

引用:谢瑛琪,高双双,李婷,等.咖啡酸苯乙酯抑制肺炎克雷伯菌增殖及生物膜形成的分子机制研究[J].聊城大学学报(自然科学版),2026,39(4):603-613.

Citation:XIE Yingqi, GAO Shuangshuang, LI Ting, LI Zongze, XUAN Hongzhuan. Study on the molecular mechanism of caffeic acid phenethyl ester inhibiting the proliferation and biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of Liaocheng University (Natural Science Edition), 2026, 39(4):603-613.

文章编号 1672-6634(2026)04-0603-11

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2025120017

咖啡酸苯乙酯抑制肺炎克雷伯菌增殖及生物膜形成的分子机制研究

谢瑛琪,高双双,李婷,李宗泽,玄红专

(聊城大学 农业与生物学院,山东 聊城 252059)

摘要 探究咖啡酸苯乙酯(Caffeic acid phenethyl ester,CAPE)对肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)的抑菌活性,并阐明其抑制生物膜形成的分子机制。通过最小抑菌浓度(MIC)、最小杀菌浓度(MBC)及生长曲线分析 CAPE 对细菌增殖的影响。利用结晶紫染色、黏附量测定及激光共聚焦成像分析 CAPE 对细菌生物膜形成和结构的干扰,并对胞外 DNA 与蛋白质的渗漏情况以及胞外多糖含量的变化进行了测定。进一步利用 RT-qPCR 分析生物膜形成基因、黏附基因及毒力基因的表达水平变化。结果显示,CAPE 对 *K. pneumoniae* 的 MIC 和 MBC 分别为 0.312 5 mmol/L 和 0.625 0 mmol/L,可显著抑制细菌增殖。在 2 MIC 浓度下,CAPE 可有效清除成熟生物膜,其清除率可达到 50.18%,同时细菌黏附和胞外多糖含量分别下降 73.3%和 46.2%,并诱导胞外 DNA 和蛋白质大量渗漏。RT-qPCR 结果表明,多个生物膜形成相关基因的表达均显著下调。综上,CAPE 对 *K. pneumoniae* 具有显著的抗菌活性,可通过破坏细胞膜完整性、抑制生物膜形成及调控毒力基因实现多重抗菌作用,为其作为潜在抗 *K. pneumoniae* 的天然药物提供了理论依据。

关键词 咖啡酸苯乙酯;肺炎克雷伯菌;抑菌活性;生物膜形成;分子机制

中图分类号 Q939.99

文献标志码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Study on the molecular mechanism of caffeic acid phenethyl ester inhibiting the proliferation and biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae*

XIE Yingqi, GAO Shuangshuang, LI Ting,
LI Zongze, XUAN Hongzhuan

(College of Agriculture and Biology, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract This study investigated the antibacterial activity of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against *Klebsiella pneumoniae* and explored its molecular mechanisms in inhibiting biofilm formation. The effects

收稿日期:2025-12-22

基金项目:泰山学者青年人工计划项目(tsqn202211172);山东省蜂产业技术体系产品加工与质量控制岗位(SDAIT-24-05)资助

通信作者:玄红专,女,汉族,博士,教授,山东省泰山学者青年专家,研究方向:蜂产品功效评价与质量控制,E-mail: hongzhuan-nxuan@163.com。

of CAPE on bacterial growth were evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and growth curves. Crystal violet staining, adhesion assays, and confocal laser scanning microscopy were used to assess the effects of CAPE on biofilm formation and structure. In addition, leakage of extracellular DNA and proteins, as well as changes in exopolysaccharides content, were quantitatively analyzed. RT-qPCR was performed to determine the expression levels of genes associated with biofilm formation, adhesion, and virulence. The results showed that the MIC and MBC of CAPE against *K. pneumoniae* were 0.312 5 mmol/L and 0.625 0 mmol/L, respectively, and that CAPE significantly inhibited bacterial growth. At 2 MIC, CAPE effectively removed mature biofilms, achieving a removal rate of 50.18%. Meanwhile, bacterial adhesion and exopolysaccharides content were reduced by 73.3% and 46.2%, respectively, and CAPE induced substantial leakage of extracellular DNA and proteins. RT-qPCR analysis further revealed significant downregulation of multiple genes related to biofilm formation. In conclusion, CAPE exhibits potent antibacterial activity against *K. pneumoniae* by impairing membrane integrity, inhibiting biofilm formation, and modulating the expression of virulence-related genes, supporting its potential as a natural antimicrobial agent.

Keywords caffeic acid phenethyl ester; *Klebsiella pneumoniae*; antibacterial activity; biofilm formation; molecular mechanisms

0 引言

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)是临床上常见的机会性致病菌,可引起呼吸道、泌尿系统及血流等多种感染。根据其毒力特征,该菌可分为经典型和高毒力型两类,其中高毒力型菌株通过高表达荚膜多糖、铁载体等毒力因子,通常会导致更严重的组织侵袭和不良临床表现^[1]。近年来,随着抗菌药物的广泛应用,肺炎克雷伯菌的耐药问题日益严峻,尤其在呼吸机相关性肺炎中,其检出率持续升高,多重耐药菌株的流行显著增加了临床治疗难度,导致患者病死率和并发症发生率明显上升^[2]。因此,筛选针对耐药肺炎克雷伯菌的有效治疗药物,已成为当前临床与科研领域亟待解决的关键问题。

当前,肺炎克雷伯菌的临床一线治疗主要依赖 β -内酰胺类、碳青霉烯类及氨基糖苷类等抗菌药物。然而,随着产超广谱 β -内酰胺酶及碳青霉烯酶菌株的流行,尤其是多重耐药与高毒力特征在部分菌株中的共存,使得传统抗菌药物的疗效日趋局限,可选择的治疗手段日益减少。面对此类菌株感染,临床常被迫使用多粘菌素、替加环素等毒性较大的药物,或尝试效果不确定的联合用药方案,导致患者治疗失败、病程延长及死亡风险显著增加^[3-4]。因此,开发具有新作用机制或能够克服现有耐药性的新型抗菌或抗毒力策略,已成为迫切的临床需求。

咖啡酸苯乙酯(Caffeic acid phenethyl ester, CAPE)作为一种天然咖啡酸衍生物,是蜂胶的主要活性成分之一。其分子内含有的儿茶酚结构被认为是多种生物活性的关键结构基础^[5]。研究表明,CAPE不仅具有广谱抗菌作用,还兼具抗氧化、抗炎、抗肿瘤及免疫调节等多种药理活性,在医药研究领域受到广泛关注^[6-7]。

越来越多研究发现,CAPE对多种革兰氏阳性菌(如金黄色葡萄球菌、粪肠球菌)、革兰氏阴性菌(如大肠杆菌)、真菌(如白色念珠菌)及植物病原菌具有显著抑制作用^[8-12]。而且,CAPE可能的作用靶点包括RNA、DNA和细胞蛋白,可通过干扰生物膜形成、抑制胞外多糖分泌等途径削弱病原菌的致病力^[13-15]。更重要的是,CAPE在对抗多重耐药菌株方面也表现出潜在优势,为开发高效、低毒的新型天然抗菌剂提供了新的策略。

