



扶绍东,王子菁,王正磊,等. 海洋链球菌次级代谢产物 Streptochlorin 对金黄色葡萄球菌诱发乳腺细胞氧化应激的保护作用[J]. 南京农业大学学报,2024,47(3):522-529.

FU Shaodong, WANG Zijing, WANG Zhenglei, et al. The protective effects of Streptochlorin, marine *streptomyces.sp* secondary metabolite, on oxidative stress of mammary cells induced by *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(3): 522-529.

海洋链球菌次级代谢产物 Streptochlorin 对金黄色葡萄球菌 诱发乳腺细胞氧化应激的保护作用

扶绍东¹, 王子菁¹, 王正磊¹, 黄代钊², 石皖荣³, 苗晋锋¹, 张明智^{2*}

(1.南京农业大学动物医学院,江苏 南京 210095;2.南京农业大学理学院,江苏 南京 210095;
3.安徽医科大学第一附属医院,安徽 合肥 230011)

摘要: [目的] 本试验旨在探讨 Streptochlorin 对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 感染引起小鼠乳腺上皮细胞氧化应激的影响及机制。 [方法] 采用海洋链球菌次级代谢产物 Streptochlorin 预处理小鼠乳腺上皮细胞指标检测 (EpH4-Ev) 2 h, 适时加入 *S. aureus* (MOI=10) 共孵育 4 h, 收集样品; 通过细胞活性检测、倒置荧光显微镜观察、生化指标检测、Western blot、RT-PCR 等方法检测相关指标, 并辅以计算机分子对接技术, 明确 Streptochlorin 对 *S. aureus* 诱发乳腺上皮细胞氧化应激的影响及潜在机制。 [结果] 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Streptochlorin 预处理能够明显改善 *S. aureus* 侵袭导致的乳腺上皮细胞排列紊乱、皱缩等形态改变, 降低细胞损伤标志物乳酸脱氢酶 (LDH)、N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶 (NAGase) 的分泌以及肿瘤坏死因子 (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β) 和白细胞介素 6 (IL-6) 等炎性细胞因子的基因表达 ($P<0.05$)。Streptochlorin 预处理能显著降低乳腺上皮细胞胞内活性氧 (ROS) 水平, 提高细胞总抗氧化能力 (T-AOC) 水平, 减少丙二醛 (MDA) 水平 ($P<0.05$)。Western blot 检测以及分子对接结果显示, Streptochlorin 可能通过 Keap1-Nrf2 信号通路促进下游分子血红素加氧酶 1 (HO-1)、NAD(P)H:醌氧化还原酶 1 (NQO1)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 的基因表达发挥抗氧化作用 ($P<0.05$)。 [结论] Streptochlorin 对 *S. aureus* 感染小鼠乳腺上皮细胞诱发的氧化应激和炎症反应具有显著的保护作用, 这可能与 Keap1-Nrf2 信号通路的激活有关。

关键词: 海洋链球菌; Streptochlorin; 金黄色葡萄球菌; 氧化应激; Keap1-Nrf2

中图分类号: S852.2

文献标志码: A

文章编号: 1000-2030(2024)03-0522-08

The protective effects of Streptochlorin, marine *Streptomyces sp.* secondary metabolite, on oxidative stress of mammary cells induced by *Staphylococcus aureus*

FU Shaodong¹, WANG Zijing¹, WANG Zhenglei¹, HUANG Daichuan²,
SHI Wanrong³, MIAO Jinfeng¹, ZHANG Mingzhi^{2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;
2. College of Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;
3. The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230011, China)

Abstract: [Objectives] The study aimed to explore the effect and mechanism of Streptochlorin on oxidative stress of mice mammary epithelial cells induced by *Staphylococcus aureus* infection. [Methods] Mice mammary epithelial cells (EpH4-Ev) were pretreated with Streptochlorin, then the *S. aureus* (MOI=10) was added for 4 h to collect samples to clarify the effect and underlying mechanism of Streptochlorin on oxidative stress induced by *S. aureus* in EpH4-Ev cells, the levels of related indicators were detected by cell viability test, inverted fluorescence microscope, biochemical test, Western blot, RT-qPCR, complemented by computer molecular docking technology. [Results] 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Streptochlorin pretreatment was found to significantly ameliorate the morphological changes such as disorganization and wrinkling of EpH4-Ev cells caused by *S. aureus* invasion, and reduce the secretion of the cell supernatant damage markers lactate dehydrogenase (LDH) and N-acetyl- β -D-aminoglucosidase (NAGase) as well as the gene

收稿日期: 2023-04-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (22177051, 32061143045); 中央高校基本业务费专项资金 (KYCYXT2022010); 四川省科技计划项目 (2022YFN0068)

* 通信作者: 张明智, 副教授, 博士, 主要从事抗感染靶向药物的设计、合成及作用机制研究, E-mail: mzzhang@njau.edu.cn.

expression of classical inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β) and interleukin 6 (IL-6) ($P < 0.05$). Streptochlorin pretreatment significantly reduced intracellular reactive oxygen species (ROS) levels, increased total antioxidant capacity of cells (T-AOC) capacity, and decreased malondialdehyde (MDA) level in EpH4-Ev cells ($P < 0.05$). Western blot and molecular docking results tentatively demonstrated that Streptochlorin might exert antioxidant effects through Keap1-Nrf2 signaling pathway and promote the gene expression of downstream molecules heme oxygenase 1 (HO-1), NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1), catalase (CAT), and glutathione-S-transferase (GST) ($P < 0.05$). [Conclusions] Streptochlorin had significant protective effects on oxidative stress and inflammatory responses of EpH4-Ev cells induced by *S. aureus* infection, which might be associated with Keap1-Nrf2 pathway activation.

