

# 基于FT-IR研究环丙沙星和白花丹素对金黄色葡萄球菌的抗菌作用

王雨涛<sup>1,2</sup>, 刘荟群<sup>1,2</sup>, 简诗琪<sup>1,2</sup>, 王孟冉<sup>1,2</sup>, 罗砚浓<sup>1,2\*</sup>, 吴美燕<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>广西医科大学生命科学研究院, 广西 南宁

<sup>2</sup>国家卫生健康委地中海贫血防治重点实验室, 广西地中海贫血防治重点实验室, 广西 南宁

收稿日期: 2026年4月20日; 录用日期: 2026年6月9日; 发布日期: 2026年6月17日

## 摘要

目的: 本研究旨在探讨环丙沙星(CIP)与白花丹素(PLU)对不同生长阶段的金黄色葡萄球菌(SA)的动态杀菌过程及其细胞结构改变。方法: 利用剂量-反应曲线和时间杀伤曲线评估两种药物在指数期和稳定期的杀菌动力学; 采用傅里叶变换红外光谱(FT-IR)监测细菌在药物作用后细菌细胞膜、蛋白质、核酸等结构及胞外多糖(EPS)的变化; 利用主成分分析(PCA)和支持向量机(SVM)模型对光谱数据进行特征提取和分类验证; 采用透射电子显微镜(TEM)技术观察药物处理前后SA的超微结构变化。结果: CIP对指数期SA杀伤迅速, 而PLU在稳定期表现出更强的抑制作用, 两药联用在不同生长阶段均表现出相加或协同效应。光谱分析证实, CIP主要破坏细胞膜完整性并在作用后期损伤核酸结构; PLU虽对膜破坏有限, 但显著改变蛋白质空间构象, 单独或与CIP联合显著减少了EPS分泌。PCA显示各处理组间差异显著, SVM模型分类准确率最高达100%。TEM显示CIP和PLU均破坏了SA的细胞膜。结论: 本研究展示了CIP与PLU在金黄色葡萄球菌上的多靶点联合作用(膜、蛋白、核酸及EPS等), 为应对耐药性贡献了潜在策略, 为时序性联合用药提供了依据, 并展示了FT-IR在监测抗菌动态过程中的潜在应用价值。

## 关键词

金黄色葡萄球菌, 白花丹素, 环丙沙星, 傅里叶变换红外光谱, 支持向量机

# Study of the Antimicrobial Activity of Ciprofloxacin and Plumbagin against Staphylococcus Aureus Based on FT-IR

Yutao Wang<sup>1,2</sup>, Huiqun Liu<sup>1,2</sup>, Shiqi Jian<sup>1,2</sup>, Mengran Wang<sup>1,2</sup>, Yannong Luo<sup>1,2\*</sup>, Meiyun Wu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Life Sciences Institute, Guangxi Medical University, Nanning Guangxi

<sup>2</sup>Guangxi Key Laboratory of Thalassemia Research, NHC Key Laboratory of Thalassemia Medicine, Nanning Guangxi

\*通讯作者。

文章引用: 王雨涛, 刘荟群, 简诗琪, 王孟冉, 罗砚浓, 吴美燕. 基于 FT-IR 研究环丙沙星和白花丹素对金黄色葡萄球菌的抗菌作用[J]. 微生物前沿, 2026, 15(2): 74-84. DOI: 10.12677/amb.2026.152008

## Abstract

**Objective:** This study aims to investigate the dynamic bactericidal process and associated changes in cell structure of *Staphylococcus aureus* (SA) at different growth stages following treatment with ciprofloxacin (CIP) and plumbagin (PLU). **Methods:** Dose-response curves and time-kill curves were utilised to evaluate the bactericidal kinetics of the two drugs during the log and stationary phases; Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) was employed to monitor changes in bacterial cell membranes, proteins, nucleic acids and extracellular polysaccharides (EPS) following drug exposure; principal component analysis (PCA) and support vector machine (SVM) models were used for feature extraction and classification validation of the spectral data; The ultrastructural changes in SA before and after drug treatment were observed using transmission electron microscopy (TEM). **Results:** CIP rapidly killed SA during the log phase, whilst PLU exhibited stronger inhibitory effects during the stationary phase; the combination of the two drugs demonstrated additive or synergistic effects across different growth stages. Spectral analysis confirmed that CIP primarily disrupted cell membrane integrity and damaged nucleic acid structures in the later stages of action; although PLU caused limited membrane disruption, it significantly altered the spatial conformation of proteins and, either alone or in combination with CIP, significantly reduced EPS secretion. PCA analysis revealed significant differences between treatment groups, with the SVM model achieving a classification accuracy of up to 100%. **Conclusion:** This study demonstrates the multi-targeted synergistic effects of CIP and PLU against *Staphylococcus aureus* (acting on membranes, proteins, nucleic acids, and EPS, among others), offering a potential strategy for combating antimicrobial resistance, providing a basis for sequential combination therapy, and highlighting the potential value of FT-IR in monitoring the dynamics of antimicrobial activity.

## Keywords

**Staphylococcus Aureus, Plumbagin, Ciprofloxacin, FT-IR, Support Vector Machines**

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

金黄色葡萄球菌是一种广泛定植于人类皮肤和黏膜的革兰氏阳性菌[1]。当身体的免疫系统功能低下时,金黄色葡萄球菌可能会引起感染,如皮肤化脓,呼吸道感染,严重者出现败血症[2][3]。金黄色葡萄球菌感染率逐年上升,已成为医院和社区获得性感染最常见的病原体之一[4]-[6]。

环丙沙星(CIP)作为第二代氟喹诺酮,具有广谱抗菌活性,通过靶向细菌 DNA 拓扑异构酶 II/IV 形成复制叉,阻断 DNA 复制,导致细菌迅速死亡[7][8]。然而,金黄色葡萄球菌对环丙沙星的耐受性日益增强,这在一定程度上增加了用药难度[9]。探寻疗效更好、副作用更小的治疗方案,如佐剂与抗生素的联合使用是可选策略之一[10]-[12]。已有研究证实药用植物是潜在的有效抗菌药物来源[13],其中白花丹素(5-羟基-2-甲基-1,4-萘醌, PLU)是一种来源于白花丹的天然萘醌,具有抗菌活性[14],且不会改变人体血浆的凝血参数,具备良好的血液相容性和用药安全性,具备进一步开展临床转化研究的潜力[15]。研究表明白花丹素与环丙沙星联合使用对金黄色葡萄球菌呈协同作用[16][17],但目前的研究主要基于单一阶段

