

甘草治疗耐甲氧西林表皮葡萄球菌感染的活性成分筛选及作用机制

王建超¹, 洪紫嫣², 伍子琦¹, 黄宏辉³, 杨得坡^{2*}, 徐新军², 彭华勇^{1,2*}

1 吉首大学 药学院, 湖南 吉首

2 中山大学 药学院, 广东 广州

3 广州南药园科技发展有限公司, 广东 广州

王建超, 洪紫嫣, 伍子琦, 黄宏辉, 杨得坡, 徐新军, 彭华勇. 甘草治疗耐甲氧西林表皮葡萄球菌感染的活性成分筛选及作用机制[J]. 微生物学报, 2025, 65(3): 1119-1136.

WANG Jianchao, HONG Ziyao, WU Ziqi, HUANG Honghui, YANG Depo, XU Xinjun, PENG Huayong. Active components and mechanisms of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. in treating methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* infections[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(3): 1119-1136.

摘要: 【目的】筛选甘草中治疗耐甲氧西林表皮葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*, MRSE)感染的活性成分, 并研究其潜在的抗菌作用机制。【方法】采用半数稀释法测定甘草中药理成分对 MRSE 的抗菌活性; 利用微生物粘着碳烃化合物法、结晶紫染色法、扫描电子显微镜和一体化细胞成像仪等技术, 评估药物抵抗 MRSE 感染的抗菌表型; 采用 GC-MS 进行代谢组学分析, 并用试剂盒测定胞内氧化脱氢酶的活性, 采用染料标记法评价细胞膜的损伤与流动性, 并通过大蜡螟幼虫感染生存率试验评估体内抗菌效率。【结果】甘草中的甘草查尔酮 A、甘草查尔酮 C 和光甘草定等成分对 MRSE 表现出高效抗菌活性, 其中甘草查尔酮 A 抑制 MRSE 的效果最为显著, 其最小抑菌浓度为 6.0 $\mu\text{g/mL}$, 最小杀菌浓度为 12.0 $\mu\text{g/mL}$ 。代谢组学分析显示, 甘草查尔酮 A 主要影响 MRSE 的代谢、次生代生物合成以及 ABC 转运等生物途径, 阻碍鸟氨酸、赖氨酸和烟酸的生物合成, 并确认 1,3-二棕榈酸甘油酯(1,3-dipalmitin)在胞内积累。表型实验结果证实, 甘草查尔酮 A 可导致 MRSE 的三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)循环通量下调, 胞内 ATP 水平降低; 抑制生物被膜的形成和胞内蛋白质的表达, 阻止 MRSE 细菌黏附 HaCaT 细胞; 破坏 MRSE 细胞膜的结构, 导致细胞塌陷变形甚至破裂, 并提高了 MRSE 感染后

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD1600304); 广东省农业科技创新与推广项目(2023KJ142); 云浮科技项目(2021020605); 湖南省自然科学基金(2024JJ7415); 湖南省教育厅优秀青年项目(24B0501)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1600304), the Agricultural Science and Technology Innovation and Promotion Program of Guangdong Province (2023KJ142), the Yunfu Scientific and Technological Project (2021020605), the Natural Science Foundation of Hunan Province (2024JJ7415), and the Excellent Youth Project of Education Department of Hunan Province (24B0501).

*Corresponding authors. E-mail: YANG Depo, lssydp@mail.sysu.edu.cn; PENG Huayong, penghy29@163.com

Received: 2024-09-18; Accepted: 2025-01-10; Published online: 2025-02-08

大蜡螟幼虫的存活率。【结论】甘草查尔酮 A 的暴露改变了 MRSE 细胞的糖、脂质和氨基酸代谢，影响生物被膜、蛋白等次生代谢物的合成与细胞膜的结构，导致 MRSE 的 ATP 生成减少、转运蛋白功能失常以及黏附与感染能力下降等抗菌表型。

关键词：甘草；甘草查尔酮 A；耐甲氧西林表皮葡萄球菌；代谢组学；代谢途径；ABC 转运

Active components and mechanisms of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. in treating methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* infections

WANG Jianchao¹, HONG Ziyang², WU Ziqi¹, HUANG Honghui³, YANG Depo^{2*}, XU Xinjun², PENG Huayong^{1,2*}

1 School of Pharmaceutical Sciences, Jishou University, Jishou, Hunan, China

2 School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong, China

3 Southern Medicine Fairyland (Guangzhou) Technology Development Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong, China

Abstract: [Objective] To identify the active components in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. that inhibit methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) infections and explore their potential antibacterial mechanisms. [Methods] The half-dilution method was employed to assess the inhibitory activities of pharmacological components from *G. uralensis* against MRSE. The anti-MRSE phenotype of this medicinal herb was evaluated by microbial adhesion to hydrocarbons, crystal violet staining, scanning electron microscopy, and integrated cell imaging. Additionally, metabolomic analysis was conducted *via* gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), and the activity of intracellular oxidative dehydrogenase was measured by a commercially available reagent kit. The propidium iodide and laurdan dyes were utilized to assess the membrane damage and fluidity of cells. The challenge test was conducted with the larvae of *Galleria mellonella* to determine the antibacterial activities of tested pharmacological components *in vivo*. [Results] Licochalcone A, licochalcone C, and glabridin from *G. uralensis* demonstrated significantly inhibitory activities against MRSE. Among these compounds, licochalcone A exhibited the strongest inhibitory effect on MRSE, with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 6.0 µg/mL and a minimum bactericidal concentration (MBC) of 12.0 µg/mL. The metabolomic analysis indicated that licochalcone A primarily influenced the metabolic pathways, secondary metabolite biosynthesis, and ATP-binding cassette (ABC) transport systems of MRSE. This compound impeded the biosynthesis of ornithine, lysine, and niacin, leading to the accumulation of 1,3-dipalmitin in the cells. Phenotypic experiments corroborated that licochalcone A downregulated the tricarboxylic acid (TCA) cycle flux and reduced the intracellular ATP level in MRSE. Furthermore, it inhibited the biofilm formation and intracellular protein expression, thereby preventing MRSE from adhering to HaCaT cells. Additionally, licochalcone A disrupted the structural integrity of the MRSE cell membrane, resulting in cell collapse, deformation, and even rupture and increased the survival rate of *G. mellonella* larvae following MRSE infection. [Conclusion] Exposure to

licochalcone A alters the metabolism of sugars, lipids, and amino acids in MRSE cells, thereby influencing the biofilm formation, biosynthesis of secondary metabolites such as proteins, and the remodeling of cell membranes. Consequently, this alteration results in an antimicrobial phenotype characterized by decreased ATP production, impaired transporter function, and reduced adhesion and infection of MRSE.

Keywords: *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; licochalcone A; methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*; metabolomics; metabolic pathway; ABC transport

豆科植物甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)、胀果甘草(*Glycyrrhiza inflata* Bat.)、光果甘草(*Glycyrrhiza glabra* L.)的干燥根和根茎,具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药的功效,常用于治疗脾胃虚弱、倦怠乏力、心悸气短、咳嗽痰多、脘腹及四肢挛急疼痛、痈肿疮毒,还可缓解药物毒性及烈性^[1]。现代药理学研究证实,甘草的主要药理成分包括三萜类和黄酮类,以光甘草定、甘草酸和甘草次酸为主的三萜类成分,具有抗癌、抗病毒、免疫调节等药理作用^[2];以2-苯基色原酮为母核的黄酮类成分则具有较强的抗氧化功能和抗菌抑菌作用。甘草作为一种药食同源的中药材,不仅在中医领域有着广泛的应用,还常作为食品添加剂使用,展现了其在保健和疾病预防治疗方面的多重功效。

细菌耐药已经成为威胁人类健康的全球性公共问题。据世界卫生组织报告,每年全球约有170万人死于细菌耐药,如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)、多重耐药铜绿假单胞菌(multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*)、抗万古霉素屎肠球菌(vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*)等耐药细菌正在全球范围内造成严重的健康问题^[3-4]。例如,住院患者和免疫力低下人群易感染的表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)也在向多药耐药方向不断演化,调查显示临床分离的 *S. epidermidis*

菌株中有80%以上对青霉素、氨苄西林、头孢唑林和头孢菌素耐药^[5-6]。有效治疗多耐药耐甲氧西林表皮葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*, MRSE)感染的抗生素正不断减少,不受控制的MRSE感染正威胁着住院患者和免疫力低下人群的健康和生命。

由于临床上治疗MRSE感染越发困难,研究人员正试图发现新型抗菌药物或开发更有效的抗菌策略来应对MRSE的演化和发展。以往的研究表明,甘草在耐药菌治疗方面具有确切的疗效,如甘草的80%甲醇提取物对多种MRSA菌株(KCCM 11812、40510、40512)具有抗菌活性^[7-9],甘草中的光甘草醇、甘草查尔酮A、甘草查尔酮C、甘草查尔酮E等异戊烯基查尔酮成分对MRSA表现出高效的杀伤作用^[10]。然而,关于甘草治疗MRSE感染的研究报道较少,其抗MRSE感染的药理学成分与作用机制尚不清楚。本研究根据甘草的有效成分对多药耐药细菌的抗菌特性,推测甘草中的戊烯基查尔酮能高效杀伤多药耐药的 *S. epidermidis*,并通过实验加以验证。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

耐甲氧西林表皮葡萄球菌(MRSE, RP62A/ATCC 35984)购自广东省微生物菌种保藏中心^[11],并通过划线法进行纯化;HaCaT细胞来源于本课题组的传代培养,大蜡螟幼虫购自上