Keywords: marine *Streptomyces* sp.; Streptochlorin; *Staphylococcus aureus*; oxidative stress; Keap1-Nrf2

海洋是地球生命的起源,占地球面积 70% 的海洋生态系统孕育了 60% 的生物,蕴藏着丰富多样的自然资源。海洋中高压、高盐和低温的特殊生境导致海洋微生物具有区别于陆地微生物的独特代谢途径和防御系统,也产生了大量活性高的次级代谢产物。从海洋微生物中寻找新的活性化合物已成为现代天然产物研究的重要组成部分^[1-3]。其中,海洋放线菌作为海洋微生物的主要成员之一,被认为是海洋衍生天然产物的重要生产者^[4-5],约 70% 的抗生素来自海洋放线菌,如红霉素、万古霉素等^[6]。与海洋放线菌相比,对海洋链球菌及其次级代谢产物的研究较少,研究空间更大。Streptochlorin 是一种小分子吡啶生物碱,1988 年由 Watanabe 在海洋链霉菌次级代谢产物中发现,后被鉴定为 4-氯-5-(3'-吡啶基)-恶唑^[7]。Streptochlorin 具有多种生物学活性,如抗血管生成^[8]、抗菌^[9-10]、抗肿瘤^[11-12],但其抗氧化作用尚未见报道。

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是一种常见的人畜共患病原菌,可引发各种传染病,如皮肤及软组织感染、肺炎及菌血症等^[13]。*S. aureus* 感染与乙型病毒性肝炎、艾滋病共同被视为当今世界三大传染病^[14]。畜牧生产中,*S. aureus* 也是诱发奶牛乳腺炎的主要原因,可通过多种媒介传播^[15]。抗生素仍是治疗 *S. aureus* 感染的主要手段,但治愈效果差。此外,在中性粒细胞的吞噬作用下,*S. aureus* 仍具有很强的生存能力,导致胞内持续感染和氧化损伤^[16]。活性氧 (ROS)、活性氮 (RNS) 和炎症因子的过度分泌会诱发氧化应激,损害细胞功能^[17]。奶牛乳腺代谢强度高,一旦感染病原微生物,会产生大量 ROS,同时其自身的抗氧化能力容易被抑制,是遭受氧化损伤最严重的器官之一。降低感染时的氧化应激水平是治疗奶牛乳腺炎的有效措施之一^[18-20]。

机体在应对各种应激时会不断进化自身的防御系统,其中 KELCH 样 ECH 关联蛋白 1 (KELCH like ECH associated protein 1, Keap1)-核因子红细胞系 2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 途径是对机体抵抗氧化应激最重要防御系统之一。在正常条件下,Nrf2 被 Keap1 持续泛素化后通过泛素-蛋白酶体途径降解^[21],但在 ROS 或亲电试剂存在下,Keap1 中的半胱氨酸残基被共价修饰引起其构象改变,Nrf2 进入细胞核并诱导下游靶基因的表达。因此,本试验探讨 Streptochlorin 是否对 *S. aureus* 感染小鼠乳腺上皮细胞具有抗氧化活性及具体机制,为 *S. aureus* 感染提供潜在的治疗策略。

1 材料与方法

1.1 试验材料

小鼠乳腺上皮细胞 (Eph4-Ev) 与金黄色葡萄球菌 (ATCC 29213) 均购自 ATCC; Streptochlorin 由本课题组提供; CCK-8 试剂盒购于南京凯基生物有限公司; ROS 荧光探针、BCA 试剂盒、RIPA 裂解缓冲液、蛋白上样缓冲液购于南京碧云天生物公司; Tubulin、血红素氧合酶 1 (HO-1)、Keap1 抗体购于南京巴微得生物科技有限公司; Nrf2 抗体及二抗购于 CST 公司; T-AOC、MDA、NAGase、乳酸脱氢酶 (LDH) 检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所; 相关引物由南京擎科生物科技有限公司合成; PrimeScript RT Master Mix、TB Green™ Premix Ex Taq 酶购自湖南艾科瑞生物有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 细菌培养及生长曲线测定 将 *S. aureus* 按 1:100 (体积比) 的比例接种于灭菌的 LB 培养基中,在 37 °C、180 r·min⁻¹ 的恒温培养箱中培养至对数生长期 ($D_{600} = 0.6$)。将 *S. aureus* 接种于含有 Streptochlorin (终浓度 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 LB 培养基中培养,并分别在 3、6、9、12、15、18、24 h 测量 D_{600} ,绘制生长曲线。

1.2.2 细胞培养及处理 采用含 10% (体积分数) 胎牛血清 DMEM 培养液培养小鼠乳腺上皮细胞系 EpH4-Ev 细胞 (37 °C、5% CO₂)。试验共分为 4 组,分别为空白对照组、Streptochlorin 处理组、*S. aureus* 感染组、Streptochlorin 处理后 *S. aureus* 感染组。将 EpH4-Ev 细胞传代至 6 孔板中培养,待其生长至 80% 融合时,感染组先加入 20 μmol·L⁻¹ Streptochlorin 培养 2 h,接入 *S. aureus*,轻轻混匀后共孵育 4 h;对照组则加入等量 PBS。结束后按照试验所需进行相应细胞样品收集。

1.2.3 蛋白提取及电泳 取处理后细胞,PBS 清洗 3 次后加入 RIPA 裂解液与苯甲磺酰氟 PMSF 裂解细胞,将细胞刮下收集至 EP 管中,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后收集上清液。BCA 法测定蛋白浓度,加入上样缓冲液并充分混匀,煮沸后待用。将预染蛋白标准品和样品加入 SDS-PAGE 胶孔里,80 V 电泳至浓缩胶与分离胶分界线,调节电压至 120 V,继续电泳至凝胶下部;100 V 湿法转膜 90 min,加 50 g·L⁻¹ BSA 室温封闭 2 h 后加入一抗 (1:1 000),4 °C 孵育过夜;TBST 洗涤 3 次后加入稀释 (1:10 000) 的二抗,室温孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次后置于发光成像系统拍照并用 Image J 软件扫描并统计分析。

