

## LFcin(17-30)对金黄色葡萄球菌及其生物膜的抑制作用

王舰辉<sup>1,2,3</sup>, 温路遥<sup>1,2,3</sup>, 李明航<sup>1,2,3</sup>, 于书凝<sup>1,2,3</sup>, 武 瑞<sup>1,2,3</sup>, 耿子健<sup>1,2,3</sup>,  
连 帅<sup>1,2,3</sup>, 王建发<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>黑龙江八一农垦大学动物科技学院 黑龙江大庆 163319

<sup>2</sup>农业农村部东北寒区牛病防治重点实验室 黑龙江大庆 163319

<sup>3</sup>黑龙江省牛病防治重点实验室 黑龙江大庆 163319

**摘要** 研究抗菌肽 LFcin(17-30)对耐甲氧西林金葡萄菌(MRSA)生物膜的抑制作用。方法:采用 PCR 及头孢西丁药敏纸片扩散法筛选 24 株乳源金黄色葡萄球菌中的 MRSA;采用刚果红平板法和结晶紫染色法鉴定生物被膜阳性菌株,并评估其产膜能力及生物膜生长曲线;采用纸片扩散法药敏试验验证 MRSA 生物膜与耐药性间的关系;采用微量稀释法测定 LFcin(17-30)对 MRSA 的最小抑菌浓度(MIC);采用结晶紫染色和扫描电子显微镜(SEM)测定 LFcin(17-30)对 MRSA 生物膜的抑制作用;测定 LFcin(17-30)对 MRSA 生物膜成分的影响。结果显示:在 24 株乳源金黄色葡萄球菌中,筛选出 4 株 MRSA,分别为 DQ05、DQ07、DQ09、DQ23,生物膜定性均为阳性菌株。结晶紫染色结果显示 4 株 MRSA 中 DQ05 的产膜能力最强,DQ09 的产膜能力最弱,且 DQ05 的耐药性强于 DQ09。生物膜生长曲线测定结果表明,在 24 h 时生物膜量最高。LFcin(17-30)对 MRSA 的 MIC 为 150  $\mu\text{mol/L}$ 。LFcin(17-30)浓度为 75  $\mu\text{mol/L}$  时,即可明显抑制生物形成,破坏形成的生物膜。LFcin(17-30)抑制胞外聚合物中胞外多糖和胞外蛋白质的合成和分泌,对胞外 DNA 的影响随 LFcin(17-30)浓度的升高而增强。结论:LFcin(17-30)可广谱抑制食源 MRSA 流行株及其生物膜形成,有望用于食源 MRSA 的辅助治疗。

**关键词** LFcin(17-30); 抗菌肽; MRSA; 生物膜

文章编号 1009-7848(2026)01-0037-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2026.01.004

近年来,耐甲氧西林金葡萄菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)污染动物源性食品情况愈发严重,给食品安全带来巨大危害<sup>[1]</sup>。可在生鲜肉、生牛乳、冷冻食品等中检出,其中生牛乳中的检出率高达 38.5%<sup>[2]</sup>。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是厚壁菌门的革兰氏阳性、无芽孢、凝固酶阳性的球形细菌。虽然葡萄球菌属包括 52 个种和 28 个亚种,但是金黄色葡萄球菌是迄今为止最具临床相关性的<sup>[3]</sup>。MRSA 分离株对所有可用的青霉素类和其它  $\beta$ -内酰胺类抗菌药物均耐药<sup>[4]</sup>。与甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌相比,MRSA 感染的死亡率更高<sup>[5]</sup>。

生物膜(Biofilm)是附着在生物或非生物表面的基质包裹的微生物附着物,是一种重要、有待研究的细菌生长模式<sup>[6]</sup>。食品和食品加工环境是微生

物附着和生物膜形成的最佳场所。病原微生物可以附着在食品表面,在其上生长并形成生物膜,导致食品安全风险增加<sup>[7]</sup>。细菌通常在营养丰富时以浮游方式生长,而在营养缺乏的环境条件下,它们则几乎只以生物膜的多细胞聚集体形式存在<sup>[8]</sup>。生物被膜的形成包括以下几个阶段:浮游细胞在基质表面黏附定植、生物被膜成熟和生物被膜扩散<sup>[9]</sup>。在生物被膜中细菌细胞被包裹在胞外聚合物(Extracellular polymeric substances, EPS)中,而胞外聚合物是由蛋白质、多糖、核酸和脂质等生物分子组成的复杂且高度极性的混合物<sup>[10]</sup>。金黄色葡萄球菌形成生物膜以减缓或阻止抗菌药物的扩散,从而阻碍药物进入生物膜内的细菌细胞<sup>[11]</sup>。据报道,覆盖在生物膜中的细菌细胞对抗生素的抵抗力比浮游生长的细菌细胞高 10~1 000 倍<sup>[12]</sup>。

抗菌肽(Antimicrobial peptide, AMPs)是一类小分子多肽,通常由 12~50 个氨基酸残基组成,是几乎所有生物先天免疫的重要组成部分,在抵抗外来微生物入侵中发挥重要作用<sup>[13]</sup>。乳铁蛋白(Lactoferrin, LF)是一种多功能糖蛋白,主要存在

收稿日期: 2025-01-24

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32172814,32172937);  
黑龙江省“揭榜挂帅”科技攻关项目(2023ZXJ02B03)

第一作者: 王舰辉,男,硕士

通信作者: 王建发 E-mail: wjflw@sina.com

于哺乳动物的初乳与乳汁中,具有抗细菌、抗真菌、抗病毒、抗氧化等多种功能<sup>[14]</sup>。Lfcin(17-30)是乳铁蛋白的14个氨基酸残基,属于乳铁蛋白肽的一种,主要通过膜透性表现出广谱的抗菌活性<sup>[15]</sup>。有研究表明 Lfcin(17-30)对细菌和细菌生物膜有抑制作用,包括肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌以及多重耐药菌肠聚集性大肠杆菌<sup>[16-18]</sup>。有研究表明 Lfcin(17-30)对 MRSA 有良好的抑菌效果,当 Lfcin(17-30)达到 20  $\mu\text{mol/L}$  时,对细菌生长抑制率在 85%以上<sup>[19]</sup>。之前有关 Lfcin(17-30)对 MRSA 的研究中,尚未对临床样本分离的 MRSA 抑菌浓度及生物膜作用进行深入研究。本试验旨在研究 Lfcin(17-30)对野生型 MRSA 抑菌和生物膜作用,为其作为新型抗生物膜制剂提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 乳铁蛋白肽 Lfcin(17-30) 参考乳铁蛋白的氨基酸序列合成,氨基酸序列为:FKCRRWQWRMKKLG,由上海楚肽生物科技有限公司合成,纯度(HPLC) $\geq 95\%$ 。ddH<sub>2</sub>O 作为抗菌肽的溶剂。

