

同分异构体桑根酮C和桑根酮D对金黄色葡萄球菌 磷脂生物合成的差异调控机制

林均蕙^{1,2}, 邹宇晓², 刘凡², 黄兆翔², 王卫飞², 黎尔纳², 廖森泰², 庞道睿^{2*}, 王弘^{1*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业农村部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610)

摘要: 金黄色葡萄球菌是一种常见的食源性致病菌, 但金黄色葡萄球菌对常见防腐剂耐受性等增强。为了挖掘新型的天然防腐剂, 本文以桑树中异戊二烯类黄酮——桑根酮 C 和桑根酮 D 作为研究对象, 采用扫描电子显微镜、实时荧光定量 PCR、平行反应监测等技术, 探究其对金黄色葡萄球菌的细胞膜磷脂生物合成的抑制机制。研究结果表明: 桑根酮 C 和桑根酮 D 对金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度分别为 $70.60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $17.60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 显著优于肉桂醛; 桑根酮 D 能破坏金黄色葡萄球菌细胞结构和形态; 桑根酮 D 抑制金黄色葡萄球菌的活性及对其磷脂生物合成相关基因与蛋白表达的抑制均强于桑根酮 C, 尤其是桑根酮 D 对磷脂合成通路中 Fab H 和 CdsA 表达有更显著地抑制作用。进一步基于分子对接结果推测, 桑根酮 D 与 PlsX 相互作用在 Lys290、Glu233、Gly293 和 Ser294 形成氢键, 其作用强度高于桑根酮 C 与 PlsX 形成的氢键作用, 以上作用机制可能导致桑根酮 D 的抑制作用强于桑根酮 C。因此, 桑根酮 D 具有开发为天然食品防腐剂的应用潜力, 为其作为新型天然防腐剂的开发应用提供理论参考。

关键词: 桑根酮; 金黄色葡萄球菌; 抑菌活性; 细胞膜; 磷脂生物合成途径; 磷脂酰甘油

文章编号: 1673-9078(2026)04-105-113

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.4.0028

Differential Regulation Mechanisms for Isomers Sanggenon C and Sanggenon D in Phospholipid Biosynthesis of *Staphylococcus aureus*

LIN Junhui^{1,2}, ZOU Yuxiao², LIU Fan², HUANG Zhaoxiang², WANG Weifei², LI Erna², LIAO Sentai²,
PANG Daorui^{2*}, WANG Hong^{1*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (2. Sericultural & Agri-Food Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610, China)

Abstract: *Staphylococcus aureus* is a prevalent foodborne pathogen. However, it has exhibited increasing tolerance to common preservatives. The aim of this study was to analyze new natural preservatives to combat this issue. In this study, sanggenon C and sanggenon D were used as research objects. The study employed scanning electron microscopy, real-time fluorescence quantitative PCR, parallel reaction monitoring, and other technologies to explore the inhibitory mechanism of sanggenon C and sanggenon D on the phospholipid biosynthesis of *Staphylococcus aureus*. The results showed that the minimum inhibitory concentrations (MICs) of sanggenon C and sanggenon D against *Staphylococcus aureus* were $70.60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $17.60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively, which were significantly higher than cinnamaldehyde. Sanggenon D could destroy the cell structure and morphology of *Staphylococcus aureus*. Sanggenon D inhibited the activity of *Staphylococcus aureus* and the expression of related genes and proteins of phospholipid biosynthesis more strongly than sanggenon C, especially sanggenon D had a more significant inhibitory effect on the expression of Fab H and CdsA in the phospholipid biosynthesis pathway. Further based on the molecular docking results, it was speculated that sanggenon D interacted with PlsX at Lys290, Glu233, Gly293, and Ser294 to form hydrogen bonds, and its interaction strength was higher than that of sanggenon C with PlsX. The above mechanism may lead to a stronger inhibitory effect of sanggenon D than sanggenon C. Therefore, sanggenon D has the potential to be developed as a natural food preservative, providing theoretical reference for its application as a new natural preservative.

引文格式:

林均蕙, 邹宇晓, 刘凡, 等. 同分异构体桑根酮C和桑根酮D对金黄色葡萄球菌磷脂生物合成的差异调控机制[J]. 现代食品科技, 2026, 42(4): 105-113.

LIN Junhui, ZOU Yuxiao, LIU Fan, et al. Differential regulation mechanisms for isomers sanggenon C and sanggenon D in phospholipid biosynthesis of *Staphylococcus aureus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(4): 105-113.

收稿日期: 2025-01-07; 修回日期: 2025-03-06; 接受日期: 2025-03-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(32201958); 广州市基础与应用基础研究项目(202201010670); 以农产品为单元的广东省现代农业产业技术体系创新团队建设项目(南药产业技术体系)(2024CXTD24)

作者简介: 林均蕙(1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: linjunhui23@163.com

通讯作者: 庞道睿(1987-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品科学, E-mail: daorui66@163.com; 共同通讯作者: 王弘(1973-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全与营养, E-mail: gzwhongd@163.com

C and D, derived from mulberry trees, were investigated to understand the inhibition mechanisms involved in the cell membrane biosynthesis of *S. aureus* by using scanning electron microscopy, quantitative real-time PCR, and parallel reaction monitoring. The results indicated that the minimum inhibitory concentrations of sanggenon C and sanggenon D against *S. aureus* were $70.60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $17.60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively, demonstrating significantly superior efficacy when compared with that of cinnamaldehyde. Furthermore, sanggenon D disrupted the cell structure and morphology of *S. aureus*. Notably, sanggenon D exhibited a stronger inhibitory effect on *S. aureus* than sanggenon C for the expression of genes and proteins related to phospholipid biosynthesis. In particular, sanggenon D exerted a more significant inhibitory effect on the expressions of Fab H and CdsA within the phospholipid synthesis pathway. Based on molecular docking results, the interaction between sanggenon D and PlsX probably involved the formation of hydrogen bonds at Lys290, Glu233, Gly293, and Ser294, with a greater interaction strength than that of the hydrogen bond interaction between sanggenon C and PlsX. This mechanism may account for the enhanced inhibitory effect of sanggenon D when compared with that of sanggenon C. Therefore, sanggenon D holds potential for development as a natural food preservative. These findings offer a theoretical foundation for the application of sanggenon D as a novel type of natural preservative.

