

网络出版时间:2020-03-13 16:40 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2020.09.003
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.s.20200312.1021.028.html

苦参碱对金黄色葡萄球菌入侵 BMECs 的干预作用

张想军,冯 峰,周学章

(宁夏大学 生命科学学院 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室,宁夏 银川 750021)

【摘 要】【目的】研究苦参碱在金黄色葡萄球菌入侵奶牛乳腺上皮细胞(BMECs)过程中的干预作用及其原因,为苦参碱的临床应用奠定基础。【方法】用 CCK-8 法检测苦参碱对 BMECs 增殖的影响,用庆大霉素保护试验检测苦参碱对金黄色葡萄球菌入侵 BMECs 的影响;并在苦参碱干预金黄色葡萄球菌感染 BMECs 后,分别采用 RT-qPCR 检测 BMECs 中抗菌肽基因的表达,Greiss 法检测 NO 的分泌,Western blot 检测 NF- κ B 通路蛋白 p65 的表达。【结果】25~100 μ g/mL 苦参碱均能促进 BMECs 的增殖,并能抑制金黄色葡萄球菌入侵 BMECs;苦参碱干预能显著下调 BMECs 中抗菌肽基因 TAP 和 BNBD5 mRNA 的表达,抑制 NO 的分泌和 NF- κ B 的活化,并呈剂量依赖性。【结论】苦参碱通过抑制 NF- κ B 的活化来抑制金黄色葡萄球菌入侵 BMECs,并可显著下调金黄色葡萄球菌感染的 BMECs 中抗菌肽基因的表达。

【关键词】 苦参碱;奶牛乳腺上皮细胞;金黄色葡萄球菌;NF- κ B 通路

【中图分类号】 S858.237.2⁺6

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2020)09-0017-07

Effect of matrine on invasion of bovine mammary epithelial cells by *Staphylococcus aureus*

ZHANG Xiangjun, FENG Feng, ZHOU Xuezhong

(Key Laboratory of the Ministry of Education for the Conservation and Utilization of Special Biological Resources of Western China, College of Life Science, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract: 【Objective】 This study investigated the intervention effect and causes of matrine on the invasion process of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells (BMECs) to provide basis for the clinical application of matrine. 【Method】 Effect of matrine on the proliferation of BMECs was detected by CCK-8 assay. Thereafter, the effect on BMECs invaded by *S. aureus* was detected by gentamicin protection test. The mRNA expression levels of antimicrobial peptide from *S. aureus* infected BMECs induced by matrine were determined by RT-qPCR. The NO secretion in BMECs was analyzed by the Greiss method. The effect of matrine on the expression of NF- κ B pathway protein p65 was determined by the Western blot. 【Result】 Matrine can promote the proliferation of BMECs and inhibit the invasion of *S. aureus* at the concentration of 25—100 μ g/mL. Matrine can significantly down-regulate the mRNA expression levels of tracheal antimicrobial peptide (TAP) and bovine neutrophil beta-defensin 5 (BNBD5) in BMECs infected by *S. aureus*. Matrine can inhibit the NO production in BMECs infected by *S. aureus*. Matrine can inhibit the activation of NF- κ B in BMECs infected by *S. aureus* in a dose-dependent manner. 【Conclusion】 Matrine can suppress the invasion of *S. aureus* by inhibiting the activation of NF- κ B pathway and significantly

〔收稿日期〕 2019-09-27

〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(31660728,31460676)

〔作者简介〕 张想军(1991—),男,甘肃漳县人,在读硕士,主要从事微生物与基因工程研究。E-mail:1782585246@qq.com

〔通信作者〕 周学章(1969—),男,宁夏银川人,教授,博士,博士生导师,主要从事兽医药理学研究。

E-mail:zhouxuezhong@nxu.edu.cn

down-regulate the expression of antibacterial peptide genes in BMECs infected by *S. aureus*.

Key words: matrine; bovine mammary epithelial cells; *Staphylococcus aureus*; NF- κ B pathway

在奶牛乳腺炎的发病过程中,奶牛乳腺上皮细胞(Bovine mammary epithelial cells, BMECs)是病原菌穿过乳头末端的机械屏障后最先黏附和入侵的细胞,并已证明其在抵抗病原菌感染时主要通过先天性免疫和获得性免疫发挥保护作用^[1-2]。研究发现,金黄色葡萄球菌是引起奶牛乳腺炎的主要病原菌之一,它首先通过黏附作用定植到 BMECs 表面,然后入侵到 BMECs 中引发炎症反应,进而诱发细胞凋亡和坏死,严重感染时会导致乳腺坏死^[3-4]。入侵到细胞内的金黄色葡萄球菌很难被抗生素杀死,所以开发其他抗菌药物显得尤为重要。

