

本文引文格式:覃春,徐佳音,王雪,等. 乌药成分异乌药内酯抗 *H. pylori* 及其抗菌谱的筛选[J]. 右江民族医学院学报, 2022, 44(2): 155-157, 179.

【论著与临床报道】

乌药成分异乌药内酯抗 *H. pylori* 及其抗菌谱的筛选

覃春^{1,2}, 徐佳音^{1,2}, 王雪^{1,2}, 管爱星^{1,2}, 廖丽娟^{1,2}, 黄永毅², 黄赞松¹

(1. 右江民族医学院研究生学院, 广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院耐药微生物感染防治研究中心, 广西 百色 533000)

摘要:目的 筛选异乌药内酯的抗菌谱。方法 微量稀释法检测异乌药内酯对不同 *H. pylori* 菌株及非 *H. pylori* 菌株的最小抑菌浓度(MIC)。结果 异乌药内酯对敏感和耐药 *H. pylori* 菌株的 MIC 均为 8~16 $\mu\text{g/ml}$; 异乌药内酯对金黄色葡萄球菌等非 *H. pylori* 菌株的 MIC 均 $>128 \mu\text{g/ml}$ 。结论 异乌药内酯对 *H. pylori* 有明显的抑制作用, 并可专一作用于 *H. pylori*。

关键词: 幽门螺杆菌; 异乌药内酯; 抗菌谱

中图分类号: R573

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2022)02-0155-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-5817.2022.02.003

Screening of the anti-*H. pylori* and its antibacterial spectrum of isolinderalactone

Qin Chun^{1,2}, Xu Jiayin^{1,2}, Wang Xue^{1,2}, Guan Aixing^{1,2},

Liao Lijuan^{1,2}, Huang Yongyi², Huang Zansong¹

(1. Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;

2. Research Center for the Prevention and Control of Drug-Resistant Microbial Infection,

Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To screen the antibacterial spectrum of isolinderalactone. **Methods** The method of microdilution was adopted to detect the minimum inhibitory concentration (MIC) of isolinderalactone against different *H. pylori* and non-*H. pylori* strains. **Results** The MIC of isolinderalactone against sensitive *H. pylori* and drug-resistant *H. pylori* strains was all 8~16 $\mu\text{g/ml}$. The MIC of isolinderalactone against staphylococcus aureus and other non-*H. pylori* strains was all greater than 128 $\mu\text{g/ml}$. **Conclusion** Isolinderalactone has significant inhibitory effect on *H. pylori* and the effect was specific.

Key words: *Helicobacter pylori*; isolinderalactone; antibacterial spectrum

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) 是一种可定植于人胃黏膜上皮细胞的革兰阴性、微需氧螺旋杆菌, 是导致胃部疾病轻、中、重疾病的主要原因^[1]。世界超过 50% 的人口胃内定植有 *H. pylori*, 美国将 *H. pylori* 明确归为致癌物。治疗并根除 *H.*

pylori 已成为治疗消化性溃疡及预防胃癌发生的重要手段。由于抗生素的广泛使用引起的细菌耐药, 导致 *H. pylori* 的根除率逐年下降, 耐药率随之上升, 发掘新的抗 *H. pylori* 药物非常必要^[2]。随着中药的不断发掘, 其抗菌作用也逐渐被发现。乌药 [*Lindera ag-*

基金项目: 国家自然科学基金项目(32060018)

第一作者简介: 覃春(1996-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 幽门螺杆菌的致病机制, E-mail: 1320370242@qq.com

通讯作者简介: 黄赞松(1962-), 男, 医学硕士, 三级教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 广西科协决策咨询专家库专家, 广西高校优秀人才, 研究方向: ①肝癌基础与临床研究; ②幽门螺杆菌致病与耐药机制研究, E-mail: 1019846481@qq.com

gregata (Sims) Kosterm] 属樟科植物, 其干燥后的块根是常用的行气止痛药物, 可治疗胸腹胀痛、产后腹痛、寒气郁滞、痛经、头痛、尿频、遗尿等症状。乌药中主要含有挥发油、异喹啉生物碱、呋喃倍半萜及其内酯、黄酮类等成分。异乌药内酯, 又名异乌药醚内酯, 属于乌药主要成分中呋喃倍半萜内酯化合物的一种^[3]。研究显示, 异乌药内酯在卵巢癌、乳腺癌及肺癌等多种肿瘤中具有抑制其增殖、转移或促进凋亡的作用^[4-7]。近几年, 其抗炎作用逐渐被发现, 在酒精性肝损伤或小鼠炎症模型中均发现其抗炎作用^[8-10]。另有研究表明异乌药内酯在肝脏糖代谢中也起到关键作用^[11]。但异乌药内酯在抗菌方面鲜有研究, 特别是对 *H. pylori* 的抗菌作用很少见报道。因此, 本研究针对异乌药内酯对 *H. pylori* 及非 *H. pylori* 菌株的抑制作用展开研究, 筛选其抗菌谱, 以期探究其抗菌作用, 并为后期研发先导药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 异乌药内酯(CAS 号: 957-66-4)购于成都瑞芬思生物科技有限公司, Bacto™ Brain Heart infusion(BHI)培养基、哥伦比亚 Columbia blood Agar base (G)培养基、营养肉汤培养基、营养琼脂培养基、标准小牛血清均购于南京晶格化学科技有限公司, *H. pylori* 标准菌株(26695、NSH57、MSD132、G27)由南京医科大学毕洪凯实验室赠送, *H. pylori* 临床分离菌株(HPBS001-HPBS016)为本实验室分离获得。非 Hp 菌株: 金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯杆菌、鲍曼不动杆菌、白色念珠菌、新生隐球菌、奇异变形杆菌、热带假丝酵母、空肠弯曲菌、枯草芽孢杆菌、摩氏摩根菌、溶血葡萄球菌、嗜麦芽寡养单胞菌、醋杆菌、大肠杆菌、弯曲乳杆菌、酿酒酵母、脆弱拟杆菌、长双歧杆菌、霍氏肠杆菌均购自广东微生物保藏中心。