Key words: sanggenon; *Staphylococcus aureus*; antibacterial activity; cell membrane; phospholipid biosynthesis pathway; phosphatidylglycerol

金黄色葡萄球菌是一种常见的食源性致病菌,可导致腹泻、呕吐、胃肠道损伤等多种症状,甚至危及人类生命^[1]。据统计,在2019年已有超100万例死亡病例与金黄色葡萄球菌有关,是造成死亡人数最多的常见食源性致病菌^[2]。近年来,金黄色葡萄球菌对常见防腐剂的耐受性逐渐增强,而合成类防腐剂可能带来的潜在危害也更多引起广泛关注,因此,发掘抑菌活性强、毒性低的天然食品防腐剂十分必要。

桑树(*Morus alba* L.)中的不同部位(如桑叶、桑椹、桑枝、桑白皮等)均含有多种活性物质。桑资源中的主要活性物质为黄酮类化合物,具有抗氧化、抗菌、降血糖、降血脂等多种生物活性^[3],而其中的异戊二烯类黄酮,其类黄酮骨架带有异戊二烯基团^[4],表现出更显著的抑菌活性^[5]。而异戊烯基黄酮类化合物细胞毒性相对较低^[6],抑制金黄色葡萄球菌的作用机制主要在于调控脂肪酸生物合成过程^[5],即调控金黄色葡萄球菌中磷脂生物合成的前体物质。桑树的异戊烯基黄酮有较强抑制金黄色葡萄球菌的活性^[7],其中同分异构体的异戊二烯类黄酮(桑根酮C与桑根酮D)的抑菌活性存在显著差异,然而,对于上述同分异构体的异戊二烯类黄酮产生抑菌活性差异的分子机制尚不清楚。

本研究以桑根酮C和桑根酮D作为研究对象,采用扫描电子显微镜、实时荧光定量PCR、平行反应监测等技术探究了同分异构体桑根酮C和桑根酮D对金黄色葡萄球菌磷脂生物合成的抑菌作用机制,并阐明了桑根酮C和桑根酮D与金黄色葡萄球菌调控磷脂生物合成可能作用的差异调控机制,为发掘潜在天然食品防腐剂提供了理论参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

桑根酮C和桑根酮D,购自上海源叶生物科技有限公司;肉桂醛,梯希爱(上海)化成工业发展有限公司;碘硝基四唑紫(Iodonitrotetrazolium Chloride, INT),美国AMRESCO公司;LB营养肉汤培养基,购自广东环凯微生物科技有限公司;16:0-d31-18:1磷脂酸(Phosphatidic Acid, PA)和16:0-d31-18:1磷脂酰甘油(Phosphatidylglycerol, PG)标准品,购自上海甄准生物科技有限公司。

金黄色葡萄球菌 ATCC 6538, 购自广东省微生物菌种保藏中心。用经高压灭菌的LB培养基复苏菌株,并置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 恒温摇床培养24 h。

1.2 仪器与设备

K6600B型多功能全波长酶标仪,北京凯奥科技发展有限公司;超高效液相-飞行时间质谱(ExionLC™ AD)美国AB-SCIEX公司;3K15型台式高速冷冻离心机,德国Sigma公司;SU8010型扫描电子显微镜,日本日立公司;DHP-9082型电热恒温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;HN200型多功能氮吹仪,济南海能仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 最低抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)测定

桑根酮C和桑根酮D分别对金黄色葡萄球菌的MIC值测定参考Pang等^[7]方法,稍作修改。将 $144\text{ }\mu\text{L}$

无菌 LB 培养基、18 μL 细菌悬液 ($10^7 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和 18 μL 桑根酮 C 或桑根酮 D 溶液添加到 96 孔的微孔板中。其中,桑根酮C和桑根酮D用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解 (DMSO 终浓度的体积分数为 0.5%)。以肉桂醛和表没食子儿茶素没食子酸酯 (Epigallocatechin Gallate, EGCG) 作为阳性对照组, 含体积分数为 0.5% DMSO 的无菌水作为阴性对照组。将 96 微孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 h。并在 0 h 和 20 h 后, 采用酶标仪测定混合物在 600 nm 波长处的光密度 (OD_{600} 值)。测定 20 h 的 OD_{600} 值后, 向每孔添加 30 μL 的 $0.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ INT, 并进一步孵育 2 h。通过观察每个微孔的颜色变化验证上述结果。微孔中无颜色变化表示金黄色葡萄球菌的生长受到抑制。MIC 值定义为完全抑制金黄色葡萄球菌生长的化合物最低浓度。

1.3.2 扫描电子显微镜 (Scanning Electron Microscope, SEM)

使用 SEM 观察金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 的细胞微观结构和细胞膜形态^[8]。将桑根酮 C 和桑根酮 D 分别添加到 $10^8 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 金黄色葡萄球菌的菌悬液中, 并使用等量无菌水 (含体积分数为 0.5% DMSO) 作为阴性对照。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中培养 6 h 后, 将金黄色葡萄球菌菌悬液于 8 000 $\times g$ 条件下离心 5 min, 收集菌沉淀, 并用磷酸盐缓冲液 (PBS) 进行洗涤 3 次, 弃去上清液。收集的细菌沉淀用戊二醛过夜固定。随后, 用 PBS 再次清洗菌沉淀, 将固定的菌体依次进行干燥、喷金处理、抽真空, 进一步通过扫描电子显微镜进行观察。

1.3.3 RNA提取及实时荧光定量PCR测定

参考 Pang 等^[9]方法测定基因的相对表达, 方法稍作调整。分别经桑根酮 C 和桑根酮 D 处理 6 h 后, 离

心收集金黄色葡萄球菌沉淀。并采用 Trizol 试剂提取菌体沉淀中的总 RNA, 进一步反转录以合成 cDNA。通过 StepOne 荧光定量 PCR 仪以测定实时荧光定量 PCR。16S rRNA 基因作为参考。引物序列如表 1 所示, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 分析目的基因的相对表达量。

1.3.4 相对蛋白表达量测定

通过平行反应监测测定相对蛋白表达量^[10]。分别添加桑根酮 C 和桑根酮 D 处理金黄色葡萄球菌 6 h 后, 离心收集菌体沉淀。从金黄色葡萄球菌沉淀中提取总蛋白, 并使用 BCA 蛋白测定试剂盒测定其总蛋白量。在经过还原烷基化和酶解后, 利用超高效液相色谱-质谱 (UPLC-MS, Thermo Xcalibur 4.0), C_{18} 柱 ($75 \mu\text{m}\times 25 \text{ cm}$), 流量为 $30 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测每个样品中特定蛋白的相对表达量。详细色谱和质谱条件按照 Pang 等^[11]方法。