目前,已经发现许多中药成分对金黄色葡萄球菌引起的奶牛乳腺炎具有很好的治疗效果。中药葛根素通过抑制 NF- κ B 和 MAPK 信号通路来发挥抗炎作用,可以治疗金黄色葡萄球菌引起的乳腺炎^[5];杜鹃素通过调节抗菌肽基因的表达和 NF- κ B 的活化来抑制金黄色葡萄球菌入侵 BMECs^[6]。苦参碱(Matrine)是从苦参根中分离得到的一种生物碱类化合物,已被证明能以剂量依赖性的方式抑制炎症介质的表达^[7-9];此外,它还具有抗菌活性^[10]。本试验旨在研究苦参碱对金黄色葡萄球菌入侵 BMECs 的抑制机制,为苦参碱的临床应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 金黄色葡萄球菌 ATCC 27543(分泌 α -溶血素),购于美国 ATCC 生物标准品资源中心;金黄色葡萄球菌标准株 8325-4(来自 NCTC 8325 的高产 H1a 菌株,高产 α -溶血素)和 DU1090(8325-4 同源 H1a 缺失株,不分泌 α -溶血素),均由爱尔兰都柏林大学 Timothy J Foster 教授惠赠。

1.1.2 试剂 苦参碱,购自国家医药和生物制品控制研究所;NF- κ B p65、 β -actin,购自 Cell Signaling Technology Inc;辣根过氧化物酶偶联二抗,购自北京 ZSGB-BIO;RNAprep pure 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒,购自中国天根生物技术有限公司;ChamQ SYBR[®] qPCR Master Mix、HiScript Q Select RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper),购自南京诺唯赞生物科技有限公司;细胞计数试剂盒(CCK-8)、Annexin-V/碘化丙啶(PI)凋亡检测试剂盒、核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒,均购自南京凯

基生物发展有限公司;一氧化氮(NO)检测试剂盒、NF- κ B 抑制剂 PDTC,购自上海碧云天生物技术公司;DMEM/F12 培养液,购自美国 Hyclone 公司;庆大霉素,购自美国 Sigma 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 BMECs 的分离培养 参照卢金霞等^[11]的方法分离培养原代 BMECs。

1.2.2 苦参碱对 BMECs 增殖的影响 将 BMECs 按 1×10^4 /孔接种于 96 孔板中,在二氧化碳培养箱中培养 24 h,弃去培养液,加入含不同质量浓度苦参碱(25, 50, 75, 100, 125, 150 μ g/mL)的培养液培养 12 h,然后加 10 μ L/孔 CCK-8, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,用酶标仪在 450 nm 波长处检测光密度值。

1.2.3 苦参碱对金黄色葡萄球菌入侵 BMECs 的影响 将 BMECs 以 1×10^5 /孔接种于 12 孔板中,培养 12 h 后弃掉上清液,分为 A、B 两组。其中, A 组加 DMEM/F12 培养液培养细胞 3 h,弃去培养液用 PBS 洗涤后,按照感染复数 MOI(MOI=细菌数:细胞数)100 加入制备好的金黄色葡萄球菌(8325-4、DU1090、ATCC 27543)菌悬液; B 组加 DMEM/F12 培养液溶解的苦参碱(25, 50, 75 μ g/mL)预处理细胞 3 h,弃去培养液用 PBS 洗涤后,加入制备好的金黄色葡萄球菌(ATCC 27543)菌悬液(MOI=100), 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 后弃上清,用无菌 PBS 洗 3 遍后,每孔加 1 mL 含 100 μ g/mL 庆大霉素的 DMEM/F12 培养液再孵育 2 h,以杀死细胞外黏附的金黄色葡萄球菌。用 PBS 洗 3 次,加质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化细胞后,再加体积分数 0.1% Triton X-100 充分裂解细胞,将细胞裂解物倍比稀释后涂于 TSA 平板上,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱过夜培养后计数,每组 3 个重复,计算入侵指数。入侵指数=入侵的细菌总数/每孔细胞数 $\times 100\%$ 。

1.2.4 NO 含量的测定 将 BMECs 按 1×10^6 /孔接种于 6 孔板中培养 24 h,分为 A、B 两组, A、B 组均加不同质量浓度的苦参碱(25, 50, 75 μ g/mL)预处理 3 h, A 组另加 DMEM/F12 培养液、B 组则加 DMEM/F12 培养液和金黄色葡萄球菌 ATCC 27543 的菌悬液,均作用 3 h 后收集培养物上清液,通过 Greiss 反应评估 BMECs 培养上清液中 NO 的含量。

1.2.5 抗菌肽基因表达的检测 以 GAPDH 为内

参(内源基因),用 RT-qPCR 检测苦参碱预处理后 *TAP* 和 *BNBD5* 基因的 mRNA 表达水平。参考 Yang 等^[6]设计 *TAP*、*BNBD5*、*GAPDH* 基因的引