1.2.4 RT-PCR 检测细胞炎性因子和抗氧化基因相对表达水平 取处理后细胞,用通用型 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,反转录为 cDNA 后按照预混型 TB GreenTM Premix Ex Taq 试剂盒检测相关基因 mRNA 的表达,使用 2^{-ΔΔC_T} 法计算各目的基因的相对表达水平^[22]。引物序列见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primers sequences for RT-PCR

基因 Gene	引物对序列 Primer pairs sequences (5'→3')	登录号 Accession No.	产物大小/bp Product size
<i>β-actin</i>	GTCCTCACCTCCCAAAG/GCTGCCTCAACACCTCAACCC	NM_007393	266
<i>IL-1β</i>	AACCTGCTGGTGTGTGACGTTTC/GAGCAGGAGGCTTTTTTGTGTGT	NM_008361.4	78
<i>IL-6</i>	TGGAGTACAGAAAGGAGTGGCTAAG/TCTGACCACAGTGAGGAATGTCCAC	NM_001314054.1	155
<i>TNF-α</i>	CATCTTTCTCAAAATTCGAGTGACAA/TGGGAGTAGACAAGGTAGAACCC	NM_013693.3	176
<i>HO-1</i>	CACTCTGGAGATGACACCTGAG/GTGTTCCTCTGTGACATCACC	NM_010442.2	115
<i>NQO1</i>	GCCGAACACAAGAAGCTGGAAG/GGCAAATCTGCTACGAGCACT	NM_008706.5	120
<i>CAT</i>	CCGTCCCTGCTGTCTCA/ATTGGGTCCCGCCTC	NM_009804.2	156
<i>GST</i>	CCCCACTGGAGTAACAAG/GGAAGAGGGTGAGGAGAT	NM_010358.5	182

1.2.5 胞内活性氧水平测定 2,7-二氯荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 探针本身无荧光,但可跨膜进入细胞内被酯酶水解生成 DCFH,而 DCFH 不可透膜,导致胞内积聚。细胞内的 ROS 能够氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 2,7-二氯荧光素 (DCF)。绿色荧光强度与活性氧的水平成正比。观察胞内 ROS 时,取处理后细胞,PBS 清洗 3 次后加入终浓度为 10 μmol·L⁻¹ 的 DCFH-DA 探针,37 °C 恒温培养箱中孵育 20 min,弃上清液后 PBS 清洗 3 次,加 1 mL PBS 于 6 孔板中,在倒置荧光下观察并拍照。观察细胞形态时,PBS 清洗 3 次,直接在倒置荧光下观察并拍照。

1.2.6 细胞损伤和氧化应激相关生化指标测定 取处理后的细胞,按照试剂盒说明书完成相关生化指标的测定。

1.2.7 Streptochlorin 与 Keap1 分子对接 对接使用的蛋白晶体结构 Keap1 通过 Uniprot 数据库 (Uniprot ID: Q9Z2X8,选择 AlphaFold 预测的全长结构) 获得;同时使用 AVOGADR 1.2.0 的 MMFF94 力场将小分子 Streptochlorin 的 3D 结构进行能量最小化处理。采用 AutoDock Vina 1.1.2 软件进行分子对接,在对接开始之前,使用 PyMol 学术开源版对所有受体蛋白进行加氢处理,再使用 ADFRsuite 1.0 将所有处理好的小分子以及受体蛋白转换为对接必需的 PDBQT 格式。对接前,以蛋白的质心为盒子中心,调整合适的 X、Y、Z 边长构建盒子并使其充分包裹整个蛋白。对接时,将网格盒子以及处理好的蛋白和小分子的 PDBQT 文件作为输入文件,使用 AutoDock Vina 1.1.2 进行对接。对接全局搜索的详尽度设为 32,其余参数保持默认设置。最后,输出打分最高的对接构象被认为是结合构象,使用 PyMol 学术开源版对对接结果进行可视化分析。

1.3 数据处理与分析

采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,采用单因素方差 (one-way ANOVA) 分析和差异显著性检验,通过 Graph Pad Prism 8.0 软件绘图。数据结果表示为平均值±标准误 ($\bar{x} \pm SE$)。

2 结果与分析

2.1 Streptochlorin 对 EpH4-Ev 细胞和金黄色葡萄球菌活性的影响

如图 1 所示,40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Streptochlorin 对 EpH4-Ev 细胞的生长具有明显的毒性作用($P<0.01$),但是对 *S. aureus* 的生长无影响,因此,本试验选择 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Streptochlorin 进行后续试验。

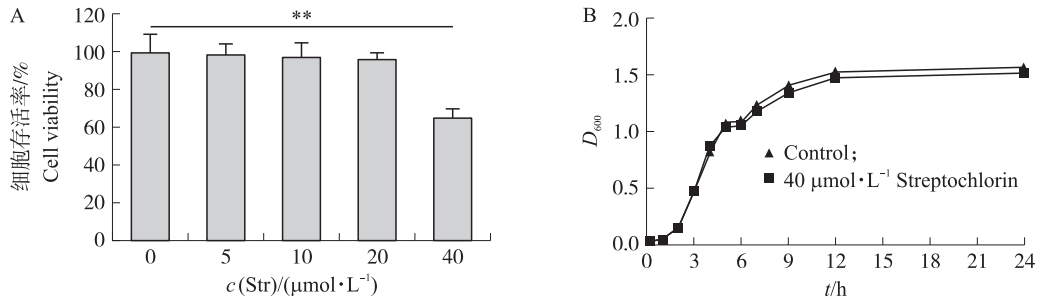


图 1 Streptochlorin (Str) 对 EpH4-Ev 细胞存活率 (A) 和金黄色葡萄球菌生长 (B) 的影响

Fig. 1 Effect of Streptochlorin (Str) on EpH4-Ev cells viability (A) and *Staphylococcus aureus* growth (B)

