

罗汉果抑制大肠埃希菌生物膜活性成分的筛选

王海洋, 王涛, 李红月, 徐多多*
(长春中医药大学, 长春 130117)

[摘要] 目的:研究罗汉果抑制大肠埃希菌生物膜(BBF)有效部位的化学成分及单体活性。方法:以大肠埃希菌 BBF 为模型对罗汉果的有效部位进行筛选,采用柱色谱等方法分离其有效部位中的化学成分,鉴定其结构,并研究它们对大肠埃希菌生物膜的影响。结果:95%乙醇洗脱部位为有效部位,并从中分离得到 3 个化合物,分别为十六烷酸(1),环-(亮氨酸-异亮氨酸)(2),谷甾醇-3-O-葡萄糖(3)。在质量浓度为 1 000 mg·L⁻¹时,化合物 1,2,3 对大肠埃希菌生物膜的抑制率分别为 51.47%,76.34%,67.01%。结论:化合物 3 首次从罗汉果中分离得到。

[关键词] 罗汉果; 大肠埃希菌; 细菌生物膜; 谷甾醇-3-O 葡萄糖

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)02-0051-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016020051

Selecting Active Constituents of Siraitiae Fructus on Inhibition of *Escherichia coli* Bacterial Biofilms

WANG Hai-yang, WANG Tao, LI Hong-yue, XU Duo-duo*
(Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effective fraction and compounds from Siraitiae Fructus on inhibition of *Escherichia coli* biofilms. **Method:** The *E. coli* bacterial biofilms (BBF) was used as the model to screen the effective fraction of Siraitiae Fructus. The chemical compounds were isolated from effective fraction by column chromatography to identify their structures and study their effect on *E. coli* bacterial biofilms. **Result:** 95% ethanol elution fraction was the effective fraction, and 3 compounds were obtained from it, including palmitic acid (1), ring- (leucine-isoleucine acid) (2) and daucosterol (3) respectively. Under the concentration of 1 000 mg·L⁻¹, the inhibition rates of compound 1, 2, 3 were 51.47%, 76.34% and 67.01% on *E. coli* bacterial biofilms. **Conclusion:** Compound 3 is isolated from Siraitiae Fructus for the first time.

[Key words] Siraitiae Fructus; *Escherichia coli*; bacterial biofilm; daucosterol

慢性感染是一种临床常见的疾病,人们一直认为细菌是以单个浮游状态存在。近年来,随着研究和诊断技术的不断进步,人们研究发现,大多数细菌在生长过程中为了适应周围不利的生存环境,自身能够分泌一些胞外基质,从而形成具有保护作用的细菌生物膜(bacterial biofilm, BBF)^[1]。BBF 是由许多细菌聚集黏结在一起分泌的一种特殊黏性物质,主要是由多糖、蛋白、核酸、脂类等交联在一起形成

“薄膜”,将细菌“保护”在里面,使其能够逃脱机体免疫系统的攻击以及抗菌药物的杀伤,自由地在体内散播,并表现出高度耐药性^[2]。据统计,由细菌引起的人体感染中至少有 80% 与生物膜形成有关,如肺囊性纤维化、牙周炎、瓣膜心内膜炎、中耳炎、慢性前列腺炎等慢性细菌感染疾病^[3]。本文采用 BBF 作为慢性感染模型,能够更加真实地模拟人体细菌感染状态,更好地进行药物筛选。

[收稿日期] 20150107(019)

[基金项目] 吉林省科技发展项目(20120743)