海爬缘生物有限公司, 长约 2–3 cm, 重约 400–500 mg, 颜色均匀, 无暗点或灰色斑纹; CAMHB 肉汤培养基和 M-H 固体培养基购自广东环凯微生物科技有限公司; 甘草素、异甘草素、甘草苷和甘草查尔酮 A 由课题组前期分离得到并通过核磁共振确认结构; 其他甘草成分购自四川省维克奇生物科技有限公司; 甲氧西林、克拉霉素、头孢氨苄、庆大霉素、万古霉素为分析纯; 蛋白提取试剂盒购自上海贝博生物科技有限公司; 微生物分解代谢物控制蛋白 (catabolite control protein A, CcpA) ELISA 试剂盒购自江苏晶美生物科技有限公司; 胞浆异柠檬酸脱氢酶 (cytosolic isocitrate dehydrogenase, ICDHc) 活性检测试剂盒、NAD-苹果酸脱氢酶 (NAD-dependent malate dehydrogenase, NAD-MDH) 活性检测试剂盒、柠檬酸 (citric acid, CA) 含量检测试剂盒、顺乌头酸酶 (aconitase, ACO) 活性检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; ATP 检测试剂盒购自上海碧云天生物技术股份有限公司。

紫外可见分光光度计购自北京普析通用仪器有限公司; 微生物培养箱、超净工作台、微量分光光度计、一体化细胞成像分析仪购自 ThermoFisher Scientific 公司; 高压蒸汽灭菌锅购自上海旻泉仪器有限公司; 恒温摇床购自上海贝英实业有限公司; 扫描电镜购自 Hitachi High-Tech Scientific Solutions 公司; 气相色谱质谱联用仪购自 Agilent 公司; 多功能酶标仪购自 BioTek 公司。

1.2 最小抑菌浓度和最小杀菌浓度的测定

参考文献 [12] 方法测定最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 和最小杀菌浓度 (minimum bactericidal concentration, MBC) 来评价甘草的主要成分对 MRSE 的抑菌活性。

将药物用 4 倍质量的 DMSO 溶解至 200.0 mg/mL, 以半数连续稀释法将药物分散于 CAMHB 培养基中, 并在接下来的实验中使用 0.1% DMSO 作为对照。将对数生长期的 MRSE 用 CAMHB 培养基重悬后稀释, 取 100 μ L 菌悬液接种于 96 孔板上, 并用不同浓度的药物处理, 使得最终菌悬液浓度约 10^6 CFU/mL, 药物浓度范围为 1.0–100.0 μ g/mL。在 37 $^{\circ}$ C 条件下培养 24 h 后, 无明显细菌生长的最低浓度为 MIC 浓度。为测定 MBC, 从未见细菌生长孔中取 100 μ L, 接种于 M-H 琼脂板上, 37 $^{\circ}$ C 孵育 72 h 后测定活菌数量。MBC 定义为能够杀灭 99.9% 细菌的最低药物浓度。

1.3 药物对 MRSE 的抑制与杀灭作用

分别用 0.5 \times MIC、1 \times MIC、2 \times MIC 的药物浓度处理对数生长期的 MRSE (1×10^6 CFU/mL), 然后在 37 $^{\circ}$ C 条件下监测 24 h 内 OD_{600} 值, 分析药物作用下 MRSE 的生长。再分别用不同浓度的药物处理对数生长期的 MRSE (1×10^6 CFU/mL), 每 2 h 取 100 μ L 菌液进行倍比稀释后均匀涂布在 M-H 琼脂板, 37 $^{\circ}$ C 孵育 72 h, 测定活菌数, 绘制药物对 MRSE 杀灭曲线。

1.4 代谢组学分析

代谢物的制备及 GC-MS 分析按照文献 [13] 进行。对数生长期的 MRSE (OD_{600} 值为 0.2) 在 37 $^{\circ}$ C 下暴露于 0.5 \times MIC 的药物中 4 h 后, 4 $^{\circ}$ C、4 000 \times g 离心 6 min 收集菌体, 用预冷的 PBS 离心洗涤 2 次, 将 0.5 \times MIC 组和对照组的样品加入 -80 $^{\circ}$ C 的预冷甲醇中, 使用超声波系统破碎细胞 (50% 超声强度, 超声 2 s、间隔 3 s, 共 10 min)。细胞破碎后再次离心取上清液, 加入内标物核糖醇后真空干燥。干燥后的样品使用 MSTFA 进行衍生化处理, 然后 12 000 \times g 离心 10 min, 取上清液在 24 h 内通过气相色谱质谱联用仪进行检测。

在峰识别和解卷积后, 使用 NIST 数据库 (<https://www.nist.gov/srd/nist-standard-reference-database-1a>) 和 Fiehn 数据库 (<https://fiehnlab.ucdavis.edu>) 鉴定代谢物。使用内标物核糖醇对质谱数据进行归一化处理, 以便后续分析。基于与对照组相比的多重变化, 使用 Student's *t* 检验的 *P* 值和校正后的调整 *P* 值来选择差异代谢物, 并执行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 进行主成分分析。将差异代谢物映射到 KEGG 数据库 (<https://www.kegg.jp/>) 使用 MBROLE 2.0 中的富集分析模块富集代谢途径。

1.5 分析细菌的 TCA 循环水平

对数生长期的 MRSE (OD_{600} 值为 0.2) 在 37 °C 下暴露于 0.5×MIC 的药物中 4 h 后, 4 °C、4 000×g 离心 6 min 收集菌体, 并用预冷的 PBS 离心洗涤 2 次。按蛋白提取试剂盒的说明书抽提给药组与对照组的细菌蛋白。使用试剂盒测定 ICDHc、NAD-MDH、ACO 的活性, 以及 CcpA、CA 和 ATP 的含量。

1.6 生物被膜与 Zeta 电位分析

采用结晶紫染色法评价 MRSE 生物被膜的形成^[14]。将对数生长期的 MRSE 在 CAMHB 培养基中重悬至 OD_{600} 值为 0.2, 用 0.5×MIC 和 1×MIC 的药物在 37 °C 孵育 12 h。孵育结束后丢弃上清, 用 PBS 冲洗孔板 3 次以去除浮细胞, 然后将孔板置于 50 °C 烤箱中 1 h。加入 200 μL 1% 结晶紫溶液对剩余生物被膜染色 20 min 后, 去除多余结晶紫溶液。冲洗并干燥后, 用 30% 醋酸溶液提取结晶紫 20 min, 测定 OD_{570} 值。此外, 采用 BCA 蛋白测定法评价 MRSE 蛋白质的生物合成^[15], 将对数生长期的 MRSE 在 CAMHB 培养基中重悬至 OD_{600} 值为 0.2, 在 0.5×MIC 和 1×MIC 的药物中 37 °C 孵育 4 h。4 °C、4 000×g 离心 6 min 收集菌体, 用预冷的 PBS 再次离心洗涤 2 次后, 加入溶菌酶至终浓

度为 10 μg/mL, 37 °C 孵育 45 min。冰浴超声破碎后, 以 8 000×g 离心 5 min, 取上清用 BCA 蛋白试剂盒测定蛋白浓度。

1.7 HaCaT 细胞模型评价细菌黏附力

1.7.1 药物处理 MRSE 与荧光标记

参考文献[16]方法, 评估药物对 MRSE 黏附感染宿主细胞的影响。将对数生长期的 MRSE 在 CAMHB 培养基中重悬至 OD_{600} 值为 0.2, 用 0.5×MIC 和 1×MIC 的药物在 37 °C 孵育 4 h。4 °C、4 000×g 离心 6 min 收集菌体后用无菌 PBS 重悬, 定量至 1.0 mL (OD_{600} 值为 1.0), 加入 CFDA-SE 染色储存液至终浓度为 2 μmol/L, 混匀后置于 37 °C 孵育 30 min。用预冷的 1% FBS/HBSS 液体洗涤 3 次后, 定量至 1 mL 备用。

1.7.2 MRSE 黏附 HaCaT 细胞

在预定时间内, 将 HaCaT 细胞以每孔 5×10^5 个细胞的比例接种于 12 孔板中, 在含 10% FBS 的 DMEM 双抗培养基中, 37 °C、5% CO₂ 下培养 24 h 直至细胞融合。在接种细菌前再让细胞成熟 24 h。用 1% FBS/HBSS 液体洗涤 HaCaT 细胞 2 次后, 按 MOI 为 100:1 的比例加入 CFDA-SE 染色的 MRSE 菌, 37 °C 孵育 2 h。孵育完成后, 用 1% FBS/HBSS 溶液轻轻冲洗 3 次, 并在 1% FBS/HBSS 液体中保存。选用适用于 CFDA-SE 染料的绿色荧光通道, 在 2 h 内使用一体化细胞成像仪拍照观察 MRSE 黏附 HaCaT 细胞的情况。

1.8 测定药物作用下细菌的 DNA、RNA 泄漏

收集对数生长期的 MRSE 在 HBSS 中重悬至 OD_{600} 值为 0.2, 用 0.5×MIC 和 1×MIC 的药物在 37 °C 处理 4 h。随后, 通过 0.22 μm 微孔过滤器过滤获得上清液, 并使用超微量分光光度计进行分析, 以测定 DNA 和 RNA 的释放情况。

1.9 测定甘草查尔酮 A 损伤 MRSE 细胞膜的程度

将对数生长期的 MRSE 用 CAMHB 培养基重悬至 OD_{600} 值为 0.2, 用 $0.5\times MIC$ 、 $1\times MIC$ 和 $2\times MIC$ 的甘草查尔酮 A 处理 4 h。处理结束后, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 重悬至 OD_{600} 值为 1.0, 避光加入碘化丙锭(propidium iodide, PI)至终浓度为 $2\ \mu\text{mol/L}$, $37\ ^\circ\text{C}$ 避光孵育 30 min, 用 PBS 洗涤细胞 3 次后重悬。采用流式细胞术进行检测: 使用未染色细菌作为阴性对照, 选用 FITC 通道检测荧光信号。首先检测阴性对照样本, 调节电压使细胞群体位于阴性区; 再检测 PI 染色后的细菌样本, 用中位荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)进行定量, 每个样本采集至少 20 000 个微粒信号。使用 FlowJo 软件绘制荧光直方图和散点图, 确认染色后的细菌由于细胞膜受损而产生强烈荧光, 并比较不同实验条件下的 MFI 值, 以定量评估细菌细胞膜受损程度。

