

# 11 种昆虫提取物的抑菌活性研究

张普照<sup>1</sup>, 靳亮<sup>2</sup>, 万红娇<sup>1</sup>, 徐杰<sup>1</sup>, 朱金华<sup>1</sup>, 马广强<sup>1\*</sup>

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 江西省科学院微生物所, 南昌 330000)

**[摘要]** **目的:**寻找新的抑菌类化合物及开展昆虫天然产物化学的研究,通过药理实验找出昆虫的有效抑菌活性部位。**方法:**采用溶剂两段提取法提取昆虫虫体,用二氯甲烷溶剂浸渍 2 次,再用 70% 甲醇浸渍 2 次获得昆虫提取物。并采用了药敏试验法给药物定性和浓度梯度稀释法测出药物的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)值。**结果:**在 11 种昆虫中,只有蝉蜕和蝼蛄 2 种昆虫的昆虫提取物(分别为蝉蜕正丁醇部、蝼蛄乙酸乙酯、蝉蜕乙酸乙酯和蝉蜕水部位),对金黄色葡萄球菌和结核杆菌有较明显的抑菌活性,其中蝉蜕乙酸乙酯对金黄色葡萄球菌的抑菌作用极强。**结论:**该研究将为抗生素新药先导化合物的发现和拓展昆虫化学研究方向提供新的思路。

**[关键词]** 昆虫提取物; 抑菌活性; 蝉蜕; 蝼蛄

**[中图分类号]** R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)07-0161-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016070161

## Antibacterial Activity of 11 Kinds of Insects Extracts

ZHANG Pu-zhao<sup>1</sup>, JIN Liang<sup>2</sup>, WAN Hong-jiao<sup>1</sup>, XU Jie<sup>1</sup>, ZHU Jin-hua<sup>1</sup>, MA Guang-qiang<sup>1\*</sup>

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

(2. Institute of Microbiology, Jiangxi Academic of Science, Nanchang 330000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To find new antibacterial compounds, carry out the chemistry research on insect natural products, and find effective antimicrobial sites of insects through pharmacological experiment. **Method:** The insect bodies were extracted by two stage extraction solvent. Firstly, the bodies were impregnated two times with dichloromethane solvent, and then, soaked with 70% methanol soaking two times. Drug sensitive test was used to qualitatively detect the drugs and their minimum inhibitory concentrations (MIC) were tested by concentration gradient dilution method. **Result:** Of all eleven species of insects, only extracts (respectively *Periostracum cicadae* butanol, *Mole cricket* ethyl acetate, *P. cicadae* ethyl acetate and *P. cicadae* water sites) of *P. cicadae* and the *M. cricket* have significant antibacterial activity to *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis*, and *P. cicadae* ethyl acetate has the best antibacterial effect against *S. aureus*. **Conclusion:** This study will provide new ideas for the discovery of new antibiotics and insects chemical research for development of new medicines.

**[Key words]** insect extracts; antibacterial activity; *Periostracum cicadae*; *Mole cricket*

众所周知,抗生素的泛滥使用导致耐药性的菌株不断出现,使得抗感染治疗愈加的困难和复杂化。传统的抗生素已经无法满足当前的治疗需求,而新型抗菌药物的研发速率也跟不上病原微生物引起的感染性疾病的出现速率。因此,越来越多的人在关

注新型抗菌药物的研发,同时,也在积极探索新的治疗手段<sup>[1-4]</sup>。因此寻找天然高效的抗菌药物和研制新的抗生素迫在眉睫。昆虫一直以来都是中草药的重要组成部分,比如蝉蜕(*Periostracum cicadae*, PC)为蝉科昆虫黑蚱 *Cryptotympana pustulata* 的若虫羽