然而,目前关于CAPE对肺炎克雷伯菌的抑制功效及作用机制尚缺乏系统研究,这在一定程度上制约了其临床应用潜力。因此,系统阐明CAPE对肺炎克雷伯菌的抗菌作用及分子机制,不仅有助于丰富天然抗菌剂的研究,也为应对耐药菌感染提供了重要科学依据。基于此,本研究旨在系统评估CAPE对肺炎克雷伯菌的体外抗菌活性,进一步探讨其对细菌生物膜形成的抑制作用,并分析其对关键毒力基因表达的调控

机制,以期为 CAPE 在肺炎克雷伯菌感染防控中的应用提供实验依据和理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

咖啡酸苯乙酯(纯度不小于 98%,上海源叶生物科技有限公司);肺炎克雷伯菌(编号:ATCC 13883,广东省微生物菌种保藏中心);树脂天青(刃天青钠,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);胰酪胨大豆肉汤(TSB)(山东西亚化学有限公司);结晶紫(CV)(上海麦克林生化科技股份有限公司);LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit(美国 Thermo Fisher 公司)。

1.2 仪器

FV1200 激光扫描共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司);NanoDrop 微量分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司);EPOCH2 全波长酶标仪(美国 BIOTEK 公司);日立 S-4800 扫描电子显微镜(日本 Hitachi 公司);CFX96™ Real-Time PCR 仪(美国 BIO RAD 公司)

1.3 方法

1.3.1 *K. pneumoniae* 菌液制备。无菌条件下,取 *K. pneumoniae* 冻干粉,用 200 μ L TSB 培养基复溶后,均匀涂布于 TSB 琼脂平板,并置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 24 h。挑取形态均一的单个菌落,接种至 TSB 培养基中,于 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 恒温摇床中振荡培养 24 h 以活化菌株。取 100 μ L 活化菌液转接至 20 mL TSB 培养基中,在相同条件下继续培养 24 h,培养结束后将菌液储存于 4 $^{\circ}$ C 暂存备用。

1.3.2 最小抑菌浓度(MIC)的测定。采用刃天青微量稀释法^[16]测定 CAPE 对 *K. pneumoniae* 的 MIC 值。取 1.3.1 获得的菌液,加入 TSB 培养基制备浓度为 1×10^7 CFU/mL 的菌悬液。CAPE 以二甲基亚砜(DMSO)溶解制备母液,且工作液中 DMSO 终浓度均小于 0.1%。采用二倍稀释法配置终浓度梯度为 0.078 1 ~ 10 mmol/L 的 CAPE 溶液,将 CAPE 与菌悬液加入 96 孔板,使每孔菌液终浓度为 5×10^6 CFU/mL,置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 24 h。随后,每孔加入 20 μ L 浓度为 0.1 mg/mL 的刃天青钠染液,避光条件下 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h。实验设置 3 组对照:空白对照组(仅含 TSB 培养基)、阴性对照组(含菌悬液与 TSB 培养基,不含 CAPE)、阳性对照组(含菌悬液、TSB 培养基及终浓度为 10 μ g/mL 的庆大霉素)。本实验中 MIC 指阻止菌液由紫色变为粉色的最低 CAPE 浓度,阳性对照主要用于验证实验体系的有效性和稳定性,并作为 MIC 判定的质量控制标准。

1.3.3 最小杀菌浓度(MBC)的测定。采用 TSB 琼脂稀释法测定 MBC。在完成 MIC 测定后,取 MIC 各实验孔中的菌悬液点涂于 TSB 琼脂平板上。将平板置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 24 h,观察平板上菌落生长情况。本实验中 MBC 指平板上无菌落形成或菌落数量减少不小于 99.9% 的最低 CAPE 浓度。

1.3.4 生长曲线的测定。取 1.3.1 的菌液加入 TSB 培养基制备浓度为 1×10^7 CFU/mL 的菌悬液。向菌悬液中加入不同体积 CAPE 母液,使其终浓度分别为 1/2 MIC、MIC、2 MIC,且反应体系均为 5 mL, DMSO 终浓度均小于 0.1%。置于 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床中培养 24 h,培养期间,每隔 2 或 4 h 取样 1 次,每次吸取 100 μ L 菌液在波长 600 nm 处测定吸光值(OD_{600})。对照组不含 CAPE 溶液,其他成分与处理组相同。

1.3.5 结晶紫半定量黏附实验。取 1.3.1 的菌液用含 1% 蔗糖的 TSB 培养基调整菌液浓度至 1×10^7 CFU/mL 以制备菌悬液。96 孔培养板每孔加入 200 μ L 菌悬液,置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中孵育 24 h,以促进细菌在孔底表面黏附并形成生物膜。孵育结束后,弃去各孔上清液,分别向孔中加入含不同浓度 CAPE(1/2 MIC、MIC、2 MIC)的 1% 蔗糖 TSB 培养基 200 μ L,相同条件下继续培养 24 h。设置阴性对照组仅含菌悬液与 1% 蔗糖 TSB 培养基。随后弃去各孔上清液,用无菌磷酸盐缓冲液(pH 7.4)轻轻洗涤 3 次以去除未黏附的浮游细菌,室温自然风干。每孔加入 150 μ L 甲醇固定 15 min,弃去甲醇后再次室温晾干。加入 150 μ L 0.1% (m/v) 结晶紫染液,室温避光染色 15 min。弃去染液后,用生理盐水反复冲洗至洗液无色,室温晾干。每孔加入 150 μ L 95% 乙醇,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 以充分溶解结合的结晶紫染料。采用酶标仪在 590 nm 波长下测定吸光度(OD_{590}),以 OD 值反映细菌黏附量及生物膜量^[17]。

1.3.6 胞外 DNA(extracellular DNA, eDNA)、蛋白质及胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)含量的测定。

(1) 胞外 DNA 与蛋白质含量测定。取 1.3.1 的菌液用 TSB 培养基调整浓度至 1×10^7 CFU/mL, 收集对数生长期菌悬液。取 500 μ L 菌悬液接种至 TSB 培养基中, 加入不同体积 CAPE 母液, 使其终浓度分别为 1/2 MIC、MIC、2 MIC。阴性对照组仅含菌悬液与 TSB 培养基, 不含 CAPE。置于 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 恒温摇床中振荡培养 24 h 后, 于 4 $^{\circ}$ C、12 000 g 条件下离心 30 min, 收集上清液。并测定上清液在 260 nm(OD_{260})和 280 nm(OD_{280})波长处的吸光值, 其中 OD_{260} 值反映胞外 DNA 释放量, OD_{280} 值反映胞外蛋白质释放量^[18], 间接评估 CAPE 对细菌细胞膜完整性的影响。(2) 胞外多糖含量测定。采用苯酚-硫酸法测定 EPS 含量^[19], 实验分组及菌液预处理同上, 收集上清液并转移至洁净离心管中。向上清液中加入 3 倍体积预冷无水乙醇, 充分混匀后于 4 $^{\circ}$ C 静置过夜, 以促进 EPS 沉淀。待 EPS 充分沉淀后, 于 4 $^{\circ}$ C、15 000 g 条件下离心 10 min, 弃去上清液, 沉淀用 1 mL 无菌水充分复溶。采用苯酚-硫酸比色法, 在 490 nm 波长处测定复溶后溶液的吸光值, 以葡萄糖为标准品绘制标准曲线, 计算 EPS 的含量。