1.3.5 细菌磷脂谱测定

金黄色葡萄球菌磷脂谱根据之前报道的方法测定^[12]。分别用桑根酮 C 和桑根酮 D 处理细菌 6 h 后, 通过离心得到金黄色葡萄球菌的菌沉淀。使用氯仿和甲醇混合溶液 (体积比为 2:1) 提取细菌沉淀中的各种磷脂。并通过氮吹仪蒸发溶剂, 用 1 mL 甲醇、氯仿和水 (体积比为 1:1:0.3) 的混合溶液重新溶解试管底部的磷脂类物质。提取脂质前, 将内标物 (16:0-d31-18:1 PA 和 16:0-d31-18:1 PG) 加入至样品中。使用 UPLC-MS 和 ekspert TM ultraLC 110-XL 系统检测样品的磷脂谱。样品的分离使用 C_{18} 色谱柱 ($2.1\times 100 \text{ mm}^2$, $1.7 \mu\text{m}$)。参数设置参考之前报道的方法^[11]。不同种类磷脂的含量以每克样品的微克数 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) 表示。测试结果结合数据库分析^[13](<http://prime.psc.riken.jp/compms/msdial/main.html>)。

表 1 金黄色葡萄球菌16S rRNA与磷脂生物合成途径相关基因的引物序列

Table 1 Primer sequences for <i>S. aureus</i> 16S rRNA and genes involved in the phospholipid biosynthesis pathway		
Gene	Primer-F	Primer-R
16S rRNA	AGCTCGTGTCTGAGATGTTG	TCGCTGCCCTTTGTATTGTC
<i>fabH</i>	GTGTAAAAGCAATCGCTGACG	CAACTTTGCCCGTCCCTAA
<i>fabI</i>	TAATATGGAAGACTTACGCGGAC	GCTTTAGCAACACCCATCACA
<i>fabF</i>	GTCGTCCATTCCAAGAAGGTAG	TATTGGCACCTCGAGCTTGT
<i>cdsA</i>	GGTGGCTTGTCTGTAGTTTGATA	AACGCCGAAATGACGCTTA
<i>plsY</i>	ATGTTTACCAGTTCACGCAGAT	ATTGACTCCCAAGACGACACC
<i>plsX</i>	TGGAAGATGAGCCTGTAGAGC	ACTACTAAAGCCGGTCTAGCTACAC
<i>plsC</i>	CGCACATCGCAAGAAGGT	CGTGAATCTTAGTAGGACCAACAT
<i>pgsA</i>	CCTTAGCGATTTTGTTGATGGT	TTACCTAATTGACCAGCTGCACT
<i>mprF</i>	AAACGCCAGTAAGAATGAGAA	AAAATCGTAAGCCAGAAGTAATAGC

表 2 桑根酮C和桑根酮D对金黄色葡萄球菌的MIC值
Table 2 Determination of MICs for sanggenon C and D toward *S. aureus*

菌种	MIC/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)			
	桑根酮 C	桑根酮 D	肉桂醛	EGCG
金黄色葡萄球菌	70.60 $\pm$ 0.00	17.60 $\pm$ 0.00	4 729.10 $\pm$ 0.00	283.61 $\pm$ 0.00

1.3.6 同源建模

通过 BLAST 搜索，并从 RCSB 蛋白质数据库 (PDB ID:1VI1) 检索磷酸转酰酶 X (PlsX)，获得了晶体的结构。使用分子操作环境 (MOE) 软件，参考 Wen 等^[14]方法进行同源建模。为了优化蛋白质的质子化状态和氢位置，在 pH 值为 7 和 300 K 的条件下使用了 QuickPrep 模块。将目标序列与模板序列进行比对，生成了 10 个不同的中间模型。这些模型通过选择各种环候选物和侧链旋转异构体形成。在这些中间模型中，根据 GB/VI 评分函数选择了最终模型，该模型表现出优越的特性。最终模型通过 AMBER12/EHT 力场进一步进行能量最小化。本研究中选择用于同源建模的模板与 PlsX 的总体氨基酸序列同一性为 52.1%。

1.3.7 分子对接

采用 MOE Dock 预测配体与 PlsX 的结合亲和力。将桑根酮 C 或桑根酮 D 定义为配体，而 PlsX 定义为靶标。通过 MOE 中的能量最小化，配体的二维结构被转换为三维结构。使用 QuickPrep 模块在 pH 值为 7 和 300 K 下优化目标蛋白的质子化状态和氢的位置。在对接之前，采用 AMBER10:EHT 力场和反应场隐式溶剂化模型。由于模板结构缺乏天然配体且特异性结合位点未知，因此使用 MOE 的位点查找器模块来预测 PlsX 的结合口袋。结果表明，PlsX 中存在由 Met61、Lys290、Gly293、Lys230 等残基组成的结合口袋。对接方式遵循“诱导契合”方法，允许受体口袋的侧链根据配体构象进行调整。为了将侧链原子固定在其原始位置，分配的权重设置为 10。对接模拟后，使用伦敦 dG 评分方法对对接分子的姿势进行排序。此外，对前 15 个分子对接姿势进行力场细化，并使用 GBVI/WSA dG 方法进行重新评分。

1.3.8 数据分析

每个样品的三个独立重复数据以平均值 $\pm$ 标准差表示。并使用单因素方差分析进行统计比较，并采用 Duncan 多重极差检验进行进一步分析。所有统计分析均使用 SPSS 软件程序 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) 执行。*P* 值小于 0.05 被认为具有统计显著性。

2 结果与讨论

2.1 桑根酮C和桑根酮D作用金黄色葡萄球菌的MIC值

桑根酮 C 和桑根酮 D 对金黄色葡萄球菌的 MIC 分别为 70.60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (50.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和 17.60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (12.50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (表 2)。桑根酮 D 作用于金黄色葡萄球菌的抑菌活性优于桑根酮 C。肉桂醛和 EGCG 作为阳性对照，其 MIC 值分别为 4 729.10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 283.61 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。Su 等^[15]测定肉桂醛作用于金黄色葡萄球菌的 MIC 亦为 4 729.10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。由此可见，桑根酮 C 和桑根酮 D 对金黄色葡萄球菌的抑制作用明显优于肉桂醛和 EGCG。此外，桑根酮 C 桑根酮 D 对金黄色葡萄球菌的抑制作用也优于其他常见的黄酮类化合物，如矢车菊素-3-O-葡萄糖苷 MIC 为 11.13 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (5.00 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)^[16]，槲皮素 MIC $\geq$ 3 390.73 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (1.02 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)^[17]，茶多酚 MIC 为 444.27 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (0.13 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)^[18]。

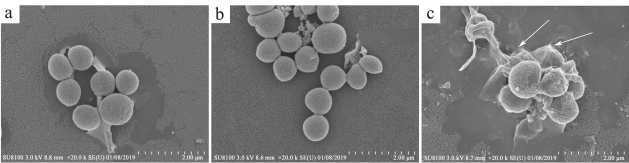


图 1 桑根酮 C 或桑根酮 D (35.30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 作用金黄色葡萄球菌的扫描电子显微镜图

Fig. 1 Scanning electron microscopy images of *S. aureus* cells after exposure to sanggenon C or sanggenon D at 35.30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