1.10 测定甘草查尔酮 A 对 MRSE 细胞膜流动性的影响

将对数生长期的 MRSE 用 PBS 重悬, 加入 laurdan 染料至终浓度为 $2\ \mu\text{mol/L}$, $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 10 min。用 PBS 洗涤菌体 2 次后重悬至 OD_{600} 值为 0.5, 再用 $0.5\times MIC$ 、 $1\times MIC$ 和 $2\times MIC$ 的甘草查尔酮 A 处理 35 min, 阳性对照组选用苯甲醇。在激发波长 350 nm, 发射波长 440 nm 和 490 nm 的条件下, 使用酶标仪测量各组的荧光值。根据公式(1)计算两极分化(generalized polarization, GP)^[17]评价细胞膜的流动性。

$$GP=(I_{440}-I_{490})/(I_{440}+I_{490}) \quad (1)$$

1.11 扫描电镜分析

按照文献[15]方法, 通过扫描电镜观察药物对 MRSE 形态的影响, 将对数生长期的 MRSE 在 CAMHB 培养基中重悬至 OD_{600} 值为 0.2, 用

$0.5\times MIC$ 和 $1\times MIC$ 的药物在 $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 4 h。 $4\ ^\circ\text{C}$ 、 $4\ 000\times g$ 离心 6 min 收集菌体后, 用无菌 PBS 洗涤 3 次, 用 2.5% 戊二醛在 $4\ ^\circ\text{C}$ 下固定过夜。随后, 样品分别用浓度逐渐增加的乙醇(50%、70%、90% 和 100%)脱水 15 min。脱水后的样品冷冻干燥 2 h。最后, 用金溅射形成薄层, 并用扫描电镜进行观察。

1.12 大蜡螟攻毒保护试验

选用全身乳白色、无明显黑斑且表现出较强活力的大蜡螟幼虫, 确保幼虫的大小和体重相近。将 40 只大蜡螟幼虫随机分为 4 组: 空白组(仅注射无菌 PBS 溶液)、对照组(不注射任何药物)、万古霉素给药组(注射 5.0 mg/kg 的万古霉素)、甘草查尔酮 A 给药组(注射 5.0 mg/kg 的甘草查尔酮 A, $n=10$)。观察并记录幼虫是否因注射器注射液体而导致死亡。将对数生长期的 MRSE 用无菌 PBS 稀释至 2.0×10^7 CFU/mL, 然后使用微量注射器在幼虫右腹足注射 $10\ \mu\text{L}$ MRSE 菌液, 将幼虫置于一次性培养皿中, 在 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养箱中静置 2 h 后取出, 再由左腹足注射相应的药物溶液。继续在 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养箱中静置培养 72 h, 期间每 12 h 记录 1 次幼虫的存活情况^[17]。

1.13 统计分析

所有实验至少重复 3 次, 结果以均数(mean) \pm 标准差(SD)表示。采用单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA)和 Duncan 多重极差检验进行统计分析。当 P 值小于 0.05 时, 认为差异有统计学意义。用星号表示组间差异有统计学意义(*表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$, ***表示 $P<0.001$, ****表示 $P<0.0001$), NS 表示 $P\geq 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 体外筛选甘草中抗 MRSE 的活性成分

鉴于甘草的主要药理成分为三萜类和黄酮

类化合物, 本研究选用甘草酸、甘草次酸等三萜类化合物, 甘草素、甘草苷、光甘草定、甘草酮 C 等异黄酮类化合物, 以及异甘草素、异甘草苷、刺甘草查尔酮、甘草查尔酮 A、甘草查尔酮 C、甘草查尔酮 D 等查尔酮类化合物为研究对象(图 1), 通过半数连续稀释法测定化合物抑制 MRSE 的 MIC, 并采用倍比稀释 M-H 琼脂平板涂布法测定 MBC, 结果见表 1。盐酸克林霉素对细菌的 MIC > 200.0 $\mu\text{g/mL}$, 硫酸庆大霉素对细菌的 MIC > 200.0 $\mu\text{g/mL}$, 头孢氨苄对细菌的 MIC 为 62.0 $\mu\text{g/mL}$, 万古霉素对细菌的 MIC 为 1.5 $\mu\text{g/mL}$, MBC 为 3.0 $\mu\text{g/mL}$ 。受试 MRSE 菌株(RP62A/ATCC 35984)对大环内酯类、氨基糖苷类、 β -内酰胺类抗生素耐药, 但对糖肽类抗生素万古霉素敏感。化合物甘草素、甘草苷、光甘草定、甘草酸、甘草次酸、异甘草素、异甘草苷、刺甘草查尔酮等对细菌的 MIC > 200.0 $\mu\text{g/mL}$, 甘草酮 C 对细菌的 MIC 为

15.0 $\mu\text{g/mL}$, 甘草查尔酮 A 对细菌的 MIC 为 6.0 $\mu\text{g/mL}$, MBC 为 12.0 $\mu\text{g/mL}$, 甘草查尔酮 C 对细菌的 MIC 为 12.5 $\mu\text{g/mL}$, MBC 为 37.5 $\mu\text{g/mL}$, 甘草查尔酮 D 对细菌的 MIC 为 50.0 $\mu\text{g/mL}$ 。研究表明, 甘草中的甘草查尔酮 A 对 MRSE 的抑制活性最强, 其次是甘草查尔酮 C 和光甘草定。基于甘草素与异甘草素的分子骨架进行结构-活性分析, 发现增加异戊烯基是提升抗 MRSE 活性的关键; 基于黄酮的分子骨架进行结构-活性分析, 甘草中查尔酮结构的化合物对 MRSE 的抑制活性最佳。本研究选用甘草查尔酮 A 进行后续研究。

2.2 甘草查尔酮 A 对 MRSE 的杀伤或杀灭作用

为了准确评估甘草查尔酮 A 对 MRSE 增殖的抑制作用及其杀伤能力, 将浓度约为 10^6 CFU/mL 的 MRSE 分别暴露于 $0.5 \times \text{MIC}$ 、 $1 \times \text{MIC}$ 、 $2 \times \text{MIC}$ 的甘草查尔酮 A 中, 并在 37°C

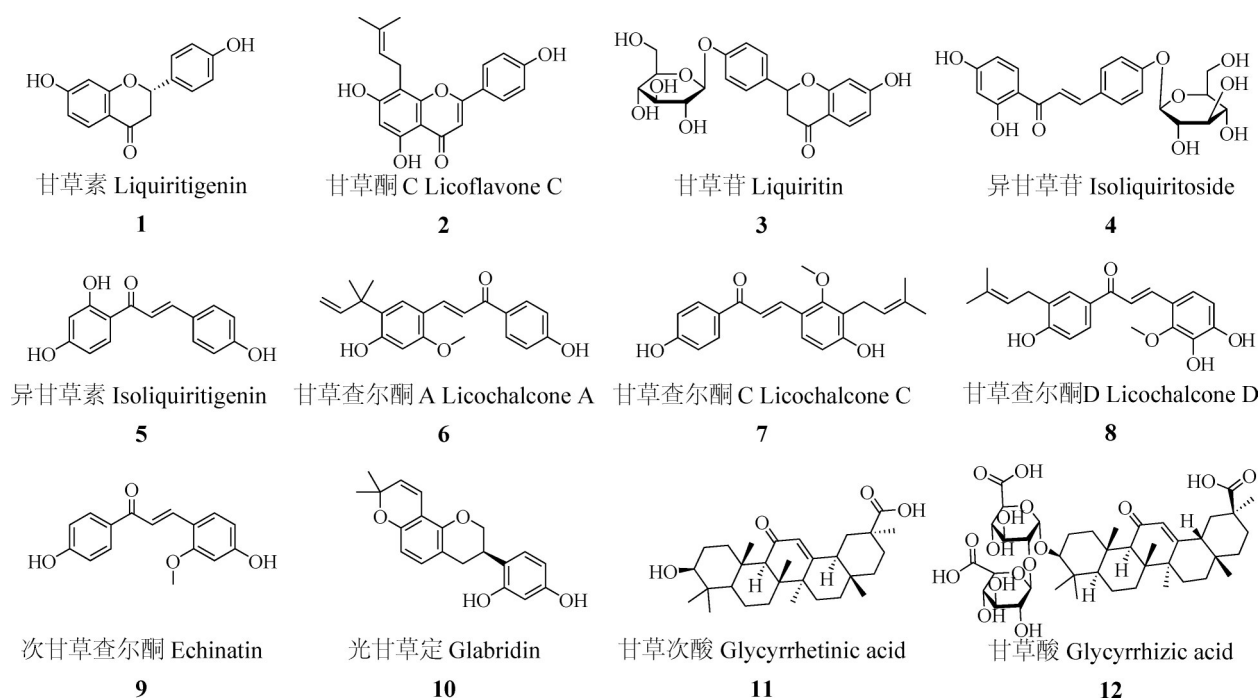


图1 甘草的主要成分(1-12)的化学结构

Figure 1 Chemical structures of the main components (1-12) of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.