物,引物序列见表 1,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 本研究中实时荧光定量 PCR 引物

Table 1 Real-time fluorescent quantitative PCR primers used in this study

基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Sequence of primer (5'→3')	产物大小/bp Product size
<i>TAP</i>	F:GCGCTCCTCTTCTGCTCCTG;R:GCACGTCTTGACTGGGCATTGA	216
<i>BNBD5</i>	F:GCCAGCATGAGGCTCCATC; R:TTGCCAGGGCAGCAGATCG	143
<i>GAPDH</i>	F:TCAACGGGAAGCTCACTGG; R:CCCCAGCATCGAAGGTAGA	237

将 BMECs 按 3×10^6 /孔接种于 12 孔板上,分为 A、B 两组,处理方法同 1.2.4 节,按照 RNAprep pure 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA,采用 HiScript Q Select RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)反转录合成 cDNA。然后,按照 ChamQ SYBR[®] qPCR Master Mix 试剂盒说明书进行 RT-qPCR。反应体系为: $2\times$ ChamQ SYBR qPCR Master Mix $10\ \mu\text{L}$,上下游引物各 $0.4\ \mu\text{L}$, $50\times$ ROX Reference Dye 1 $0.4\ \mu\text{L}$, cDNA 模板 $0.2\ \mu\text{L}$, ddH₂O $8.6\ \mu\text{L}$ 。反应条件为: $95\ ^\circ\text{C}$ 预变性 30 s; $95\ ^\circ\text{C}$ 10 s, $60\ ^\circ\text{C}$ 30 s,共 40 个循环。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析 RT-qPCR 结果。

1.2.6 NF- κ B 通路蛋白 p65 表达水平的检测 将 BMECs 以 1×10^6 /孔接种于 6 孔板中,培养 24 h 后弃掉上清液,分为 A、B、C 3 组,其中 A 组为空白对照组;B 组加金黄色葡萄球菌 ATCC 27543 的菌悬液作用 2 h;C 组先加苦参碱(25,50,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$)预处理 3 h,再加金黄色葡萄球菌作用 2 h。弃去培养液收集细胞,用预冷的 PBS 洗 2 遍。按照核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒说明书提取蛋白质。Western blot 参考 Wang 等^[12]描述的条件进行。

1.2.7 PDTC 对金黄色葡萄球菌入侵 BMECs 的影响 PDTC 是 NF- κ B 核转位的抑制肽。为了进一步验证苦参碱对金黄色葡萄球菌入侵 BMEC 的抑制作用及其与 NF- κ B 通路的关系,设计 A、B、C、D 共 4 个组。将 BMECs 以 1×10^5 /孔接种于 12 孔板中,培养 12 h 后弃掉上清液,A 组加 DMEM/F12 培养液、B 组加 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苦参碱、C 组加 100 μmol PDTC、D 组加苦参碱和 PDTC,均预处理细胞 3 h;其他操作及细胞计数方法与 1.2.3 节同,每组 3 个重复,计算入侵指数。

1.3 数据处理

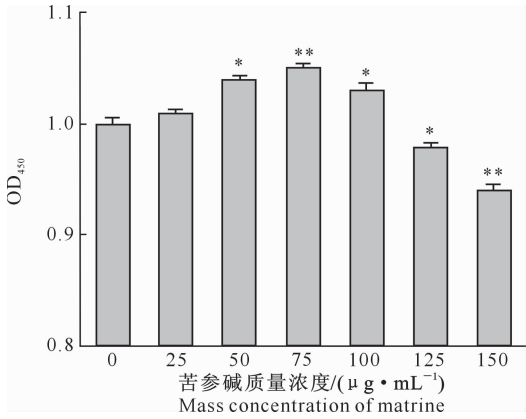
试验数据用“平均值 $\pm$ 标准差”表示,采用 GraphPad Prism 8 分析数据及作图,用方差分析(ANOVA)进行组间比较, $P\leq0.05$ 表示具有显著

性统计学意义。

2 结果与分析

2.1 苦参碱对 BMECs 增殖的影响

用含不同质量浓度苦参碱的培养液培养 BMECs 12 h,通过 CCK-8 法分析苦参碱对 BMECs 增殖的影响。试验结果(图 1)显示,苦参碱质量浓度为 25~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时均能促进奶牛乳腺上皮细胞(BMECs)的增殖,且在 25~75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对 BMECs 增殖影响具有明显剂量依赖性。说明苦参碱质量浓度为 25~75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时无细胞毒性作用,且呈剂量依赖性,因此选择质量浓度为 25,50,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的苦参碱用于后续试验。



* 和 * * 分别表示与对照相比差异显著($P<0.05$)和差异极显著($P<0.01$)。图 3,4,6 同

Compared to the control, * and * * show significant difference ($P<0.05$) and extremely significant difference ($P<0.01$), respectively. The same for Fig. 3, Fig. 4 and Fig. 6