抑菌实验, 尚未报道不同生长阶段的联合动态杀菌效果及其机制。

本研究围绕环丙沙星和白花丹素对 SA 的杀伤作用及其机制进行讨论。通过抗生素暴露实验和时间杀伤实验, 首次展示了环丙沙星和白花丹素对不同生长阶段 SA 的联合动态杀菌过程: 药物联合对指数期和稳定期 SA 均表现出相加效果。我们利用 FT-IR 探究了药物作用后 SA 的细胞结构变化, 发现环丙沙星可改变细胞膜、蛋白质、核酸的结构, 而白花丹素对胞外多糖(EPS)的影响在指数期和稳定期不同, 同时发现药物联用可减少稳定期 SA 胞外多糖的分泌, 并通过 TEM 验证了药物诱导的 SA 膜损伤。综上所述, 本研究初步阐明了环丙沙星和白花丹素对 SA 细胞结构改变的机制, 还为临床治疗金黄色葡萄球菌感染提供了新策略, 为白花丹素临床转化贡献理论依据。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 试剂与材料

本研究使用的金黄色葡萄球菌(ATCC 25293)购自美国典型培养物保藏中心。培养基包括胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)和胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)购自中国北京索莱宝科技有限公司。环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)购自美国 MedChemExpress (MCE)公司, 白花丹素(Plumbagin, PLU)购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

### 2.2. 细菌培养与试剂配方

SA 以甘油菌形式(25% (v/v))在 TSB 中 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存。实验用时, 从 $37^{\circ}\text{C}$ 下 TSA 平板上生长 18~24 h 的单菌落中分离细菌, 接种于 TSB 中, 在 $37^{\circ}\text{C}$ 下以 200 rpm 振荡培养过夜。过夜培养物以 1:2000 稀释, 为初始接种浓度( $10^5$  CFU/mL)。CIP 以 20 mg/mL 溶于 0.1 M HCl 中, PLU 以 25 mg/mL 溶于二甲基亚砷(DMSO)中, 于 $-20^{\circ}\text{C}$ 中避光保存。

### 2.3. 环丙沙星和白花丹素对 SA 的杀伤试验

#### 2.3.1. 最小抑菌浓度

CIP、PLU 对金黄色葡萄球菌 ATCC25293 的最小抑菌浓度(MIC)通过肉汤微量稀释法测定。在 TSB 中准备系列稀释液(CIP:  $0.03125\ \mu\text{g/mL}$ ~ $4\ \mu\text{g/mL}$ ; PLU:  $0.5\ \mu\text{g/mL}$ ~ $32\ \mu\text{g/mL}$ ), 以工作接种浓度过夜培养 SA, 记录无明显生长的最低浓度为 MIC。

#### 2.3.2. 剂量杀伤试验

SA 以初始接种浓度在 $37^{\circ}\text{C}$ 下 200 rpm 培养 4 h 或 20 h, 获得指数期和稳定期的金黄色葡萄球菌悬液, 分别暴露于  $0.25 \times \text{MIC}$ ,  $0.5 \times \text{MIC}$ ,  $1 \times \text{MIC}$ ,  $3 \times \text{MIC}$ ,  $6 \times \text{MIC}$ ,  $10 \times \text{MIC}$ ,  $30 \times \text{MIC}$ ,  $60 \times \text{MIC}$  和  $100 \times \text{MIC}$  的环丙沙星, 或  $0.25 \times \text{MIC}$ ,  $0.5 \times \text{MIC}$ ,  $1 \times \text{MIC}$ ,  $2 \times \text{MIC}$ ,  $4 \times \text{MIC}$ ,  $5 \times \text{MIC}$ ,  $6 \times \text{MIC}$ ,  $8 \times \text{MIC}$ ,  $12 \times \text{MIC}$  和  $16 \times \text{MIC}$  的白花丹素中,  $37^{\circ}\text{C}$ 下 200 rpm 培养 24 h。在 0、24 h 取样, 用磷酸盐缓冲液(PBS)以 $10^{\circ}\text{C}$ 、12000 rpm 离心 10 min (Eppendorf 5810R, 奥地利维也纳), 清洗 3 次, 进行连续稀释并在 TSA 上滴板, 测定存活菌数量。滴板重复滴 3 遍, 并在每个浓度绘制存活细菌数量的平均值  $\pm$  标准差。

#### 2.3.3. 时间杀伤试验

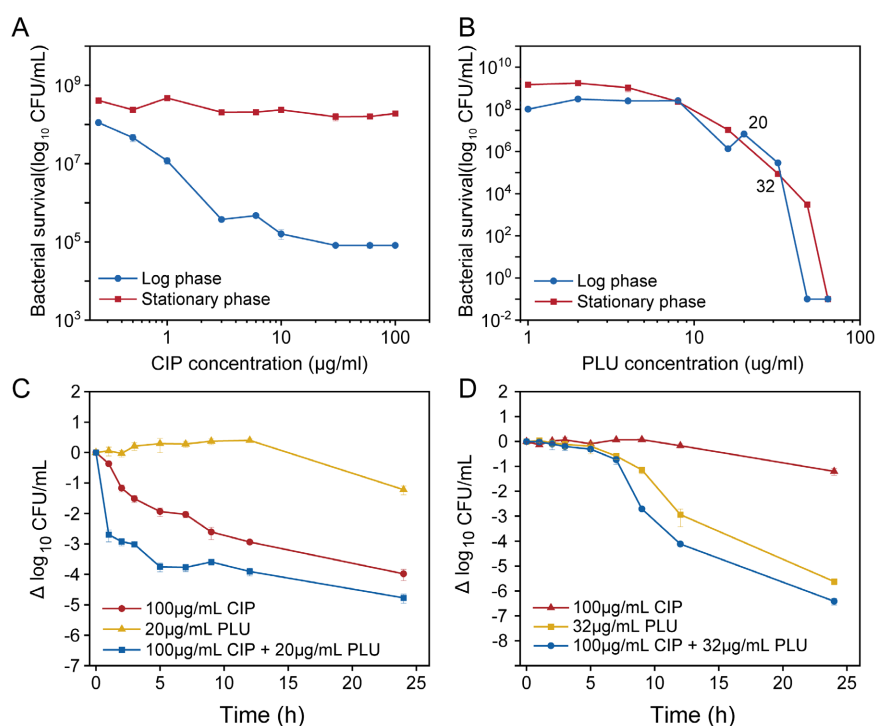
将上述指数期 SA 悬液暴露于  $100 \times \text{MIC}$  ( $100\ \mu\text{g/mL}$ )的环丙沙星、 $5 \times \text{MIC}$  ( $20\ \mu\text{g/mL}$ )的白花丹素和同样浓度的药物联合中, 稳定期菌液则采用  $100 \times \text{MIC}$  ( $100\ \mu\text{g/mL}$ )的环丙沙星、 $8 \times \text{MIC}$  ( $32\ \mu\text{g/mL}$ )的白花丹素  $37^{\circ}\text{C}$ 下 200 rpm 培养 24 h。在 0、1、2、3、5、7、9、12 和 24 h 取样, PBS 离心清洗 3 次, 连续稀释后在 TSA 上滴板, 重复 3 滴, 测定存活菌数量, 并在每个时间点计算平均值  $\pm$  标准差。同时留取 0 h、12 h 和 24 h 的样本作为后续采集 FT-IR 的样本。