1.1.2 菌种 金黄色葡萄球菌标准菌株:BNCC186355,购自北京北纳创联生物技术研究院;乳源金葡菌流行株,由某规模化奶牛场患乳房炎牛乳汁中分离鉴定获得。

1.1.3 主要试剂和仪器 细菌基因组 DNA 提取试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;头孢西丁纸片,英国 OXOID 公司;MH 培养基、TSB 培养基,青岛海博生物科技有限公司;结晶紫、刚果红,上海源叶生物科技有限公司。

酶标仪(SpectraMax<sup>®</sup> ABS),美谷分子仪器有限公司;恒温摇床(NRY-1102C),上海南荣实验室设备有限公司;扫描电子显微镜(SU8010),日立。

### 1.2 方法

1.2.1 鉴定乳源金黄色葡萄球菌中的 MRSA 采用“金标准”*mecA* 基因聚合酶链反应扩增法及头孢西丁纸片扩散法进行 MRSA 鉴定,具体方法如下;按 DNA 提取试剂盒说明书方法提取 DNA。PCR 引物序列 F (5'-GTGAAGATATACCAAGTC

ATT-3'),R(5'-ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT-3')。扩增条件为 94  $^{\circ}\text{C}$  3 min 1 个循环,94  $^{\circ}\text{C}$  1 min,58  $^{\circ}\text{C}$  45 s,72  $^{\circ}\text{C}$  1 min,30 个循环,72  $^{\circ}\text{C}$  5 min 1 个循环。用生理盐水调整菌液浊度,使之达到 0.5 个麦氏浊度标准,接种到平板上,接种后 15 min 内将药敏纸片置于平板上。结果判定标准:抑菌圈直径 $\leq 21$  mm 为耐药, $\geq 22$  mm 为敏感。最终两种方法均检测为阳性的菌株判定为 MRSA。

### 1.2.2 刚果红平板法定性 MRSA 生物膜形成能力

挑取单个菌落接种于 TSB 培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$ ,180 r/min 培养过夜,将活化后的菌悬液点种于刚果红琼脂平板上,于恒温培养箱内 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h,然后置于室温 72 h 观察菌落变化特点。判断标准:若菌落变为致敏、黑色且干燥,并出现透明圈则为阳性,光滑、红色且湿润则为阴性。

### 1.2.3 结晶紫半定量 MRSA 生物膜形成能力

取单个菌落接种于 TSB 培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$ ,120 r/min 培养 12 h,取 1%菌液传代培养,37  $^{\circ}\text{C}$ ,120 r/min 培养 12 h,取 1%菌液传代培养,37  $^{\circ}\text{C}$ ,120 r/min 培养 4~6 h,将菌液浓度调至  $1 \times 10^6$  CFU/mL。取稀释好的菌液 200  $\mu\text{L}$  接种到 96 孔培养板上,每个菌株重复 3 个复孔,以培养基为空白对照,37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h。培养结束后,弃去培养基,用 PBS 轻轻漂洗 2~3 次,然后在各孔中加甲醇 200  $\mu\text{L}$  固定生物膜,15 min 后弃去甲醇,室温自然晾干后,加入 100  $\mu\text{L}$  0.1%结晶紫染液染色 15 min,洗去多余染液,晾干,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  33%冰醋酸,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min 后,酶标仪测定波长 570 nm 处的光密度值。OD 值反映生物被膜与接触表面的黏附程度,依据临界 OD<sub>c</sub> 值(OD<sub>c</sub> 等于空白孔的平均值)可对生物被膜分类:OD $\leq$ OD<sub>c</sub> 为不黏附(-),OD<sub>c</sub><OD $\leq$ 2OD<sub>c</sub> 为弱黏附(+),2OD<sub>c</sub><OD $\leq$ 4OD<sub>c</sub> 为中等黏附(++),OD>4OD<sub>c</sub> 为强黏附(+++)。

1.2.4 MRSA 抗生素药物敏感性试验 采用 K-B 纸片扩散法检测野生型 MRSA 对 34 种抗生素的耐药性。具体操作如下:挑取单菌落接种于 TSB 液体培养基,置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温摇床,用无菌生理盐水稀释至 OD<sub>600nm</sub> = 0.5,浓度约  $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$  CFU/mL。取 50  $\mu\text{L}$  菌液均匀涂布于直径为 70 mm 的 TSB 琼脂平板,置于超净工作台,室温干燥 3~5 min,粘贴药敏纸片,置于 35  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱培养 24