**[收稿日期]** 20150824(007)

**[基金项目]** 江西省卫生厅中医药科技项目(2012A034)

**[第一作者]** 张普照,硕士,讲师,从事天然药物活性成分的提取、分离、鉴定和合成科研工作, Tel:18270852060, E-mail:zhpuzh@163.com

**[通讯作者]** \*马广强,博士,副教授,从事病原微生物学研究, Tel:18770050616, E-mail:maguangqiang@163.com

化时脱落的体壁,别名蝉衣、蝉退、蝉壳、知了壳。首载于《名医别录》,蝉蜕性甘、寒,味咸,是一种常用中药,具有散风解热、清肺利咽、解表透疹、解毒消炎、清肝明目、安神定志、止咳平喘、息风止痉、明目退翳之功效,临床上常用于治疗风热感冒,咳嗽音哑,咽喉肿痛,小儿惊痫,惊风抽搐,风疹瘙痒,痘疹疔疮,破伤风等病症<sup>[5]</sup>。近年来关于昆虫具有抗菌消炎的作用,尤为引起天然药物化学家的关注<sup>[6-10]</sup>。如 2012 年,孙龙<sup>[11]</sup>对 2 种鞘翅目昆虫抗菌肽的分离纯化与活性研究,发现其抗菌肽具有一定的抑菌活性。2009 年河北农业大学李秀花灯等<sup>[10]</sup>对线虫细菌的代谢产物进行了抑菌活性研究,发现对灰霉菌有抑菌活性的代谢产物。

为了寻找新的具有抗菌活性物质及抗菌类化合物,本文使用溶剂两段提取法对鼠妇虫、蝉蜕等 11 种昆虫进行提取,对昆虫提取物的抑菌活性进行研究筛选。本研究以 5 种临床菌株为实验对象,探讨了蜈蚣和蝉等 11 种昆虫提取物的抑菌活性。并采用不同提取方法对它们的活性成分进行初步分离,并对各种提取方法所得提取物进行了体外抑菌活性研究,为深入了解各昆虫的化学组成和抑菌作用提供基础数据。

## 1 材料

**1.1 材料** 鼠妇虫 *Pillbug armadillidium*, 蝉蜕 *Periostracum cicada*, 蜈蚣 *Mole cricket*, 五谷虫 *Oriental latrine*, 蜈蚣 *Centipede*, 桑螵蛸 *Ootheca mantidis*, 土鳖虫 *Eupolyphaga sinensis*, 雄蚕蛾 *Male silkmoths*, 白僵蚕 *Silkworm larva*, 虻虫 *Gadfly insect*, 九香虫 *Aspongopus chinensis*。11 种昆虫采购于樟树天济堂。由江西中医药大学张普照鉴定。

菌株: 白色念珠菌 (*Monilia albican*, ATCC10231), 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, ATCC6538), 粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*, ATCC29212), 大肠埃希菌 (*Escherichia coli*, ATCC8739) 和结核杆菌 (即结核分枝杆菌, *Mycobacterium tuberculosis*, H37RA)。所有菌株均购买自美国典型微生物菌种保存中心 (ATCC-American type culture collection)。

**1.2 试剂** 营养琼脂粉, 营养肉汤 (NB), 玫瑰红钠琼脂培养基。购买自杭州微生物天和微生物试剂有限公司, 批号 161111。

**1.3 仪器** TG16WS 型高速离心机 (湖南湘仪集团), TN-100B 型托盘扭力天平 (上海新诺仪器设备有限公司), GSP-9080MBE 型隔水式恒温培养箱 (上

海博讯实业有限公司), PM-CHS-40X50 型隔水式电热恒温培养箱 (上海博讯实业有限公司), HealForce B2 型生物安全柜 (香港力康生物医药科技集团), SHA-C 型恒温振荡器 (河北省虹宇设备有限公司), RE-52C 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂), ALPHA1-2LDpLus 型冷冻干燥机 (德国 Christ 公司), SPX-250B 型生化培养箱 (北京天创尚邦仪器设备有限公司)。

## 2 方法

**2.1 提取物的制备** 采用溶剂两段提取法提取昆虫虫体。将购置的昆虫冷冻干燥, 粉碎后, 用二氯甲烷溶剂浸渍 2 次, 每次数日, 合并浸出液, 回收虫体。浸取液除溶剂后, 得昆虫脂溶性成分 I。将上述回收的昆虫虫体干燥至恒重, 再用 70% 甲醇浸渍 2 次, 每次数日, 合并浸出液。除溶剂后得昆虫提取物 II, 获得 11 种提取物, 分别标号, 放置冰箱保存备用。