## 2.4. FT-IR 采集、预处理与分析

上述 0 h、12 h 和 24 h 的菌液取 1 mL，以 4℃、12,000 rpm 离心 10 min，弃去上清，PBS 清洗 3 次，最终取沉淀，加入 50  $\mu\text{L}$  PBS 混匀。将锡纸平整地包裹在载玻片上，将清洗好的菌液滴取 10  $\mu\text{L}$  滴在锡纸板上，重复 3 滴，置于超净台中等待液滴干燥。干燥细菌样本置于傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR)上，选择反射模式，波数范围为 4000~650  $\text{cm}^{-1}$ ，通过 64 次扫描的累积和平均获得光谱，光分辨率为 4  $\text{cm}^{-1}$ 。每个样本记录 20 个光谱。我们对光谱进行预处理，对原始光谱进行基线矫正，使用 Savitzky-Golay 方法(3 阶，10 点窗口)对光谱进行平滑[18]，将光谱归一化到区间(0, 1)，并对每个样本的 20 个光谱统计均值。基于 Python 环境构建了支持向量机(SVM)分类模型[19]，用于 FT-IR 数据的定性分析。鉴于光谱数据具有高度非线性的分布特征，选用径向基函数核(RBF)将原始特征映射至高维空间，以提升模型的线性可分性。在超参数配置方面，惩罚因子 C 设为 1.0，核函数参数  $\gamma$  采用自适应模式(Scale)。针对实验组间样本量的轻微差异，模型引入了类别权重平衡策略(Class Weight Balancing)。为严控过拟合风险并提升模型泛化能力，本研究采取了多重优化措施：首先，通过主成分分析(PCA)提取累积方差贡献率达 95% 的主成分，在保留核心特征信息的同时剔除冗余噪声；其次，将数据集按 7:3 的比例进行分层抽样划分，确保训练集与测试集的种类分布一致；最后，在训练集阶段实施五折分层交叉验证[20]，结合特征标准化预处理，确保了模型在未知样本上的稳定性和鲁棒性。

## 3. 结果与分析

### 3.1. 白花丹素和环丙沙星对 SA 的杀伤作用



**Figure 1.** Dose-response curves of (A) ciprofloxacin and (B) plumbagin against SA. Time-response curves of both drugs, either alone or in combination, against SA in (C) the log phase and (D) the stationary phase

**图 1.** (A)环丙沙星和(B)白花丹素对 SA 的剂量杀伤曲线，以及单独或联合对(C)指数期和(D)稳定期 SA 的时间杀伤曲线

使用二倍稀释法测得了 SA 在环丙沙星和 白花丹素中的 MIC 值分别为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。图 1(A), 图 1(B)展示了不同药物对 SA 的剂量 - 反应曲线: 当 CIP 浓度  $> 10 \times \text{MIC}$ , 活菌数趋于稳定, 且环丙沙星在指数期的杀伤效果更好。当 PLU 浓度  $> 16 \times \text{MIC}$ , 指数期和稳定期的 SA 均被清除, 说明高浓度的 白花丹素对 SA 具有更强的杀伤力。从指数期和稳定期 SA 的时间杀伤曲线(图 1(C), 图 1(D))中可以发现 CIP 对指数期 SA 的杀伤率优于稳定期, 而 PLU 作用效果刚好相反, CIP + PLU 联用对指数期和稳定期 SA 均呈现相加效果。