[第一作者] 王海洋,在读硕士,从事天然药物化学的研究工作, Tel:15144109315, E-mail:why_wang9132@126.com

[通讯作者] * 徐多多,博士,助理研究员,从事天然药物化学研究工作, Tel:0431-86172046, E-mail:czxuduoduo@163.com

中药在治疗慢性感染性疾病方面有着良好的效果,汪长中等^[4-6]的研究表明,黄连解毒汤、野菊花、牡丹皮水煎剂等对白色念珠菌 BBF 具有明显的抑制作用;黄晓敏等^[7-9]研究显示溪黄草复方、五倍子水提物、茶树油等对金黄色葡萄球菌 BBF 具有明显的清除、杀菌作用;也有研究表明中药复方百肤青对大肠杆菌 BBF 及铜绿假单胞菌 BBF 具有显著的抑制作用^[10-11],但是目前的研究大部分都是针对复方及单体对 BBF 的抑制作用,而以 BBF 作为模型对中药进行化学成分筛选的报道却很少。

罗汉果被誉为“东方神果”,是我国传统的药用植物,具有清热润肺、镇咳祛痰、降血糖、抗氧化、免疫增强等功效^[12-15],现代药理研究表明,罗汉果具有良好的抑菌效果,但其抑制 BBF 活性尚未见报道。本文采用大肠埃希菌 BBF 为模型筛选罗汉果的有效部位,并从中分离化学成分,鉴定其结构,为进一步阐明其药效物质基础提供理论依据。

1 材料

DHP-9025 型电热恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司),SJ-CJ-2D 型双人工作净化台(苏州净化设备有限公司),MK3 型酶标仪(上海热电仪器有限公司),WGZ-3-XJ 型细菌浊度仪(上海晰瑞仪器仪表有限公司),96 孔细菌培养板(海门市天龙实验仪器制造厂),D-101 型大孔树脂(沧州宝恩化工有限公司)。

大肠埃希菌,中国科学院微生物研究所(菌种编号 1.1369);罗汉果药材,购自于同仁堂药店,经长春中医药大学高其品教授鉴定为葫芦科植物罗汉果 *Siraitia grosvenorii* 的干燥果实。

营养肉汤培养基(NB,北京美坛公司),脱氧胆酸钠(北京鼎国生物技术有限公司),结晶紫(天津市华东试剂厂),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 BBF 活性的测定 依据本实验室建立的 BBF 模型进行实验^[16]。将大肠埃希菌(*Escherichia coli*)菌落增殖培养,用 NB 培养基将菌液的麦氏比浊度调至 0.5 CFU 后,将菌液稀释 100 倍加入到 96 孔细菌培养板中,每孔 100 μL 。将菌液 80 μL 与待测样品 20 μL 共同加入到首行,其余各行倍比稀释,以菌液作为空白。将上述 96 孔板置于恒温培养箱中培养,培养 24 h 后,将液体倾出,用蒸馏水反复清洗,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘干,然后向其加入 0.2% 的结晶紫溶液 150 μL 进行染色,染色 30 min 后,倾出液体,用蒸馏水冲洗,然后加入 1% 的脱氧胆酸钠溶液

150 μL 脱色 30 min 后,置酶标仪上于 590 nm 下测定其吸光度 A ,计算抑制率。

$$\text{BBF 抑制率} = (A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白}} \times 100\%$$

$A_{\text{空白}}$ 为不加样品只加菌液培养后的吸光度, $A_{\text{样品}}$ 为菌液和样品共同培养后的吸光度。

2.2 罗汉果有效部位的筛选 取干燥罗汉果果实 500 g,粉碎并均分成 2 份,其中 1 份,加 8 倍量的蒸馏水,煎煮 3 次,每次 1 h,过滤,合并滤液,浓缩,干燥,得罗汉果水提取物(A)。另 1 份样品,加 8 倍量 90% 乙醇,加热回流提取 3 次,每次 1 h,过滤,合并提取液,回收溶剂,干燥,得罗汉果乙醇提取部位(B)。将 B 用 30% 乙醇溶解,经过 D101 大孔树脂,分别用 30%,50%,70%,95% 乙醇洗脱,收集洗脱液,回收乙醇,干燥,分别得到 30%,50%,70%,95% 乙醇提取部分。以上 A~F 部分各取 10 mg,用蒸馏水 10 mL 溶解。按照 2.1 项下方法考察 BBF 活性。