h。测量抑菌环直径,参照杭州微生物试剂有限公司药敏试验标准判定细菌对抗生素的敏感、中敏、

耐药,具体判定标准见表 1。

表 1 药敏试验纸片法的抑菌范围标准

Table 1 Standard of bacteriostatic range of drug sensitivity test paper method

抗生素	判定标准抑菌圈直径/mm			抗生素	判定标准抑菌圈直径/mm		
	耐药(R)	中敏(MS)	敏感(S)		耐药(R)	中敏(MS)	敏感(S)
卡那霉素	≤13	13~14	≥15	诺氟沙星	≤12	13~16	≥17
新霉素	≤12	13~16	≥17	克林霉素	≤14	15~20	≥21
复方新诺明	<10	10~14	≥15	多西环素	≤12	13~15	≥16
呋喃唑酮	≤14	15~16	≥17	庆大霉素	≤13	13~14	≥15
氯霉素	≤12	13~17	≥18	麦迪霉素	≤13	14~17	≥18
多粘菌素 B	≤8	8~11	≥12	丁胺卡那	≤14	15~16	≥17
米诺环素	<10	10~14	≥15	四环素	≤14	15~18	≥19
氧氟沙星	≤12	13~15	≥16	头孢曲松	≤13	14~20	≥21
万古霉素	<15		≥15	青霉素	≤28		≥29
羧苄西林	≤13	14~16	≥17	头孢拉丁	≤14	15~17	≥18
头孢唑林	≤14	15~17	≥18	红霉素	≤13	14~22	≥23
哌拉西林	≤17		≥18	林可霉素	<10	10~14	≥15
苯唑西林	≤10	11~12	≥13	恩诺沙星	<10	10~14	≥15
头孢他啶	≤14	15~17	≥18	复方新诺明	<10	10~16	>16
头孢氨苄	≤14	15~17	≥18	替考拉宁	≤10	11~13	≥14
头孢哌酮	≤15	16~20	≥21	环丙沙星	≤15	16~20	≥21
氨苄西林	≤28		≥29	头孢呋辛	≤14	15~22	≥23

1.2.5 抗菌肽 LFcin(17-30)对 MRSA 最小抑菌浓度测定 参照 CLSI (Clinical laboratory standards institute)指南<sup>[20]</sup>,采用微量肉汤稀释法测定 LFcin(17-30)对 MRSA 的 MIC。取单个菌落接种于 MH 培养基中,37 °C,120 r/min 培养 12 h,取 1%菌液传代培养,37 °C,120 r/min 培养 12 h,取 1%菌液传代培养,37 °C,120 r/min 培养 4~6 h,将菌液浓度调至  $1 \times 10^5$  CFU/mL。向 96 孔培养板各加入 100  $\mu$ L 经倍比稀释的 LFcin(17-30),使最终药物浓度分别为 600,300,150,75,37.5,18.75  $\mu$ mol/L,再加入 100  $\mu$ L 菌液,终体积为 200  $\mu$ L。以 MH 培养基为阴性对照,以未加药的菌液作为阳性对照,于 37 °C 培养 16~20 h,酶标仪于波长 600 nm 处测定其吸光度。以 OD 值不再有显著变化的最小浓度定义为最小抑菌浓度 MIC。

1.2.6 MRSA 生物膜生长曲线 取稀释好的菌液 200  $\mu$ L 接种到 96 孔培养板上,每个菌株重复 3 个复孔,分别培养 4,8,12,16,24,48,72 h,隔 24

h 换液 1 次。培养结束后,弃去培养基,用 PBS 轻轻漂洗 2~3 次,以洗去杂质和浮游菌,然后在各孔中加甲醇 200  $\mu$ L 固定生物膜,15 min 后弃去甲醇,室温自然晾干后,加入 100  $\mu$ L 0.1%结晶紫染液染色 15 min,洗去多余染液,晾干,每孔加入 100  $\mu$ L 33%冰醋酸,37 °C 孵育 30 min 后,酶标仪测定波长 570 nm 处的光密度值。

1.2.7 LFcin(17-30)对 MRSA 生物膜的抑制作用

取稀释好的菌液 100  $\mu$ L 接种到 96 孔培养板上,再加入 LFcin(17-30)使其终浓度为  $1 \times \text{MIC}$ 、 $1/2 \times \text{MIC}$ 、 $1/4 \times \text{MIC}$ 、 $0 \times \text{MIC}$ ,重复 3 个复孔,培养 24 h。培养结束后,弃去培养基,用 PBS 轻轻漂洗 2~3 次,以洗去杂质和浮游菌,然后在各孔中加甲醇 200  $\mu$ L 固定生物膜,15 min 后弃去甲醇,室温自然晾干后,加入 100  $\mu$ L 0.1%结晶紫染液染色 15 min,洗去多余染液,晾干,每孔加入 100  $\mu$ L 33%冰醋酸,37 °C 孵育 30 min 后,酶标仪测定波长 595 nm 处的光密度值。

同 1.2.3 节的方法纯化培养 MRSA 菌液,将菌液浓度调至  $1 \times 10^6$  CFU/mL。取稀释好的菌液 1 mL 接种到 6 孔培养板上,再加入 LFc<sub>in</sub>(17-30) 1 mL 使其终浓度为  $1 \times \text{MIC}$ 、 $1/2 \times \text{MIC}$ 、 $1/4 \times \text{MIC}$ 、 $0 \times \text{MIC}$ , 每孔加入细胞爬片重复 3 个复孔,培养 24 h。培养结束后,弃去培养基,用 PBS 轻轻漂洗细胞爬片 2~3 次,以洗去杂质和浮游菌,处理后加入 2.5% 戊二醛,在 4 °C 下固定 12 h,乙醇脱水,干燥后镀金,扫描电镜下观察。

**1.2.8 LFc<sub>in</sub>(17-30)对 MRSA 生物膜胞外聚合物的影响** 首先提取 MRSA 胞外聚合物(Extracellular polymeric substances, EPS),同 1.2.7 节的方法培养生物膜,培养结束后,弃去培养基,用 PBS 轻轻漂洗 2~3 次,以洗去杂质和浮游菌,加入 1 mL PBS,用细胞刮刀刮下生物膜,转移至离心管,10 000 r/min,4 °C 离心 10 min,取上清,于 0.22 μm 滤膜过滤备用。取 1 mL 样品加入 15 mL 离心管后,加入 1 mL 苯酚溶液(50 g/L),混合振荡 15 s 后,加入 5 mL 95% 硫酸溶液,避光反应 10 min,混合振荡 10 s 后,置于 25 °C 水浴孵育 10 min,孵育完,用分光光度计测定 OD<sub>490nm</sub>,根据标准曲线计算胞外多糖的含量。用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定胞外蛋白质含量。按 Rice 等<sup>[21]</sup>的方法提取 eDNA,用分光光度计检测 OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub> 比值,eDNA 的表达量用 OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub> 表示。

**1.2.9 数据分析** 使用 Graphpad prism 9.0 软件

进行统计学分析,结果表示为“平均值±标准差”。采用 One-way ANOVA 进行单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异显著, $P < 0.01$  为差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 鉴定乳源金黄色葡萄球菌中的 MRSA