1.3.7 CAPE 对肺炎克雷伯菌基因表达量的影响。为明确 CAPE 对肺炎克雷伯菌基因表达水平的影响, 选取 MIC 浓度的 CAPE 处理肺炎克雷伯菌, 并通过实时荧光定量 PCR 对相关基因的表达变化进行分析。肺炎克雷伯菌总 RNA 的提取按照 TRleasyTM 总 RNA 提取试剂说明书进行。使用 NanoDrop Ultra-Micro 分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度。提取后, 使用 PrimeScriptTM RT Master Mix 试剂盒进行反转录, 然后使用 TB Green®Premix EX TaqTM 试剂进行荧光定量 PCR 测定。实验中所用引物均由生工生物股份有限公司合成, 引物信息如表 1 所示。以内参基因 16S rRNA 为基准, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法测定相对 mRNA 表达水平。16S rRNA 作为细菌中常用的内参基因, 在不同处理条件下表达相对稳定, 且在前期预实验中其表达未受到 CAPE 处理的显著影响, 因此将其作为本研究的内参基因。

表 1 肺炎克雷伯菌相关基因引物序列

Tab. 1 Primer sequences of genes in *Klebsiella pneumoniae*

基因名称	引物序列(5'-3')	基因名称	引物序列(5'-3')
16S rRNA	F:CGTGTGTGAAATGTTGGGT R:CCACCTTCCTCCAGTTTATCA	<i>luxS</i>	F:CGATGTGCTGAAGGTGAAAG R:TTCGTCGTTGCTGTTGATG
<i>mazF</i>	F:CACGGTTTCACTGGAAGAGG R:GTATGCGTTCCAGACGCTTG	<i>mrkD</i>	F:GATTGGTATGCGTTTCAGCC R:TCAAGGGAATAGTTGGTGGTGT
<i>fimH</i>	F:TCACGGACCGATAAACCTT R:TGAAGTGAAGGAGTCGCTATT	<i>wbbM</i>	F:TTATCAGGCTGCCATTGCCAT R:CAGCTATATGCCCAATAACGC
<i>mrkA</i>	F:ACGTCTCTAACTGCCAGGC R:TAGCCCTGTTGTTTGTCTGGT	<i>ompA</i>	F:TGGTATCGCAGGTTTCCGT R:AGACCGTTTAGCCAGGTTTCG
<i>uge</i>	F:AAGGCTGCCGTCATACCAA R:GCTCATTTGGCTTTCTTGGTG	<i>mrkH</i>	F:AGAGGAGTTGCGCAAACGTA R:TGTCAGGGCCGCATTAAACT

1.3.8 分子对接。为探究 CAPE 抑制肺炎克雷伯菌生物膜形成的潜在机制, 进行了分子对接验证。CAPE 的三维结构从 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中获取。九种与生物膜形成相关的蛋白结构来源于 PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)及 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>), 包括 MrkA(PDB ID: 9HW9)、MrkH(PDB ID: 5EJL)、LuxS(PDB ID: 5E68)、MazF(PDB ID: 7D2M)、Uge (AlphaFold model ID: AF-A0A0K1SB67-F1)、WbbM(PDB ID: 6U4B)、OmpA(PDB ID: 5NHX)、FimH (PDB ID: 9AT9)和 MrkD(PDB ID: 3U4K)。采用 AutoDock Vina 对配体与蛋白受体之间进行对接模拟, 以评估其结合亲和力。使用 PyMOL 进行结构预处理及关键结合残基和分子相互作用的可视化分析。

1.3.9 LIVE/DEAD 荧光试剂盒测定 CAPE 抗菌生物膜效果。取 1.3.1 的菌液用 TSB 培养基调整浓度至 1×10^7 CFU/mL, 取 2 mL 加入共聚焦培养皿中, 37 $^{\circ}$ C 条件下静置培养, 使其在表面形成成熟生物膜。培养结束后弃去上清液, 使用 TSB 培养基对样品轻柔冲洗三次以去除浮游菌。设置对照组(仅含菌液和 TSB 培养基)、1/2 MIC、MIC、2 MIC 实验组(含 CAPE), 作用时间 8 h。弃去培养皿内液体, 使用无菌生理盐水清洗以去除残留物。随后采用 LIVE/DEAD 细菌活性检测试剂盒进行染色, 将 SYTO 9 和碘化丙啶(Propidi-

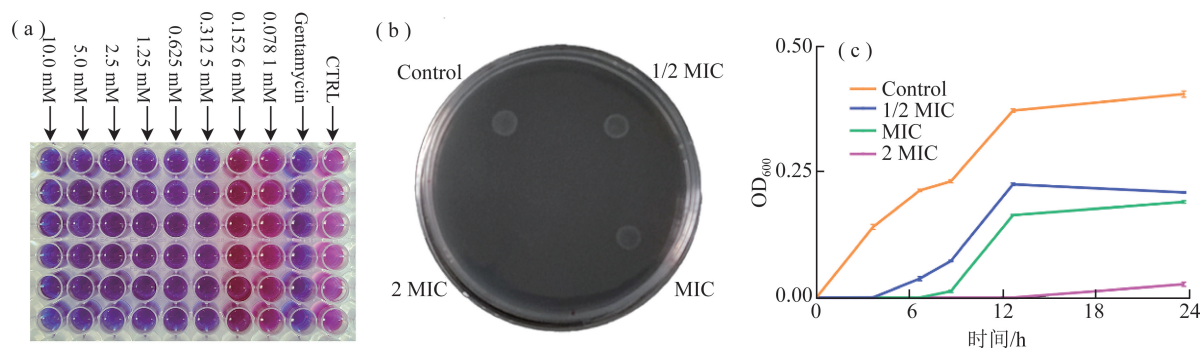
um Iodide, PI)按 1:1 体积比混合并用 PBS 稀释为工作液。向培养皿中加入 200 μL 染色液并在避光条件下孵育 15 min。染色结束后弃去染液,用 PBS 轻柔冲洗 2~3 次以去除多余染料。最后采用激光共聚焦显微镜(CLSM)进行观察,使用 488 nm 激光激发 SYTO 9, 562 nm 激光激发 PI,绿色荧光表示活菌,红色荧光表示死菌。根据荧光信号的定量分析结果对生物膜的结构特征及 CAPE 的作用效果进行评价^[20-21]。

1.3.10 数据处理。所有检测数据均以三次重复的平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据使用 Graphpad Pism 9.5.0 软件作图,并使用 SPSS 27 进行回归分析和方差分析(One-way ANOVA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

2 结果与分析

2.1 CAPE 对肺炎克雷伯菌的 MIC、MBC 及生长曲线的影响

MIC 和 MBC 是评估抗菌药物体外抗菌活性的核心指标,结果显示如图 1(a、b),CAPE 对 *K. pneumoniae* 的 MIC 为 0.312 5 mmol/L, MBC 为 0.625 0 mmol/L, MBC/MIC 比值为 2,提示 CAPE 对肺炎克雷伯菌具有较强的抗菌活性。