表1 化合物对MRSE的抑制作用

Table 1 The inhibitory effect of compounds on MRSE

Compounds	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)
(1) Liquiritigenin	>200.0	-
(2) Licoflavone C	15.0	30.0
(3) Liquiritin	>200.0	-
(4) Isoliquiritoside	>200.0	-
(5) Isoliquiritigenin	>200.0	-
(6) Licochalcone A	6.0	12.0
(7) Licochalcone C	12.5	37.5
(8) Licochalcone D	50.0	-
(9) Echinatin	>200.0	-
(10) Glabridin	11.0	30.0
(11) Glycyrrhetic acid	>200.0	-
(12) Glycyrrhizic acid	>200.0	-
Methicillin	>200.0	-
Clarithromycin	>200.0	-
Cefalexin	62.0	-
Gentamicin	>200.0	-
Vancomycin	1.5	3.0

孵育，每 2 h 测定 1 次 OD_{600} 值与活细胞数量，结果见图 2。细菌生长曲线显示，对照组细菌在 2 h 后进入对数生长期，表明 0.1% DMSO 不影响 MRSE 的生长繁殖。在 $0.5\times\text{MIC}$ 的甘草查尔酮 A 作用下，细菌在 6 h 后开始加速增殖；在

$1\times\text{MIC}$ 的甘草查尔酮 A 作用下，孵育 20 h 后细菌才出现增殖趋势；而在 $2\times\text{MIC}$ 的甘草查尔酮 A 作用下，24 h 内未观察到细菌生长，表明甘草查尔酮 A 对 MRSE 的增殖抑制作用呈剂量依赖性。时间杀伤曲线显示，对照组中初始浓度约 10^6 CFU/mL 的 MRSE 活细胞数量持续增长，当 MRSE 暴露于 $0.5\times\text{MIC}$ 、 $1\times\text{MIC}$ 、 $2\times\text{MIC}$ 的甘草查尔酮 A 中时，前 4 h 内均表现出明显的杀伤或杀灭现象。给药 4 h 后，在 $0.5\times\text{MIC}$ 组的活细胞数量开始上升；在 $1\times\text{MIC}$ 组的活细胞数量保持相对稳定；在 $2\times\text{MIC}$ 组的活细胞数量则持续减少，进一步证实甘草查尔酮 A 对 MRSE 的杀伤作用呈剂量依赖性。

2.3 甘草查尔酮 A 影响 MRSE 的代谢轮廓

根据甘草查尔酮 A 杀伤 MRSE 的浓度与时间因素，选用 $0.5\times\text{MIC}$ 的甘草查尔酮 A 处理 MRSE，收集菌体并提取代谢物，通过 GC-MS 进行分析。对照组与 $0.5\times\text{MIC}$ 组代谢物的离子流图见图 3A，通过分析各鉴定代谢物的峰面积和 P 值的倍数变化，筛选选出 81 种差异代谢物。给药组相对于对照组的代谢物偏移图见

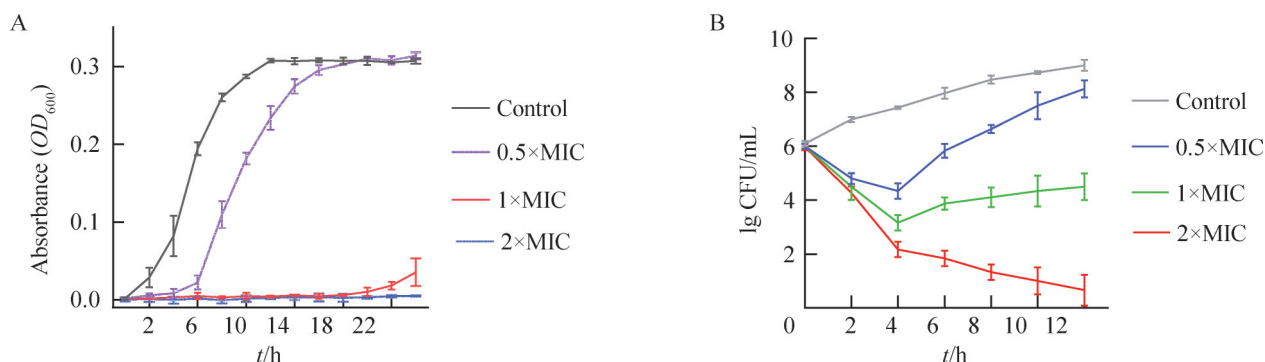


图2 甘草查尔酮A作用下MRSE的生长曲线与时间杀伤曲线。A：不同浓度甘草查尔酮A作用下MRSE细胞在96孔微滴板上的生长曲线；B：不同浓度甘草查尔酮A作用下MRSE细胞的存活数量。

Figure 2 The growth curves and time-killing curves of MRSE in response to licochalcone A. A: The growth curves of MRSE cells in a 96-well microplate treated with various concentrations of licochalcone A; B: The survival count of MRSE cells subjected to different concentrations of licochalcone A.

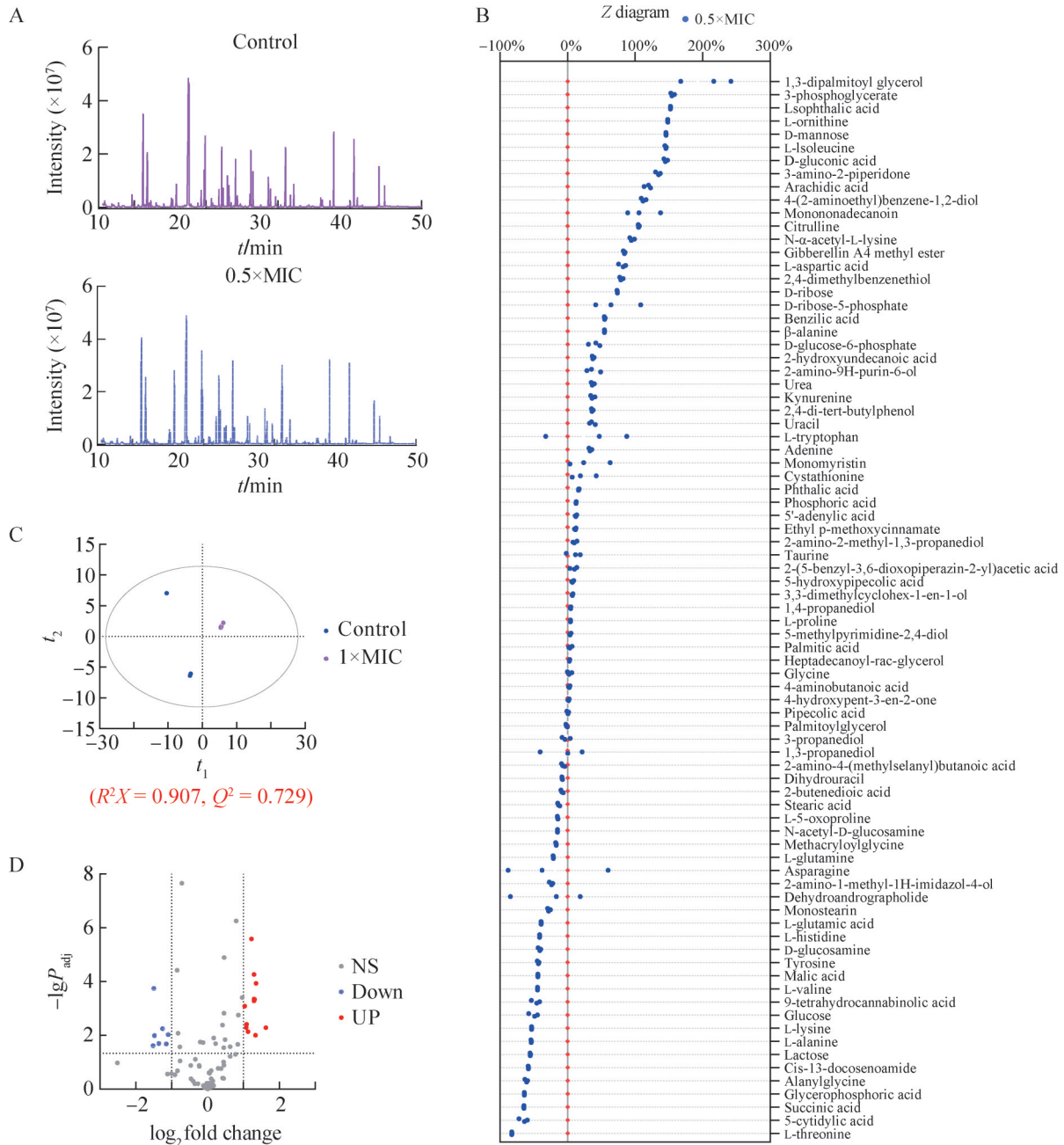


图3 甘草查尔酮A作用下MRSE代谢谱的显著改变。A: 对照组与0.5xMIC给药组的离子流图; B: 0.5xMIC给药组相对于对照组差异代谢物变化; C: 对照组与0.5xMIC给药组的主成分分析(PCA); D: 差异代谢物的火山图。

Figure 3 Significant changes in the MRSE metabolic profile under the influence of licochalcone A. A: Ionic chromatogram of the control group compared to the 0.5xMIC group; B: Alterations in differential metabolites of the 0.5xMIC group relative to the control group; C: Principal component analysis (PCA) of the control and 0.5xMIC group; D: Volcano plot of differential metabolites. UP: Upregulation; DP: Downregulation; NS: No significant change.