图 1 苦参碱对 BMECs 增殖的影响

Fig. 1 Effect of matrine on proliferation of BMECs

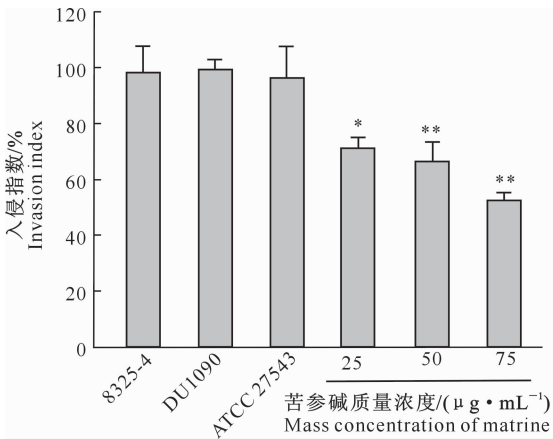
2.2 苦参碱对金黄色葡萄球菌入侵 BMECs 的影响

通过庆大霉素保护试验评估苦参碱对金黄色葡萄球菌入侵 BMECs 的影响,结果(图 2)显示,与未经苦参碱预处理相比,苦参碱预处理能显著或极显

著阻止 ATCC 27543 入侵 BMECs,说明苦参碱能抑制金黄色葡萄球菌入侵 BMECs,并表现出剂量依赖性。但 8325-4 感染组与 DU1090、ATCC 27543 感染组相比无显著差异,说明金黄色葡萄球菌入侵 BMECs 与其是否分泌 α -溶血素无相关性。

2.3 苦参碱对 BMECs 中 NO 分泌的影响

苦参碱对金黄色葡萄球菌处理后 BMECs 分泌



* 和 ** 分别表示与 ATCC 27543 感染组相比差异显著 ($P<0.05$) 和差异极显著 ($P<0.01$)

Compared to ATCC 27543 group, * and ** show significant difference ($P<0.05$) and extremely significant difference ($P<0.01$), respectively

图 2 苦参碱对金黄色葡萄球菌入侵 BMECs 的影响
Fig.2 Effect of matrine on invasion of *S. aureus* to BMECs

2.4 苦参碱对 BMECs 中抗菌肽基因表达的影响

通过 RT-qPCR 检测苦参碱对金黄色葡萄球菌诱导的 BMECs 中抗菌肽基因 *TAP* 和 *BNBD5* mRNA 表达的影响,结果(图 4)显示,与未感染组相比,ATCC 27543 感染组 *TAP* 和 *BNBD5* 基因的 mRNA 表达量极显著上调;与未经苦参碱预处理的

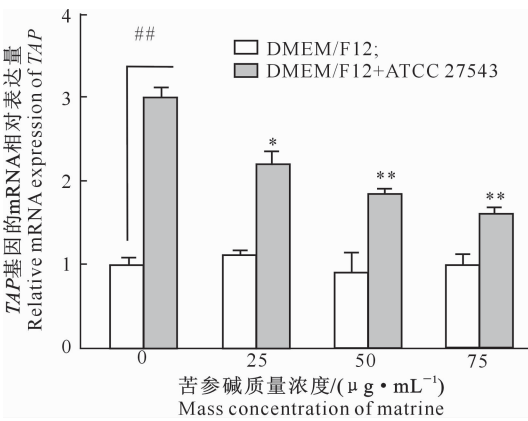
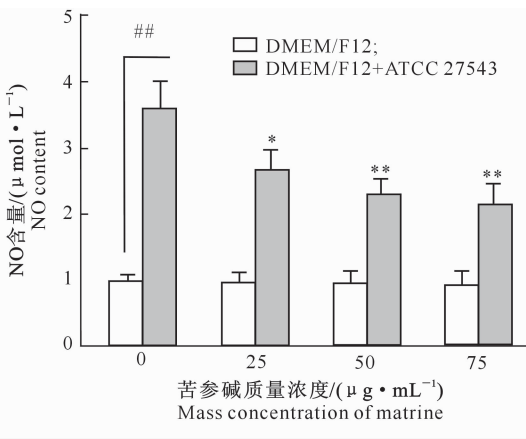


图 4 苦参碱对 BMECs 中抗菌肽基因表达的影响

Fig.4 Effect of matrine on antimicrobial peptide gene expression in BMECs

NO 影响的研究结果(图 3)表明,与未刺激组相比,ATCC 27543 刺激组 NO 分泌量极显著增多;与未经苦参碱预处理的 ATCC 27543 刺激组相比,使用不同质量浓度苦参碱(25~75 $\mu\text{g}/\text{mL}$)预处理的 ATCC 27543 刺激组 NO 的分泌显著减少。说明苦参碱对金黄色葡萄球菌诱导的 BMECs 分泌 NO 具有抑制作用。