** $P<0.01$.

2.2 Streptochlorin 对金黄色葡萄球菌诱导的 EpH4-Ev 细胞损伤的保护作用

如图 2 所示:与感染组相比,Streptochlorin 预处理可以显著降低细胞上清中乳酸脱氢酶 (LDH) 和 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶 (NAGase) 活性($P<0.05$)。此外,通常情况下,EpH4-Ev 细胞排列整齐、边界清晰,呈典型的多边形,*S. aureus* 感染后细胞出现排列紊乱、变圆、皱缩等典型形态改变,而 Streptochlorin 预处理 2 h 后显著改善,表明 Streptochlorin 可以缓解 *S. aureus* 感染造成的细胞损伤。

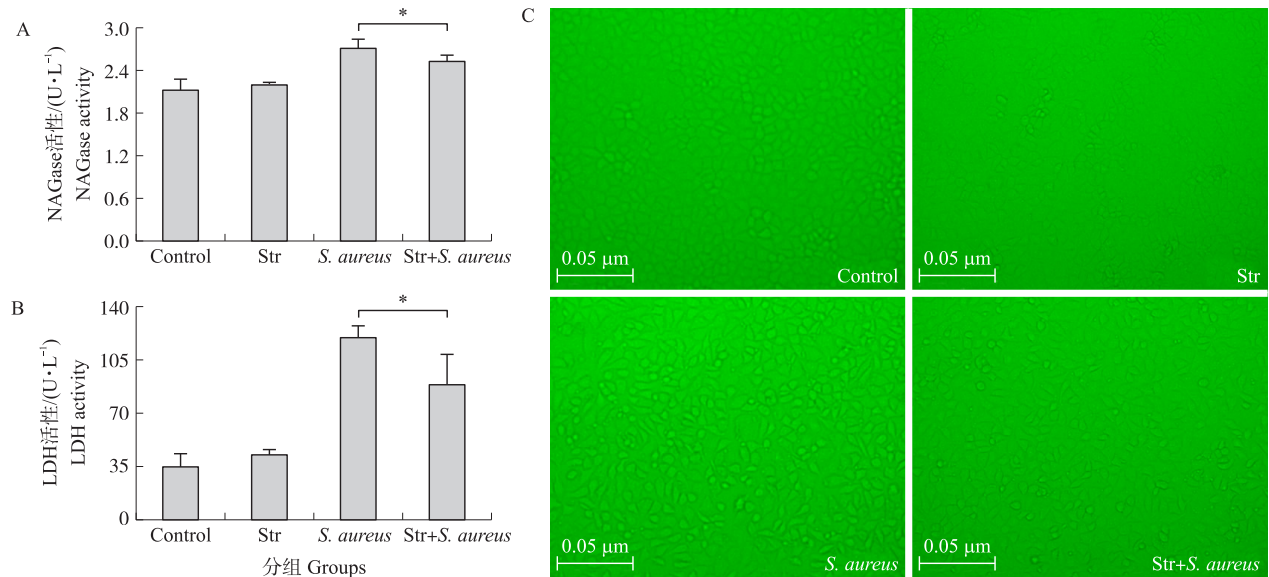


图 2 Streptochlorin (Str) 对金黄色葡萄球菌感染引起的 EpH4-Ev 细胞损伤的保护作用

Fig. 2 Protective effect of Streptochlorin (Str) in *S. aureus* induced cell damage in EpH4-Ev cells

A. NAGase 活性 The activity of NAGase; B. LDH 活性 The activity of LDH; C. 细胞形态 Cell morphology. * $P<0.05$. The same as follows.

2.3 Streptochlorin 对金黄色葡萄球菌诱导的 EpH4-Ev 细胞炎症反应的保护作用

如图 3 所示:*S. aureus* 感染后肿瘤坏死因子 ($TNF-\alpha$)、白细胞介素 1β ($IL-1\beta$) 及白细胞介素 6 ($IL-6$) 基因表达水平显著升高($P<0.05$),而与感染组相比,Streptochlorin 预处理 2 h 显著降低细胞中上述基因的表达水平($P<0.05$),表明 Streptochlorin 可以一定程度上缓解 *S. aureus* 感染诱发的炎症反应。

2.4 Streptochlorin 对金黄色葡萄球菌诱导的 EpH4-Ev 细胞抗氧化作用的影响

如图 4 所示:与感染组相比,Streptochlorin 预处理 2 h 显著提高细胞内总抗氧化能力 (T-AOC) 水平并降低丙二醛 (MDA) 水平($P<0.05$)。进一步观察发现,Streptochlorin 预处理后绿色荧光强度明显降低,说明 Streptochlorin 可显著降低胞内 ROS 水平。此外,内源性抗氧化分子如血红素氧合酶 1 (HO-1)、NADPH

醌氧化还原酶 1(NQO1)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、过氧化氢酶(CAT)mRNA 表达水平都在 Streptochlorin 预处理后增加($P<0.05$),表明 Streptochlorin 可以一定程度上缓解 *S. aureus* 感染诱发的氧化应激。

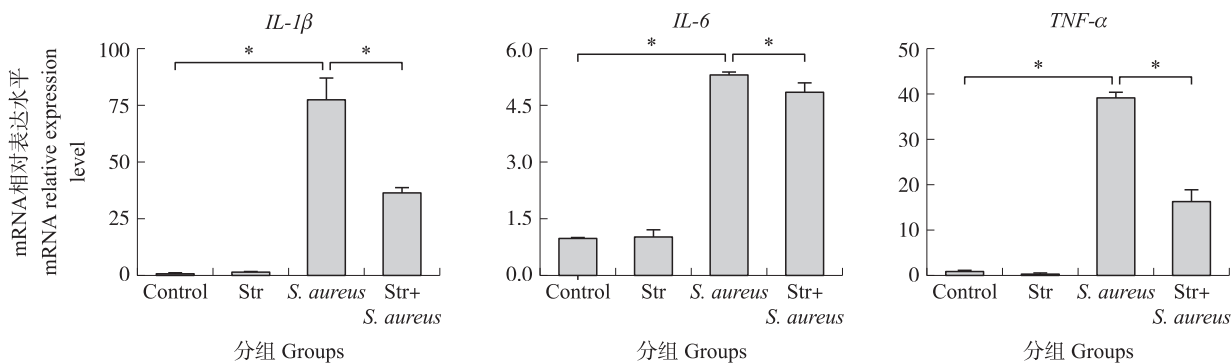


图 3 Streptochlorin(Str)对金黄色葡萄球菌诱导的 EpH4-Ev 细胞炎症因子基因表达的影响

Fig. 3 Effect of Streptochlorin(Str) on the expression of *S. aureus* induced inflammatory factors in EpH4-Ev cells