**2.2 实验菌种的复苏** 将用低温保存的 5 种菌种 (白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、大肠埃希菌和结核杆菌) 分别用三线法在相应的平板上接种, 置于相应的恒温培养箱中培养。(白色念珠菌需置于 28 ℃, 其他菌种置于 37 ℃ 中培养) 24 h 生长良好, 置于冰箱中随时待用。

**2.3 提取物生物活性的测定**

**2.3.1 药敏定性试验** 将菌种接种涂满整个平板 (每菌种接 2 个平板), 每个平板贴上 6 个圆形纸片, 分别用移液枪给每个菌种滴加 < 10 mL 的 11 种提取物, (其中有 1 个纸片不滴加药物, 以作空白对照)。全部完成后置于相应温度下培养 24 h 观察 (结核杆菌生长速度稍慢, 一般培养 2 d 观察)。

**2.3.2 提取物再提成分的制备** 将蝉蜕和蜈蚣提取物分别用不同有机溶剂提取后获得 7 种再提取药物成分: 1 号蝉蜕正丁醇部, 2 号蜈蚣正丁醇部, 3 号蜈蚣乙酸乙酯, 4 号蝉蜕乙酸乙酯, 5 号蜈蚣石油醚, 6 号蝉蜕水部位, 7 号蜈蚣水部位。分别标号, 放置冰箱保存、备用。

**2.3.3 再次药敏定性试验** 将 7 种再提取成分的质量, 加生理盐水溶解, 同时记录它们的浓度见表 1。按照步骤 2.3.1 同样的方法对这 7 种成分以金葡菌、粪肠球菌和结核杆菌为对象进行纸片法药敏试验, 溶解质量分数均为 1 g·mL<sup>-1</sup>。

**2.3.4 最小抑菌浓度 (MIC) 的测定** 对 1, 3, 4, 6 号成分用浓度梯度稀释法进行定量分析。做出 10 个浓度梯度, 每种成分做 2 套, 分别接种金黄色葡萄

表 1 蝉蜕、螻蛄提取成分信息

Table 1 *Periostracum cicada*, *Mole cricket* extracts information

No.	成分/部位	质量/g	预加生理盐水量/ $\mu\text{L}$
1	蝉蜕正丁醇	0.501	501
2	螻蛄正丁醇	0.510	510
3	螻蛄乙酸乙酯	0.520	520
4	蝉蜕乙酸乙酯	0.190	190
5	螻蛄石油醚	0.550	550
6	蝉蜕水	0.510	510
7	螻蛄水	0.520	520

球菌和结核杆菌 2 种细菌。置于 37  $^{\circ}\text{C}$  摇床摇匀培养 24 h, 观察结果。所有与细菌相关的实验均在生物安全等级二级的实验室中进行。

### 3 结果

3.1 11 种昆虫提取物药敏试验分析 11 种提取物中, 只有蝉蜕和螻蛄提取物对金黄色葡萄球菌、粪肠球菌和结核杆菌有效, 见表 2。

表 2 昆虫提取物抗菌谱(抑菌圈直径)

Table 2 Antibacterial results of insect extracts mm

No.	昆虫 提取物	金黄色 葡萄球菌	白色 念球菌	粪肠 球菌	大肠 埃希菌	结核 杆菌
1	鼠妇虫	-	-	-	-	-
2	蝉蜕	13	-	-	-	16
3	螻蛄	-	-	9	-	10
4	五谷虫	-	-	-	-	-
5	蜈蚣	-	-	-	-	-
6	桑螵蛸	-	-	8 <sup>1)</sup>	-	-
7	土鳖虫	-	-	-	-	-
8	雄蝉蜕	-	-	-	-	-
9	白僵蝉	-	-	-	-	-
10	虻虫	-	-	-	-	-
11	九香虫	-	-	-	-	-