注:(a) MIC 的测定;(b) MBC 的测定;(c)生长曲线的测定。

图1 CAPE 对 *K. pneumoniae* 增殖活性的影响

Fig.1 Effects of CAPE on the proliferative activity of *K. pneumoniae*

细菌生长曲线分析结果如图 1(c),与未加药对照组相比,不同浓度 CAPE 对 *K. pneumoniae* 的生长抑制效应呈现明显的浓度依赖性。培养 24 h 内,对照组细菌生长未受任何抑制,吸光值结果呈现典型的“迟缓期-对数生长期-稳定期”完整生长曲线。1/2 MIC 和 MIC 浓度 CAPE 处理组的细菌生长趋势与对照组一致,但各时间点的吸光值均明显低于对照组,说明细菌总体生物量增加速率减缓。2 MIC 浓度 CAPE 处理组的吸光值在整个培养过程中基本保持稳定,未出现明显的上升,说明该 CAPE 浓度下细菌生长几乎停滞。上述结果证实,CAPE 可通过延缓细菌生长速率、抑制细菌增殖过程发挥体外抑菌作用,且其抑菌活性呈现浓度依赖性。

2.2 CAPE 对肺炎克雷伯菌生物膜和黏附量的影响

生物膜形成与细菌黏附能力密切相关,为明确 CAPE 抑制 *K. pneumoniae* 生物膜的作用,本研究系统分析 CAPE 对细菌成熟生物膜及初始黏附能力的影响。

生物膜定量检测结果显示如图 2(a),CAPE 处理组的成熟生物膜与 CAPE 浓度呈显著负相关。在设定的浓度梯度范围内,CAPE 对生物膜的抑制效应随浓度升高而逐步增强,其中 2 MIC 组的抑制效果最为显著,成熟生物膜清除率达 50.18%,且与对照组相比差异极显著($p < 0.001$)。该结果与 Qiu 等^[22]关于丁香酚抑制肺炎克雷伯菌生物膜的研究结果一致。

细菌黏附量定量分析结果如图 2(b),当 CAPE 浓度高于 1/2 MIC 时,*K. pneumoniae* 在聚苯乙烯表面的初始黏附量显著降低($p < 0.001$),2 MIC 时,黏附抑制率可达到 73.3%,同时,CAPE 对已形成的细菌黏附菌团具有明显的解离作用。上述结果证实,CAPE 可能通过“抑制细菌初始黏附”与“解离已形成黏附菌团”的双重机制,阻断生物膜形成的关键起始环节,进而发挥生物膜抑制作用。

2.3 CAPE 对肺炎克雷伯菌胞外 DNA、蛋白质及多糖含量的影响

K. pneumoniae 生物膜的胞外基质主要由胞外多糖(EPS)、胞外 DNA 及蛋白质构成,其中 EPS 是维持生物膜结构稳定、介导细菌耐药性及毒力表达的关键功能性成分^[23]。当生物膜结构受到外界因素(如抗菌剂、金属离子或酶处理)破坏后,其胞外基质成分通常会出现显著变化。因此,通过检测 eDNA、EPS 和蛋白质含量的变化,可以间接反映生物膜被破坏的程度。本研究一方面通过检测培养上清液在特征波长处的吸光度,评估 CAPE 对细胞膜通透性及胞内成分外渗的影响;另一方面采用苯酚-硫酸法测定 EPS 含量,以探讨 CAPE 对生物膜基质合成的调控作用。

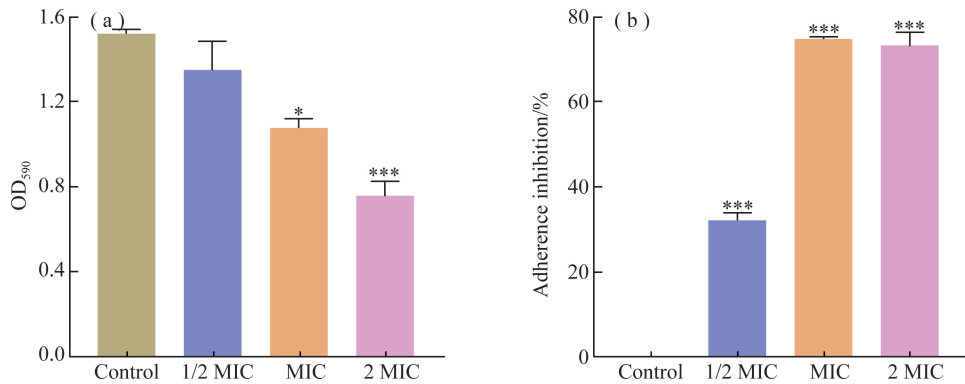


图2 CAPE 对 *K. pneumoniae* 生物膜总量和黏附量的影响

Fig. 2 Effects of CAPE on the total biofilm biomass and adhesion of *K. pneumoniae*

结果显示如图 3(a,b),MIC 和 2 MIC 浓度的 CAPE 处理均导致上清液在 280 nm 与 260 nm 处的吸光度显著升高($p < 0.001$),说明 CAPE 在 MIC 及以上浓度可破坏 *K. pneumoniae* 细胞膜的结构完整性,从而促进胞内蛋白质与 DNA 渗漏至胞外,进而影响生物膜基质的正常构成。

苯酚-硫酸法检测结果显示如图 3(c),CAPE 对 *K. pneumoniae* 的 EPS 合成与释放具有浓度依赖性抑制效应:当 CAPE 浓度从 1/2 MIC 梯度升高至 2 MIC 时,EPS 的抑制率呈逐步上升趋势,且各浓度组的抑制效果均具有统计学极显著性差异($p < 0.001$),其中 2 MIC 组的 EPS 抑制率可达到 46.2%。这一结果证实,CAPE 可通过剂量依赖性下调 EPS 产量,削弱生物膜胞外基质的结构稳定性,且其抑制作用强度与药物浓度呈正相关。

综上,CAPE 一方面通过破坏细菌细胞膜完整性诱导胞内 DNA、蛋白质外渗,另一方面通过浓度依赖性减少 EPS 水平,双重调控生物膜关键基质成分的代谢过程。这一协同作用从结构基础层面阻断生物膜的形成与稳定,是 CAPE 抑制肺炎克雷伯菌生物膜的重要分子机制之一。

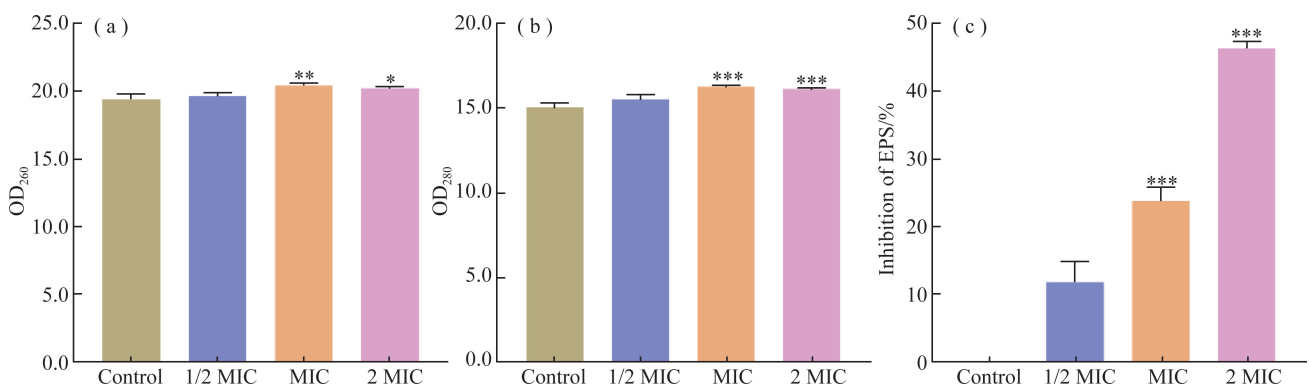


图3 CAPE 对 *K. pneumoniae* 胞外 DNA 和蛋白质及多糖的释放水平

Fig. 3 Effects of CAPE on the release levels of eDNA, proteins, and EPS in *K. pneumoniae*