注：(a) 经体积分数为 0.5% DMSO 无菌水处理的金黄色葡萄球菌细胞 (20 000 $\times$)；(b) 经桑根酮 C 处理的金黄色葡萄球菌细胞 (20 000 $\times$)；(c) 经桑根酮 D 处理的金黄色葡萄球菌细胞 (20 000 $\times$)。

2.2 桑根酮C和桑根酮D对金黄色葡萄球菌细胞膜结构的影响

采用扫描电子显微镜观察金黄色葡萄球菌经桑根酮 C 和桑根酮 D 处理后的细胞膜形态和细胞结构的变化。对照组细胞膜结构完整，细胞呈表面光滑的球形 (图 1)。菌体采用等浓度的桑根酮 C 和桑根酮 D 处理，

即 0.5×MIC 桑根酮 C (35.30 μmol·L⁻¹) 和 2.0×MIC 桑根酮 D (35.30 μmol·L⁻¹)。经桑根酮 C 处理后少部分细菌结构变得不完整, 菌体形状发生了改变。然而, 经桑根酮 D (35.30 μmol·L⁻¹, 2.0×MIC) 处理后, 大量细胞发生变形, 细胞膜明显受损, 细胞内物质开始渗漏。

2.3 桑根酮C和桑根酮D处理后磷脂生物合成相关基因的表达

在细菌细胞膜的形成过程中, 磷脂起着至关重要的作用。桑根酮 C 和桑根酮 D 属于异戊二烯类黄酮含有异戊烯基团, 具有亲脂性, 可能与细胞膜磷脂存在相互作用^[19]。为了探究桑根酮 C 和桑根酮 D 对金黄色葡萄球菌细胞膜生物合成过程的影响, 采用实时荧光定量 PCR 测定了磷脂生物合成途径中相关基因的相对表达水平。结果如图 2 所示, 经 0.5×MIC 桑根酮 C (35.30 μmol·L⁻¹) 和 2.0×MIC 桑根酮 D (35.30 μmol·L⁻¹) 处理后, 与阴性对照相比, 磷脂合成相关基因的表达量显著差异 ($P<0.05$)。与对照相比, 编码磷酸转酰酶 C (Phosphoryl Acetyltransferase C, *plsC*) 和编码多肽抗性因子 (Multiple Peptide Resistance Factor, *mprF*) 显著下调 ($P<0.05$)。这些基因分别参与 PA 和赖氨酰磷脂酰甘油 (Lysyl-phosphatidylglycerol, L-PG) 的生物合成。样品组桑根酮 C 和桑根酮 D 之间的编码磷酸转酰酶 X (Phosphoryl Acetyltransferase X, *plsX*) 和磷酸转酰酶 Y (Phosphoryl Acetyltransferase Y, *plsY*) 的表达水平存在显著差异。金黄色葡萄球菌脂肪酸生物合成关键基因 *fabH*、*fabF* 或 *fabI* 的表达量在各组间无显著差异。而与对照组相比, 桑根酮 D 的相对表达量分别降低了 25.29%、41.41% 和 50.58%。

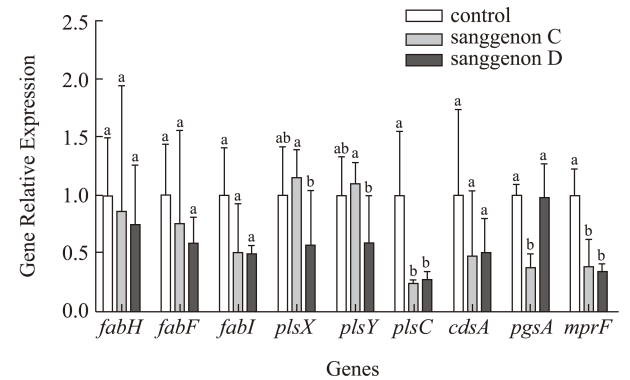


图 2 桑根酮 C 或桑根酮 D 作用下金黄色葡萄球菌细胞膜磷脂合成相关基因表达水平

Fig. 2 Expression of cell membrane phospholipid synthesis-associated genes in *S. aureus* after exposure to sanggenon C or D

注: 图中不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。下同。

2.4 桑根酮C和桑根酮D处理后磷脂生物合成相关蛋白的表达

基于基因表达结果, 采用平行反射监测探究桑根酮 C 和桑根酮 D 处理后金黄色葡萄球菌后磷脂生物合成途径中的相对蛋白表达水平。如图 3 所示, 与对照组相比, 经桑根酮 C 处理后, 磷脂生物合成途径相关蛋白 FabH 和胞苷二磷酸 - 二酰基甘油合酶 A (Cytidine Diphosphatediacylglycerol Synthase A, CdsA) 的相对蛋白表达水平与对照组相比变化不显著, 而经桑根酮 D 处理后, FabH 和 CdsA 的相对表达量显著降低 ($P<0.05$), 分别下降了 39.06% 和 63.34%。然而, 一些蛋白质在桑根酮 C 和桑根酮 D 处理后出现上调, 例如 FabF、FabI、PlsX、PlsC、磷脂酰甘油合成酶 A (Phosphatidylglycerol Synthase A, PgsA) 和 MprF。这些结果可能表明, 桑根酮 C 和桑根酮 D 处理后受损的细胞膜磷脂引发了磷脂修复系统的上调。此外与桑根酮 C 样品组相比, 桑根酮 D 处理后的 FabI、PlsC、PgsA 和 MprF 等蛋白质的上调趋势显著降低 (比桑根酮 C 样品组分别降低了 53.18%、52.02%、60.13% 和 45.56%)。

与桑根酮 C 相比, 桑根酮 D 组中 PgsA 和 MprF 蛋白的相对表达水平明显较低, 但高于对照组。这可能是因为桑根酮 D 对金黄色葡萄球菌的磷脂修复过程表现出比桑根酮 C 更强的抑制作用。不同种类的细菌中存在着磷脂修复系统^[20]。当金黄色葡萄球菌的细胞结构受损时, 细胞启动自我修复机制, 导致磷脂生物合成和修复相关基因及蛋白质表达水平的变化。然而, 相对基因表达与相对蛋白表达并不一致。这些可能是由于转录后和翻译后修饰的自我调节所导致^[21]。另外, 从金黄色葡萄球菌中提取的 RNA 样本仅来自活细胞, 而蛋白质样本在活细胞和死细胞中均被提取, 这也可能导致基因和蛋白质之间表达水平的不一致。