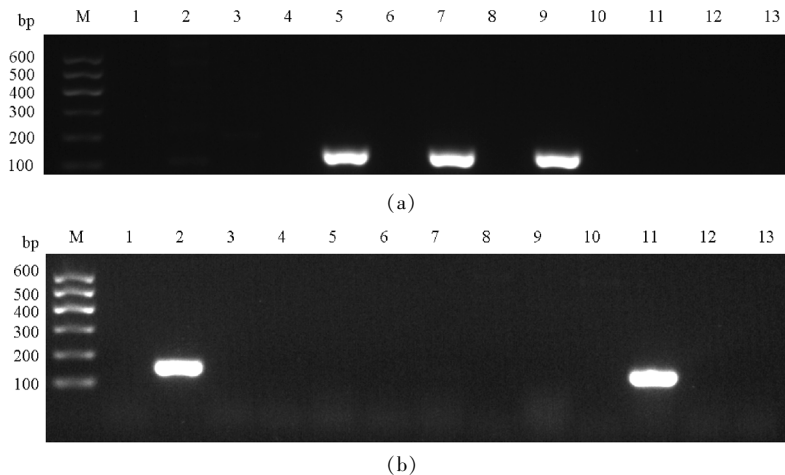
如图 1a、1b 所示,分离的 24 株乳源金黄色葡萄球菌中共检出 5 株 *mecA* 基因阳性菌株分别为 DQ05、DQ07、DQ09、DQ15、DQ23。如表 2 所示,检出 5 株耐药菌分别为 DQ05、DQ07、DQ09、DQ21、DQ23。结合两种方法,判定 DQ05、DQ07、DQ09、DQ23 为 MRSA。

### 2.2 MRSA 生物膜形成能力的定量与定性观察

如图 2 所示,临床分离 MRSADQ05、DQ07、DQ09、DQ23 在刚果红平板上形成黑色、干燥菌落且菌落周围有透明圈,表明 4 株 MRSA 均具有形成生物膜的能力。如表 3 所示,临床分离 MRSADQ05、DQ07、DQ09、DQ23 经结晶紫染色后测得  $\text{OD} > 4\text{OD}_c$ ,均为强黏附(++++)。DQ05 形成生物膜能力最强,DQ09 形成生物膜能力最弱,DQ05 作为后续试验菌株。

### 2.3 MRSA 抗生素药物敏感性试验

如表 4 所示,对 DQ05 和 DQ09 进行药物敏感性分析,结果显示 DQ09 对卡那霉素、复方新诺酮、氨苄西林、克林霉素、多西环素、四环素、青霉素、林可霉素 8 种抗生素耐药。DQ05 对卡那霉素、



注:M:600 bp DNA Maker;图 a 中,1~12 为 DQ1~DQ12,13 为 BNCC186335;图 b 中,1~12 为 DQ13~DQ24,13 为 BNCC186335。

图 1 *mecA* 基因 PCR 扩增

Fig.1 The amplification of *mecA* genes

表 2 头孢西丁药敏试验结果

Table 2 Results of cefoxitin susceptibility test

菌株	抑菌环直径/mm	结果判定	菌株	抑菌环直径/mm	结果判定
DQ01	28	S	DQ14	27	S
DQ02	30	S	DQ15	32	S
DQ03	30	S	DQ16	32	S
DQ04	26	S	DQ17	30	S
DQ05	17	R	DQ18	29	S
DQ06	24	S	DQ19	32	S
DQ07	19	R	DQ20	29	S
DQ08	22	S	DQ21	15	R
DQ09	20	R	DQ22	32	S
DQ10	27	S	DQ23	16	R
DQ11	26	S	DQ24	28	S
DQ12	28	S	BNCC186335	25	S
DQ13	32	S			

注:R. 耐药;S. 敏感。

表 3 结晶紫半定量检测 MRSA 形成生物膜能力

Table 3 Crystal violet semi-quantitative detection of MRSA biofilm formation ability

菌株	OD <sub>570nm</sub>	结果判定
DQ05	1.352 ± 0.037	+++
DQ07	0.889 ± 0.022	+++
DQ09	0.802 ± 0.023	+++
DQ23	1.189 ± 0.063	+++
阴性对照	0.095 ± 0.014	

注:+++. 强黏附。

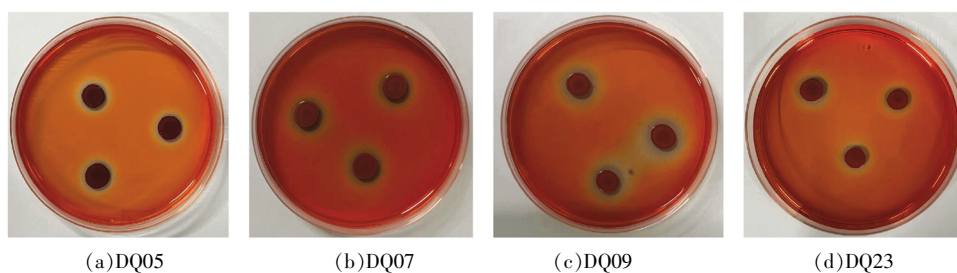


图 2 刚果红平板定性筛选 MRSA 形成生物膜能力

Fig.2 Congo red plate identify the ability of MRSA biofilm formation

新霉素、复方新诺酮、多粘菌素 B、氨苄西林、克林霉素、庆大霉素、麦迪霉素、四环素、青霉素、红霉素、林可霉素、复方新诺明 13 种抗生素耐药。

#### 2.4 抗菌肽 LFcin(17-30)对 MRSA MIC 测定

采用肉汤微量稀释法测定 MIC 结果如图 3 所示,在 LFcin(17-30)达到 150  $\mu\text{mol/L}$  后吸光度无显著变化,LFcin(17-30)对 MRSA 的 MIC 为 150  $\mu\text{mol/L}$ 。

#### 2.5 MRSA 生物膜生长曲线

如图 4 所示,在 0~12 h 内,随着培养时间的延长,吸光度不断上升,是生物膜黏附阶段。在 12~48 h 内,随培养时间延长,吸光度变化相对稳定,是生物膜成熟阶段。在 24 h 时,吸光度达到最高,后续试验选择 24 h 为培养时间节点。在 48~96 h 内,吸光度随培养时间延长不断下降,是生物膜扩散阶段。