2.3 活性部位的分离 取有效部位(60.7 g),通过硅胶 G(200~300 目)色谱,用三氯甲烷-甲醇(100:0~0:100)梯度洗脱,TLC 检识,合并后,得到 3 个部分(Fr I~Fr III)。Fr I(3.47 g)经硅胶 G 柱色谱,石油醚-乙酸乙酯(100:12~100:15)梯度洗脱,三氯甲烷重结晶,得化合物 1(21 mg)。Fr II(10.74 g)经硅胶 G 柱色谱,三氯甲烷-甲醇(1000:7~1000:12)梯度洗脱,得 Fr1(210 mg)。Fr1 经羟甲基葡聚糖凝胶(三氯甲烷-甲醇 4:6)纯化得化合物 2(32 mg)。Fr III(16.99 g)经硅胶 G 柱色谱,三氯甲烷-甲醇(200:1~200:4)梯度洗脱,得到 Fr2(264 mg)。Fr2 经中压硅胶 G(三氯甲烷-乙醇)柱色谱,羟甲基葡聚糖纯化后得化合物 3(21 mg)。各单体化合物分别经 HPLC 鉴定其纯度,采用 IR, NMR, MS 等方法鉴定其化学结构。按照 2.1 项下考察各单体化合物抑制 BBF 的活性。

2.4 罗汉果各提取部位对大肠埃希菌生物膜的活性 各提取部位对大肠埃希菌生物膜活性见表 1。由表可知,乙醇提取部位活性明显优于水煎部位,故采用 90% 乙醇进行提取。B 部位进一步采用大孔树脂进行分离,其中,30% 乙醇洗脱部位无活性,50%,70%,95% 乙醇洗脱部分均有一定的效果,故将此 3 部分合并。

活性部位的提取步骤为将罗汉果用 90% 乙醇提取,提取物用 30% 乙醇溶解,经过 D101 大孔树脂,分别用 30%,95% 乙醇洗脱,收集 95% 乙醇洗脱液,回收洗脱液,干燥,得 95% 乙醇洗脱液为罗汉果抑制 BBF 的活性部位。

表 1 不同质量浓度罗汉果各提取部位对大肠埃希菌 BBF 的活性抑制率

提取部位	1 000 mg·L ⁻¹	500 mg·L ⁻¹	250 mg·L ⁻¹	125 mg·L ⁻¹	62.5 mg·L ⁻¹	31.25 mg·L ⁻¹	15.63 mg·L ⁻¹	%
A	53.02	43.11	11.48	0.00	0.00	0.00	0.00	
B	74.97	56.74	52.69	38.95	28.03	17.24	16.54	
C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
D	55.58	50.64	45.39	32.15	22.24	11.29	10.16	
E	78.32	65.43	60.95	52.35	43.27	40.15	39.51	
F	87.62	81.59	79.11	78.63	64.87	62.92	60.27	

2.5 活性部位单体化合物的鉴定 化合物 **1** 白色片状结晶, mp 65 ~ 66 °C。碘酸钾-碘化钾试剂试验呈阳性, 说明为脂肪酸类化合物, HPLC-MS 知其分子量为 256, IR (KBr) cm⁻¹: 2 917, 2 848 (-COOH), 2 930, ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) δ: 2.34 (2H, t, J = 7.2 Hz, 2-H), 1.63 (2H, m, 15-H), 1.25 (24H, br s, 3 ~ 14-H), 0.88 (3H, t, J = 7.2 Hz, 16-CH₃)。 ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) δ: 178.74 (C-1), 33.83 (C-2), 31.92 (C-14), 29.66 ~ 29.06 (C-4 ~ C-13), 24.70 (C-3), 22.68 (C-15), 14.11 (C-16)。查阅文献, 化合物数据与文献[17]一致, 鉴定此化合物为直链饱和十六烷酸。