2.4 CAPE 对肺炎克雷伯菌相关功能基因表达水平的调控作用

RT-qPCR 结果见图 4,CAPE 可显著下调 *K. pneumoniae* 生物膜形成相关基因(*mrkA*、*mrkH*、*luxS*)、毒力相关基因(*mazF*、*uge*、*wbbM*、*ompA*)及黏附相关基因(*fimH*、*mrkD*、*ompA*)的表达。这些基因分别参

与菌毛合成(*fimH*、*mrkA*、*mrkD*)、脂多糖与荚膜多糖合成(*uge*、*wbbM*)、群体感应调控(*luxS*)、生物膜成熟调控(*mrkH*)及毒力因子(*mazF*、*ompA*)介导的致病性等关键致病过程。综上,CAPE通过下调多个关键致病基因的表达,从黏附定植、生物膜形成及毒力表达等方面削弱细菌的致病潜力,体现出其系统性抗感染作用。该研究结果与既往关于抗肺炎克雷伯菌机制的研究结论相符^[24-26]。

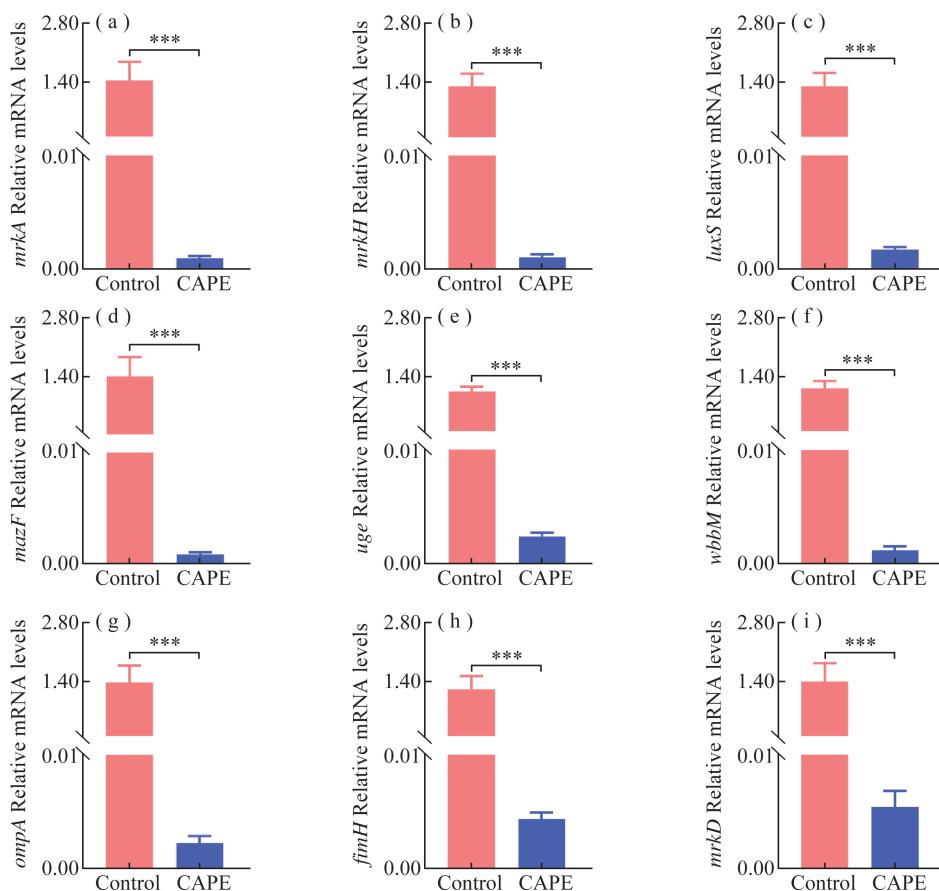


图4 CAPE对*K. pneumoniae*基因表达量的影响

Fig. 4 Effects of CAPE on gene expression levels in *K. pneumoniae*

2.5 分子对接分析

分子对接结果显示,CAPE可与多种肺炎克雷伯菌毒力及生物膜相关蛋白形成稳定复合物,其预测的结合自由能介于 $-6.4 \sim -8.2$ kcal/mol之间(见表2)。其中,CAPE与LuxS和MrkD的结合能力最强,得分均为 -8.2 kcal/mol,其次为WbbM(-7.7 kcal/mol)和MazF(-7.6 kcal/mol),而与OmpA(-6.6 kcal/mol)和FimH(-6.4 kcal/mol)的结合能力相对较弱,表明CAPE对不同靶蛋白具有差异化的结合亲和力。构象分析结果如图5表明,CAPE能嵌入各靶蛋白的结合口袋,并主要通过氢键和疏水相互作用与关键氨基酸残基形成稳定相互作用网络。在LuxS和MrkD中,CAPE深入活性或功能结构域,与多个关键残基形成多重氢键及疏水作用,显示出较高的构象稳定性。而在OmpA和FimH中,CAPE主要位于蛋白表面沟槽区域,结合位点相对暴露,可能导致其结合稳定性较弱。综合来看,CAPE可能通过多靶点协同作用,同时干扰群体感应相关蛋白LuxS、菌毛黏附相关蛋白MrkD/MrkA以及多糖合成相关蛋白,从而影响肺炎克雷伯菌的黏附、生物膜形成及毒力表达,为其发挥抗生物膜和抑菌作用提供了分子水平依据。

表2 CAPE与不同受体蛋白的预测结合自由能

Tab. 2 Docking scores of CAPE with different receptor proteins

受体蛋白	Docking score/(kcal · mol ⁻¹)	受体蛋白	Docking score/(kcal · mol ⁻¹)	受体蛋白	Docking score/(kcal · mol ⁻¹)
MrkA	-7.0	MrkH	-7.4	LuxS	-8.2
MazF	-7.6	Uge	-7.0	WbbM	-7.7
OmpA	-6.6	FimH	-6.4	MrkD	-8.2

2.6 Live/Dead 荧光染色分析 CAPE 对细菌生物膜的抑制效应

采用 Live/Dead 荧光试剂盒染色结合激光扫描共聚焦显微镜(CLSM),系统观察 CAPE 对肺炎克雷伯菌生物膜结构的破坏作用及细菌存活状态的影响。图 6(a)为不同浓度 CAPE(1/2 MIC、MIC 及 2 MIC)处理后,生物膜的代表性 CLSM 荧光图像(活菌被染为绿色荧光,死菌被染为红色荧光)。对照组生物膜呈现大面积连续分布的绿色荧光,荧光信号强且分布均匀,生物膜结构致密、活菌密度高,红色荧光信号几乎不可检出,表明对照组生物膜处于高活性稳定状态。经 CAPE 处理后,生物膜的结构完整性与细菌存活状态均呈现明显的浓度依赖性变化,其中,1/2 MIC 组绿色荧光强度较对照组轻度减弱,生物膜整体结构保持完整但局部区域出现松散化改变,红色荧光信号微弱且分布局限,提示该浓度 CAPE 可轻度抑制生物膜内细菌活力,但未导致细菌大规模死亡。MIC 组中,绿色荧光信号显著衰减且分布稀疏,红色荧光区域明显扩大、荧光强度显著增强,生物膜结构呈现碎片化断裂,表明生物膜内活菌数量大幅减少,死菌比例显著升高。2 MIC 组中,绿色荧光信号近乎完全消失,红色荧光占据视野主导地位,生物膜原有的三维聚集结构完全崩解,证实 2 MIC 浓度的 CAPE 可有效杀伤生物膜内细菌,并彻底破坏其结构完整性^[21]。

