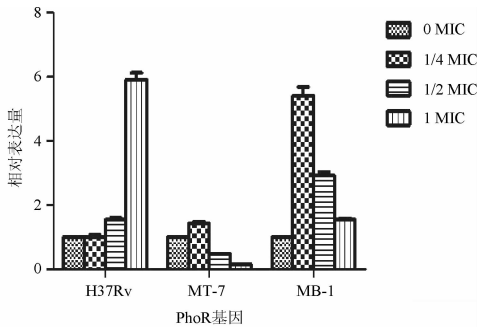


图3 黄连总生物碱作用下H37Rv、MB-1、MT-7的PhoP、PhoR基因表达水平

PhoP、PhoR 基因表达原始状态相比相差不大, MB-1的 PhoP、PhoR 基因表达是原始状态的 6.9 倍和 5.4 倍;黄连总碱浓度为 1/2MIC 时 MT-7 的 PhoP、PhoR 基因表达比原始状态下调了 0.82 倍和 0.86 倍,MB-1 的 PhoP、PhoR 基因表达量与原始状态相差不大;黄连总碱浓度为 1 MIC 时 MT-7 的 PhoP、PhoR 基因表达量比黄连总碱浓度为 1/4MIC 时下调 1.3 倍和 1.2 倍,MB-1 的 PhoP、PhoR 基因表达量比黄连总碱浓度为 1/4MIC 时下调 5.4 倍和 4.1 倍(图3)。



2.4 黄连总生物碱与 RFP 作用下 PhoP、PhoR 基因的 mRNA 相对表达量 虽然 H37Rv 在药物黄连总生物碱与 RFP 药物作用下 PhoP、PhoR 基因的表达量有所差异,但 $P>0.05$ 无统计学意义;MB-1、MT-7 在药物黄连总生物碱与 RFP 作用下 PhoP、

PhoR 基因的表达量有所差异,而且 MB-1、MT-7 在药物黄连总生物碱与 RFP 联用的作用下,PhoP、PhoR 基因的表达量均比在单独用黄连和单独用 RFP 的表达量降低了,差异有统计学意义, $P<0.05$ (图4)。

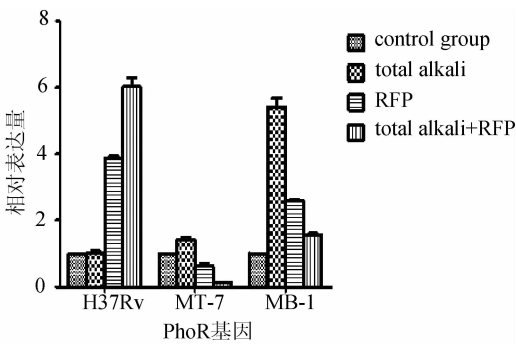
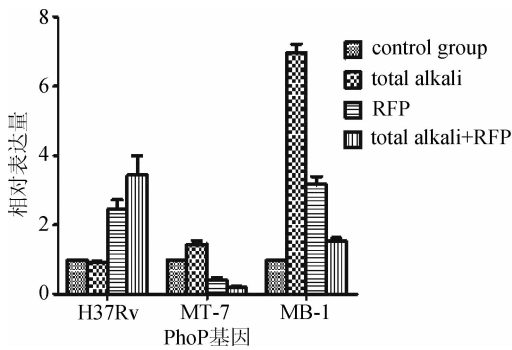


图4 黄连总生物碱和 RFP 作用下 H37Rv、MB-1、MT-7 的 PhoP、PhoR 基因表达水平

3 讨论

结核分枝杆菌 Pho PR 双组分系统是结核分枝杆菌编码的 11 个完整的双组分系统中最基本、最重要的调节系统。它可以感应外界环境变化,并做出相应反应的调控,能够使结核分枝杆菌更好的适应宿主微环境变化,以及协助结核分枝杆菌逃避宿

主的免疫监视和杀灭,促使其在宿主体内生存、繁殖、致病等。同时对结核分枝杆菌在宿主体内的生长、分化、代谢、渗透调节、繁殖、毒性、趋化性、变异性、致病性等方面发挥着重要的调控作用^[7-8]。对于 PhoRP 双组份系统在耐药菌中的调控作用是否伴有相关耐药基因的高表达以及与细菌中的其他