化合物 **2** 白色针状晶体(丙酮-甲醇), mp 243 ~ 245 °C。0.2% 茚三酮反应呈阳性, TLC 检视, 遇碘显淡棕红色斑点, HPLC-MS 显示 [M]⁺ 为 247.2, [M]⁻ 为 245.2, 246。IR (KBr) cm⁻¹: 3 191 (-NH) 处表现出中等强度的尖锐峰形, 1 665 (-CONH) 处表现出强峰信号, 由此可推断该化合物为环肽类生物碱。¹H-NMR (DMSO) 低场区化学位移 δ_H 8.15 和 δ_H 8.02 (br s) 表明该化合物中含有 2 个酰胺质子; ¹³C-NMR (400 MHz, DMSO) δ_C: 168.35, 166.82 为 2 个羰基碳信号峰, 表明该化合

物为环二肽类生物碱。查阅文献, 数据与文献[18]一致, 鉴定此化合物 **2** 为环-(亮氨酸-异亮氨酸)。

化合物 **3** 白色粉末, mp 270 ~ 273 °C。Molish 反应为阳性, Libermann-Burchard 反应呈阳性; 由 HPLC-MS 图分析可知该化合物的相对分子质量为 575.43; ¹H-NMR (DMSO) δ: 0.65 (3H, d, J = 4.2 Hz, CH₃), 0.92 (3H, s, CH₃), 0.86 (3H, s, CH₃), 0.88 (3H, s, CH₃), 0.91 (3H, s, CH₃), 0.84 (3H, s, CH₃), 3.95 (1H, m, H-3), 5.35 (1H, s, H-6), 4.59 (1H, d, J = 10.5 Hz, Glu H-1'), 3.75 ~ 4.50 (7H, m, 3-H 和糖上 6 个 H)。 ¹³C-NMR (DMSO) δ_C: 19.36 × 10⁻⁶ 显示了该物质的结构基础为甾体类化合物结构, 78.33 (C-3) 为连接羟基的碳信号, 145.24 (C-5), 119.97 (C-6), 为双键上的 2 个碳信号, 75.62 (C-2'), 78.33 (C-3'), 71.91 (C-4'), 75.62 (C-5'), 62.94 (C-6') 为糖上的碳信号。查阅文献, 核磁数据与文献[19]一致, 鉴定此化合物 **3** 为谷甾醇-3-O-葡萄糖。

2.6 单体化合物对大肠埃希菌 BBF 的抑制作用 各单体化合物对大肠埃希菌 BBF 均具有较好的抑制作用。在 3 个化合物中, 化合物 **2** 的活性最好, 随着浓度的增加, 抑制率增加。见表 2。

表 2 不同质量浓度罗汉果各单体对大肠埃希菌 BBF 抑制率

化合物	1 000 mg·L ⁻¹	500 mg·L ⁻¹	250 mg·L ⁻¹	125 mg·L ⁻¹	62.5 mg·L ⁻¹	31.25 mg·L ⁻¹	15.63 mg·L ⁻¹	%
1	51.47	50.76	49.81	33.91	31.21	34.67	29.57	
2	76.34	71.04	60.03	43.79	43.53	24.56	15.32	
3	67.01	59.90	52.73	46.55	23.40	18.06	8.39	

3 讨论

本文采用大肠埃希菌 BBF 模型对中药材罗汉果中的抑菌活性部位进行筛选, 并分离其中的化学成分, 研究单体化合物活性。从中分离得到了 3 个单体化合物, 分别为十六烷酸(**1**), 环-(亮氨酸-异亮

氨酸)(**2**), 谷甾醇-3-O-葡萄糖(**3**), 其中, 化合物 **3** 首次从罗汉果中分离得到。3 个单体化合物对大肠埃希菌 BBF 均具有较好的抑制作用, 在质量浓度为 1 000 mg·L⁻¹ 时, 化合物 **1, 2, 3** 对大肠埃希菌生物膜的抑制率分别为 51.47%, 76.34%, 67.01%。