图 3B, 代谢物含量差异越大, 数值越远离 0 点。为了鉴定推定的代谢生物标志物, 对 81 种代谢物进行主成分分析, PCA 结果显示 $R^2X=0.907$, $Q^2=0.729$, 对照组和 $0.5\times MIC$ 组之间存在明显分离(图 3C), 表明模型具有良好的可预测性。图 3D 为 MRSE 差异代谢物的火山图。通过设定 $|\log_2 \text{fold change}|>1$ 且 $P<0.05$ 作为筛选标准, 共识别出 19 个显著差异代谢物, 其中 12 个代谢物在实验组中显著上调, 7 个代谢物显著下调。

2.4 甘草查尔酮 A 主要影响 MRSE 的 TCA 循环、生物合成和 ABC 转运

为了进一步了解显著性差异代谢物的生物学功能, 进行了 KEGG 通路富集分析, 结果如图 4B 所示。在代谢组学中鉴定的差异代谢物被映射到代谢途径的概述(KEGG 数据库中编号: 01100)。甘草查尔酮 A 主要影响 MRSE 的代谢途径(如三羧酸循环、赖氨酸降解、半乳糖代谢)、次生代生物合成(如鸟氨酸、赖氨酸、烟酸、氨基酰基 tRNA)以及 ABC 转运。在参与富集途径的差异代谢物中 L-异亮氨酸、D-甘露糖、鸟氨酸、乳糖、L-赖氨酸、丙氨酰甘氨酸、琥珀酸、1,3-双棕榈酸甘油酯是代谢途径的关键中间体(图 4A), 每个差异代谢物至少参与 9 个代谢途径中的 3 个。

在好氧菌的代谢途径中, 三羧酸循环(TCA)在细菌细胞代谢中占据核心地位, 不仅支持细胞的能量需求, 还参与多种次生代谢过程以及调控能量代谢和中间代谢产物的供应^[18]。TCA 循环为合成各种重要生物分子提供前体物质, 包括黏附蛋白的合成和分泌, 这些蛋白是细菌黏附宿主细胞表面或生物材料表面的关键因素^[19]。此外, TCA 循环和 ABC 转运蛋白在细胞代谢和物质转运中相互协作, TCA 循环提供能量和代谢中间体, 而 ABC 转运蛋白则通过转运

这些代谢物和维持细胞的能量供应来支持细胞的整体功能^[20]。根据甘草查尔酮 A 影响 MRSE 的代谢轮廓与主要的生物途径, 推测甘草查尔酮 A 可能通过影响 MRSE 的 TCA 循环通量, 进而影响生物被膜和黏附蛋白等次生代生物合成, 并改变细胞膜的物质结构以影响 ABC 转运, 从而杀伤或杀灭 MRSE。

2.5 甘草查尔酮 A 处理影响 MRSE 的 TCA 循环通量, 减少 ATP 生成

TCA 循环在细菌的代谢、能量生产、环境适应以及致病性方面扮演了多重关键角色。它不仅支持细菌的基本生理功能, 还影响其生存和致病能力。通过调控 TCA 循环, 细菌能够有效适应不同的生长环境, 提高其生存能力和适应性^[21]。为了更好地了解甘草查尔酮 A 对 MRSE 代谢的影响, 分析了代谢物的积累以及参与 TCA 循环的关键酶的活性(图 5)。从代谢轮廓分析中发现, 甘草查尔酮 A 处理降低了富马酸、琥珀酸等中间产物的水平, 但细胞内柠檬酸(citrate, CA)持续积累(图 5D), 提示甘草查尔酮 A 处理减少了细菌的 TCA 循环通量。为了进一步研究甘草查尔酮 A 对细菌 TCA 循环的影响, 测定了 NAD-MDH、ACO、ICDHs 的活性, 以及胞内 ATP 水平。结果显示, 暴露于甘草查尔酮 A 中的 MRSE, 胞内 ICDHs 活性无显著差异, 但 NAD-MDH 活性下降约 71.5%, ACO 活性下降约 77.2% (图 5A-5C), ATP 水平下降 85.9%。胞内 ACO 催化活性下调与柠檬酸的积累有直接关系, NAD-MDH 和 ICDHs 活性的变化与柠檬酸的积累间接关联(图 5D、5E), 这些结果进一步证实甘草查尔酮 A 处理减少了细菌的 TCA 循环通量, 导致 ATP 生成显著下降。

分解代谢控制蛋白 A (catabolite control protein A, CcpA)通过碳代谢物抑制调控 TCA 循

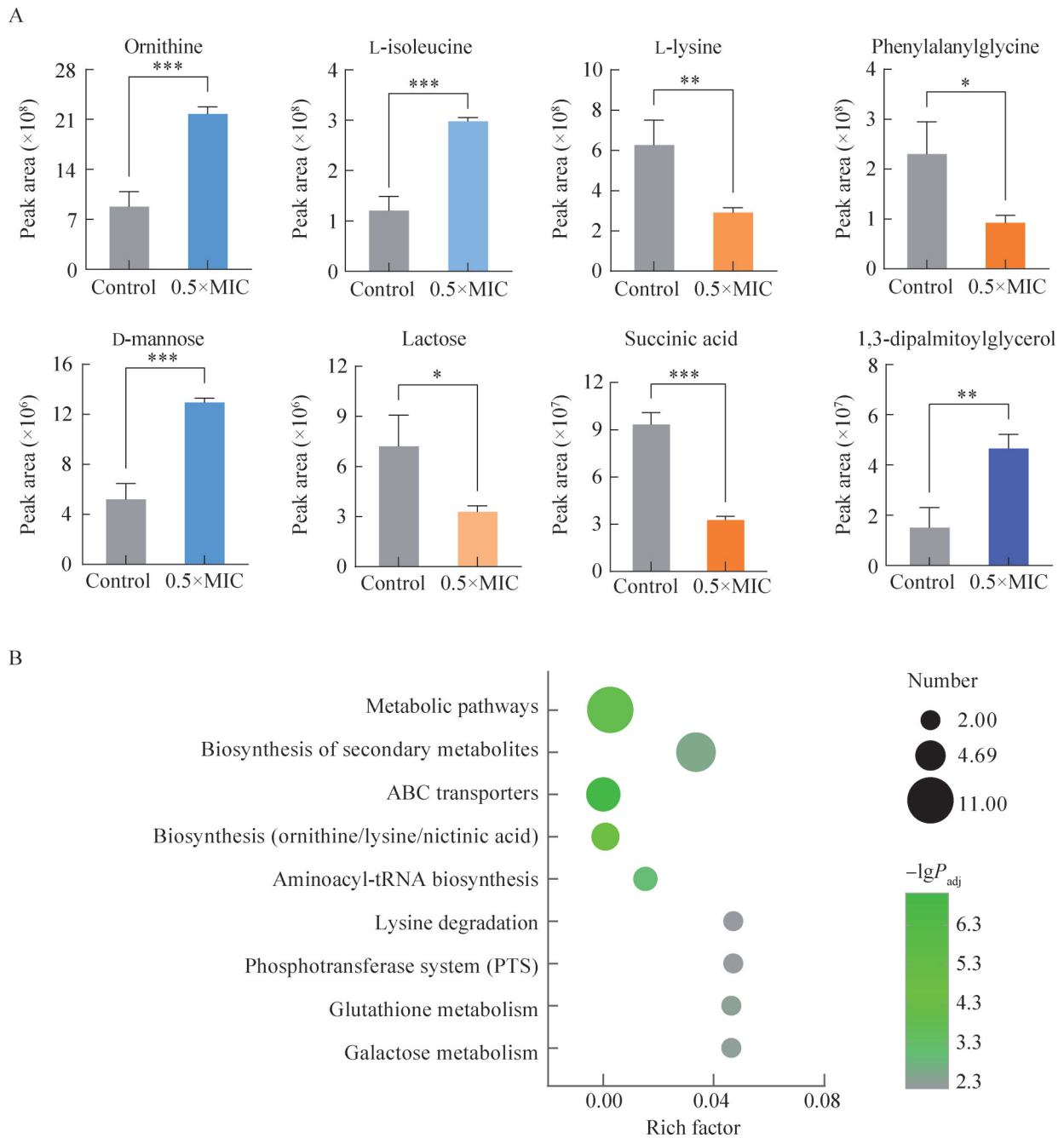


图4 甘草查尔酮A主要影响MRSE的代谢、生物合成与ABC转运。A：对照组和0.5×MIC组中关键代谢物的峰面积(通过GC-MS代谢组学方法对代谢物峰面积进行定量)；B：显著性差异代谢物的KEGG通路分析。

Figure 4 Licochalcone A primarily influences the metabolism, biosynthesis, and ABC transport of MRSE. A: The peak areas of key metabolites in the control group and the 0.5×MIC group were quantified using a GC-MS-based metabolomics method to assess the peak areas of metabolites (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$); B: KEGG pathway analysis for significantly different metabolites are presented.

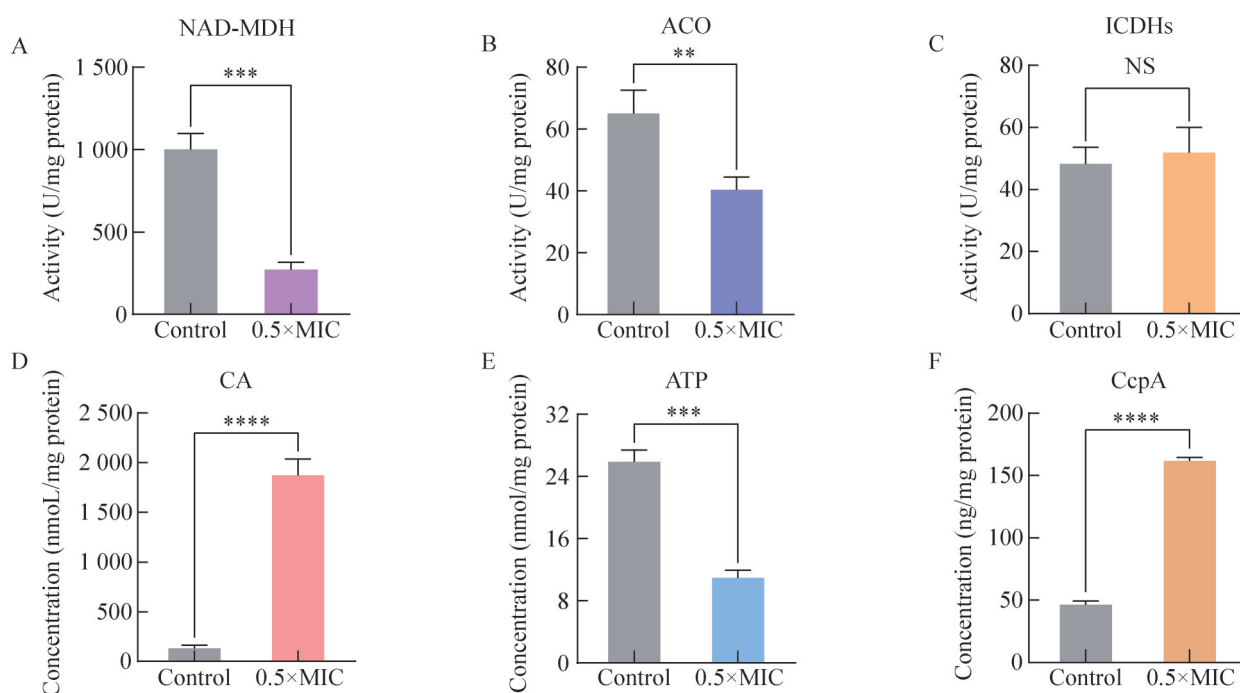


图5 甘草查尔酮A影响MRSE的TCA循环与ATP生成。A-C: 对照组和0.5×MIC组TCA循环中NAD-MDH、ACO、ICDHs酶的活性; D、E: 对照组和0.5×MIC组胞内柠檬酸(CA)、ATP的含量; F: 对照组和0.5×MIC组胞内代谢调控蛋白CcpA的含量。

Figure 5 Licochalcone A influences the TCA cycle and ATP production in MRSE. A-C: The activities of the enzymes NAD-MDH, ACO, and ICDHs in the TCA cycle for both the control group and the 0.5×MIC group; D, E: The levels of intracellular citrate (CA) and ATP in the control group compared to the 0.5×MIC group; F: The concentration of the intracellular metabolic regulatory protein CcpA in both the control and 0.5×MIC groups (**: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$).