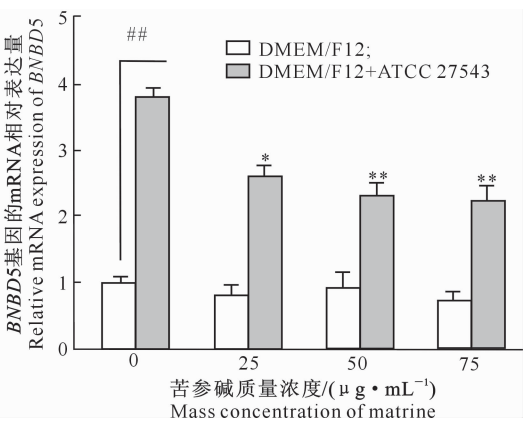


表示与未加苦参碱组相比,差异极显著 ($P<0.01$)。图 4 同

Compared to no matrine treatment, ## shows extremely significant difference ($P<0.01$). The same for Fig. 4

图 3 苦参碱对金黄色葡萄球菌刺激 BMECs 分泌 NO 的影响
Fig.3 Effect of matrine on *S. aureus*-induced NO expression in BMECs

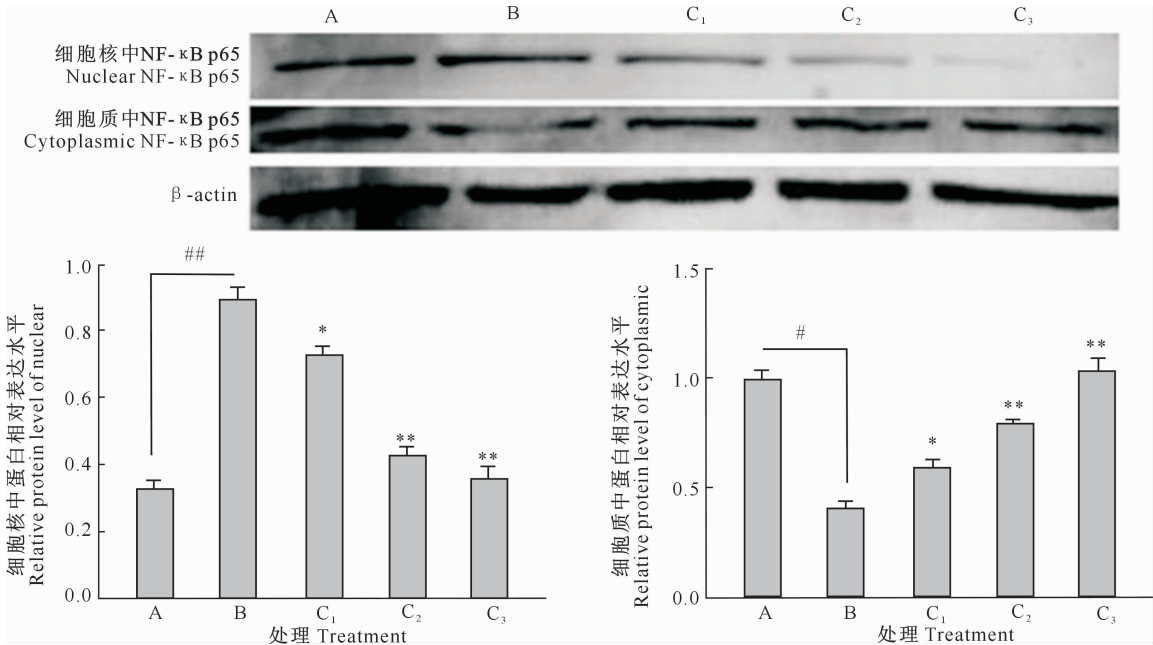
ATCC 27543 刺激组相比,使用不同质量浓度苦参碱(25~75 $\mu\text{g}/\text{mL}$)预处理的 ATCC 27543 刺激组 *TAP* 和 *BNBD5* 基因 mRNA 表达显著下调。说明金黄色葡萄球菌对抗菌肽基因表达具有促进作用,而苦参碱对这一作用有抑制效果。



2.5 苦参碱对金黄色葡萄球菌诱导的 BMECs 中 NF-κB 活化的影响

Western blot 检测苦参碱对金黄色葡萄球菌诱导的 BMECs 中 NF-κB 活化的影响,结果(图 5)表明,金黄色葡萄球菌的诱导能促进 NF-κB p65 的表

达,而苦参碱预处理能显著抑制 NF-κB p65 从细胞质向细胞核转移,且呈剂量依赖性。由此可知,苦参碱对金黄色葡萄球菌入侵 BMECs 的抑制作用可能与 NF-κB 的活化有关。