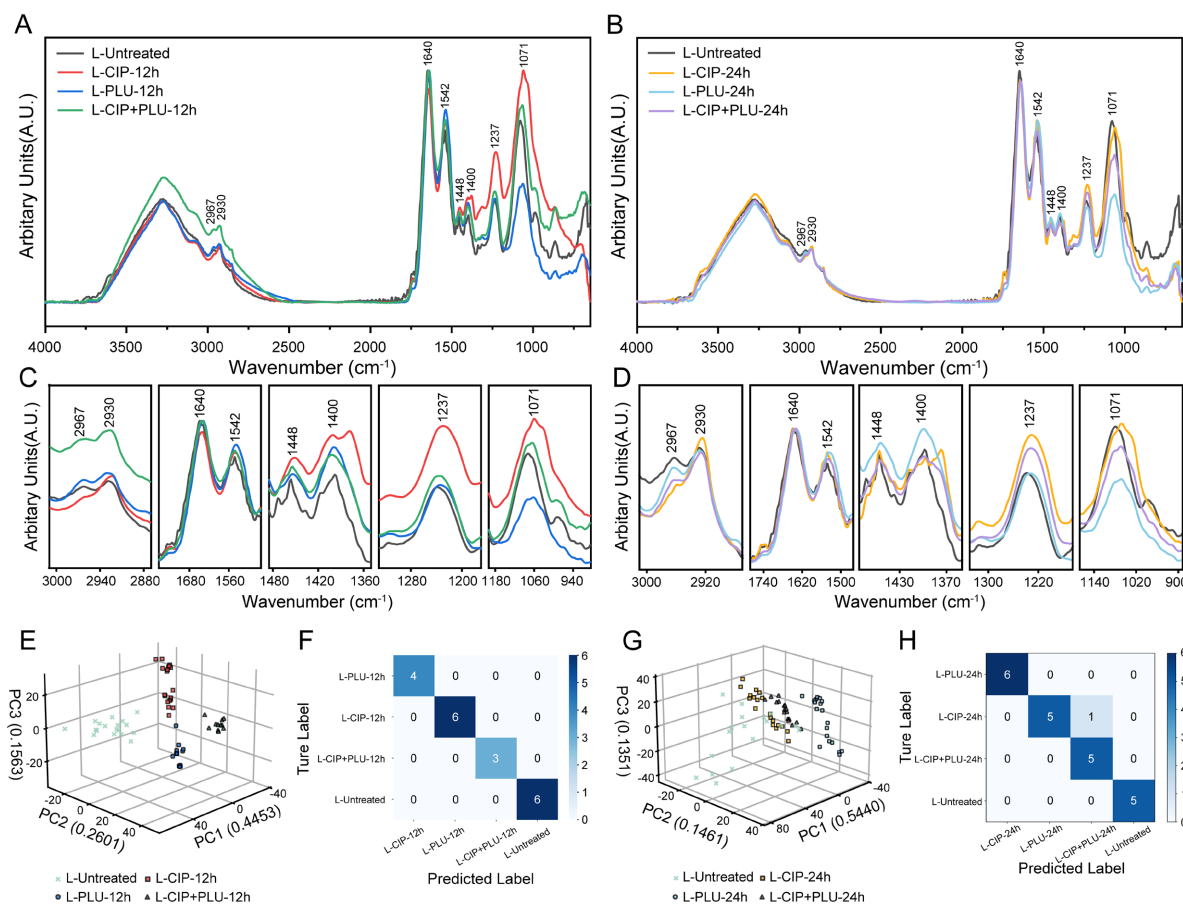
### 3.2. 指数期 SA 的 FT-IR 改变

利用傅里叶变换红外光谱仪采集光谱, 探究 SA 在 白花丹素和环丙沙星作用后细胞结构的动态变化, 并对 SA 的光谱波段的物质归属进行指认(表 1)。图 2(A), 图 2(B)显示, 指数期 SA 在 白花丹素作用 12 h 后, 脂肪酸  $\text{CH}_3$  和  $\text{CH}_2$  不对称拉伸(2967 和 2930  $\text{cm}^{-1}$ )和核酸  $\text{PO}_2$  和  $\text{P}=\text{O}$  拉伸(1237  $\text{cm}^{-1}$ )的相关峰变化不明显, 但表征蛋白质中 C-N、N-H 和 C=O 的酰胺 II 相关峰(1542  $\text{cm}^{-1}$ )升高, 提示菌体可能产生了应激性蛋白合成或蛋白质变性; 而代表细胞壁多糖及能量储备的碳水化合物 C-O-C、C-O、C-O-P 和 P-O-P 拉伸的相关峰(1071  $\text{cm}^{-1}$ )显著降低, 这表明白花丹素可能干扰了胞外多糖的合成[21]。相比之下, 环丙沙星作用 12 h 后, 脂肪酸相关峰表现出复杂波动: 2930  $\text{cm}^{-1}$  升高、2967 和 1400  $\text{cm}^{-1}$  降低、且在代表  $\text{COO}^-$  基团对称拉伸的 1400  $\text{cm}^{-1}$  处出现双峰, 说明细胞膜脂质排列、链长和膜流动性受到了干扰, 膜结构完整性被破坏[22]; 此外, 1542  $\text{cm}^{-1}$  升高同样反映了环丙沙星诱导下的蛋白质代谢异常, 而核酸(1237  $\text{cm}^{-1}$ )和多糖(1071  $\text{cm}^{-1}$ )波段变化不明显。为了进一步量化不同药物处理对 SAFT-IR 光谱指纹图谱造成的整体差异并实现分类判别, 本研究采用光谱主成分分析(PCA)进行降维可视分析, 并结合支持向量机(SVM)构建模型。PCA 结果显示, 前 3 个主成分的累积贡献率为 86.17%, 其中主成分 1 (PC1)贡献了 44.53% 的方差, 主成分 2 (PC2)占总体方差的 26.01%。各组样本间明显区分, 组内样本分布集中(图 2(D))。SVM 模型中, 测试集的准确率达到 100%, 表明所有样本被准确分类, 未出现误判, 可认为该模型具有对未知数据的最佳泛化能力(图 2(E))。结果表明在药物作用早期, 白花丹素未明显破坏指数期 SA 的细胞膜和核酸结构, 却减少了胞外多糖; 环丙沙星造成了细胞膜完整性受损、膜流动性增加, 对核酸损伤尚不明显; 此外, 两种药物均改变了蛋白质酰胺 II 的空间结构。

**Table 1.** Assignments of the functional groups associated with major vibrational bands in spectra [24]

**表 1.** 光谱中主要振动带相关的官能团归属[24]

波数( $\text{cm}^{-1}$ )	官能团的分子振动和贡献的生物分子
2967	脂肪酸中 $\text{CH}_3$ 的不对称拉伸
2930	脂肪酸中 $\text{CH}_2$ 不对称拉伸
1640	蛋白质中 C-N、N-H 和 C=O 的酰胺 I 对称拉伸
1542	蛋白质中 C-N、N-H 和 C=O 的酰胺 II 对称拉伸
1448	脂质的 C-H 和 $\text{CH}_2$ 弯曲振动
1400	脂肪酸和氨基酸 $\text{COO}^-$ 基团的对称拉伸
1237	核酸官能团 $\text{PO}_2$ 和 $\text{P}=\text{O}$ 的拉伸
1071	碳水化合物(C-O-C、C-O、C-O-P 和 P-O-P)的拉伸