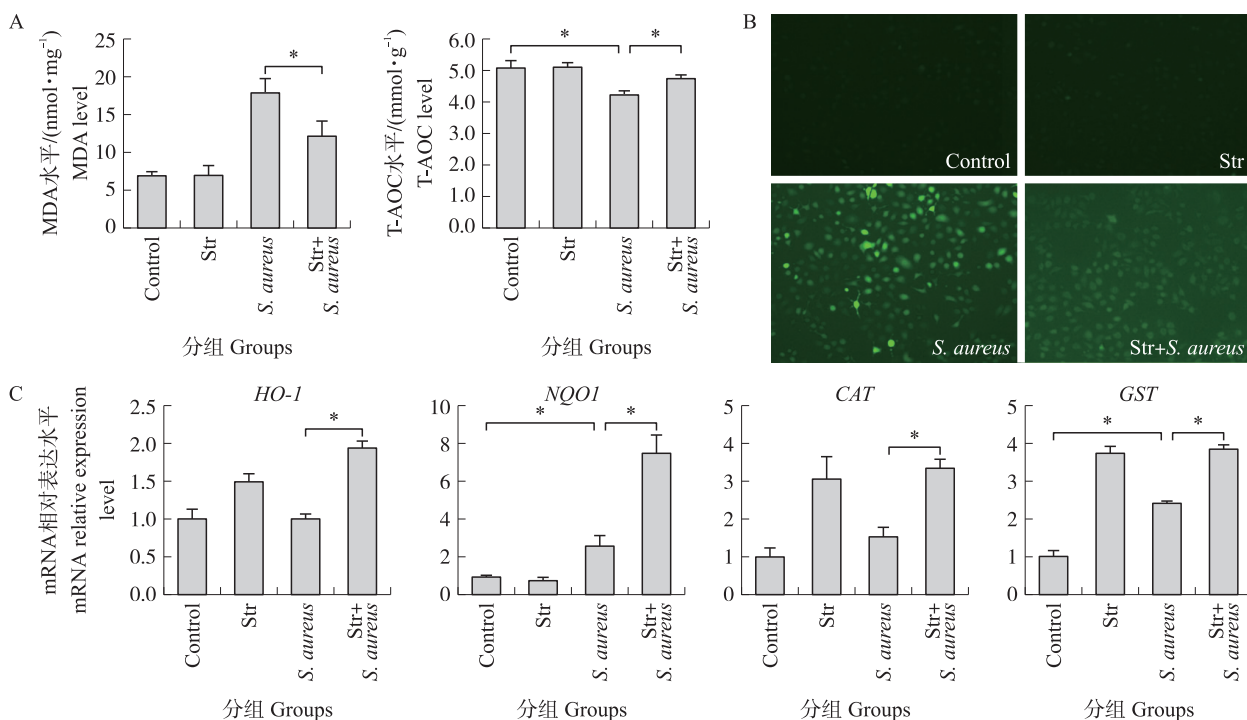


图 4 Streptochlorin(Str)对金黄色葡萄球菌诱导的 EpH4-Ev 细胞抗氧化指标的影响

Fig. 4 The effect of Streptochlorin(Str) on antioxidant indicators of EpH4-Ev cells induced by *S. aureus*

A. MDA 和 T-AOC 水平 The level of MDA and T-AOC; B. ROS 荧光强度 Fluorescence intensity of ROS; C. 抗氧化相关基因相对表达水平 mRNA relative expression level of antioxidant related genes.

2.5 Streptochlorin 对金黄色葡萄球菌诱导的 EpH4-Ev 细胞中 Keap1-Nrf2 通路的影响

通过 AutoDock Vina 1.1.2 软件对小分子 Streptochlorin 与 Keap1 蛋白进行对接。结果表明,小分子 Streptochlorin 与 Keap1 蛋白的结合亲和力为 $-30.54 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ (小于 $-20.92 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$),表明 Streptochlorin 与 Keap1 蛋白具备较为理想的潜在活性效果。

进一步分析它们之间的结合方式(相互作用力),结果如图 5 所示。小分子 Streptochlorin 结合在 Keap1 蛋白上由 Leu³⁶⁵、Val⁶⁰⁴、Arg⁴¹⁵、Gly⁴⁶²、Gly³⁶⁴、Val⁴⁶³、Ile⁴¹⁶、Gly⁴¹⁷、Ala³⁶⁶、Val⁴⁶⁵、Val⁴¹⁸氨基酸围绕而成的“口袋”结构当中,其中与 Leu³⁶⁵、Val⁶⁰⁴形成氢键作用,与 Arg⁴¹⁵、Gly⁴⁶²、Gly³⁶⁴、Val⁴⁶³、Ile⁴¹⁶、Gly⁴¹⁷、Ala³⁶⁶、Val⁴⁶⁵、Val⁴¹⁸形成疏水作用。综上所述,Keap1 蛋白与小分子 Streptochlorin 的主要作用为氢键和疏水作用,该作用可能是 Streptochlorin 分子对 Keap1 蛋白发生互作的主要作用类型。

蛋白检测结果如图 6 所示。与对照组相比,在 Streptochlorin 处理后,p-Nrf2、HO-1 蛋白的表达水平增加,而 Keap1 蛋白表达水平减少($P<0.05$)。表明,Streptochlorin 激活了 EpH4-Ev 细胞中的 Keap1-Nrf2 信