A. 空白对照组;B. 金黄色葡萄球菌感染组;C₁、C₂、C₃ 依次为质量浓度 25,50,75 μg/mL 苦参碱+金黄色葡萄球菌组。# 和 ## 表示与 A 处理相比差异显著($P<0.05$)和差异极显著($P<0.01$);* 和 * * 表示与 B 处理相比差异显著($P<0.05$)和差异极显著($P<0.01$)

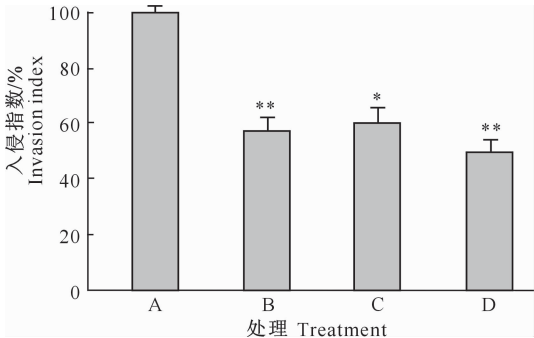
A. Control;B. *S. aureus*;C₁,C₂,C₃ were matrine 25,50,75 μg/mL + *S. aureus*,respectively. Compared with A treatment, # and ## show significant difference($P<0.05$) and extremely significant difference($P<0.01$),respectively;Compared with B treatment, * and * * show significant difference($P<0.05$) and extremely significant difference($P<0.01$),respectively

图 5 苦参碱对金黄色葡萄球菌刺激的 BMECs 中 NF-κB 活化的影响

Fig. 5 Effect of matrine on activation of NF-κB in BMECs stimulated by *S. aureus*

2.6 PDTC 对金黄色葡萄球菌入侵 BMECs 的影响

NF-κB 抑制剂(PDTC)对金黄色葡萄球菌入侵 BMECs 的影响见图 6。



A. 空白对照组;B. 苦参碱组;C. PDTC 组;D. 苦参碱+PDTC 组

A. Control;B. Matrine;C. PDTC;D. Matrine+PDTC

图 6 NF-κB 抑制剂(PDTC)对金黄色葡萄球菌入侵 BMECs 的影响

Fig. 6 Effects of NF-κB inhibitors on internalization of *S. aureus* into BMECs

在金黄色葡萄球菌诱导前,用 PDTC 对 BMECs 进行预处理,进一步证明苦参碱对金黄色葡萄球菌入侵 BMECs 的抑制作用与 NF-κB 活化的关系,结果(图 6)表明,苦参碱(75 μg/mL)与 PDTC 均能显著抑制金黄色葡萄球菌入侵 BMECs,当苦参碱和 PDTC 联合使用时,与空白对照组相比差异极显著($P<0.01$)。说明苦参碱对金黄色葡萄球菌入侵 BMECs 的抑制作用是通过影响 NF-κB 的活化来实现的。

3 讨论

金黄色葡萄球菌是引起奶牛乳腺炎的主要病原菌之一,其通过入侵到宿主细胞内而引发炎症反应,进而导致凋亡、坏死等一系列程序性死亡^[4]。Almeida 等^[13]研究发现,金黄色葡萄球菌能入侵到 BMECs 中,并能进行正常的生长繁殖;Gutiérrez-Barroso 等^[14]研究发现,在感染状态下牛催乳激素

(bPRL)能抑制宿主免疫反应的成分,并促进金黄色葡萄球菌入侵到 BMECs 中;而 Ochoa-Zarzosa 等^[15]研究发现,辛酸钠具有与 bPRL 相反的作用,可以与免疫调节因子共同作用,减轻金黄色葡萄球菌对 BMECs 的损伤。

苦参碱是一种从苦参根中分离出来的中药单体生物碱,不仅具有抗病毒和抗菌活性^[10],还具有调节免疫的功能^[16]。Sun 等^[17]研究发现,苦参碱通过抑制 TLR3,4/NF- κ B/TNF- α 通路,在猪生殖呼吸综合征病毒和 2 型猪圆环病毒共同感染猪肺泡巨噬细胞时表现出抗病毒活性。Pourahmad 等^[10]发现,苦豆子提取物和苦参碱能下调编码 AcrAB-TolC 外排泵组分基因(如 *acrA*)的表达,还具有抗泵活性。Liu 等^[16]发现,苦参碱可以通过抑制 ROS 的产生、NF- κ B 和 MAPK 途径的激活,来下调 TNF- α 刺激的人主动脉平滑肌细胞(HASMC)中血管细胞黏附分子 1(VCAM-1)和细胞间黏附分子 1(ICAM-1)的表达。Feng 等^[18]发现,苦参碱能抑制金黄色葡萄球菌分泌 α -溶血素及入侵 BMECs,还能减轻金黄色葡萄球菌诱导的 BMECs 损伤。本研究发现,苦参碱对金黄色葡萄球菌(ATCC 27543)的生长无影响,但能促进 BMECs 的增殖,并能以剂量依赖性的方式抑制金黄色葡萄球菌入侵 BMECs,说明苦参碱能用于预防金黄色葡萄球菌引起的感染。