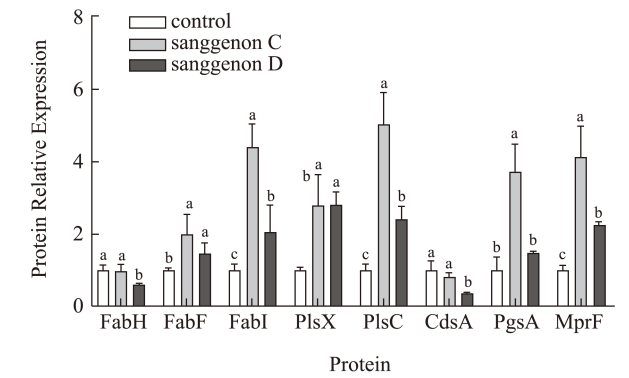


图 3 桑根酮 C 或桑根酮 D 作用下金黄色葡萄球菌细胞膜磷脂合成相关蛋白表达水平

Fig. 3 Expression of cell membrane phospholipid synthesis-associated proteins in *S. aureus* treated with sanggenon C or D

表 3 金黄色葡萄球菌脂质提取物中磷脂类化合物的类型及其离子对的信息
Table 3 Types and ion pairs of phospholipids in lipid extracts of *S. aureus*

No.	Retention time/min	Molecular weight m/z ^a	Adduct	Compounds
1	9.40	819.63	[M-H] ⁻	PG39:0 PG19:0/20:0
2	8.11	777.57	[M-H] ⁻	PG36:0 PG17:0/19:0
3	7.82	763.56	[M-H] ⁻	PG35:0 PG15:0/20:0
4	7.22	749.54	[M-H] ⁻	PG34:0 PG15:0/19:0
5	6.94	735.53	[M-H] ⁻	PG33:0 PG15:0/18:0
6	6.32	721.51	[M-H] ⁻	PG32:0 PG15:0/17:0
7	6.05	707.49	[M-H] ⁻	PG31:0 PG15:0/16:0
8	5.50	693.48	[M-H] ⁻	PG30:0 PG15:0/15:0
9	5.13	679.46	[M-H] ⁻	PG29:0 PG14:0/15:0
10	4.73	665.44	[M-H] ⁻	PG28:0 PG13:0/15:0
11	7.64	877.63	[M-H] ⁻	L-PG34:1 L-PG15:0/19:1
12	7.38	863.62	[M-H] ⁻	L-PG33:0 L-PG15:0/18:0
13	6.75	849.60	[M-H] ⁻	L-PG32:0 L-PG15:0/17:0
14	6.42	835.58	[M-H] ⁻	L-PG31:1 L-PG15:0/16:1
15	7.29	647.46	[M-H] ⁻	PA32:0 PA15:0/17:0

2.5 桑根酮C和桑根酮D作用下金黄色葡萄球菌的脂质谱

采用超高效液相-飞行时间质谱探究桑根酮 C 和桑根酮 D 对金黄色葡萄球菌磷脂谱的影响。结果如表 3 所示，共检测出 15 种磷脂类物质，其中包括 10 种 PG、4 种 L-PG 和 1 中 PA。如图 4 所示，对金黄色葡萄球菌细胞中的 PA32:0/15:0-17:0 进行了定量。经桑根酮 C 处理后，与对照组相比，PA32:0/15:0-17:0 的含量显着增加。桑根酮 D 处理后 PA 含量从 7.44 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 下降至 5.76 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (图 4)。

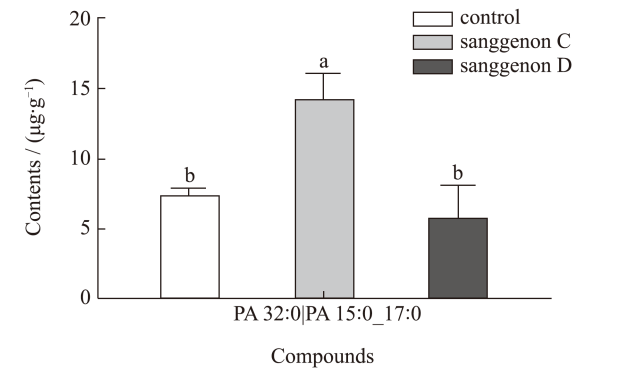


图 4 桑根酮 C 或桑根酮作用下金黄色葡萄球菌的磷脂酸 (PA) 含量
Fig. 4 Phosphatidic acid (PA) content of *S. aureus* after exposure to sanggenon C or D

L-PG 是细胞膜磷脂的重要成分^[22]。如图 5 所示，经桑根酮 C 处理后金黄色葡萄球菌的总 L-PG 含量从

352.39 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 下降至 327.82 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。与对照组相比，经桑根酮 D 处理后 L-PG 总含量显著降低 ($P<0.05$)。在金黄色葡萄球菌中共检测出 4 种 L-PG，分别为 L-PG15:0/17:0、L-PG15:0/19:1、L-PG15:0/18:0 和 L-PG15:0/16:1 (见图 6)。其中，L-PG15:0/17:0 的含量最高。经桑根酮 D 处理后，L-PG15:0/17:0 含量较对照组显着下降，由 181.25 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 降至 114.46 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ，而 L-PG15:0/18:0 和 L-PG15:0/16:1 的含量与对照组相比分别降低了 40.01% 和 51.55%，L-PG15:0/19:1 含量无显着性差异。经桑根酮 C 处理后，L-PG15:0/18:0 的含量较对照组显著降低 ($P<0.05$)，而其他 L-PG 的含量则未观察到显著变化。此外，经桑根酮 C 和桑根酮 D 处理后，PG 总含量显著下降 ($P<0.05$)，从 1787.90 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 分别下降至 892.36 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 701.57 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (图 5)，其中桑根酮 D 下降水平明显大于桑根酮 C。本研究对金黄色葡萄球菌中的 9 种 PG 进行定量分析 (见图 7)。结果显示，PG31:0/PG15:0_16:0、PG30:0/PG15:0_15:0、PG34:0/PG15:0_19:0、PG33:0/PG15:0_18:0 和 PG35:0/PG15:0_20:0 是主要成分 (图 7)。与对照组相比，经桑根酮 C 和桑根酮 D 处理后，上述 5 种 PG 的含量均显著降低。PG31:0/PG15:0_16:0 是在金黄色葡萄球菌中检测处含量最高的 PG。经桑根酮 C 和桑根酮 D 处理后，PG31:0/PG15:0_16:0 含量分别从 628.72 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 下降至 326.71 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 239.29 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。对于 PG31:0/PG15:0_16:0 而言，桑根酮 D 下降效果显著大于桑根酮 C。而 PG30:0/PG15:0_15:0 的含量分别从 245.18 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

下降至 $116.00 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $101.03 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。此外,金黄色葡萄球菌中 PG36:0/PG17:0_19:0、PG39:0/PG19:0_20:0 和 PG28:0/PG13:0_15:0 的含量均显著下降 ($P<0.05$)。结果表明,桑根酮 D 对 L-PG 和 PG 的抑制作用优于桑根酮 C。