号通路,缓解了 *S. aureus* 感染造成的氧化应激。

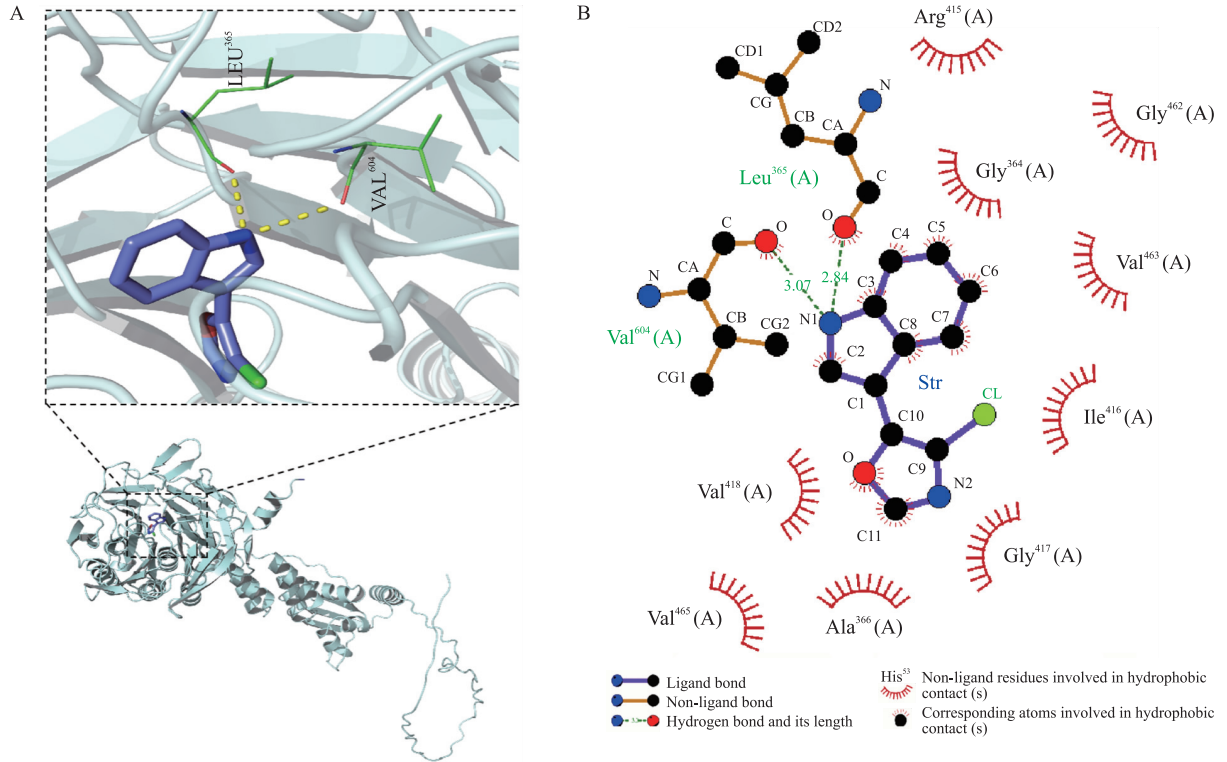


图 5 Keap1-Streptochlorin 复合物的三维图(A)与局部结合二维图(B)

Fig. 5 Global(A) and local binding views(B) of the Keap1-Streptochlorin complex

A. 黄色虚线代表氢键,绿线代表与 Streptochlorin 形成氢键的氨基酸,底图代表 Keap1 蛋白,紫色棒式结构代表 Streptochlorin。Yellow dotted line represents hydrogen bond,the green line represents the amino acid that forms hydrogen bonds with Streptochlorin,the cartoon represents the Keap1 protein,and the purple stick represents the Streptochlorin molecule. B. Keap1-Streptochlorin 二维相互作用图。2D interaction map of of the Keap1-Streptochlorin complex.

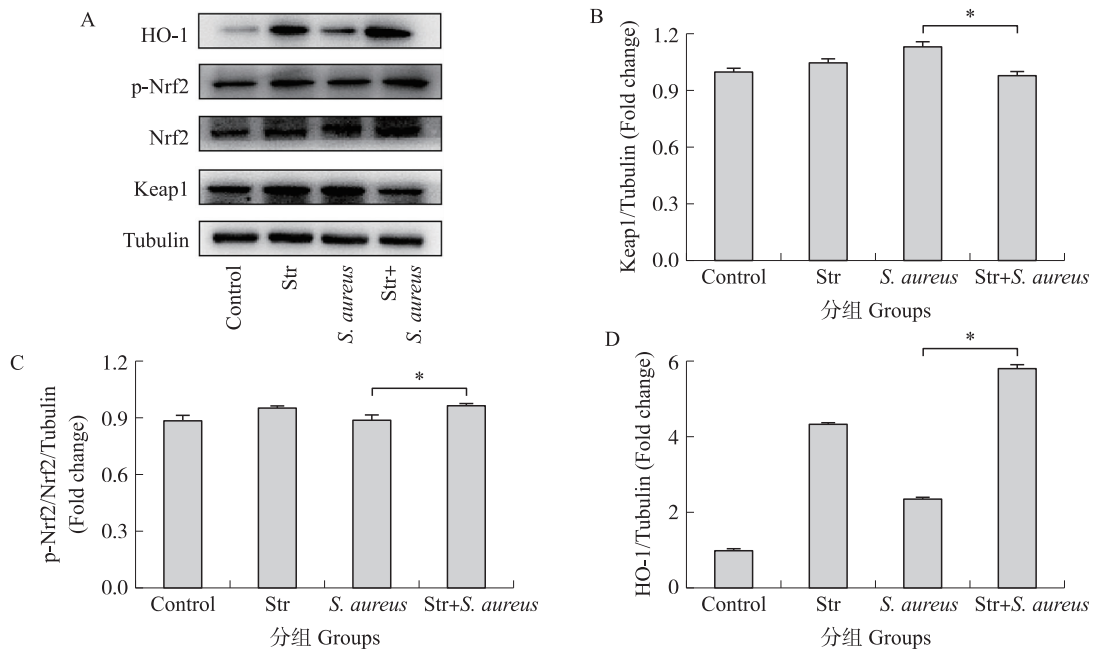


图 6 Streptochlorin(Str)对金黄色葡萄球菌诱导的 EpH4-Ev 细胞中 Keap1-Nrf2 通路蛋白表达水平的影响

Fig. 6 The effect of Streptochlorin(Str) on the expression level of Keap1-Nrf2 pathway protein in *S. aureus* induced EpH4 Ev cells

A. 蛋白的免疫印迹分析 Immunoblot analysis of HO-1,p-Nrf2 and Keap1 proteins. B-D. 蛋白表达的统计分析 Statistical analysis of Keap1,p-Nrf2 and HO-1 protein.