表4 MRSA药敏试验结果

Table 4 Results of MRSA susceptibility test

抗生素	DQ09		DQ05	
	抑菌环	结果	抑菌环	结果
	直径/mm	判定	直径/mm	判定
卡那霉素	12	R	7	R
新霉素	16	MS	7	R
复方新诺酮	6	R	7	R
呋喃唑酮	21	S	28	S
氯霉素	21	S	26	S
多粘菌素 B	17	S	7	R
米诺环素	17	S	32	S
氧氟沙星	21	S	22	S
万古霉素	19	S	21	S
羧苄西林	34	S	29	S
头孢唑林	36	S	38	S
哌拉西林	24	S	21	S
苯唑西林	28	S	30	S
头孢他啶	22	S	26	S
头孢氨苄	28	S	31	S
头孢哌酮	31	S	29	S
氨苄西林	26	R	23	R
诺氟沙星	17	S	14	MS
克林霉素	12	R	7	R
多西环素	11	R	18	S
庆大霉素	17	S	7	R
麦迪霉素	22	MS	7	R
丁胺卡那	25	S	16	MS
四环素	8	R	14	R
头孢拉丁	32	S	34	S
头孢曲松	26	S	34	S
青霉素	24	R	11	R
红霉素	32	S	7	R
林可霉素	6	R	7	R
恩诺沙星	26	S	14	MS
复方新诺明	18	S	7	R
替考拉宁	18	S	20	S
环丙沙星	19	MS	20	MS
头孢呋辛	33	S	39	S

注:R. 耐药;MS. 中敏;S. 敏感。

## 2.6 LFcin(17-30)对MRSA生物膜的抑制作用

如图5所示,与对照组(0  $\mu\text{mol/L}$ )相比 LFcin(17-30)对MRSA生物膜形成有明显抑制作用。LFcin(17-30)在75  $\mu\text{mol/L}$ 时,对MRSA生物膜形成极明显抑制作用。且随着LFcin(17-30)浓度的

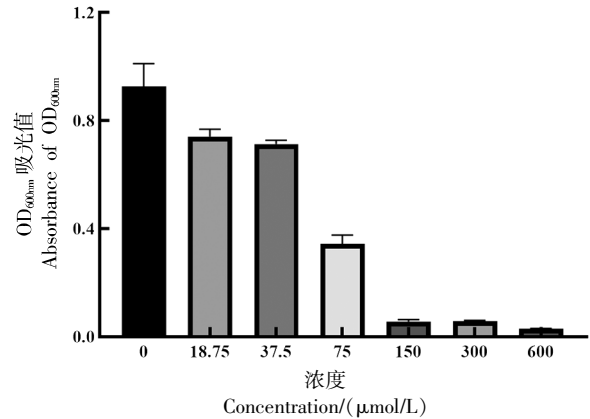


图3 LFcin(17-30)对MRSA的MIC测定

Fig.3 MIC determination of MRSA by LFcin (17-30)

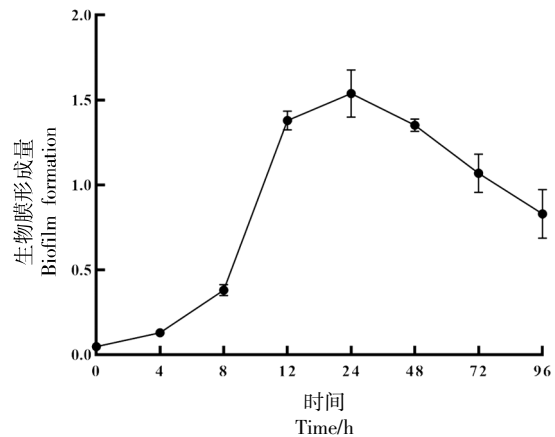
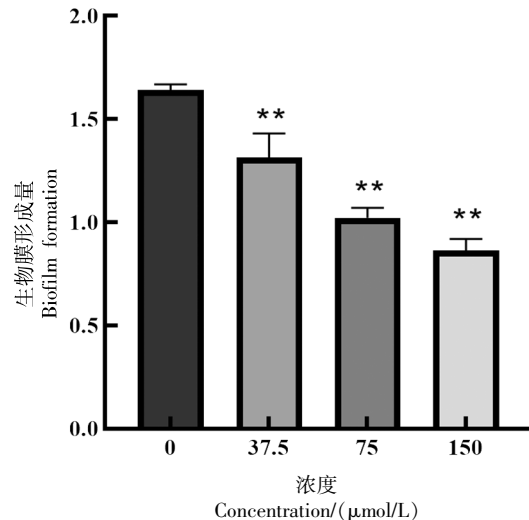