环的活性,使细菌能够根据环境中的碳源可用性动态调整其代谢途径。在高葡萄糖条件下,CcpA抑制TCA循环,使细菌依赖糖酵解和发酵途径生产能量;而在葡萄糖缺乏的情况下,CcpA的抑制作用减弱,允许TCA循环恢复,从而利用其他碳源维持代谢平衡^[22]。此外,CcpA通过调节代谢途径、促进生物被膜形成、改变药物靶点以及调节药物代谢等方式,发展对抗菌药物的耐受性。研究发现甘草查尔酮A处理使MRSE中CcpA的表达相对于对照组上调至3.5倍(图5F)。结合TCA循环通量下调的结果,认为MRSE可能通过调整TCA循环来增强甘草查尔酮A的耐受性。

2.6 甘草查尔酮A抑制细菌的生物合成阻止MRSE黏附细胞

细菌的黏附能力是指其附着在宿主细胞或环境表面的能力,这一过程对细菌的生存和致病至关重要。细菌的黏附能力主要依赖于特定的生物合成途径,包括合成多种黏附蛋白(如纤毛、黏附素、黏附胶)直接参与细菌的黏附过程,产生胞外多糖形成生物被膜以增强其黏附能力,以及生产黏附因子与宿主细胞表面受体结合,启动感染过程。为了评估药物对细菌生物合成与黏附能力的影响,测定了暴露于甘草查尔酮A中的MRSE的生物被膜形成与胞内蛋白质含量,并构建了2D HaCaT细胞感染模型以分析细

菌的黏附能力, 结果见图 6。在结晶紫染色法测定生物被膜形成时, OD_{570} 值作为细菌生物被膜形成的指标, 在 $0.5\times MIC$ 的甘草查尔酮 A 作用下, 生物被膜的形成减少了约 51.3%; 而在

$1\times MIC$ 的甘草查尔酮 A 作用下, 生物被膜的形成减少了约 75.1%, 这表明甘草查尔酮 A 显著降低了 MRSE 的生物被膜形成能力, 且呈剂量依赖性(图 6A)。通过 BCA 蛋白试剂盒测定

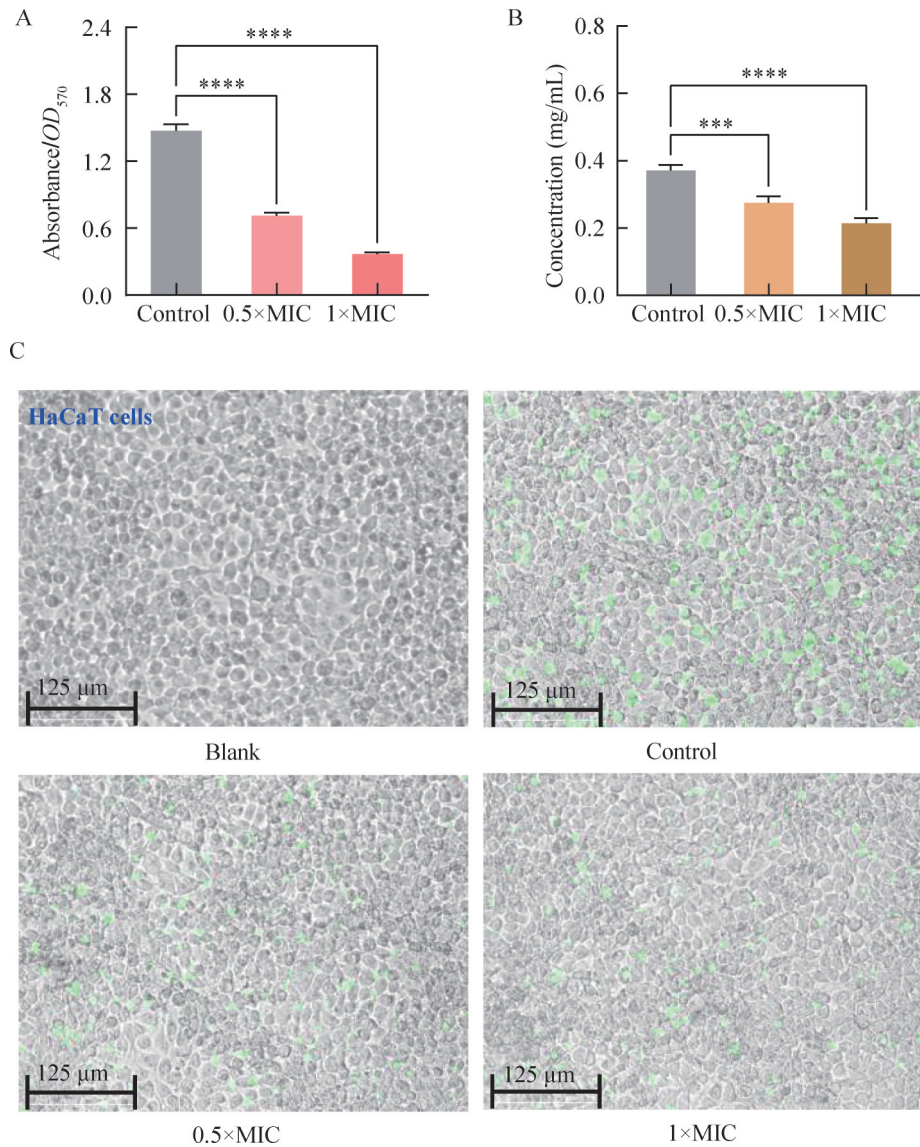


图6 甘草查尔酮A影响MRSE的黏附。 A、B: 对照组、 $0.5\times MIC$ 组、 $1\times MIC$ 组的生物被膜生成(A)与胞内蛋白含量(B)的变化; C: 对照组、 $0.5\times MIC$ 组、 $1\times MIC$ 组的MRSE黏附HaCaT细胞的荧光显微镜图, 绿色表示荧光标记的MRSE。

Figure 6 The impact of licochalcone A on the adhesion of MRSE. A, B: Biofilm formation (A) and intracellular protein content (B) in the control group, $0.5\times MIC$ group, and $1\times MIC$ group (***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$); C: Fluorescence microscopy images of MRSE adhesion to HaCaT cells in the control group, $0.5\times MIC$ group, and $1\times MIC$ group, with green indicating fluorescence-labeled MRSE.

MRSE 胞内蛋白含量发现, 在 $0.5\times\text{MIC}$ 的甘草查尔酮 A 作用下, 蛋白质合成减少了约 25.8%, 在 $1\times\text{MIC}$ 的甘草查尔酮 A 作用下, 蛋白质合成减少了约 42.1%, 这表明甘草查尔酮 A 显著抑制了 MRSE 的蛋白质合成, 且呈剂量依赖性(图 6B)。在 2D HaCaT 细胞感染模型中, 绿色荧光代表 CFDA-SE 标记的 MRSE 细胞(绿色荧光越强表示 MRSE 黏附越多, 反之则越少)。结果显示, 在 $0.5\times\text{MIC}$ 和 $1\times\text{MIC}$ 的甘草查尔酮 A 处理后, MRSE 黏附 HaCaT 细胞的能力显著性降低, 且呈剂量依赖性(图 6C)。研究结果表明, 甘草查尔酮 A 通过抑制细菌的生物合成, 有效地阻止了 MRSE 黏附宿主细胞。

2.7 甘草查尔酮 A 影响细菌细胞膜的结构来扰乱 ABC 转运

ABC 转运体(ATP-binding cassette transporters) 是一类嵌入细胞膜磷脂双层中的跨膜蛋白家族, 它们利用膜内的 ATP 来驱动物质转运, 包括从环境中摄取营养物质以维持生长繁殖, 以及将抗菌物质和其他有害物质从细胞内排除以增强耐受性。ABC 转运体的功能直接依赖于膜的结构和环境, 胞内 ATP 的减少会直接影响转运体的运作能力; 细胞膜破损可能导致细胞内的物质泄漏, 使 ABC 转运体无法有效地控制细胞内外物质的平衡; 细胞膜破损还可能导致转运体无法正确嵌入或维持其功能。细菌细胞膜结构的完整性与通透性, 以及胞内 ATP 水平均涉及 ABC 转运体的功能以及细胞的整体健康。然而, 在细胞膜损伤评估中, 细胞膜疏水性与细胞质渗漏是可量化的指标^[23]。评估细菌细胞膜损伤情况发现, 经甘草查尔酮 A 处理的 MRSE 培养上清液中 DNA 与 RNA 含量显著高于对照组(图 7A), 而细胞膜疏水率上升(图 7B), 且均呈剂量依赖性。研究表明甘草查尔酮 A 损伤了 MRSE 的细胞膜, 导致细胞膜的结构改变与渗透性增强。