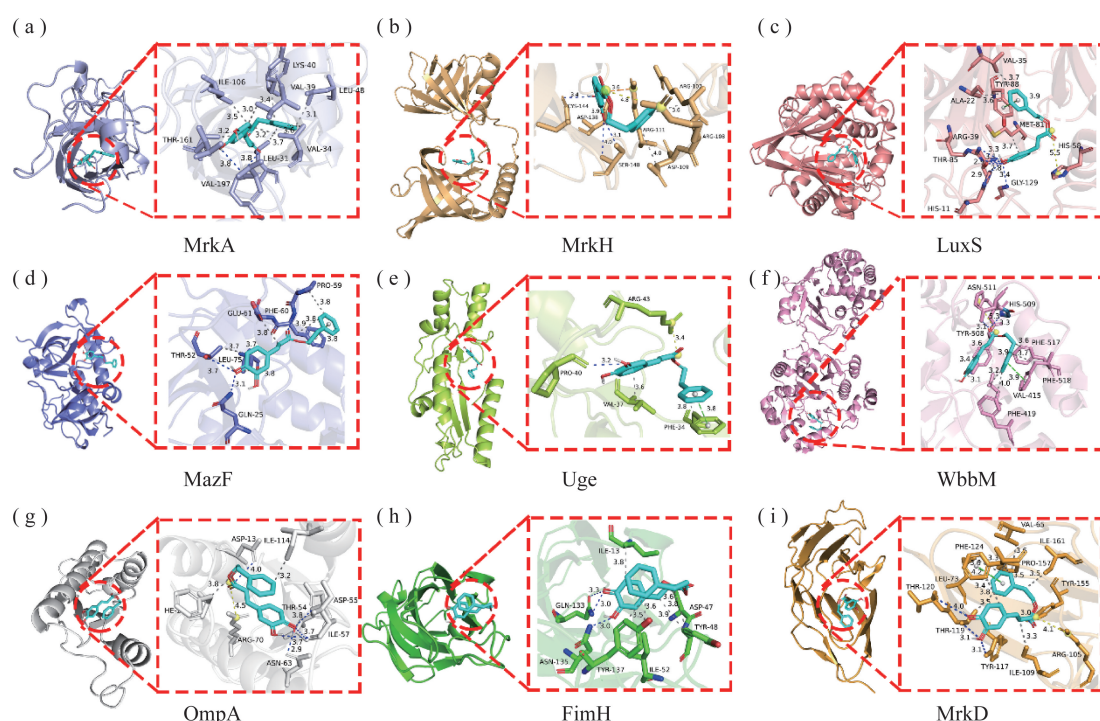


图 5 CAPE 与不同受体蛋白的分子对接分析

Fig. 5 Molecular docking analysis of CAPE with different receptor proteins

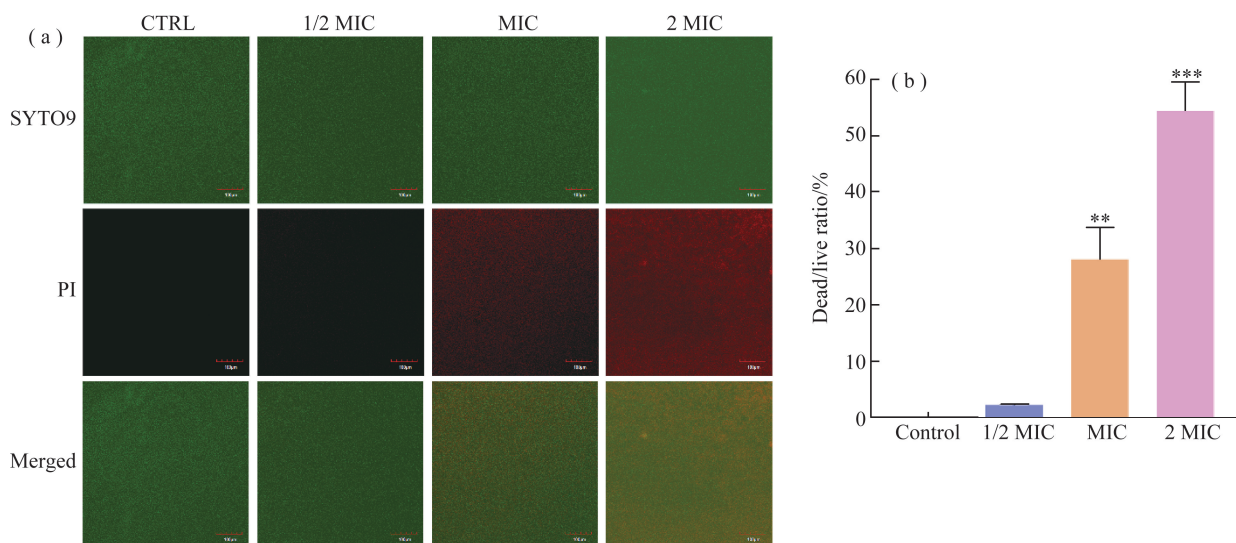
图 6(b)为荧光量化分析结果,通过 Image J 软件量化荧光值以计算不同处理组的死/活菌比例。结果表明 1/2 MIC 组死菌比例约为 2%,MIC 组显著增加至约 28%,2 MIC 组可达到约 54%,呈现明显的浓度依赖性变化。该定量结果进一步验证了荧光图像观察到的趋势,说明 CAPE 对肺炎克雷伯菌生物膜的破坏效应及细菌杀伤作用均随浓度增加而增强。

综上,CAPE 对肺炎克雷伯菌生物膜的破坏效应及细菌杀伤作用均呈浓度依赖性。进一步证实了 CAPE 通过干扰细菌黏附与聚集过程,不仅能显著抑制肺炎克雷伯菌生物膜的形成,还可诱导成熟生物膜解聚并杀伤膜内细菌。

3 讨论

肺炎克雷伯菌是当前临床中常见且高度耐药的重要机会致病菌,可引发肺炎、脑膜炎、尿路感染及败血症等严重疾病。本研究表明,蜂胶的主要活性成分咖啡酸苯乙酯(CAPE)对肺炎克雷伯菌具有显著的抑制作用。CAPE 不仅明显抑制细菌的生长与增殖,还通过破坏细胞膜的完整性和功能,削弱细菌的生理活性。

同时,CAPE 能够抑制成熟生物膜的形成并破坏其三维结构,从而降低细菌对宿主表面的黏附能力。此外,CAPE还能显著下调与毒力、生物膜形成及黏附相关的关键基因表达,进一步削弱肺炎克雷伯菌的致病能力。



注:(a)不同浓度 CAPE 处理后 *K. pneumoniae* 的 CLSM 荧光图像;(b)不同浓度 CAPE 处理后 *K. pneumoniae* 死/活菌比例的定量分析。