注: <sup>1)</sup> 表示抑菌圈现象不明显。

3.2 蝉蜕和螻蛄不同溶剂提取物药敏试验分析 蝉蜕和螻蛄的 7 种成分对粪肠球菌均无效, 而蝉蜕的正丁醇部、乙酸乙酯部、水提部和螻蛄的乙酸乙酯部成分对金黄色葡萄球菌和结核杆菌均有效, 见表 3。

3.3 蝉蜕和螻蛄有效成分 MIC 测定 用稀释法对蝉蜕的正丁醇部、乙酸乙酯部、水提部和螻蛄的乙酸乙酯部成分的 MIC 检测结果表明(表 4): 螻蛄的乙酸乙酯提取部位对结核杆菌的 MIC 最低达到了

表 3 药物 MIC(最低抑菌浓度)的浓度梯度测量抗菌谱(抑菌圈直径)结果

Table 3 Concentration gradient measurement results of *Periostracum cicada*, *Mole cricket* extracts MIC mm

菌名	成分 1	成分 2	成分 3	成分 4	成分 5	成分 6	成分 7
金黄色葡萄球菌	15	0	9	7	0	9	0
粪肠球菌	0	0	0	0	0	0	0
结核杆菌	20	0	7.5	12 <sup>1)</sup>	0	5 <sup>1)</sup>	0

注: <sup>1)</sup> 表示难以测量抑菌圈的直径, 用半径表示。

10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 蝉蜕的乙酸乙酯部对金黄色葡萄球菌的抑菌活性最好, 达到了 0.1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。而且蝉蜕的水提部对结核杆菌的效果也达到了 10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。说明这 4 种成分对此 2 个菌种均有较强的抑菌作用, 蝉蜕乙酸乙酯对金黄色葡萄球菌的抑菌作用极强。

表 4 药物 MIC 的浓度梯度测量

Table 4 Concentration gradient measurement results of drug MIC  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

No.	菌名	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
1	金黄色葡萄球菌	-	-	+	+	+	+
	结核杆菌	-	+	+	+	+	+
3	金黄色葡萄球菌	-	+	+	+	+	+
	结核杆菌	-	-	+	+	+	+
4	金黄色葡萄球菌	-	-	-	-	+	+
	结核杆菌	-	+	+	+	+	+
6	金黄色葡萄球菌	-	+	+	+	+	+
	结核杆菌	-	-	+	+	+	+

### 4 讨论

由表 1 可知, 2 号提取物对金黄色葡萄球菌和结核杆菌的抑菌圈较大, 3 号提取物对粪肠球菌和结核杆菌也有较强的抑菌效果, 其他提取物对这 5 个菌种均无抑菌作用, 并且白念菌和大肠埃希菌对这 11 种提取物都不敏感, 这样即对药物和菌种进行了双向筛选。对 2, 3 号提取物(分别为螻蛄和蝉蜕的提取物)进行再提取获得 7 种提取成分, 对这 7 种成分进行对剩下的 3 个菌种的定性实验, 由表 4 可知, 粪肠球菌对于 7 种成分都不敏感, 1 号蝉蜕正丁醇部, 3 号螻蛄乙酸乙酯, 4 号蝉蜕乙酸乙酯和 6 号蝉蜕水部位都对金黄色葡萄球菌及结核杆菌有抑菌效果, 这样即对药物和菌种进行了第 2 次双向筛选。最后利用浓度梯度稀释法即可测出 1, 3, 4, 6 号再提取成分分别对金黄色葡萄球菌和结核杆菌的 MIC。通过实验可知, 蝉蜕正丁醇部、螻蛄乙酸乙酯、蝉蜕乙酸乙酯和蝉蜕水部位化学成分对金黄色葡萄球菌

及结核杆菌均有较强的抑菌活性,其中,蝉蜕乙酸乙酯对金黄色葡萄球菌的 MIC 最小可达  $1 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,这说明蝉蜕乙酸乙酯对金黄色葡萄球菌具有极强的抑菌活性。这些结果表明,昆虫提取物中具有抗生素活性,是潜在的天然抗生素,具有一定的开发前景。