为了评估暴露于甘草查尔酮 A 中的 MRSE 细胞膜的损伤情况, 通过 PI 荧光染料染色试验, 进一步评估甘草查尔酮 A 对 MRSE 细胞膜完整性的影响。经甘草查尔酮 A 处理后, 流式直方图中的荧光强度显著上升。与对照组相比, 经 $0.5\times\text{MIC}$ 甘草查尔酮 A 处理后, PI 值显著升高约 4 倍; 经 $1\times\text{MIC}$ 甘草查尔酮 A 处理后, PI 值显著升高约 10 倍(图 7C)。结果表明, 甘草查尔酮 A 破坏了 MRSE 细胞膜的完整性。使用 laurdan 染料考察甘草查尔酮 A 对 MRSE 细胞膜流动性的影响。结果见图 7D, 与对照组相比, 甘草查尔酮 A 处理菌体 0.5 h 后, laurdan GP 值显著降低, 并具有浓度依赖性。结果表明, 甘草查尔酮 A 可以增强 MRSE 细胞膜的流动性。通过 SEM 拍照观察甘草查尔酮 A 处理后 MRSE 细胞的超微结构变化(图 7E)。对照组 MRSE 细胞表面完整, 胞质丰富且无明显塌陷。然而, 甘草查尔酮 A 处理对 MRSE 细胞外膜造成了不可逆转的结构损伤。用 $0.5\times\text{MIC}$ 的甘草查尔酮 A 处理后, 部分细菌表面出现波纹和皱缩; 暴露于 $1\times\text{MIC}$ 的甘草查尔酮 A 中的细菌, 细胞表现出严重的表面塌陷和形态破坏, 甚至破碎成碎片。相比之下, 暴露于甘草查尔酮 A 中的 MRSE 细胞清晰显示出细胞膜损伤, 并呈剂量依赖性。研究结果表明, 甘草查尔酮 A 作用于 MRSE 的细胞膜, 杀伤或杀灭细菌。

2.8 甘草查尔酮 A 降低 MRSE 对大蜡螟幼虫的杀伤作用

为了评估甘草查尔酮 A 抑制宿主生物中的 MRSE 的能力, 使用大蜡螟幼虫动物模型, 测定了感染 MRSE 的大蜡螟幼虫的生存率(图 8)。在注射 MRSE 菌液后 72 h, 攻毒对照组大蜡螟的生存率为 10%, 而仅注射 PBS 的空白组在 72 h 内全部存活, 据此判断大蜡螟幼虫攻毒模型建立成功。万古霉素给药组在 72 h 后的存活

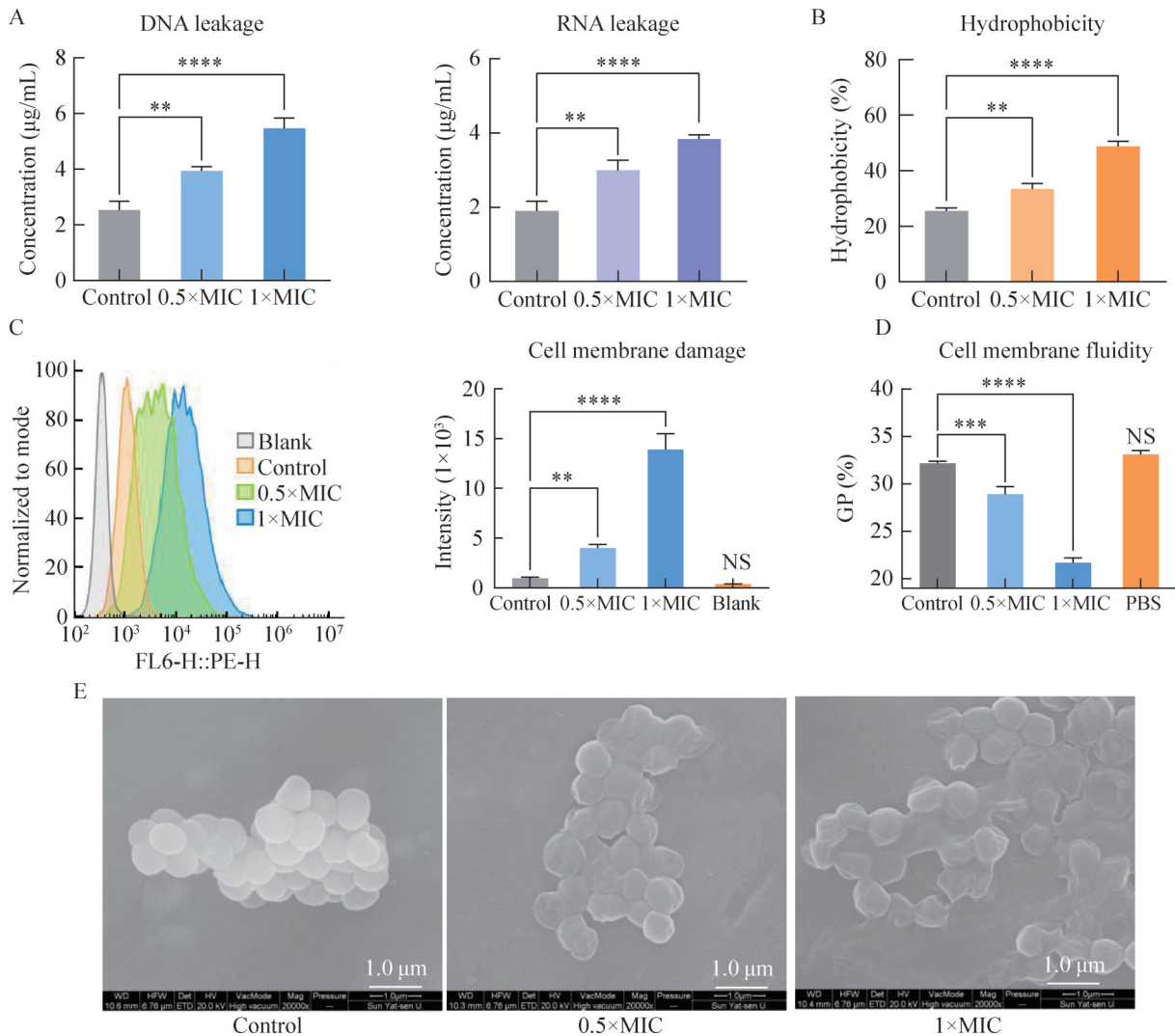


图7 甘草查尔酮A影响细菌细胞膜的结构。A: 甘草查尔酮A影响MRSE的DNA与RNA泄漏; B: 甘草查尔酮A影响MRSE细胞外膜疏水性改变; C: PI标记甘草查尔酮A损伤MRSE细胞膜; D: 甘草查尔酮A影响MRSE细胞膜的流动性; E: 甘草查尔酮A影响MRSE细胞的形态。

Figure 7 The effect of licochalcone A on the structure of bacterial cell membranes. A: Licochalcone A affects the leakage of DNA and RNA in MRSE; B: Licochalcone A influences the hydrophobicity of the MRSE cell outer membrane; C: PI labeling of licochalcone A damages the MRSE cell membrane; D: Licochalcone A affects the fluidity of the MRSE cell membrane; E: Licochalcone A impacts the morphology of MRSE cells. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

率达到 90%，而甘草查尔酮 A 给药组的存活率达到 80%。与攻毒对照组相比，甘草查尔酮 A 治疗组的大蜡螟存活率显著提高，且接近万古霉素的治疗效果，表明甘草查尔酮 A 对 MRSE 感染具有一定的体内治疗效果。

3 讨论与结论

本研究筛选了甘草中黄酮类成分抗 MRSE 的活性，发现甘草查尔酮 A、甘草查尔酮 C 和光甘草定对 MRSE 具有良好的抗菌活性，其中

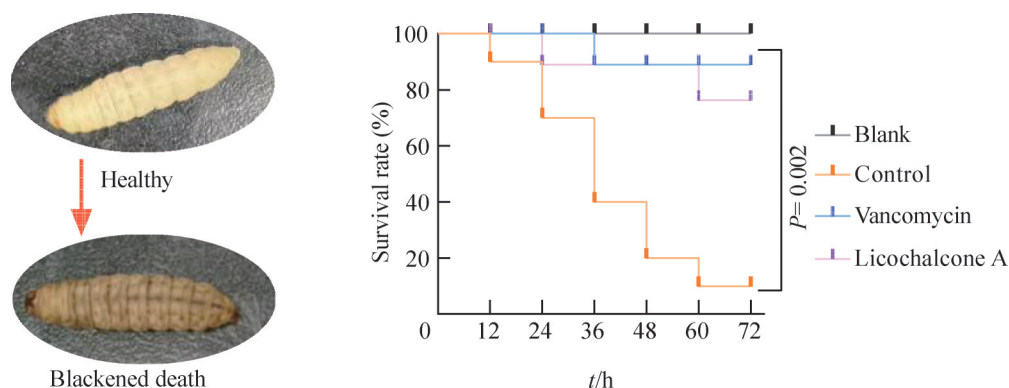


图8 甘草查尔酮A对MRSE感染的大蜡螟幼虫生存情况的影响

Figure 8 The effect of licochalcone A on the survival of *Galleria mellonella* larvae infected with MRSE.