3 讨论

奶牛乳腺炎被列为危害奶牛养殖四大疾病之首,发病率高、治愈率低,轻则导致产奶量和奶品质下降,重则导致奶牛死亡,给奶牛业造成严重经济损失。*S. aureus* 是奶牛乳腺炎的常见病原菌之一,其抗原性弱、耐药菌株多,难治愈、易复发,极大增加了治疗难度。目前,天然产物尤其是微生物次级代谢产物,仍然是新化学实体药物的重要来源^[2]。全世界使用的药物中,半数以上是来源于天然产物,其余绝大多数是以天然化合物为先导物,经结构修饰后成为合成药物,而相较于陆地动、植物和微生物次级代谢产物衍生的药物,海洋衍生的药物仍然属于较新领域。Streptochlorin 属于海洋链球菌次级代谢产物,体内外研究证实其可通过调节 Lyn/Fyn 和 Syk 信号通路抑制过敏性皮炎和肥大细胞活化,并可在体外抑制 NF- κ B 活化及抑制血管生成^[23]。此外,Streptochlorin 的一种新衍生物 5-羟基-2'-异丁-Streptochlorin 也可以通过调节 TRIF 依赖性信号传导和炎症小体活化抑制炎症反应^[24]。相反,很少有研究关注 Streptochlorin 的抗氧化作用。

乳腺作为奶牛机体最大的外开放性腺,易受病原菌侵袭,而氧化应激是不同病原菌感染后共同的病理生理特征,降低氧化应激水平是乳腺炎防治过程中行之有效的干预措施^[25]。乳腺上皮细胞是乳腺组织的主要组成部分,具有完整的先天免疫相关的识别和效应系统,且其数量众多,合力不可忽视^[26-27]。LDH 和 NAGase 广泛存在机体多个组织和细胞中,当机体或细胞受到损伤时,会被分泌至胞外,因此可作为衡量细胞损伤严重程度的生物标志物^[28-29]。Streptochlorin 预处理可以显著降低 2 种损伤标志物的水平,与形态学观察结果一致。*S. aureus* 侵袭细胞会诱导促炎细胞因子的分泌,本试验检测了炎症细胞因子(IL-6、IL-1 β 、TNF- α) mRNA 水平上的变化,结果显示在 Streptochlorin 预处理后上述炎症因子的基因表达水平均显著下降。综上,Streptochlorin 可以有效缓解 *S. aureus* 引起的炎性损伤,与之前的研究相一致^[8]。

炎症和氧化应激密切相关,T-AOC 是指各种抗氧化物质和抗氧化酶等构成的总抗氧化水平,保护细胞和机体免于 ROS 等自由基造成的氧化应激损伤,直接衡量机体对自由基清除能力。自由基作用于脂质发生过氧化反应,氧化终产物为 MDA,间接反映组织过氧化损伤程度。同样,Streptochlorin 预处理可以明显降低胞内 ROS 水平和 MDA 水平,提高 T-AOC 能力,而大多数抗氧化小分子在基因表达水平也有类似的趋势,表明 Streptochlorin 可以有效缓解 *S. aureus* 引起的氧化应激。Keap1-Nrf2 途径的激活是最重要的细胞防御信号,生理状态下,Keap1 可通过泛素化降解 Nrf2。而当 ROS 产生和清除的平衡被破坏时,Keap1 会失活,最终导致 Nrf2 的过度积累和活化,然后 Nrf2 转位到细胞核中,调节抗氧化应激相关基因的表达^[30]。对接模拟技术是探究小分子与靶蛋白相互作用的有效手段之一。因此,本试验首先通过计算机辅助技术观察 Streptochlorin 是否能靶向 Keap1 蛋白,然后直接检测 Keap1 及其下游蛋白 p-Nrf2 和 HO-1 的表达量。结果发现,Streptochlorin 和 Keap1 蛋白具有结构相互作用的可能性,并可能作用于 Keap1 蛋白,导致下游蛋白 Nrf2 和 HO-1 的激活,但具体的机制仍需要更多研究证实。

综上所述,海洋链球菌次级代谢产物 Streptochlorin 对 *S. aureus* 感染具有强大的抗氧化作用,可能是通过激活的 Keap1-Nrf2 信号通路上调抗氧化基因表达,从而抑制 *S. aureus* 在 EpH4-Ev 细胞中引起的氧化应激。此外,Streptochlorin 作为先导化合物,对其进行新的结构修饰以提高其抗氧化能力具有重要意义^[31]。本试验为 Streptochlorin 或其类似物和衍生物在预防或辅助治疗复杂感染疾病中的应用提供了试验和理论基础。

参考文献 References:

- [1] Jiang L,Huang P,Ren B,et al. Antibacterial polyene-polyol macrolides and cyclic peptides from the marine-derived *Streptomyces* sp. MS110128[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2021,105(12):4975-4986.
- [2] Fenical W,Jensen P R. Developing a new resource for drug discovery;marine actinomycete bacteria[J]. Nature Chemical Biology,2006,2:666-673.
- [3] Lin S C,Lehman C W,Stewart A K,et al. Homoseongomycin,a compound isolated from marine actinomycete bacteria K3-1,is a potent inhibitor of encephalitic alphaviruses[J]. Antiviral Research,2021,191:105087.
- [4] 林真亭,叶子坚,庄玲萍,等. 一株海洋放线菌抗菌活性物质的分离与结构解析[J]. 江西农业大学学报,2017,39(3):559-566.
Lin Z T,Ye Z J,Zhuang L P,et al. Isolation and structure identification of the antimicrobial compounds from a marine actinomycetes strains[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis,2017,39(3):559-566(in Chinese with English abstract).