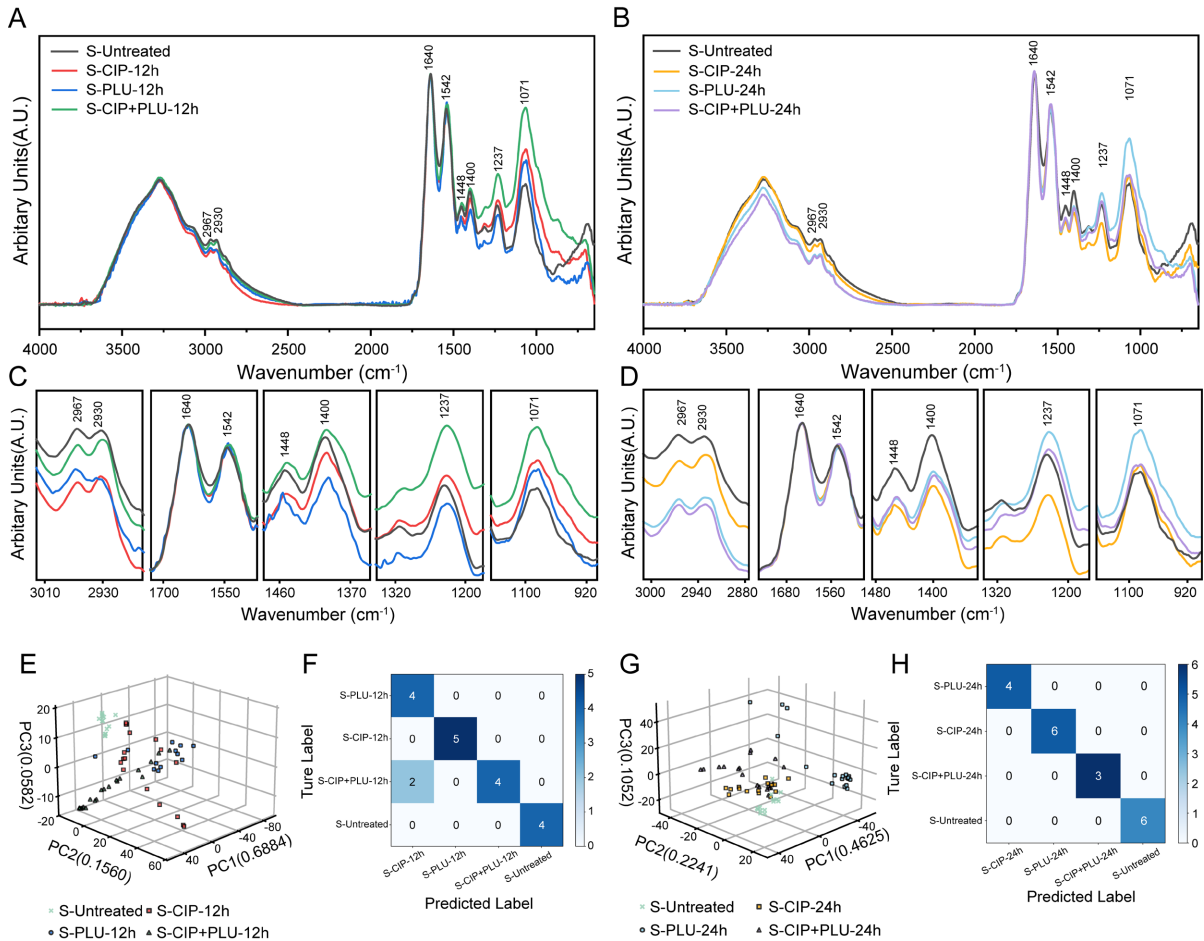


**Figure 2.** Near-infrared spectral analysis of SA in the log phase under the influence of ciprofloxacin and plumbagin. (A) Average spectrum and (C) enlarged view of characteristic spectral peaks, (E) principal component analysis (PCA) score plot, and (F) SVM confusion matrix (accuracy 100%) at 12 hours post-drug administration. (B) Average spectrum and (D) enlarged view of characteristic spectral peaks, (G) principal component analysis (PCA) score plot, and (H) SVM confusion matrix (accuracy 95.45%) after 24 h of drug treatment

**图 2.** 指数期 SA 在环丙沙星和白花丹素作用下的 FT-IR 光谱分析。药物作用 12 h 的(A)平均光谱和(C)光谱特征峰放大图、(E)主成分分析得分图和(F) SVM 混淆矩阵(准确率 100%)。药物作用 24 h 的(B)平均光谱和(D)光谱特征峰放大图、(G)主成分分析得分图和(H) SVM 混淆矩阵(准确率 95.45%)

随着药物作用至 24 h (图 2(C), 图 2(D)), 指数期 SA 的 FT-IR 光谱特征呈现出随时间依赖的变化。白花丹素处理组核酸波段变化仍不明显, 而脂肪酸特征峰  $2967\text{ cm}^{-1}$  强度却增加, 提示白花丹素破坏了细胞膜完整性,  $1542\text{ cm}^{-1}$  强度的持续升高和  $1071\text{ cm}^{-1}$  的显著降低, 说明白花丹素对蛋白质空间构象和胞外多糖的持续抑制作用; 环丙沙星在 24 h 则表现出更具穿透性的损伤,  $2930\text{ cm}^{-1}$  升高程度较早期(12 h)更为显著(图 2(D)), 不同于 12 h 的是, 后期核酸相关峰( $1237\text{ cm}^{-1}$ )出现明显升高, 提示随处理时间延长, 环丙沙星损伤了核酸的分子结构[23]。PCA 中 3 个主成分的累积贡献率为 82.53%, 各处理组在 PC1 轴上 (54.40%)表现出更强的区分度。处理组中组内样本分布集中, 3 组间在 PC1 上明显区分; 但未处理组样本较分散, 与其他组样本有少数交集(图 2(F))。SVM 模型的混淆矩阵中, 测试集的准确率为 95.45%, 对药物作用前后细菌状态的判别能力较强, 仅在 CIP 单独处理组和联合处理组中误判了 1 例(图 2(G))。结果表明在药物作用后期, 白花丹素仍未明显破坏指数期 SA 的核酸结构, 但细胞膜完整性出现损伤, 蛋白质空间结构被改变, 胞外多糖大量减少; 环丙沙星破坏了核酸磷酸基团的结构, 比早期更大程度地破坏了细胞膜完整性, 增加了膜流动性。

### 3.3. 稳定期 SA 的 FT-IR 光谱改变



**Figure 3.** Near-infrared spectral analysis of SA in the stationary phase under the influence of ciprofloxacin and plumbagin. (A) Average spectrum and (C) enlarged view of characteristic spectral peaks, (E) principal component analysis (PCA) score plot, and (F) SVM confusion matrix (accuracy 89.47%) at 12 h post-drug administration. (B) Average spectrum and (D) enlarged view of characteristic spectral peaks, (G) principal component analysis (PCA) score plot, and (H) SVM confusion matrix (accuracy 100%) at 24 h post-treatment

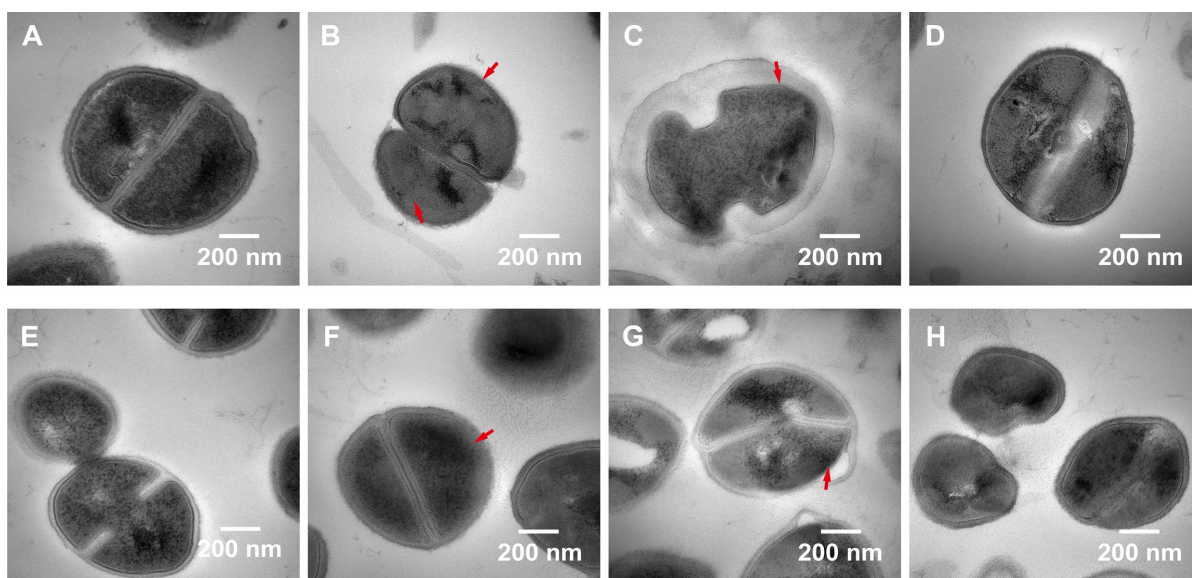
**图 3.** 稳定期 SA 在环丙沙星和白花丹素作用下的 FT-IR 光谱分析。药物作用 12 h 的(A)平均光谱和(C)光谱特征峰放大图、(E)主成分分析得分图和(F) SVM 混淆矩阵(准确率 89.47%)。药物作用 24 h 的(B)平均光谱和(D)光谱特征峰放大图、(G)主成分分析得分图和(H) SVM 混淆矩阵(准确率 100%)