过去对抗菌药物进行筛选主要采用抑菌圈法或对倍稀释法等,这些抗菌模型均以浮游细菌作为研究对象。一方面,抗生素等药物对这些细菌均有很好的抑制作用;另一方面,抗生素的耐药问题却日益突出。生物膜作为细菌耐药的主要机制之一已经成为抗感染领域的重要课题。大肠埃希菌是最常见的革兰阴性致病菌,也是医院感染的主要病菌之一,在特定条件下极易形成BBF,故本文选择大肠埃希菌BBF作为筛选模型。

中药在治疗慢性感染性疾病具有良好的效果,我们探索中药罗汉果的抗菌成分,为进一步阐明抗菌机制打下基础。

[参考文献]

[1] 徐多多,姜翔之,高阳,等. 金银花抑制大肠埃希菌生物膜活性部位的化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20): 122-125.

[2] 黄干荣,李晓华,黄衍强,等. 大黄素等提取物对耐药性大肠杆菌生物膜形成的影响[J]. 中成药, 2013, 35(12): 2602-2605.

[3] 朱斌,吴安华. 生物膜,细菌感染控制面临的新挑战[J]. 中国感染控制面临的新挑战, 2004, 3(2): 185-188.

[4] 汪长中,程惠娟,官妍,等. 黄连解毒汤体外对白念珠菌生物膜形成的影响[J]. 热带病与寄生虫学杂志, 2007, 5(2): 82-84.

[5] 汪长中,程惠娟,徐胜利,等. 中药水提物对白念珠菌生物膜抑制作用的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2009, 21(11): 965-968.

[6] 汪长中,程惠娟,官妍,等. 牡丹皮水煎剂对体外白念珠菌生物膜的抑制作用[J]. 微生物学杂志, 2009, 29(2): 67-70.

[7] 黄晓敏,柯野,林良佳,等. 溪黄草复方对金黄色葡萄

球菌生物膜影响[J]. 中国公共卫生, 2009, 23(11): 1350-1352.

[8] 黄晓敏,王婧婷,汪若波,等. 五倍子水提取物对金黄色葡萄球菌生物膜的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(4): 536-539.

[9] 黄晓敏,王婧婷,陈春营,等. 金黄色葡萄球菌生物膜对茶树油的抵抗性研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(3): 590-592.

[10] 官妍,程惠娟,汪长中,等. 复方百肤青抗大肠杆菌引起细菌性阴道病生物膜的研究[J]. 中医药学刊, 2004, 22(9): 1644-1645.

[11] 程惠娟,官妍,汤华阳,等. 百肤青抗铜绿假单胞菌生物膜的作用[J]. 安徽中医学院学报, 2004, 23(5): 30-32.

[12] 李典鹏,张后瑞. 广西特产植物罗汉果的研究与应用[J]. 广西植物, 2000, 20(3): 270-276.

[13] 戚向阳,陈维军,宋云飞,等. 罗汉果提取物对糖尿病小鼠的降血糖作用[J]. 食品科学, 2003, 24(12): 124-127.

[14] 张俐勤,戚向阳,陈维军,等. 罗汉果提取物的抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2006, 27(1): 213-216.

[15] 王勤,王坤,戴盛明,等. 罗汉果甜苷对小鼠细胞免疫功能的调节作用[J]. 中药材, 2001, 24(11): 811-8124.

[16] 徐多多,潘志,高阳,等. 细菌生物膜模型的建立及注射用双黄连对细菌生物膜形成的影响[J]. 长春中医药大学学报, 2009, 25(5): 667-668.

[17] 罗永明,刘爱华,余邦伟,等. 中药草珊瑚的化学成分研究[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(17): 1296-1298.

[18] 康洁,陈若云. 构菌发酵菌丝体化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(11): 1038-1040.

[19] 李小花,林立东,吴萍,等. 黄桐树皮的化学成分研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2007, 15(1): 35-39.

[责任编辑 顾雪竹]