甘草查尔酮 A 的体外抗菌效果最为突出。本研究还描述了在亚致死浓度下甘草查尔酮 A 对 MRSE 的抗菌表型和代谢轮廓，以阐明其抗菌机制。代谢组学分析显示，甘草查尔酮 A 主要影响 MRSE 的物质代谢、次生代生物合成和 ABC 转运，这表明甘草查尔酮 A 可能通过影响细菌的 TCA 循环通量，进而影响生物被膜与毒力因子等次生代生物合成，同时导致细胞膜损伤，使 ABC 转运效率降低。抗菌表型研究证实了这一点，甘草查尔酮 A 损伤 MRSE 细胞膜导致胞内物质渗漏，生物被膜与蛋白质生物合成减少使细菌黏附 HaCaT 细胞的能力降低，CA 积累与 CcpA 激活为特征的 TCA 循环被抑制，最终呈现出细胞膜损伤与流动性增强、ATP 减少、转运蛋白功能失常以及黏附能力下降的抗菌表型。大蜡螟幼虫体内细菌感染实验结果表明，甘草查尔酮 A 能够显著提高其治疗存活率，并对 MRSE 表现出显著的抑制效果，显示出作为新型抑菌剂的潜力。

比较甘草查尔酮 A 与已知靶向细菌细胞膜的抗生素的化学结构，发现甘草查尔酮 A 缺乏一些关键的结构基序，如万古霉素的糖肽骨架、达比霉素的脂肽骨架以及碳青霉烯类的 β -内酰胺环，因此推测甘草查尔酮 A 直接靶向细胞膜

的可能性较小。然而，越来越多的证据表明，异戊烯基黄酮类化合物能够通过影响细菌的生物代谢途径来造成细胞膜损伤，如金黄色葡萄球菌暴露于异戊烯基查尔酮甘草查尔酮 C、黄酮酚或补骨脂乙素时，会出现细胞质膜分离和细胞包膜破坏^[24]；金黄色葡萄球菌暴露于异戊烯基黄酮光甘草醇、 α -倒捻子素和桑辛素时，会介导膜渗透和质子动力耗散^[25]；疥癣链霉菌 (*Streptomyces scabies*) 暴露于槐黄烷酮 G 时，菌丝体会出现扁平 and 收缩，细胞膜穿孔和撕裂，内容物从分枝菌丝中喷出^[26]。考虑到细胞膜的物质构成涉及糖、脂质和氨基酸的代谢，我们认为改变细胞代谢可能是甘草查尔酮 A 的潜在抗菌机制。暴露于甘草查尔酮 A 中的 MRSE 出现 ATP 减少、转运蛋白功能失常以及黏附能力下降的抗菌表型，代谢组学分析确认鸟氨酸、异亮氨酸和赖氨酸代谢中断，脂肪酸甘油酯在胞内积累，重塑细胞膜结构的物质代谢与生物合成受阻，从而影响细胞膜的完整性来杀伤细菌。

作者贡献声明

王建超：方案设计、数据处理与分析、数据管理、数据可视化、文稿写作及编辑；洪紫

嫣: 方案设计、数据管理、实验操作; 伍子琦: 方案设计、数据管理、实验操作、文稿审查; 黄宏辉: 方案设计、数据管理、实验操作、文稿审查; 杨得坡: 方案设计、项目管理、监督指导、文稿审查及编辑; 徐新军: 数据处理、文稿审查; 彭华勇: 方案设计、项目管理、监督指导、文稿审查及编辑。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] People's Republic of China (PRC) Pharmacopoeia-Part I: 2020 Edition[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020 (in Chinese).
国家药典委员会. 中华人民共和国药典 一部: 2020 年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [2] HAN WW, ZHONG Q, ZHANG R, XU C. Research progress of active constituents and their mechanism of action in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.[J]. *Chemistry of Life*, 2023, 43(12): 1956-1962 (in Chinese).
韩维维, 钟晴, 张蓉, 徐驰. 甘草有效成分及其作用机制研究进展[J]. *生命的化学*, 2023, 43(12): 1956-1962.
- [3] TERRENI M, TACCANI M, PREGNOLATO M. New antibiotics for multidrug-resistant bacterial strains: latest research developments and future perspectives[J]. *Molecules*, 2021, 26(9): 2671.
- [4] SIMONS A, ALHANOUT K, DUVAL RE. Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(5): 639.
- [5] HOU Z, DA F, LIU BH, XUE XY, XU XL, ZHOU Y, LI MK, LI Z, MA X, MENG JR, JIA M, WANG YK, LUO XX. R-thanatin inhibits growth and biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* in vivo and in vitro[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(10): 5045-5052.
- [6] 袁光英, 王孟龙, 俞晓兰, 王方军. 细菌耐药机理及应对策略[J]. *国外医药(抗生素分册)*, 2024. DOI: 10.13461/j.cnki.wna.005630.
YUAN GY, WANG ML, YU XL, WANG FJ. The mechanism of bacterial resistance and human response strategies [J]. *World Notes on Antibiotics*, 2024. DOI: 10.13461/j.cnki.wna.005630. (in Chinese).
- [7] XU YT, LUO YC, XUE JH, LI YP, DONG L, LI WJ, ZHOU ZY, WEI XY. Micropyrone A and B, two new α -pyrones from the actinomycete *Microbacterium* sp. GJ312 isolated from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. [J]. *Natural Product Research*, 2023, 37(3): 462-467.
- [8] YANG RQ, ZHAO GP. RETRACTED ARTICLE: inhibitory effects of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. extract on cariogenic virulence factors of *Streptococcus mutans*[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2022, 62(3): 473.
- [9] Van DINTEREN S, MEIJERINK J, WITKAMP R, van IEPEREN B, VINCKEN JP, ARAYA-CLOUTIER C. Valorisation of liquorice (*Glycyrrhiza*) roots: antimicrobial activity and cytotoxicity of prenylated (*Iso*) flavonoids and chalcones from liquorice spent (*G. glabra*, *G. inflata*, and *G. uralensis*) [J]. *Food & Function*, 2022, 13(23): 12105-12120.
- [10] WU SC, YANG ZQ, LIU F, PENG WJ, QU SQ, LI Q, SONG XB, ZHU K, SHEN JZ. Antibacterial effect and mode of action of flavonoids from licorice against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2489.
- [11] GILL SR, FOUTS DE, ARCHER GL, MONGODIN EF, DEBOY RT, RAVEL J, PAULSEN IT, KOLONAY JF, BRINKAC L, BEANAN M, DODSON RJ, DAUGHERTY SC, MADUPU R, ANGIUOLI SV, SCOTT DURKIN A, HAFT DH, VAMATHEVAN J, KHOURI H, UTTERBACK T, LEE C, et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(7): 2426-2438.
- [12] LIAO SL, YANG G, OU YH, HUANG S, LI B, LI AJ, KAN JQ. Inhibitory impacts of essential oil (*Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc) on the growth of *Staphylococcus epidermidis*[J]. *Food Bioscience*, 2022, 49: 101906.
- [13] QIAN CG, JIN L, ZHU LP, ZHOU Y, CHEN J, YANG DP, XU XJ, DING P, LI RN, ZHAO ZM. Metabolomics-driven exploration of the antibacterial activity and mechanism of 2-methoxycinnamaldehyde[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 864246.
- [14] KANG JM, JIN WY, WANG JF, SUN YY, WU XX, LIU L. Antibacterial and anti-biofilm activities of peppermint essential oil against *Staphylococcus aureus*[J]. *LWT*, 2019, 101: 639-645.
- [15] PENG HY, CHU CL, JIN L, ZHANG JN, YANG ZL, ZHU LP, YANG DP, ZHAO ZM. Study on *Oleum cinnamomi* inhibiting *Cutibacterium acnes* and its covalent inhibition mechanism[J]. *Molecules*, 2024, 29(13): 3165.
- [16] BARUA N, HUANG L, LI C, YANG Y, LUO MJ, WEI W, WONG KT, LO NWS, KWOK KO, IP M. Comparative study of two-dimensional (2D) vs. three-dimensional (3D) organotypic keratinocyte-fibroblast skin models for *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 23(1): 299.
- [17] 朱振鑫. 超声波辅助双水相萃取甘草中的光甘草定和异甘草素及对 MRSA 的抗菌作用研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2023.
ZHU ZX. Ultrasonic-assisted aqueous two-phase extraction

- of glabridin and isoliquiritigenin from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. and its antibacterial effect on MRSA[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [18] HANSON RS, BLICHARSKA J, ARNAUD M, SZULMAJSTER J. Observations on the regulation of the synthesis of the tricarboxylic acid cycle enzymes in *Bacillus subtilis*, Marburg[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1964, 17(6): 690-695.
- [19] HUANG LX, HUANG L, YAN QP, QIN YX, MA Y, LIN M, XU XJ, ZHENG J. The TCA pathway is an important player in the regulatory network governing *Vibrio alginolyticus* adhesion under adversity[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 40.
- [20] AN BH, CHEN PY, TAO YQ. The roles of membrane permeability and efflux pumps in the toxicity of bisphenol S analogues (2,4-bisphenol S and bis-(3-allyl-4-hydroxyphenyl) sulfone) to *Escherichia coli* K12[J]. *Chemosphere*, 2023, 329: 138697.
- [21] KATAYAMA N, IWAZUMI K, SUZUKI H, OSANAI T, ITO S. Malic enzyme, not malate dehydrogenase, mainly oxidizes malate that originates from the tricarboxylic acid cycle in cyanobacteria[J]. *mBio*, 2022, 13(6): e0218722.
- [22] HARTMANN T, BARONIAN G, NIPPE N, VOSS M, SCHULTHESS B, WOLZ C, EISENBEIS J, SCHMIDT-HOHAGEN K, GAUPP R, SUNDERKÖTTER C, BEISSWENGER C, BALS R, SOMERVILLE GA, HERRMANN M, MOLLE V, BISCHOFF M. The catabolite control protein E (CcpE) affects virulence determinant production and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(43): 29701-29711.
- [23] KOS V, FORD RC. The ATP-binding cassette family: a structural perspective[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2009, 66(19): 3111-3126.
- [24] XU M, WU PY, SHEN F, JI JY, RAKESH KP. *Chalcone* derivatives and their antibacterial activities: current development[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2019, 91: 103133.
- [25] OJEDA-SANA AM, REPETTO V, MORENO S. Carnosic acid is an efflux pumps modulator by dissipation of the membrane potential in *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2013, 29(1): 137-144.
- [26] GUTIERREZ J, BAKKE A, VATTA M, ROD MERRILL A. Plant natural products as antimicrobials for control of *Streptomyces scabies*: a causative agent of the common scab disease[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 12: 833233.