目前国内外对昆虫体内抗菌物质研究,主要集中在凝集素、溶菌酶及抗菌肽等<sup>[9, 11-13]</sup>,其中以抗菌肽的研究最为广泛,并取得了很大的进展,提取方式也复杂多样,如从蚂蚁、蜘蛛等毒素中提取抗菌蛋白,通过刺激昆虫如丝光绿蝇、美洲大蠊等,分离得到抗菌肽物质<sup>[11]</sup>。而本文报道的,除去昆虫体内脂溶性物质和蛋白质等水溶性物质,仅以昆虫次生代谢物中小分子化合物为研究对象,进行抗菌活性物质的研究,目前并不多见。因此开展昆虫抗菌活性物质新化合物的研究,寻找具有抗菌活性的小分子化合物或昆虫次生代谢物活性组分,对拓展天然药物的研究领域,具有重要的意义。

本文通过对昆虫提取物的抗菌实验结果和提取方法的讨论,主要依靠天然产物研究手段进行昆虫体内存在抗菌活性的物质的研究,考虑这些抗菌物质来源于昆虫体内次生代谢物小分子。该论文对昆虫提取物抗菌活性的研究探索,仅限于对已购置的昆虫为研究对象。然而我国昆虫资源极其丰富,数量极多,这为下一步对药用昆虫、害虫和病原昆虫体内的抗菌活性物质的继续探索,提供了新的研究资源。在此实验基础上,依据已建立的实验方法,扩大虫源研究对象,将为寻找新的天然抗菌素药物或抗生素先导化合物提供新的思路。

#### [参考文献]

[1] 汪锡文,陈昂. 3303例多药耐药菌的医院感染监测

[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(13): 3235-3237.

[2] 刘华,罗蓓蓓. ICU医院感染多重耐药菌类型、耐药性及感染相关因素研究[J]. 实用医院临床杂志, 2009, 6(3): 140-142.

[3] 林冠文,刘瑛,李妮,等. 多药耐药菌的医院感染调查分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 23(23): 3773-3775.

[4] 冯其.  $\alpha$ -螺旋抗菌肽与传统抗生素的体内和体外的协同抗菌作用研究[D]. 长春:吉林大学, 2014.

[5] 文丹丹,王敏. 蝉蜕及其配伍治疗哮喘的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 242-245.

[6] 崔安妮,姜鑫,郑毅帆,等. 昆虫病原线虫共生菌毒素对水稻恶苗病菌的抑菌活性[J]. 湖北农业科学, 2015, 61(4): 862-863.

[7] 李帅. 三株昆虫共生菌的活性代谢产物研究[D]. 杭州:浙江师范大学, 2014.

[8] 文旭,南宫自艳,张园,等. 2种昆虫病原线虫共生菌的代谢产物对苹果病原菌真菌的抑菌作用[J]. 中国植保导刊, 2012, 32(1): 13-16.

[9] 包永芬,孙剑刚,袁玉林. 昆虫抗菌肽的诱导及其对荷瘤裸鼠抗瘤作用研究[J]. 武汉工程大学学报, 2010, 32(12): 39-42.

[10] 李秀花,马娟,姜占发,等. 不同昆虫病原线虫共生细菌对草莓灰霉病菌的抑制作用[J]. 河北农业大学学报, 2009, 32(1): 67-71.

[11] 孙龙. 两种鞘翅目昆虫抗菌肽的分离纯化与活性研究[D]. 北京:中国林业科学研究院, 2012.

[12] 李文渊,姜亚玲,邓瑞雪,等. 昆虫提取物的抗菌活性研究[J]. 国外医药:抗生素分册, 2012, 33(1): 30-33.

[13] 赵晴. 昆虫抗菌肽对植物病原真菌的抑菌活性及其初步分离的研究[D]. 石家庄:河北农业大学, 2009.

[责任编辑 邹晓翠]