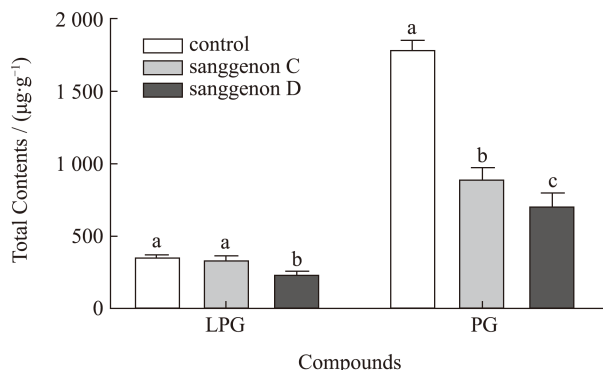


图5 桑根酮 C 或桑根酮 D 作用下金黄色葡萄球菌赖氨酸磷脂酰甘油 (L-PG) 和磷脂酰甘油 (PG) 的总含量

Fig. 5 Total contents of lysyl-phosphatidylglycerol (L-PG) and phosphatidylglycerol (PG) in *S. aureus* after exposure to sanggenon C or D

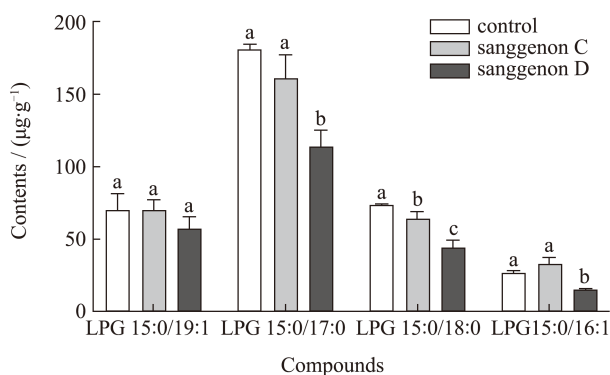


图6 桑根酮 C 或桑根酮 D 作用下金黄色葡萄球菌各种 L-PG 含量

Fig. 6 L-PG content profiles of *S. aureus* after exposure to sanggenon C or D

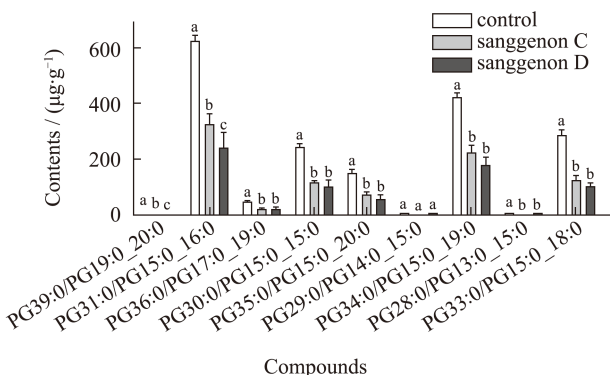


图7 桑根酮 C 或桑根酮 D 作用下金黄色葡萄球菌各种 PG 含量

Fig. 7 PG content profiles of *S. aureus* after exposure to sanggenon C or D

在本研究中,同分异构体桑根酮 C 和桑根酮 D 表现出不同的抑菌活性,同分异构体的差异可能会引起作用靶标的不同。在金黄色葡萄球菌中,细胞膜磷脂的生物合成首先通过 II 型脂肪酸生物合成途径合成 PA,继而通过磷脂生物合成途径合成不同种类的磷脂^[23]。短链脂肪酸在各种脂肪酸合成酶催化下转化为生物合成所需的长链脂肪酸。长链脂肪酸在磷酸转酰酶的催化下合成 PA。PA 还可作为合成 PG、L-PG 等各种磷脂的原料。这些不同的磷脂化合物共同组成金黄色葡萄球菌的细胞膜磷脂。

由于经桑根酮 C 和桑根酮 D 处理后,PlsX 和 PlsC 的相对表达水平显著增加 ($P<0.05$)。然而,桑根酮 D 处理后 PA 含量低于对照组(尽管差异无统计学意义)。这可能是桑根酮 D 未抑制磷酸转酰酶(如 PlsX、PlsY 和 PlsC)的表达,而是抑制其酶活性。

PA 通过 CdsA、PgsA 和 MprF 催化合成 PG 和 L-PG^[24-26]。本研究中,桑根酮 D 作用金黄色葡萄球菌后,几乎所有种类的 L-PG 和 PG 的含量均显著降低 ($P<0.05$)。然而,经桑根酮 C 处理后,L-PG15:0/17:0 和 L-PG15:0/16:1 的含量变化不显著。同样,桑根酮 C 样品组大部分检测得到的 L-PG 和 PG 含量均高于桑根酮 D 样品组。这可能是由于桑根酮 C 和桑根酮 D 对 CdsA 蛋白表达存在不同抑制作用。在甘油磷脂生物合成过程中,首先 CdsA 催化 PA 转化为其他磷脂。因此,与桑根酮 C 样品组相比,桑根酮 D 样品组的 PA 合成其他磷脂的过程可能会减少。

2.6 桑根酮 C 和桑根酮 D 与磷酸转酰酶的分子对接

本研究磷酸转酰酶的表达在桑根酮 C 和桑根酮 D 作用后,出现了上调,而桑根酮 C 和桑根酮 D 合成磷脂酸的结果差异明显,可能在化合物与酶的相互方面存在差异,进一步对桑根酮 C 与 PlsX 相互作用进行分子对接分析,结果如图 8a~8c 所示,桑根酮 C 中羧基的氧原子作为氢键受体,与 PlsX 中 Lys290 侧链的氮原子和 Gly293 骨架氮原子形成氢键。另外,桑根酮 D 中羟基的氧原子也作为氢键受体,与 PlsX 的 Lys290 和 Gly293 侧链的氮原子建立氢键(图 8d~8f)。而桑根酮 D 中酚羟基的两个氧原子作为氢键供体,分别与 PlsX 中 Glu233 和 Ser294 侧链的氧原子形成氢键。这些结果表明,桑根酮 D 与 PlsX 的氢键可能强于桑根酮 C 与 PlsX 的作用,这可能进一步导致桑根酮 D 的抑制作用强于桑根酮 C。