图4 MRSA生物膜生长曲线

Fig.4 Growth curve of MRSA biofilm



注:与对照组相比,\*. 差异显著( $P<0.05$ ),\*\*. 差异极显著( $P<0.01$ ),ns. 无统计学差异( $P>0.05$ ),下同。

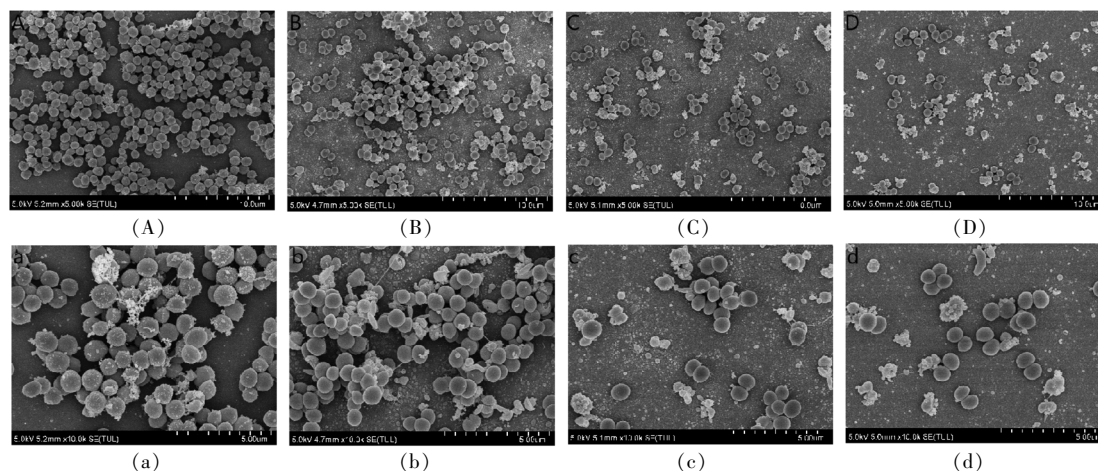
图5 LFcin(17-30)对MRSA生物膜的抑制作用

Fig.5 Inhibitory effect of LFcin (17-30) on MRSA biofilm

增加,对 MRSA 生物膜抑制作用更明显。因此,LFcin (17-30) 以浓度依赖方式抑制生物膜的形成。

通过扫描电子显微镜观察 LFcin (17-30)对 MRSA 生物膜的抑制作用。如图 6 所示,对照组中细菌菌体大量黏附在细胞爬片表面,细菌菌体之间被其分泌的胞外聚合物黏连,使其形成紧密、较

厚的三维立体结构。在 37.5  $\mu\text{mol/L}$  LFcin(17-30)作用下,细菌分泌的胞外聚合物减少,少量细菌生物膜结构出现崩解,由立体结构变成游离的单个菌落。在 75  $\mu\text{mol/L}$  和 150  $\mu\text{mol/L}$  LFcin(17-30)作用下,细菌分泌的胞外聚合物明显减少,生物膜被大量破坏,菌落单个或几个黏附在细胞爬片上,细菌菌体结构被破坏。



注:A. 空白组(5 000 $\times$ );B. 37.5  $\mu\text{mol/L}$  组(5 000 $\times$ );C. 75  $\mu\text{mol/L}$  组(5 000 $\times$ );D. 150  $\mu\text{mol/L}$  组(5 000 $\times$ );a. 空白组(10 000 $\times$ );b. 37.5  $\mu\text{mol/L}$  组(10 000 $\times$ );c. 75  $\mu\text{mol/L}$  组(10 000 $\times$ );d. 150  $\mu\text{mol/L}$  组(10 000 $\times$ )。

图 6 扫描电子显微镜观察不同浓度 LFcin(17-30)对 MRSA 生物膜的抑制作用

Fig.6 Scanning electron microscopy was used to observe the inhibitory effect of different concentrations of LFcin (17-30) on MRSA biofilm

### 2.7 LFcin(17-30)对 MRSA 胞外聚合物的影响

如图 7a 所示,在 37.5  $\mu\text{mol/L}$  LFcin(17-30)作用下,可以抑制 MRSA 生物膜胞外多糖的合成与分泌,随着 LFcin(17-30)浓度的升高,更明显抑

制 MRSA 生物膜胞外多糖的合成与分泌,且 LFcin(17-30)对 MRSA 生物膜胞外多糖的分泌与合成抑制作用呈浓度依赖性。如图 7b 所示,在 37.5  $\mu\text{mol/L}$  LFcin (17-30) 和 75  $\mu\text{mol/L}$  LFcin

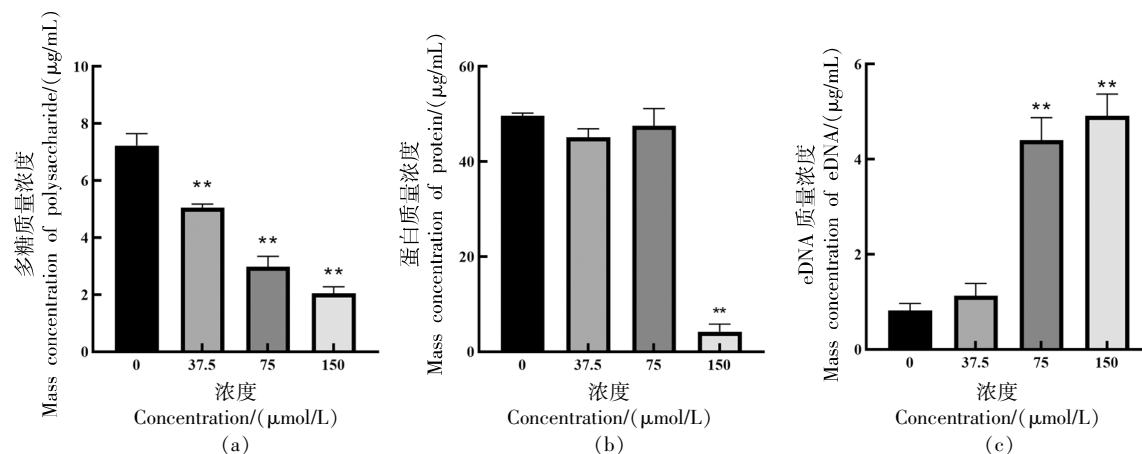


图 7 LFcin(17-30)对 MRSA 生物膜胞外聚合物的影响

Fig.7 Effect of LFcin (17-30) on extracellular polymeric substances in MRSA biofilm

(17-30)作用下,生物膜胞外蛋白含量无明显变化。当 LFcIn(17-30)浓度达到 150  $\mu\text{mol/L}$  时,明显的抑制生物膜胞外蛋白的合成与分泌。如图 7c 所示,在 37.5  $\mu\text{mol/L}$  LFcIn(17-30)作用下,对生物膜胞外 eDNA 无显著影响,在 37.5  $\mu\text{mol/L}$  LFcIn(17-30)作用下,对生物膜胞外 eDNA 含量明显升高,且 LFcIn(17-30)对生物膜胞外 eDNA 含量影响呈浓度依赖性。