调控系统共同发挥作用,其与耐药性之间的关系尚不清楚,还需要进一步研究。

中药是我国历史悠久的自然资源,在治疗疾病方面显示了独特的疗效。研究表明中药中存在潜在的对抗细菌耐药的增敏剂或逆转剂。目前研究抗结核的中药有黄芩、夏枯草、苦参、大蒜素等,而黄连抗细菌研究的较少。黄连的主治功效为清热解毒,消炎止痛,还有抑菌、抗炎的作用,同时提高机体的免疫力,主要成分为小檗碱(黄连素),以小檗碱研究居多。匡铁吉等^[9]发现黄连素(小檗碱)对 H37Rv 在浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 有杀菌作用,60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 有抑菌作用。目前,对于黄连总生物碱的研究较少,且集中于黄连总生物碱的降血糖、胃粘膜损伤的保护作用等,而对结核菌的作用未见报道。因此,本试验在前期试验的基础上,以黄连总生物碱及与 RFP 联合作用于标准菌和鹿源多药耐药结核菌,研究黄连总生物碱对结核菌 PhoPR 双组份系统基因转录水平的影响。

本研究的结果表明,在无药状态下,在耐药菌 MB-1、MT-7 中 PhoP、PhoR 基因的表达明显高于在 H37Rv 的,这可能是由于耐药菌 MB-1、MT-7 的培养环境发生了改变,PhoPR 双组分系统能感知外界环境变化作出反应,使 PhoP、PhoR 表达提高;在高浓度黄连生物碱作用时,多药耐药结核菌 MT-7、MB-1 的 PhoP 和 PhoR 的基因的表达水平明显下降,说明黄连总生物碱可能降低了 MB-1、MT-7 的耐药性;并且黄连总生物碱与 RFP 联合作用时,多药耐药结核菌 MT-7、MB-1 的 PhoP 和 PhoR 的基因的表达水平明显下降,说明黄连总生物碱与 RFP 能协同抑制结核菌^[10],表明黄连生物碱是 RFP 抗菌增效剂,其作用机制有待进一步深入研究,从而为解决动物源结核分枝杆菌的耐药性问题做出有益的探索。

参考文献:

- [1] 杜 锐. 中国养鹿与疾病防治[M]. 吉林: 中国农业出版社, 2010: 404.
- [2] Zanello G, Bar - Hen A, Boschirolu M L, *et al.* Modelling transmission of bovine tuberculosis in Red Deer and Wild Boar in Normandy, France[J]. Zoonoses and Public Health, 2012, 59 (2): 170 - 178.
- [3] World Health Organization. Global tuberculosis control and patient care: a ministerial meeting of high M /XDR - TB burden countries[R]. Beijing, China, 2009.
- [4] Smita M, Shuishu W. Structure of the response regulator PhoP from *Mycobacterium tuberculosis* reveals a dimer through the receiver domain [J]. Biochemistry, 2011, 50 (26): 5948 - 5957.
- [5] Mena C, Christophe T, Amine N, *et al.* Identification of DNA binding motifs of the *Mycobacterium tuberculosis* PhoP/PhoR two - component signal transduction system[J]. Plos One, 2012, 7(8): 42876 - 42876.
- [6] Jesús G A, Catarina M, Ferrer N L, *et al.* The virulence - associated two - component PhoP - PhoR system controls the biosynthesis of polyketide - derived lipids in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281 (3): 1313 - 1316.
- [7] Fontan P, Aris V, Ghanny S, *et al.* Global transcriptional profile of *Mycobacterium tuberculosis* during THP - 1 human macrophage infection[J]. Infect Immun, 2008, 76(2): 717 - 725.
- [8] Tailleur L, Waddell S J, Pelizzola M, *et al.* Probing host pathogen cross - talk by transcriptional profiling of both *Mycobacterium tuberculosis* and infected human dendritic cells and macrophages [J]. PLoS ONE, 2008, 3(1): 1403.
- [9] 匡铁吉,董 梅,宋 萍,等. 黄连素对结核分枝杆菌的体外抑菌作用[J]. 中国中药杂志, 2001, 35(12): 71 - 72.
- [10] 姜园园,曾范利,杜 锐,等. 抑制鹿源多药耐药结核菌中药的筛选[J]. 动物医学进展, 2016, 37(4): 54 - 57.

(编 辑:李文平)