- [5] Jagannathan S V, Manemann E M, Rowe S E, et al. Marine actinomycetes, new sources of biotechnological products[J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(7):365.
- [6] Wang C, Du W S, Lu H Y, et al. A review: halogenated compounds from marine actinomycetes[J]. *Molecules*, 2021, 26(9):2754.
- [7] Choi I K, Shin H J, Lee H S, et al. Streptochlorin, a marine natural product, inhibits NF-kappaB activation and suppresses angiogenesis *in vitro*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 17(8):1338–1343.
- [8] Kroiss J, Kaltenpoth M, Schneider B, et al. Symbiotic streptomycetes provide antibiotic combination prophylaxis for wasp offspring[J]. *Nature Chemical Biology*, 2010, 6:261–263.
- [9] Zhang M Z, Chen Q, Xie C H, et al. Synthesis and antifungal activity of novel streptochlorin analogues[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, 92:776–783.
- [10] Kwak T W, Shin H J, Jeong Y I, et al. Anticancer activity of streptochlorin, a novel antineoplastic agent, in cholangiocarcinoma[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2015, 9:2201–2214.
- [11] Shim D W, Shin H J, Han J W, et al. Anti-inflammatory effect of Streptochlorin via TRIF-dependent signaling pathways in cellular and mouse models[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(4):6902–6910.
- [12] Kim T, Yi J, Hong K H, et al. Distribution of virulence genes in spa types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from patients in intensive care units[J]. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, 2011, 31(1):30–36.
- [13] Wang A H, Zhou K, Liu Y, et al. A potential role of transposon IS431 in the loss of *mecA* gene[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7:41237.
- [14] Zheng L H, Xu Y Y, Lu J Y, et al. Variant innate immune responses of mammary epithelial cells to challenge by *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and the regulating effect of taurine on these bioprocesses[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2016, 96:166–180.
- [15] Scali F, Camussone C, Calvino L F, et al. Which are important targets in development of *S. aureus* mastitis vaccine? [J]. *Research in Veterinary Science*, 2015, 100:88–99.
- [16] Li X C, Xie H, Zhan R C, et al. Effect of double bond position on 2-phenyl-benzofuran antioxidants: a comparative study of moracin C and Iso-moracin C[J]. *Molecules*, 2018, 23(4):754.
- [17] Zhou Y L, Lan R G, Xu Y Y, et al. Resveratrol alleviates oxidative stress caused by *Streptococcus uberis* infection via activating the Nrf2 signaling pathway[J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 89:107076.
- [18] Li M, Xi P P, Xu Y Y, et al. Taurine attenuates *Streptococcus uberis*-induced bovine mammary epithelial cells inflammation via phosphoinositides/ Ca^{2+} signaling[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10:1825.
- [19] Pan J, Sun Y, Jiang Y P, et al. TRIM21 ubiquitylates SQSTM1/p62 and suppresses protein sequestration to regulate redox homeostasis[J]. *Molecular Cell*, 2016, 61(5):720–733.
- [20] 杨明, 李可, 贾丽, 等. 丹皮酚对 LPS 诱导的奶牛乳腺上皮细胞炎症损伤的缓解作用[J]. *畜牧与兽医*, 2023, 55(4):50–55.
Yang M, Li K, Jia L, et al. Alleviation effect of paeonol on LPS-induced inflammatory injury in bovine mammary epithelial cells[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2023, 55(4):50–55 (in Chinese with English abstract).
- [21] Lee S H, Shin H J, Kim D Y, et al. Streptochlorin suppresses allergic dermatitis and mast cell activation via regulation of Lyn/Fyn and Syk signaling pathways in cellular and mouse models[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9):e74194.
- [22] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(9):e45.
- [23] Shim D W, Shin H J, Han J W, et al. A novel synthetic derivative of melatonin, 5-hydroxy-2'-isobutyl-streptochlorin (HIS), inhibits inflammatory responses via regulation of TRIF-dependent signaling and inflammasome activation[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2015, 284(2):227–235.
- [24] Puppel K, Kalińska A, Kot M, et al. The effect of *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. and Enterobacteriaceae on the development of whey protein levels and oxidative stress markers in cows with diagnosed mastitis[J]. *Animals*, 2020, 10(9):1591.
- [25] Ma C, Sun Z, Zeng B H, et al. Cow-to-mouse fecal transplantations suggest intestinal microbiome as one cause of mastitis[J]. *Microbiome*, 2018, 6(1):200.
- [26] Hu X Y, Guo J, Zhao C J, et al. The gut microbiota contributes to the development of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice[J]. *The ISME Journal*, 2020, 14:1897–1910.
- [27] Kopacz A, Kloska D, Forman H J, et al. Beyond repression of Nrf2: an update on Keap1[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2020, 157:63–74.
- [28] Drent M, Cobben N A, Henderson R F, et al. Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation[J]. *The European Respiratory Journal*, 1996, 9(8):1736–1742.
- [29] Pyörälä S, Pyörälä E. Accuracy of methods using somatic cell count and N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity in milk to assess the bacteriological cure of bovine clinical mastitis[J]. *Journal of Dairy Science*, 1997, 80(11):2820–2825.
- [30] Orrù C, Giordano S, Columbano A. Nrf2 in neoplastic and non-neoplastic liver diseases[J]. *Cancers*, 2020, 12(10):2932.
- [31] Gao Y, Huang D C, Liu C, et al. Streptochlorin analogues as potential antifungal agents: design, synthesis, antifungal activity and molecular docking study[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2021, 35:116073.