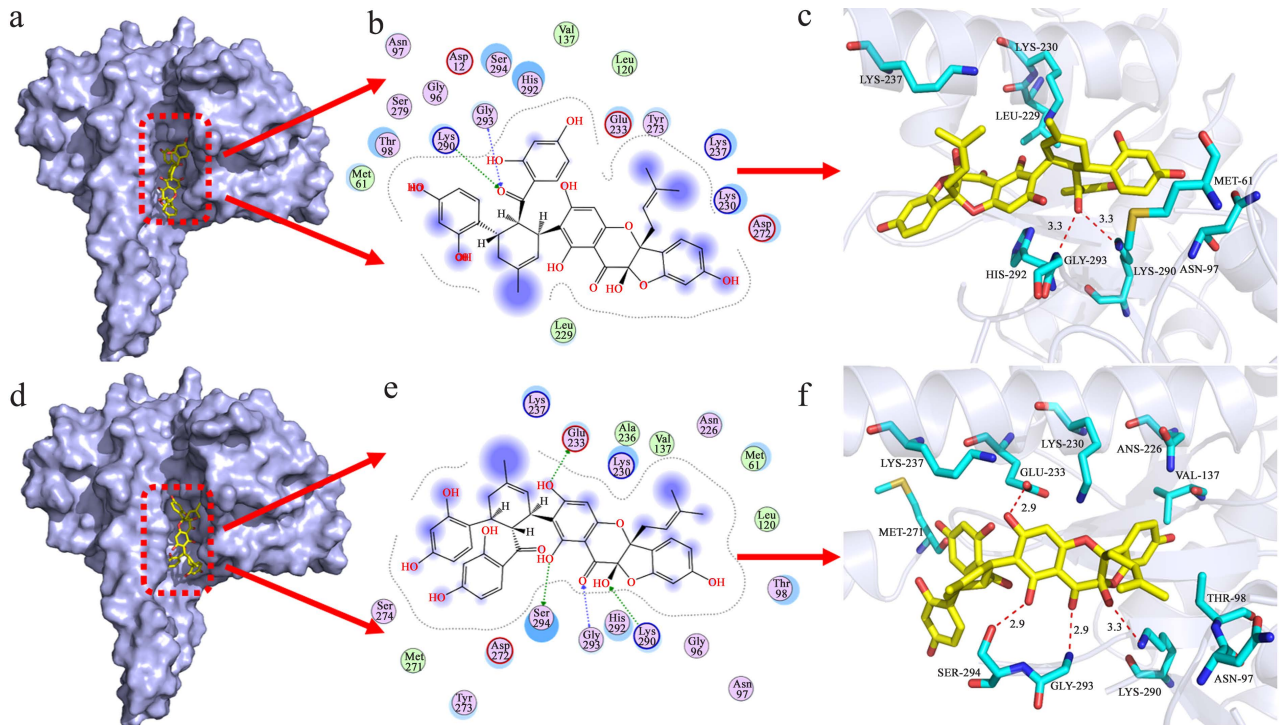


图 8 基于分子对接获得的 PlsX 与桑根酮 C、桑根酮 D 的结合模式图

Fig.8 Binding mode diagrams of PlsX with sanggenon C and sanggenon D obtained based on molecular docking

注：(a) PlsX 分子对接模型整体视图（黄色为桑根酮 C）；(b) PlsX 与桑根酮 C 相互作用的二维模型；(c) PlsX 与桑根酮 C 相互作用的三维模型（黄色为桑根酮 C，青色为结合空腔周围的残基，红色虚线表示为氢键）。(d) PlsX 分子对接模型整体视图（黄色为桑根酮 D）；(e) PlsX 与桑根酮 D 相互作用的二维模型；(f) PlsX 与桑根酮 D 相互作用的三维模型（黄色为桑根酮 D，青色为结合空腔周围的残基，红色虚线表示为氢键）。

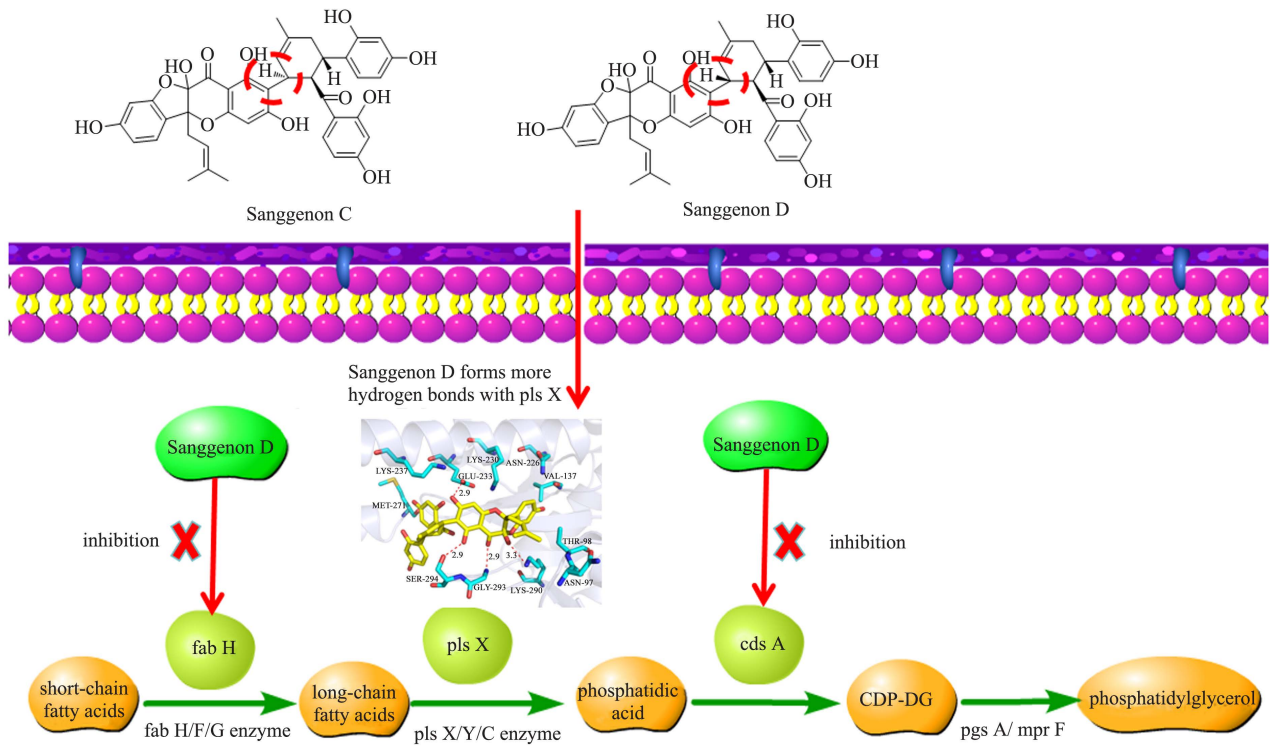


图 9 桑根酮 D 对金黄色葡萄球菌抑菌活性机理图

Fig. 9 Possible mechanisms of antibacterial activity of sanggenon D towards *S. aureus*