图6 CLSM显示CAPE对*K. pneumoniae*生物膜的影响

Fig. 6 Effect of CAPE on *K. pneumoniae* biofilm as visualized by CLSM

CAPE 可与多种与生物膜形成和毒力相关的蛋白(如 LuxS、MrkD、WbbM、MazF 等)形成稳定结合,其对接得分介于 $-6.4 \sim -8.2$ kcal/mol,其中与 LuxS 和 MrkD 的结合能力最强。构象分析表明,CAPE 主要通过氢键和疏水相互作用嵌入这些蛋白的功能结构域,提示其在分子层面上具备干扰群体感应、菌毛黏附及多糖合成等关键过程的潜力。综上所述,CAPE 通过多重机制协同作用,对肺炎克雷伯菌展现出良好的抗菌潜力。

CAPE 诱导肺炎克雷伯菌胞外 DNA 与蛋白质渗漏,提示其可破坏细菌细胞膜完整性。作为天然酚类化合物,CAPE 的分子结构赋予其两亲性特征:苯环与乙酯基构成疏水区域,酚羟基(-OH)为亲水基团,该“疏水-亲水”二元结构为其插入细菌细胞膜磷脂双分子层提供了结构基础^[27-28]。细菌细胞膜以磷脂双分子层为骨架,磷脂头部(亲水)朝外、尾部(疏水)朝内形成有序排列,CAPE 可通过“亲水基团锚定膜表面、疏水区域嵌入膜内部”的方式穿透表层,打破磷脂双分子层的有序排列^[29]。其分子插入后,一方面干扰磷脂分子间的疏水作用力与范德华力,导致双分子层紧密排列被破坏,引发局部无序化与流动性异常^[30];另一方面,酚羟基可与磷脂头部极性基团形成氢键,进一步扭曲膜结构、削弱力学稳定性^[31]。随着 CAPE 在膜内积累,对磷脂双分子层的扰动持续加剧,最终导致膜结构完整性破坏,形成“微孔”或“裂隙”,使细胞膜从有序双分子层向无序液晶态转变,膜通透性显著升高^[32]。

本研究通过结晶紫染色、黏附定量、胞外基质成分检测及结构观察等实验,进一步证实 CAPE 可显著抑制肺炎克雷伯菌生物膜形成并破坏成熟生物膜结构。CAPE 对生物膜的抑制具有明确分子调控基础,与表型变化直接关联。RT-qPCR 结果显示,其可显著下调菌毛合成与生物膜成熟相关(*mrkA*、*mrkH*)、群体感应调控(*luxS*)等关键基因表达,从上游阻断生物膜启动、黏附聚集及信号传导过程。已有研究证实 *mrkH* 是典型的 c-di-GMP 依赖转录激活因子,可启动 *mrkABCDF* 操纵子并驱动 III 型菌毛表达,而 *mrkA* 的表达水平与生物膜生物量呈显著正相关^[33-34]。同时,*luxS* 是 AI-2 介导的群体感应枢纽基因,其下调可导致生物膜启动受阻和群体行为紊乱^[35]。这些机制与本研究观察到的基因抑制趋势一致,进一步证明 CAPE 的作用属于主动靶向调控,而非仅由膜破坏引发的次级效应。

在基质层面,CAPE 扰乱生物膜基质成分,进一步加剧结构破坏。作为生物膜核心“骨架”的胞外多糖,其合成受到 CAPE 的浓度依赖性抑制,从而直接削弱生物膜的结构支撑。虽然 CAPE 处理后胞内 DNA 和蛋白质外泄增加,但这些分子缺乏在基质中的有序排列,无法参与生物膜的交联和稳定,反而加剧了结构松散。类似机制也被多种天然多酚和植物提取物报道:天然酚类化合物可下调 EPS 合成相关基因,并扰乱

eDNA 与蛋白质的有序分布,从而破坏生物膜整体结构完整性^[36-37]。由此可见,CAPE 通过下调生物膜相关基因表达阻断合成启动,同时抑制胞外多糖合成、扰乱 eDNA 与蛋白质有序分布破坏结构稳定性,结合细胞膜破坏的物理效应,多维度发挥抗生物膜作用。

CAPE 的抗细菌效应不仅体现在直接杀菌与抗生物膜作用,而且通过靶向调控毒力及黏附相关基因表达,削弱肺炎克雷伯菌的感染能力。RT-qPCR 结果证实,CAPE 可显著下调 *fimH*、*mrkD*、*uge*、*wbbM*、*ompA* 等关键毒力与黏附基因的转录水平,实现多维度毒力抑制。菌毛合成相关基因(*fimH*、*mrkD*)的下调直接削弱细菌对宿主细胞及基质的初始黏附能力,阻断感染起始环节^[38-39];脂多糖与荚膜多糖合成基因(*wbbM*、*uge*)的表达抑制,降低细菌外膜结构完整性,削弱其免疫逃逸及体内定植能力^[40];群体感应调控基因 *luxS* 的下调,干扰细菌群体通讯,间接抑制生物膜形成及毒力因子的协同表达^[41]。CAPE 靶向解除细菌致病能力的特性,是其作为抗毒力制剂的核心优势。通过精准调控细菌致病关键通路,使细菌丧失黏附、定植及免疫逃逸等能力,为应对细菌耐药性提供了新思路,也拓展了 CAPE 作为潜在抗感染制剂的应用前景。

综上所述,本研究结果表明,CAPE 处理后肺炎克雷伯菌在细胞膜完整性、生物膜形成能力及多种毒力相关基因表达水平上均发生显著变化,提示 CAPE 可能通过多重途径协同削弱其生理活性和致病潜力。然而,需要指出的是,本文所提出的作用机制更多体现为“相关性”层面的证据,而非严格意义上的“因果关系”。未来仍需通过靶蛋白验证、突变株分析及体内模型等进一步研究,以明确 CAPE 作用的直接分子靶点及其调控路径。