### 3 讨论与结论

自 20 世纪 40 年代青霉素被引入临床治疗性不久,金黄色葡萄球菌菌株中青霉素耐药的发生率增加<sup>[21]</sup>。20 世纪 60 年代开发出一种半合成青霉素甲氧西林,并且在临床上使用,随后 1 年内,MRSA 被临床中分离<sup>[23]</sup>。至今,MRSA 感染的日益流行对人类健康构成重大威胁,其中具有生物被膜形成能力的 MRSA 菌株的临床挑战尤为突出。据 Yu 等<sup>[24]</sup>报道,2014 年至 2020 年间,从中国 7 个省市收集的非重复性 MRSA 临床分离样本,发现 53.2% 的 MRSA 分离株表现出不同程度产生生物膜的能力,其中,广东地区 MRSA 高达 78.6%。本试验中 4 株 MRSA 均为生物膜阳性菌与张鹏飞等<sup>[25]</sup>研究中的食源性 MRSA 高生物膜阳性率相符合。据 Ali 等<sup>[26]</sup>报道生物膜产生与抗生素克拉霉素、左氧氟沙星、头孢吡肟和磷霉素之间存在显著相关性。本试验中对高生物膜和中生物膜产生 MRSA 进行了抗生素耐药性分析,二者对卡那霉素、复方新诺酮、氨苄西林、克林霉素、四环素、青霉素、林可霉素 7 种抗生素均耐药,与之前的研究不一致,这可能与临床样本来源处抗生素的使用情况有关。

近年来,研究表明在未来抗生物膜策略中,AMPs 可能是一种有前途的方法<sup>[27]</sup>。例如,目前被广泛研究的 LL-37,在低浓度下孵育 4 h 后,显著减少生物膜衍生的细胞数量<sup>[28]</sup>,LFcIn(17-30)具有良好的稳定性,且在 24 h 和 48 h 时,对多药耐药大肠杆菌的生物膜产生显著抑制作用<sup>[29]</sup>。本试验测定 LFcIn(17-30)对 MRSA 的 MIC 为 150  $\mu\text{mol/L}$ ,与之前研究结果不同,MIC 高于 Flores-Villaseñor 等<sup>[19]</sup>的研究结果,这可能由试验所用的菌株不同导致,本试验的研究对象为野生型 MRSA,

之前的试验将标准菌株作为研究对象,且有可能与 LFcIn(17-30)合成效能差异有关。采用结晶紫染色和扫描电子显微镜探究 LFcIn(17-30)对 MRSA 生物膜的作用,当 LFcIn(17-30)浓度达到 1/2×MIC 时,可以有效抑制 MRSA 生物膜生成,并且呈浓度依赖性抑制生物膜产生,说明 LFcIn(17-30)可作为理想的生物膜制剂。为进一步研究 LFcIn(17-30)如何抑制 MRSA 生物膜的产生,分别测定了 EPS 中胞外蛋白、胞外多糖和胞外 DNA 的作用。胞外多糖是各种微生物物种生物膜基质的主要部分<sup>[30]</sup>,发现在 LFcIn(17-30)作用下,随着 LFcIn(17-30)浓度升高,胞外多糖含量逐渐降低。在 LFcIn(17-30)作用下,胞外蛋白含量在 LFcIn(17-30)浓度为 1/4×MIC 和 1/2×MIC 时,无明显变化,当 LFcIn(17-30)浓度达到 1×MIC 时,胞外蛋白含量显著降低。胞外 DNA 的含量随着 LFcIn(17-30)浓度增加也随之增加。此结果与大多抗生物膜研究中的结果相反,然而与 Sivori 等<sup>[31]</sup>研究中提出的假设符合,胞外 DNA 的积累是由于细胞亚群的裂解,而不是由于依赖抗生素暴露而主动释放到生物膜基质中,由于 LFcIn(17-30)浓度升高,细菌菌体破裂导致胞外 DNA 外泄。

综上所述,LFcIn(17-30)对 MRSA 具有良好的抑菌和抗生物膜活性。对 LFcIn(17-30)的抗生物膜如何调控,LFcIn(17-30)在哺乳动物体内的效用如何,以及 LFcIn(17-30)是否可以与抗生素联用,在缩减抗生素剂量的同时,增强抑菌效果都有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] GONZÁLEZ-MACHADO C, ALONSO-CALLEJA C, CAPITA R. Prevalence and types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in meat and meat products from retail outlets and in samples of animal origin collected in farms, slaughterhouses and meat processing facilities. A review[J]. Food Microbiol, 2024, 123: 104580.
- [2] 索玉娟,于宏伟,凌巍,等.食品中金黄色葡萄球菌污染状况研究[J].中国食品学报,2008,8(3):88-93.
- [3] SUO Y J, YU H W, LING W, et al. Analysis on

- the contamination of *Staphylococcus aureus* in food [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2008, 8(3): 88-93.
- [3] LEE A S, DE LENCASTRE H, GARAU J, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Nature Reviews Disease Primers, 2018, 4: 18033.
- [4] DAVID M Z, DAUM R S. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic [J]. Clin Microbiol Rev, 2010, 23(3): 616-687.
- [5] LAKHUNDI S, ZHANG K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular characterization, evolution, and epidemiology [J]. Clin Microbiol Rev, 2018, 31(4): e00020-18.
- [6] HALL-STOODLEY L, COSTERTON J W, STOODLEY P. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases [J]. Nat Rev Microbiol, 2004, 2(2): 95-108.
- [7] ABEBE G M. The role of bacterial biofilm in antibiotic resistance and food contamination [J]. Int J Microbiol, 2020, 2020: 1705814.
- [8] COSTERTON J W, CHENG K J, GEESEY G G, et al. Bacterial biofilms in nature and disease [J]. Annu Rev Microbiol, 1987, 41: 435-464.
- [9] LANDINI P, ANTONIANI D, BURGESS J G, et al. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 86(3): 813-823.
- [10] JACOBSEN A S, JENSEN H. Human cathelicidin LL-37 prevents bacterial biofilm formation [J]. Future Med Chem, 2012, 4(12): 1587-1599.
- [11] DONLAN R M. Role of biofilms in antimicrobial resistance [J]. American Society for Artificial Internal Organs Journal, 2000, 46(6): S47-S52.
- [12] RIZZATO C, TORRES J, KASAMATSU E, et al. Potential role of biofilm formation in the development of digestive tract cancer with special reference to *Helicobacter pylori* infection [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 846.
- [13] ZHANG K Y, LI X, YU C, et al. Promising therapeutic strategies against microbial biofilm challenges [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2020, 10: 359.
- [14] SUPERTI F. Lactoferrin from bovine milk: A protective companion for life [J]. Nutrients, 2020, 12(9): 2562.
- [15] SILVA T, MOREIRA A C, NAZMI K, et al. Lactoferrin peptides increase macrophages' capacity to kill *Mycobacterium avium* [J]. mSphere, 2017, 2(4): e00301-e00317.
- [16] XU G, XIONG W, HU Q, et al. Lactoferrin-derived peptides and lactoferrin chimera inhibit virulence factor production and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109(4): 1311-1318.
- [17] REYES-CORTES R, ACOSTA-SMITH E, MONDRAGÓN-FLORES R, et al. Antibacterial and cell penetrating effects of LFCin17-30, LFampin265-284, and LF chimera on enteroaggregative *Escherichia coli* [J]. Biochemistry and Cell Biology, 2017, 95(1): 76-81.
- [18] POLLINI S, BRUNETTI J, SENNATI S, et al. Synergistic activity profile of an antimicrobial peptide against multidrug-resistant and extensively drug-resistant strains of Gram-negative bacterial pathogens [J]. Journal of Peptide Science, 2017, 23(4): 329-333.
- [19] FLORES-VILLASEÑOR H, CANIZALEZ-ROMÁN A, REYES-LOPEZ M, et al. Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFCin, LFampin and LFchimera on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* [J]. Biometals, 2010, 23(3): 569-578.
- [20] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 28th ed[S/OL]. Wayne, PE: CLSI, 2018. <https://clsi.org/shop/standards/m100/>.
- [21] RICE K C, MANN E E, ENDRES J L, et al. The cidA murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(19): 8113-8118.
- [22] NORTH E A, CHRISTIE R. Acquired resistance of staphylococci to the action of penicillin [J]. Med J Aust, 1946, 1: 176-179.
- [23] HARKINS C P, PICHON B, DOUMITH M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice [J]. Genome Biol, 2017, 18(1): 130.
- [24] YU J Y, HAN W H, XU Y L, et al. Biofilm-pro-