在稳定期 SA 中，白花丹素作用 12 h 后  $2930\text{ cm}^{-1}$  和  $1400\text{ cm}^{-1}$  信号降低、 $2967\text{ cm}^{-1}$  变化不明显并伴随  $1542\text{ cm}^{-1}$  (酰胺 II) 升高(图 3(A)，图 3(C))，提示膜脂质含量减少并伴有蛋白质空间构象的重排；核酸相关峰  $1237\text{ cm}^{-1}$  强度变化不明显。环丙沙星作用 12 h 后，脂肪酸相关峰  $2930\text{ cm}^{-1}$  明显升高， $1400\text{ cm}^{-1}$  降低和酰胺 II 特征峰  $1542\text{ cm}^{-1}$  升高，提示膜流动性可能增加且蛋白质的空间结构改变；核酸  $1237\text{ cm}^{-1}$  峰减低说明细菌的 DNA 复制和结构受损。光谱主成分分析(PCA)中 3 个主成分的累积贡献率为 90.26%，其中主成分 1 (PC1) 贡献了 68.84% 的方差，主成分 2 (PC2) 占总体方差的 15.6%。未处理组中组内样本分布集中，但处理组样本较分散，组间有少数交集(图 3(E))。SVM 模型中测试集的准确率为 89.47%，对细菌状态的判别能力较强，仅在 CIP 单独处理组和联合处理组中误判了 2 例(图 3(F))。结果表明，在药物作用早期，白花丹素并未明显损伤核酸结构，但破坏了稳定期 SA 的细胞膜的完整性和蛋白质的空间结构，

此外白花丹素还可能引起了胞外多糖的分泌增多；环丙沙星增加了细胞膜的流动性，破坏了核酸中磷酸基团和蛋白质酰胺 II 的空间结构。

药物作用到 24 h，稳定期 SA 的 FT-IR 光谱特征峰同样存在随时间延长而发生的变化(图 3(B))，与 12 h 不同的是，白花丹素作用后脂肪酸中  $2930\text{ cm}^{-1}$  峰强度略微升高(图 3(D))，提示膜流动性增加；酰胺 II 相关峰  $1542\text{ cm}^{-1}$  升高，且变化程度较作用早期更大(图 3(D))，表明白花丹素对蛋白质结构的损伤程度加深。环丙沙星作用 24 h 后的特征峰变化与 12 h 相似，唯一不同的是  $1542\text{ cm}^{-1}$  升高程度同样比作用早期更大(图 3(D))。此外，两种药物单独作用后碳水化合物相关峰  $1071\text{ cm}^{-1}$  都升高(图 3(D))，提示胞内或胞外多糖成分增加，但两药联用 24 h 后此峰并无明显升高。光谱主成分分析(PCA)中 3 个主成分的累积贡献率为 79.18%，其中主成分 1 (PC1)贡献了 46.25%的方差，主成分 2 (PC2)占总体方差的 22.41%。未处理组中组内样本分布集中，但处理组样本较分散；除白花丹素处理组外，其余 3 组间没有明显区分(图 3(G))。然而在 SVM 模型中，测试集的准确率为 100%，能够准确判别不同状态的细菌(图 3(H))。结果表明，在药物作用后期，白花丹素 SA 增加了细胞膜的流动性，两种药都更大程度地破坏了蛋白质酰胺 II 的空间结构。

### 3.4. TEM 下 SA 的形态学观察



**Figure 4.** TEM images of SA. Cells in the log phase: (A) untreated group, (B) CIP-treated group, (C) PLU-treated group, and (D) CIP + PLU co-treated group. Cells in the stationary phase: (E) untreated group, (F) CIP-treated group, (G) PLU-treated group, and (H) CIP + PLU co-treated group. The duration of drug action for all treatment groups was 24 hours; the red arrows indicate damage to the cell membrane

**图 4.** SA 的 TEM 照片。指数期(A)未处理组、(B)环丙沙星处理组、(C)白花丹素处理组和(D)环丙沙星和白花丹素联合处理组的细胞。稳定期(E)未处理组、(F)环丙沙星处理组、(G)白花丹素处理组和(H)环丙沙星和白花丹素联合处理组的细胞。以上处理组的药物作用时间均为 24 h，红色箭头表示细胞膜损伤

采用透射电子显微镜(TEM)观察了 SA 的超微结构，结果显示不同生长阶段、不同药物处理组的 SA 形态结构存在显著差异。未处理组中，指数期细胞呈典型球形，具备完整的细胞壁和膜结构(图 4(A))，而稳定期细胞体积较指数期明显缩小(图 4(E))。环丙沙星单独处理后，指数期细胞出现隔膜内陷及胞质电子密度不均匀现象(图 4(B))，这是因为环丙沙星阻碍了 DNA 复制，使细胞停留在隔膜收缩分裂状态；稳定期和指数期都观察到细胞膜结构模糊，提示环丙沙星作用后细胞膜受到损伤(图 4(F))。相比之下，白花丹

素处理诱导了更为严重的形态损伤, 指数期表现为细胞壁增厚、结构松散, 细胞膜不连续, 且隔膜结构异常(图 4(C)), 这是因为白花丹素阻碍 FtsZ 等分裂蛋白的定位聚集, 导致隔膜合成受阻[17]; 稳定期细胞出现细胞膜和细胞壁破裂, 有空泡状突起, 胞内物质流失缺损(图 4(G))。当环丙沙星与白花丹素联合使用时, 指数期和稳定期菌株均表现出不规则皱缩变形和形态多样性, 伴随胞质致密凝聚物(DNA 与蛋白质沉淀)形成(图 4(D), 图 4(H))。

## 4. 讨论

本研究以临床常见的强致病菌的金黄色葡萄球菌(SA)为探讨对象。环丙沙星作为氟喹诺酮类抗生素, 主要通过抑制 DNA 旋转酶阻断 DNA 复制, 但近年来针对金黄色葡萄球菌感染的疗效呈下降趋势[25][26]。研究表明, 天然提取物与抗生素联用是增强疗效、缓解耐药的有效途径[27][28]。白花丹素作为天然来源的萘醌类化合物, 因其显著的药理活性和多靶点作用模式, 展现出巨大的药物联用潜力[29]-[31]。