参 考 文 献

- [1] 聂子涵,肖丽生,赵西林,等.肺炎克雷伯菌毒力因子与耐药机制及其相互影响[J].中国抗生素杂志,2025,50(1):6-14.
- [2] RAMADAN R A, BEDAWY A M, NEGM E M, et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* among patients with ventilator-associated pneumonia: evaluation of antibiotic combinations and susceptibility to new antibiotics[J]. Infection and Drug Resistance, 2022, 15:3537-3548.
- [3] 陈秋强,詹海超,莫俊德,等.肺炎克雷伯菌在呼吸机相关性肺炎中的耐药性及多重耐药危险因素的研究[J].广东医科大学学报,2024,42(3):285-288.
- [4] 耿响,刘希望,李剑勇.肺炎克雷伯菌耐药机制和毒力因子研究进展[J].中兽医医药杂志,2024,43(1):29-38.
- [5] TAYSI S, ALGBURI F S, TAYSI M E, et al. Caffeic acid phenethyl ester: a review on its pharmacological importance, and its association with free radicals, COVID-19, and radiotherapy[J]. Phytotherapy Research, 2022, 37(3): 1115-1135.
- [6] NASIMI SHAD A, AKHLAGHIPOUR I, BABAZADEH BAGHAN A, et al. Caffeic acid and its derivative caffeic acid phenethyl ester as potential therapeutic compounds for cardiovascular diseases: a systematic review[J]. Archiv der Pharmazie-Chemistry in Life Sciences, 2024, 357(10): e2400240.
- [7] 杨九凌,祝晓玲,李成文,等.咖啡酸及其衍生物咖啡酸苯乙酯药理作用研究进展[J].中国药学杂志,2013,48(8):577-582.
- [8] VELAZQUEZ C, NAVARRO M, ACOSTA A, et al. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran Propolis[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(5): 1747-1756.
- [9] YANG M Y, YAN H, ZHOU J, et al. Physicochemical characterization, release profile, and antibacterial mechanisms of caffeic acid phenethyl ester loaded in lipid nanocapsules with lauric acid and glycerol monolaurate[J]. Food Research International, 2025, 209: 116208.
- [10] ALFARAYEH I, POLLÁK E, CZÉH Á, et al. Antifungal and anti-biofilm effects of caffeic acid phenethyl ester on different *Candida* species[J]. Antibiotics, 2021, 10(11): 1359.
- [11] 宋红志,王方芹,王俊,等.几种咖啡酸酯类衍生物对桑丁香假单胞菌的抑制活性鉴定[J].蚕业科学,2016,42(1):53-60.
- [12] 许晏,宋文森,朱丹,等.蜂胶渣提取物对青枯劳氏菌的抑制活性鉴定[J].蚕业科学,2018,44(2):205-215.
- [13] NAVARRO-NAVARRO M, RUIZ-BUSTOS P, VALENCIA D, et al. Antibacterial activity of Sonoran Propolis and some of its constituents against clinically significant *Vibrio* species[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2013, 10(2): 150-158.
- [14] NIU Y M, WANG K, ZHENG S N, et al. Antibacterial effect of caffeic acid phenethyl ester on cariogenic bacteria and *Streptococcus mutans* biofilms[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2020, 64(9): e00251.
- [15] VELOZ J J, ALVEAR M, SALAZAR L A. Antimicrobial and antibiofilm activity against *Streptococcus mutans* of individual and mixtures of the main polyphenolic compounds found in Chilean Propolis[J]. BioMed Research International, 2019(1): 7602343.
- [16] NGUIMATSIA F, MOMO E J, KEILAH LUNGA P, et al. Susceptibility patterns in *Staphylococcus* and *Klebsiella* causing nosocomial infections upon treatment with E-anethole-rich essential oil from *Clausena anisata*[J]. Drugs and Drug Candidates, 2024, 3(1): 244-255.

- [17] 覃俊媛,孙晨,彭成,等. 赶黄草水煎液对金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物膜形成的影响[J]. 中国抗生素杂志, 2023, 48(1): 54-61.
- [18] XIE X Y, LIU X Q, LI Y L, et al. Advanced glycation end products enhance biofilm formation by promoting extracellular DNA release through sigB upregulation in *Staphylococcus aureus*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11:1479.
- [19] LI C C, JIANG C Y, JING H J, et al. Separation of phenolics from peony flowers and their inhibitory activities and action mechanism on bacterial biofilm[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(10): 4321-4332.
- [20] 宋菲,向军,陆树良. 激光共聚焦显微镜和改良微孔板法观察细菌生物膜形成[J]. 中国感染与化疗杂志, 2010, 10(5): 368-372.
- [21] WANG F, YUAN J, WANG X R, et al. Antibacterial and antibiofilm activities of Chinese Propolis essential oil microemulsion against *Streptococcus mutans*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2023, 134(3): 1xad056.
- [22] 邱雪梅,刘思雨,王滨,等. 丁香酚抑制肺炎克雷伯菌毒力因子的表达及其机制研究[J]. 湖北医药学院学报, 2025, 44(5): 519-524.
- [23] CHE J H, SHI J J, FANG C G, et al. Elimination of pathogen biofilms via postbiotics from lactic acid bacteria: a promising method in food and biomedicine[J]. *Microorganisms*, 2024, 12(4):704.
- [24] 颜琪,张萍淑,李雯,等. 肺炎克雷伯菌耐药机制、耐药基因及毒力因子的研究进展[J]. 实用心脑血管病杂志, 2025, 33(5):133-140.
- [25] 蔡扩军,苏睿,徐敏. 肺炎克雷伯菌的耐药机制与耐药基因[J]. 中国兽医卫生, 2025, 2(2): 16-20.
- [26] 张嘉文,廖玉婷,刘创业,等. 肺炎克雷伯菌致下呼吸道感染患者常用抗菌药物的耐药性分析[J]. 广东药科大学学报, 2024, 40(2): 139-143.
- [27] BORGES A, FERREIRA C, SAAVEDRA M J, et al. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and Gallic acids against pathogenic bacteria[J]. *Microbial Drug Resistance*, 2013, 19(4): 256-265.
- [28] MURTAZA G, KARIM S, AKRAM M R, et al. Caffeic acid phenethyl ester and therapeutic potentials[J]. *BioMed Research International*, 2014(1): 145342.
- [29] TSUCHIYA H. Membrane interactions of phytochemicals as their molecular mechanism applicable to the discovery of drug leads from plants[J]. *Molecules*, 2015, 20(10): 18923-18966.
- [30] STASIUK M, KOZUBEK A. Membrane perturbing properties of natural phenolic and resorcinolic lipids[J]. *FEBS Letters*, 2008, 582(25/26): 3607-3613.
- [31] HOSSAIN S I, SAHA S C, DEPLAZES E. Phenolic compounds alter the ion permeability of phospholipid bilayers via specific lipid interactions[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2021, 23(39): 22352-22366.
- [32] WU Y P, BAI J R, ZHONG K, et al. Antibacterial activity and membrane-disruptive mechanism of 3-p-trans-coumaroyl-2-hydroxyquinic acid, a novel phenolic compound from pine needles of *Cedrus deodara*, against *Staphylococcus aureus* [J]. *Molecules*, 2016, 21(8): 1084.
- [33] WANG Z B, DING Z X, LI Z Y Q, et al. Antioxidant and antibacterial study of 10 flavonoids revealed rutin as a potential antibiofilm agent in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2021, 159: 105121.
- [34] WILKSCH J J, YANG J, CLEMENTS A, et al. *MrkH*, a novel c-di-GMP-dependent transcriptional activator, controls *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation by regulating type 3 fimbriae expression[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(8): e1002204.
- [35] CHEN L J, WILKSCH J J, LIU H Y, et al. Investigation of Lu_x S-mediated quorum sensing in *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2020, 69(3): 402-413.
- [36] DE BARROS P P, ROSSONI R D, GARCIA M T, et al. The anti-biofilm efficacy of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in vitro and a murine model of oral candidiasis[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 700305.
- [37] ZHOU K Y, SHI M Y, CHEN R Y, et al. Natural phytochemical-based strategies for antibiofilm applications[J]. *Chinese Medicine*, 2025, 20(1): 96.
- [38] JASIM S A, ABDULRAZZAQ S A, SALEH R O. Virulence factors of *Klebsiella pneumoniae* isolates from iraqi patients[J]. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 2020, 11(6):1-12.
- [39] MAKHRMASH J H, AL-AIDY S R, QADDOORI B H. Investigation of biofilm virulence genes prevalence in *Klebsiella pneumoniae* isolated from the urinary tract infections[J]. *Archives of Razi Institute*, 2022, 77(4): 1421-1427.
- [40] REGUÉ M, HITA B, PIQUÉ N, et al. A gene, *uge*, is essential for *Klebsiella pneumoniae* virulence[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(1): 54-61.
- [41] LI Y, NI M. Regulation of biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1238482.

(责任编辑:刘庆松)