- ducing ability of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinically isolated in China[J]. BMC Microbiology, 2024, 24(1): 241.
- [25] 张鹏飞, 王婷, 钟楠, 等. 食源性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物被膜的形成及相关基因的检测[J]. 现代食品科技, 2020, 36(10): 41-49.
- ZHANG P F, WANG T, ZHONG N, et al. Detection of biofilm formation and biofilm-related genes of food-borne methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(10): 41-49.
- [26] ALI A, RIAZ S. Emerging threats of high biofilm formation and antibiotic resistance in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates from Pakistan [J]. Infect Genet Evol, 2024, 121: 105592.
- [27] BATONI G, MAISETTA G, ESIN S. Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1858(5): 1044-1060.
- [28] HAISMA E M, DE BREIJ A, CHAN H, et al. LL-37-derived peptides eradicate multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* from thermally wounded human skin equivalents[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(8): 4411-4419.
- [29] VERGIS J, MALIK S S, PATHAK R, et al. Exploiting lactoferricin (17-30) as a potential antimicrobial and antibiofilm candidate against multi-drug-resistant enteroaggregative *Escherichia coli* [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 575917.
- [30] FLEMMING H C, WINGENDER J. The biofilm matrix[J]. Nat Rev Microbiol, 2010, 8(9): 623-633.
- [31] SIVORI F, CAVALLO I, KOVACS D, et al. Role of extracellular DNA in dalbavancin activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilms in patients with skin and soft tissue infections[J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(2): e0035122.

### Inhibitory Effect of LFcIn (17-30) on *Staphylococcus aureus* and Its Biofilm

WANG Jianhui<sup>1,2,3</sup>, WEN Luyao<sup>1,2,3</sup>, Li Minghang<sup>1,2,3</sup>, YU Shuning<sup>1,2,3</sup>, WU Rui<sup>1,2,3</sup>, GENG Zijian<sup>1,2,3</sup>, LIAN Shuai<sup>1,2,3</sup>, WANG Jianfa<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>College of Animal Science and Veterinary Medicine, Heilongjiang Bayi Agricultural Reclamation University, Daqing 163319, Heilongjiang

<sup>2</sup>Key Laboratory of Bovine Disease Control in Cold Regions of Northeast China, Department of Agriculture and Rural Affairs, Daqing 163319, Heilongjiang

<sup>3</sup>Key Laboratory of Bovine Disease Prevention and Control, Daqing 163319, Heilongjiang

**Abstract** The inhibitory effect of antimicrobial peptide LFcIn (17-30) on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilm was studied. Methods: MRSA in 24 strains of *Staphylococcus aureus* were screened by PCR and cefoxitin disk diffusion method. The biofilm-positive strains were identified by Congo red plate method and crystal violet staining method, and the biofilm-forming ability and biofilm growth curve of biofilm-positive strains were evaluated. The relationship between MRSA biofilm and drug resistance was verified by disk diffusion method. The minimal inhibitory concentration (MIC) of LFcIn (17-30) against MRSA was determined by microdilution method. The inhibitory effect of LFcIn (17-30) on MRSA biofilm was determined by crystal violet staining and scanning electron microscopy (SEM). The effect of LFcIn (17-30) biofilm composition was determined. The results showed that 4 strains of MRSA were screened out from 24 strains of *Staphylococcus aureus*, which were DQ05, DQ07, DQ09 and DQ23, and the biofilm was identified as biofilm positive strains. The results of crystal violet staining showed that DQ05 had the strongest membrane production ability among the four MRSA strains, DQ09 had the weakest membrane production ability, and the drug resistance of DQ05 was stronger than that of DQ09. The biofilm growth curve showed that the amount of biofilm was the highest at 24 h. The MIC of LFcIn (17-30) against MRSA was 150  $\mu\text{mol/L}$ . LFcIn (17-30) at 75  $\mu\text{mol/L}$  can significantly inhibit the formation and destruction of biofilms. LFcIn (17-30) inhibited the synthesis and secretion of extracellular polysaccharides and extracellular proteins in extracellular polymers, and the effect on extracellular DNA increased with the increase of LFcIn (17-30) concentration. In summary, LFcIn (17-30) can inhibit the prevalence of food-borne MRSA strains and biofilm formation, and is expected to be used as an adjuvant therapy for food-borne MRSA.

**Keywords** LFcIn (17-30); antimicrobial peptides; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; biofilm