在本研究中, 我们发现环丙沙星对指数期 SA 表现出显著的快速杀菌效果, 杀伤率远远高于稳定期。白花丹素对 SA 的杀伤效果却有极强的浓度依赖性, 两种药物联用对指数期和稳定期 SA 均表现为相加效果, 这与现有研究结果一致[16][17]。FT-IR 光谱分析从细胞分子结构方面初步探究了两药对 SA 的作用机制。环丙沙星破坏了细胞膜的完整性, 增加了膜流动性; 药物作用早期对核酸结构的损伤尚不明显, 但随着时间推移, 其对磷酸基团的损伤程度加深。相反, 白花丹素虽对指数期 SA 细胞膜的直接破坏作用有限, 却显著改变了蛋白质酰胺 II 的结构; 但在稳定期, 其对细胞膜完整性的破坏程度较指数期更明显。我们在 TEM 中观察到的 SA 细胞膜结构损伤也验证了 FT-IR 中的结果。环丙沙星和白花丹素的作用机制存在差异, 解释了两药联用能够覆盖不同生长阶段和结构靶点, 表现出相加的杀菌效果。

此外, 我们还发现白花丹素对 SA 胞外多糖的分泌具有明显的生长阶段差异性: 在指数期抑制了胞外多糖的产生; 而在稳定期反而引起了胞外多糖的分泌增加, 这可能是细菌在不同生理状态下对药物作用的差异化响应。指数期细菌代谢旺盛, 白花丹素可能干扰胞外多糖合成的相关通路, 从源头上阻断了生物膜基质的构建。而稳定期细菌生长缓慢, 细胞膜通透性改变。研究表明, 白花丹素能诱导细胞内活性氧(ROS)增加。稳定期 SA 受到深度细胞膜损伤时, 可能启动了代偿性应激保护机制, 通过增加胞外多糖的分泌来构建一层物理屏障。然而, 环丙沙星和白花丹素联用 24 h 后, 稳定期 SA 的胞外多糖分泌却并未增加。这暗示了两药之间的协同效应, 加剧了细胞膜的不可逆破坏, 使 SA 丧失了合成胞外多糖的能力。胞外多糖的分泌是金黄色葡萄球菌形成生物膜的最主要因素, 我们的发现与已有研究报道的白花丹素抑制生物膜形成的作用机制相符, 提示该药物在对抗细菌定植和生物膜形成具有独特优势[21][32]。

我们利用 PCA 和 SVM 模型对光谱进行了分类和判别。PCA 分析中, 各组样本组间区分明显, 表明药物处理后细菌的光谱特征发生了显著变化。SVM 模型在测试集上的准确率基本达到 90%以上, 说明 SA 在不同药物作用下产生的光谱特征变化具有高度的可识别性。

综上所述, 本研究不仅展示了环丙沙星和白花丹素联用对 SA 的高效杀菌作用, 还通过 FT-IR 光谱技术表现了其对细胞膜、蛋白质、核酸及胞外多糖等多重细胞结构的动态改变。基于此类光谱技术的检测平台可帮助临床评估抗生素疗效并指导个性化用药策略。

## 基金项目

1. 国家自然科学基金项目 National Natural Science Foundation of China, 11904061。
2. 广西科技计划项目 Guangxi Science and Technology Program, 桂科 AD23026196。
3. 广西自然科学基金项目 Guangxi Natural Science Foundation, 2024GXNSFBA010113。
4. 广西高校中青年骨干教师科研能力提升项目 Middle/Young aged Teachers' Research Ability Improvement

Project of Guangxi Higher Education, 2023KY0118。

5. 广西医科大学一流学科创新驱动人才计划 First-class discipline innovation-driven talent program of Guangxi Medical University。

## 参考文献

- [1] Cacace, E., Kim, V., Varik, V., Knopp, M., Tietgen, M., Brauer-Nikonow, A., *et al.* (2023) Systematic Analysis of Drug Combinations against Gram-Positive Bacteria. *Nature Microbiology*, **8**, 2196-2212. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01486-9>
- [2] Liu, X., Xu, W., Feng, J., Wang, Y., Li, K., Chen, Y., *et al.* (2025) Adoptive Cell Transfer of Piezo-Activated Macrophage Rescues Immunosuppressed Rodents from Life-Threatening Bacterial Infections. *Nature Communications*, **16**, Article No. 1363. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-56460-2>
- [3] Mlynarczyk-Bonikowska, B. and Rudnicka, L. (2025) The Pathogenicity Mechanisms of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Molecular Sciences*, **26**, Article No. 11803. <https://doi.org/10.3390/ijms262411803>
- [4] Kaul, G., Akhira, A., Shukla, M., Shafi, H., Akunuri, R., Pawar, G., *et al.* (2023) Oxiconazole Potentiates Gentamicin against Gentamicin-Resistant *Staphylococcus aureus* *In Vitro* and *In Vivo*. *Microbiology Spectrum*, **11**, Article ID: 05031-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.05031-22>
- [5] AL-Harbi, A.I., AL-Mohammadi, N.A., AL-Hubayshi, N.E. and AL-Mehayawi, S.S. (2024) Prevention and Control towards Hospital-Acquired Infections, Mixed-Methods Systemic Review. *Global Journal of Health Science*, **16**, Article No. 48. <https://doi.org/10.5539/gjhs.v16n6p48>
- [6] Silva-Santana, G. (2025) *Staphylococcus aureus*: Dynamics of Pathogenicity and Antimicrobial-Resistance in Hospital and Community Environments—Comprehensive Overview. *Research in Microbiology*, **176**, Article ID: 104267. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2025.104267>
- [7] Jia, Y. and Zhao, L. (2021) The Antibacterial Activity of Fluoroquinolone Derivatives: An Update (2018-2021). *European Journal of Medicinal Chemistry*, **224**, Article ID: 113741. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113741>
- [8] Saeful, A., Fuza Khoirun, N., Yosi, S., *et al.* (2025) Kajian Kimia Medisinal Ciprofloxacin: Mekanisme Kerja, Antibakteri, dan Pola Resistensi Bakteri. *Jurnal Ilmiah Kedokteran dan Kesehatan*, **4**, 121-131. <https://doi.org/10.55606/klinik.v4i2.3923>
- [9] Yu, X.H., Hao, Z.H., Liu, P.L., Liu, M.M., Zhao, L.L. and Zhao, X. (2022) Increased Expression of Efflux Pump *norA* Drives the Rapid Evolutionary Trajectory from Tolerance to Resistance against Ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **66**, Article ID: 00594-22. <https://doi.org/10.1128/aac.00594-22>
- [10] Hwang, J., Barman, S., Gao, R., Yang, X., O'Malley, A., Nagarkatti, P., *et al.* (2023) Membrane-Active Metallopolymers: Repurposing and Rehabilitating Antibiotics to Gram-Negative Superbugs. *Advanced Healthcare Materials*, **12**, Article ID: 2301764. <https://doi.org/10.1002/adhm.202301764>
- [11] Si, Z., Pethe, K. and Chan-Park, M.B. (2023) Chemical Basis of Combination Therapy to Combat Antibiotic Resistance. *JACS Au*, **3**, 276-292. <https://doi.org/10.1021/jacsau.2c00532>
- [12] Wang, N., Luo, J., Deng, F., Huang, Y. and Zhou, H. (2022) Antibiotic Combination Therapy: A Strategy to Overcome Bacterial Resistance to Aminoglycoside Antibiotics. *Frontiers in Pharmacology*, **13**, Article ID: 839808. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.839808>
- [13] Zouine, N., Ghachtouli, N.E., Abed, S.E. and Koraichi, S.I. (2024) A Comprehensive Review on Medicinal Plant Extracts as Antibacterial Agents: Factors, Mechanism Insights and Future Prospects. *Scientific African*, **26**, e02395. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2024.e02395>
- [14] Guo, L., Li, Y., Feng, J., Li, Y., Liao, Y., Zeng, Q., *et al.* (2025) Antibacterial Activity and Potential Mechanisms of Plumbagin against *Escherichia Coli* and Its Application in Milk. *Current Research in Food Science*, **10**, Article ID: 101083. <https://doi.org/10.1016/j.crf.2025.101083>
- [15] Janeczko, M., Demchuk, O.M., Strzelecka, D., Kubiński, K. and Masłyk, M. (2016) New Family of Antimicrobial Agents Derived from 1,4-Naphthoquinone. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **124**, 1019-1025. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.10.034>
- [16] Bie, S., Mo, Q., Shi, C., Yuan, H., Li, C., Wu, T., *et al.* (2024) Interactions of Plumbagin with Five Common Antibiotics against *Staphylococcus aureus* *In Vitro*. *PLOS ONE*, **19**, e0297493. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0297493>
- [17] Periasamy, H., Iswarya, S., Pavithra, N., Senthilnathan, S. and Gnanamani, A. (2019) *In Vitro* Antibacterial Activity of Plumbagin Isolated from *Plumbago zeylanica* L. against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, **69**, 41-49. <https://doi.org/10.1111/lam.13160>