为了保护宿主免受感染,需要天然免疫和适应性免疫防御。机体针对金黄色葡萄球菌的天然免疫防御反应非常迅速,包括向乳腺募集中性粒细胞以促进吞噬作用来清除细菌,产生活性氧物质、抗菌肽(如乳铁蛋白和 β -乳球蛋白)和防御素来保护乳腺免受感染^[19]。Ochoa-Zarzosa 等^[15]发现,丁酸钠处理能促进 BMECs 中 NO 的分泌,而丁酸钠对金黄色葡萄球菌入侵 BMECs 的抑制作用可能受到 NO 的调节。本研究结果显示,金黄色葡萄球菌感染 BMECs 中的 NO 分泌增加,而苦参碱则能抑制这种分泌。抗菌肽是先天免疫防御系统的有效效应分子,Yang 等^[20]发现,在 BMECs 中 *TAP* 和 *BNBD5* 基因的表达需要 NF- κ B 转录因子的参与;Oviedo-Boyso 等^[21]发现,金黄色葡萄球菌入侵牛血管内皮细胞与 NF- κ B 的活化有关;而 Yang 等^[6]发现,杜鹃素能以剂量依赖性的方式抑制 NF- κ B 的活化,从而减少金黄色葡萄球菌入侵 BMECs,并能下调 *TAP* 和 *BNBD5* 基因的表达;Télliez-Pérez 等^[22]发现,胆钙化醇(维生素 D)可以减少金黄色葡萄球菌入侵 BMECs,并下调 BMEC 中 *TAP* 和 *BNBD5* mRNA

的表达;而 Tse 等^[23]发现,维生素 D 能抑制 NF- κ B 的活化,这也就解释了维生素 D 能通过抑制 NF- κ B 的活化来减少金黄色葡萄球菌入侵 BMECs 的现象。本研究结果显示,苦参碱在所选质量浓度范围内,以剂量依赖性的方式抑制 NF- κ B 的活化,并下调 *TAP* 和 *BNBD5* 基因的 mRNA 表达,说明苦参碱能通过抑制 NF- κ B 的活化来减少金黄色葡萄球菌入侵 BMECs。为了进一步验证金黄色葡萄球菌入侵 BMECs 与 NF- κ B 活性的关系,Oviedo-Boyso 等^[21]用 NF- κ B 的激活剂 TNF- α /IL-1 β 处理牛血管内皮细胞时发现,经 TNF- α /IL-1 β 处理后侵入细胞的金黄色葡萄球菌数量增多,但用 NF- κ B 核转位抑制肽 SN50 处理牛血管内皮细胞时侵入细胞的金黄色葡萄球菌数量减少;魏正凯等^[24]用 SN50 处理 BMECs 时也得到了相同的结论,并证明麝香草酚也能通过抑制 NF- κ B 的活化来减少金黄色葡萄球菌入侵 BMECs。本研究使用 NF- κ B 核转位抑制肽 PDTC 也得到了相同的结果,且 PDTC 与苦参碱联合使用时抑制效果更明显,说明苦参碱确实能通过抑制 NF- κ B 的活化来干预金黄色葡萄球菌入侵 BMECs。

综上所述,苦参碱通过抑制 NF- κ B 的活化来干预金黄色葡萄球菌入侵 BMECs,并能下调金黄色葡萄球菌感染后 BMECs 中抗菌肽基因的表达。因此,苦参碱可以作为预防和治疗金黄色葡萄球菌性乳腺炎的潜在药物,但还需要进一步的临床试验进行验证。

[参考文献]

- [1] Thompson-Crispi K, Atalla H, Miglior F, et al. Bovine mastitis: frontiers in immunogenetics [J]. *Frontiers in Immunology*, 2014, 5:493.
- [2] Kaliwal B B, Sadashiv S O, Kurjogi M M, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis [J]. *Veterinary World*, 2011, 4(4):229-235.
- [3] Castilho I G, Sta D, Langoni H, et al. Host-pathogen interactions in bovine mammary epithelial cells and HeLa cells by *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis [J]. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(8):6414-6421.
- [4] Zhang L M, Gao J, Barkema H W, et al. Virulence gene profiles: alpha-hemolysin and clonal diversity in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine clinical mastitis in China [J]. *BMC Vet Res*, 2018, 14(1):63.
- [5] Wu H C, Zhao G, Jiang K F, et al. Puerarin exerts an anti-inflammatory effect by inhibiting NF- κ B and MAPK activation in *Staphylococcus aureus* induced mastitis [J]. *Phytotherapy Re-*