同分异构体桑根酮 C 和桑根酮 D 对磷脂生物合成途径的不同抑制机制, 差异地抑制金黄色葡萄球菌的活性。桑根酮 C 和桑根酮 D 对金黄色葡萄球菌磷脂生物合成的可能作用机制如图 9 所示。

3 结论

桑根酮 D 等异戊烯基黄酮通过调控金黄色葡萄球菌中的磷脂生物合成来破坏细胞膜的完整性, 主要作用于 PG 和 L-PG 的生物合成。同分异构体桑根酮 C 和桑根酮 D 主要是由于对磷脂合成通路中 Fab H 和 CdsA 表达存在差异调控作用, 且可能对磷酸转酰酶也存在差异性抑制作用, 导致对金黄色葡萄球菌磷脂生物合成的抑制差异。未来将进一步开展桑根酮 D 在不同食品保鲜防腐上的应用研究, 为桑根酮 D 作为新型天然防腐剂的开发应用提供参考。

参考文献

- [1] BENCARDINO D, AMAGLIANI G, BRANDI G. Carriage of *Staphylococcus aureus* among food handlers: An ongoing challenge in public health [J]. Food Control, 2021, 130: 108362.
- [2] ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis [J]. Lancet, 2022, 399(10325): 629-655.
- [3] 李瑞雪,汪泰初,王钰婷,等.桑树中黄酮类化合物研究进展及应用[J].安徽农业科学,2014,42(28):9661-9663,9666.
- [4] YANG X M, JIANG Y M, YANG J L, et al. Prenylated flavonoids, promising nutraceuticals with impressive biological activities [J]. Trends in Food Science & Technology, 2015, 44(1): 93-104.
- [5] PANG D R, LIAO S T, WANG W F, et al. Destruction of the cell membrane and inhibition of cell phosphatidic acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*: an explanation for the antibacterial mechanism of morusin [J]. Food & Function, 2019, 10(10): 6438-6446.
- [6] VENTURELLI S, BURKARD M, BIENDL M, et al. Prenylated chalcones and flavonoids for the prevention and treatment of cancer [J]. Nutrition, 2016, 32(11-12): 1171-1178.
- [7] PANG D R, WANG W F, LI E N, et al. Sanggenon D from root bark of mulberry inhibits the growth of *Staphylococcus aureus* by moderating the fatty acid biosynthesis system [J]. Industrial Crops and Products, 2019, 140: 11171.
- [8] OZOGUL Y, BOGA E K, AKYOL I, et al. Antimicrobial activity of thyme essential oil nanoemulsions on spoilage bacteria of fish and food-borne pathogens [J]. Food Bioscience, 2020, 36: 100635.
- [9] PANG D R, YOU L J, ZHOU L, et al. *Averrhoa carambola* free phenolic extract ameliorates nonalcoholic hepatic steatosis by modulating mircoRNA-34a, mircoRNA-33 and AMPK pathways in leptin receptor-deficient db/db mice [J]. Food & Function, 2017, 8(12): 4496-4507.
- [10] DU A, JIA W. Virtual screening, identification, and potential antioxidant mechanism of novel bioactive peptides during aging by a short-chain peptidomics, quantitative structure-activity relationship analysis, and molecular docking [J]. Food Research International, 2023, 172: 113129.
- [11] PANG D R, HUANG Z X, LI Q, et al. Antibacterial Mechanism of Cinnamaldehyde: Modulation of Biosynthesis of Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylglycerol in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2021, 69(45): 13628-13636.
- [12] HUANG Z X, PANG D R, LIAO S T, et al. Synergistic effects of cinnamaldehyde and cinnamic acid in cinnamon essential oil against *S. pullorum* [J]. Industrial Crops and Products, 2021, 162: 113296.
- [13] TSUGAWA H, IKEDA K, TAKAHASHI M, et al. A lipidome atlas in MS-DIAL 4 [J]. Nature Biotechnology, 2020, 38(10): 1159-1163.
- [14] WEN X J, XU P F, SHI M Q, et al. Evans blue-modified radiolabeled fibroblast activation protein inhibitor as long-acting cancer therapeutics [J]. Theranostics, 2022, 12(1): 422-433.
- [15] SU X, SHEN T Z, YUAN Y, et al. Effects of cinnamaldehyde on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane [J]. Food Control, 2015, 47: 196-202.
- [16] LI L L, ZHOU P, WANG Y D, et al. Antimicrobial activity of cyanidin-3-O-glucoside-lauric acid ester against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* [J]. Food Chemistry, 2022, 383:132410.
- [17] DOS SANTOS J F S, TINTINO SR, DA SILVA A R P, et al. Enhancement of the antibiotic activity by quercetin against *Staphylococcus aureus* efflux pumps [J]. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 2021, 53: 157-167.
- [18] 殷晓雨,吴凤琴,彭琴,等.山梨酸钾与天然化合物联用对金黄色葡萄球菌抑制作用研究[J].食品与发酵工业,2025,5(17):56-63.
- [19] WEN L R, ZHOU T, JIANG Y M, et al. Identification of prenylated phenolics in mulberry leaf and their neuroprotective activity [J]. Phytomedicine, 2021, 90: 153641.
- [20] LIN Y B, BOGDANOV M, LU S, et al. The phospholipid-repair system LpIT/Aas in Gram-negative bacteria protects the bacterial membrane envelope from host phospholipase A₂ attack [J]. Journal of Biological Chemistry, 2018, 293(9): 3386-3398.
- [21] KEINHÖRSTER D, GEORGE S E, WEIDENMAIER C, et al. Function and regulation of *Staphylococcus aureus* wall teichoic acids and capsular polysaccharides [J]. International Journal of Medical Microbiology, 2019, 309(6): 151333.
- [22] REHAL R P, MARBACH H, HUBBARD A T M, et al. The influence of mild acidity on lysyl-phosphatidylglycerol biosynthesis and lipid membrane physico-chemical properties in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Chemistry and Physics of Lipids, 2017, 206: 60-70.
- [23] PARSONS J B, ROCK C O. Is bacterial fatty acid synthesis a valid target for antibacterial drug discovery? [J]. Current Opinion in Microbiology, 2011, 14(5): 544-549.
- [24] ADAMS H M, JOYCE L R, GUAN Z, et al. *Streptococcus mitis* and *S. oralis* lack a requirement for CdsA, the enzyme required for synthesis of major membrane phospholipids in bacteria [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2017, 61(5): e02552-16.
- [25] GARCÍA-LARA J, WEIHS F, MA X, et al. Supramolecular structure in the membrane of *Staphylococcus aureus* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(51): 15725-15730.
- [26] SONG D F, JIAO H Z, LIU Z F. Phospholipid translocation captured in a bifunctional membrane protein MprF [J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 2927.