- [18] Li, H., Wang, S., Zeng, Q., Chen, C., Lv, X., Ma, M., *et al.* (2022) Serum Raman Spectroscopy Combined with Multiple Classification Models for Rapid Diagnosis of Breast Cancer. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **40**, Article ID: 103115. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103115>
- [19] Cai, Q., Yuan, R., He, J., Li, M. and Guo, Y. (2021) Predicting HIV Drug Resistance Using Weighted Machine Learning Method at Target Protein Sequence-Level. *Molecular Diversity*, **25**, 1541-1551. <https://doi.org/10.1007/s11030-021-10262-y>
- [20] Wu, C., Huang, H., Huang, S., Chen, I., Liao, S., Chen, C., *et al.* (2021) Resting-State EEG Signal for Major Depressive Disorder Detection: A Systematic Validation on a Large and Diverse Dataset. *Biosensors*, **11**, Article No. 499. <https://doi.org/10.3390/bios11120499>
- [21] Bie, S., Yuan, H., Shi, C., Li, C., Lu, M., Yao, Z., *et al.* (2025) Antibiofilm Activity of Plumbagin against *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, **15**, Article No. 7948. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-92435-5>
- [22] Vásquez, A., Echeverri-Gaviria, S. and Manrique-Moreno, M. (2025) Modulation of Antimicrobial Peptide-Membrane Interactions by Lysyl-Phosphatidylglycerol in *Staphylococcus aureus*: An FTIR Spectroscopy Study. *Scientia Pharmaceutica*, **93**, Article No. 49. <https://doi.org/10.3390/scipharm93040049>
- [23] Kamaruzzaman, A.N.A., Tengku Zainal Mulok, T.E., Mohamad Nor, N.H. and Raja Yahya, M.F.Z. (2022) FTIR Spectral Changes in Candida Albicans Biofilm Following Exposure to Antifungals. *Malaysian Applied Biology*, **51**, 57-66. <https://doi.org/10.55230/mabjournal.v51i4.11>
- [24] Suleiman, M., Abu-Aqil, G., Sharaha, U., Riesenber, K., Lapidot, I., Salman, A., *et al.* (2022) Infra-Red Spectroscopy Combined with Machine Learning Algorithms Enables Early Determination of *Pseudomonas aeruginosa*'s Susceptibility to Antibiotics. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **274**, Article ID: 121080. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121080>
- [25] Li, M., Jian, Q., Ye, X., Jing, M., Wu, J., Wu, Z., *et al.* (2025) Mechanisms of Mepa Overexpression and Membrane Potential Reduction Leading to Ciprofloxacin Heteroresistance in a *Staphylococcus aureus* Isolate. *International Journal of Molecular Sciences*, **26**, Article No. 2372. <https://doi.org/10.3390/ijms26052372>
- [26] Shariati, A., Arshadi, M., Khosrojerdi, M.A., Abedinzadeh, M., Ganjalishahi, M., Maleki, A., *et al.* (2022) The Resistance Mechanisms of Bacteria against Ciprofloxacin and New Approaches for Enhancing the Efficacy of This Antibiotic. *Frontiers in Public Health*, **10**, Article ID: 1025633. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1025633>
- [27] Basavegowda, N. and Baek, K. (2022) Combination Strategies of Different Antimicrobials: An Efficient and Alternative Tool for Pathogen Inactivation. *Biomedicines*, **10**, Article No. 2219. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092219>
- [28] Manso, T., Lores, M. and de Miguel, T. (2021) Antimicrobial Activity of Polyphenols and Natural Polyphenolic Extracts on Clinical Isolates. *Antibiotics*, **11**, Article No. 46. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010046>
- [29] Petrocelli, G., Marrazzo, P., Bonsi, L., Facchin, F., Alviano, F. and Canaider, S. (2023) Plumbagin, a Natural Compound with Several Biological Effects and Anti-Inflammatory Properties. *Life*, **13**, Article No. 1303. <https://doi.org/10.3390/life13061303>
- [30] Huang, A., Su, L., He, W., Zhang, F., Wei, C. and Wang, Y. (2022) Natural Component Plumbagin as a Potential Antibacterial Agent against *Streptococcus agalactiae* Infection. *Journal of Fish Diseases*, **45**, 815-823. <https://doi.org/10.1111/jfd.13606>
- [31] Wang, Y., Kong, J., Zhang, X., Liu, Y., Huang, Z., Yuan, L., *et al.* (2022) Plumbagin Resurrect Colistin Susceptible against Colistin-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* *In Vitro* and *In Vivo*. *Frontiers in Microbiology*, **13**, Article ID: 1020652. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1020652>
- [32] Yuan, H., Lu, M., Shi, C., Li, C., Yao, Z., Shang, H., *et al.* (2025) Plumbagin Disrupts the Mature Biofilm of *Staphylococcus aureus*. *Biofouling*, **41**, 1132-1144. <https://doi.org/10.1080/08927014.2025.2589802>