- search,2016,10(30):1658-1664.
- [6] Yang Z T,Fu Y H,Liu B,et al. Farrerol regulates antimicrobial peptide expression and reduces *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells [J]. Microbial Pathogenesis,2013,65:1-6.
- [7] Liou C J,Lai Y R,Chen Y L,et al. Matrine attenuates COX-2 and ICAM-1 expressions in human lung epithelial cells and prevents acute lung injury in LPS-induced mice [J]. Mediators of Inflammation,2016,2016:1-12.
- [8] Suo Z W,Liu Y,Ferreri M,et al. Impact of matrine on inflammation related factors in rat intestinal microvascular endothelial cells [J]. Journal of Ethnopharmacology,2009,125(3):404-409.
- [9] Zhang B,Liu Z Y,Li Y Y,et al. Antiinflammatory effects of matrine in LPS-induced acute lung injury in mice [J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences,2011,44(5):573-579.
- [10] Razieh P J,Parvin M. Effect of total alkaloid extract of local *Sophora alopecuroides* on minimum inhibitory concentration and intracellular accumulation of ciprofloxacin, and *acrA* expression in highly resistant *Escherichia coli* clones [J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance,2018,12:55-60.
- [11] 卢金霞,何芳,周学章,等. 苦参碱对奶牛乳腺上皮细胞增殖、凋亡及抗氧化能力的影响 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2018,46(7):1-6,14.
Lu J X,He F,Zhou X Z,et al. Effect of matrine on proliferation, apoptosis and antioxidant ability of bovine mammary epithelial cells [J]. Journal of Northwest A&F University(Natural Science Edition),2018,46(7):1-6,14.
- [12] Wang T C,Song X J,Zhang Z C,et al. Stevioside inhibits inflammation and apoptosis by regulating TLR2 and TLR2-related proteins in *S. aureus*-infected mouse mammary epithelial cells [J]. International Immunopharmacology,2014,22(1):192-199.
- [13] Almeida R A,Matthews K R,Cifrian E,et al. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells [J]. Journal of Dairy Science,1996,79(6):1021-1026.
- [14] Gutiérrez-Barroso A,L Anaya-López J L,Lara-Zárate L,et al. Prolactin stimulates the internalization of *Staphylococcus aureus* and modulates the expression of inflammatory response genes in bovine mammary epithelial cells [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology,2008,121(1/2):113-122.
- [15] Ochoa-Zarzosa A,Villarreal-Fernández E,Cano-Camacho H,et al. Sodium butyrate inhibits *Staphylococcus aureus* internalization in bovine mammary epithelial cells and induces the expression of antimicrobial peptide genes [J]. Microbial Pathogenesis,2009,47(1):1-7.
- [16] Liu J,Zhang L H,Ren Y G,et al. Matrine inhibits the expression of adhesion molecules in activated vascular smooth muscle cells [J]. Molecular Medicine Reports,2016,13(3):2313-2319.
- [17] Sun N,Sun P P,Lü H P,et al. Matrine displayed antiviral activity in porcine alveolar macrophages co-infected by porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 [J]. Scientific Reports,2016,6(1):24401.
- [18] Feng F,Wa M M,Zhou X Z. Effect of matrine on reducing damage to bovine mammary epithelial cells induced by *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin [J]. Polish Journal of Veterinary Sciences,2018,21(2):409-413.
- [19] Wellnitz O,Bruckmaier R M. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection [J]. The Veterinary Journal,2012,192(2):148-152.
- [20] Yang W,Molenaar A,Kurts-Ebert B,et al. NF- κ B factors are essential, but not the switch, for pathogen-related induction of the bovine β -defensin 5-encoding gene in mammary epithelial cells [J]. Molecular Immunology,2006,43(3):210-225.
- [21] Oviedo-Boyso J,Barriga-Rivera J G,Valdez-Alarcón J J,et al. Internalization of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells is associated with the activity state of NF-kappaB and modulated by the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1beta [J]. Scandinavian Journal of Immunology,2008,67(2):169-176.
- [22] Téllez-Pérez A D,Alva-Murillo N,Ochoa-Zarzosa A,et al. Cholecalciferol (vitamin D) differentially regulates antimicrobial peptide expression in bovine mammary epithelial cells; implications during *Staphylococcus aureus* internalization [J]. Veterinary Microbiology,2012,160(1/2):91-98.
- [23] Tse A K,Zhu G Y,Wan C K,et al. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 inhibits transcriptional potential of nuclear factor kappa B in breast cancer cells [J]. Molecular Immunology,2010,47(9):1728-1738.
- [24] 魏正凯. 麝香草酚对金葡菌诱发的奶牛乳腺上皮细胞炎症反应的保护作用及机制 [D]. 长春:吉林大学,2016.
Wei Z K. The protective effect and mechanisms of thymol on *Staphylococcus aureus*-induced inflammatory response in bovine mammary epithelial cells [D]. Changchun:Jilin University,2016.