1.2 方法

1.2.1 质谱分析 化合物异乌药内酯质谱分析由成都瑞芬思公司完成。

1.2.2 细菌培养 使用含 10% 小牛血清的哥伦比亚固体培养基或脑心浸液培养基, 于 37 °C、5% O₂、10% CO₂ 培养箱或摇床中进行培养。

1.2.3 微量稀释法检测异乌药内酯对 *H. pylori* 菌株最小抑菌浓度(MIC) ①药物制备: 配置异乌药内酯浓度为 4 mg/ml。②菌液准备: 将对数期 *H. pylori* 菌液调整浓度 OD₆₀₀ 为 0.3(1.0 × 10⁸ CFU/ml), 稀释至 1.0 × 10⁷ CFU/ml, 备用。③96 孔板制备: 以 96 孔板 A1~A12 孔作为药物浓度最高孔, 加入 173.6 μl 培养基及 6.4 μl 上述药物, 余下 7 孔均加入 90 μl 培

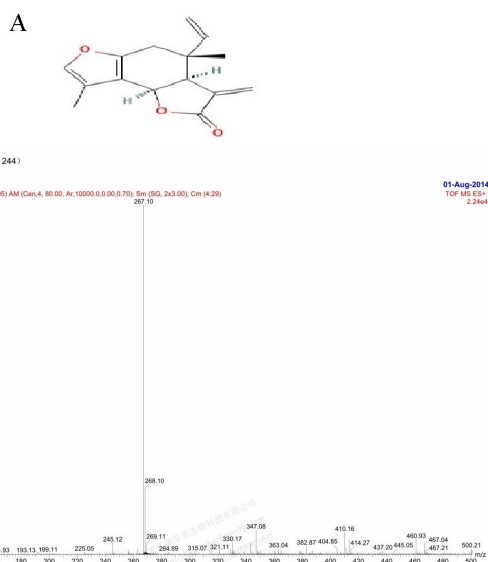
培养基, 从上至下对倍稀释至第 8 孔, 使药物浓度从 1~8 孔浓度分别为 128 μg/ml、64 μg/ml、32 μg/ml、16 μg/ml、8 μg/ml、4 μg/ml、2 μg/ml、1 μg/ml。设置培养基空白对照孔、药物阴性孔、细菌阳性孔。④接种菌液: 取上述备用菌液 10 μl 加至第 1~8 孔和阳性孔中(工作浓度为 1 × 10⁶ CFU/ml), 阴性孔不加菌对照。⑤结果判读: 以培养基空白对照孔、药物阴性孔无菌生长、细菌阳性孔有菌生长为前提进行结果判读, 以完全抑制细菌生长的最低药物浓度作为 MIC。如果出现单一的跳孔时, 应记录抑制细菌生长的最高药物浓度, 如果出现多处跳孔, 则该次结果作废。实验重复 3 次。

1.2.4 微量稀释法检测异乌药内酯对非 *H. pylori* 菌株 MIC ①药物制备: 配置异乌药内酯浓度为 4 mg/ml。②菌液准备: 将对数期菌液调整浓度细菌 OD₆₀₀ 为 0.3(1 × 10⁸ CFU/ml), 稀释至 1 × 10⁶ CFU/ml, 真菌调整浓度 OD₆₀₀ 为 0.5(5 × 10⁶ CFU/ml), 稀释至 5 × 10³ CFU/ml, 备用。③96 孔板制备: 以 96 孔板 A1~A12 孔作为药物浓度最高孔, 加入 173.6 μl 培养基及 6.4 μl 上述药物, 余下 7 孔均加入 90 μl 培养基, 从上至下对倍稀释至第 8 孔, 使药物浓度从 1~8 孔浓度分别为 128 μg/ml、64 μg/ml、32 μg/ml、16 μg/ml、8 μg/ml、4 μg/ml、2 μg/ml、1 μg/ml。设置培养基空白对照孔、药物阴性孔、细菌阳性孔。④接种菌液: 取上述备用菌液 10 μl 加至第 1~8 孔和阳性孔中(细菌工作浓度为 1 × 10⁵ CFU/ml, 真菌工作浓度为 5 × 10² CFU/ml), 阴性孔不加菌对照。⑤结果判读: 以培养基空白对照孔、药物阴性孔无菌生长、细菌阳性孔有菌生长为前提进行结果判读, 以完全抑制细菌生长的最低药物浓度作为 MIC。如果出现单一的跳孔时, 应记录抑制细菌生长的最高药物浓度, 如果出现多处跳孔, 则该次结果作废。实验重复 3 次。

2 结果

2.1 异乌药内酯的分子结构式及质谱图 异乌药内酯分子式为 C₁₅H₁₆O₃, 分子结构, 如图 1A; 异乌药内酯分子量为 244.29, 质谱为图 1B, 鉴定图谱由成都瑞芬思生物科技有限公司完成。

2.2 异乌药内酯对 *H. pylori* 菌株的抑制作用 对 18 种不同 *H. pylori* 菌株进行 MIC 检测, 如表 1 所示, 异乌药内酯对敏感、耐药、甚至多重耐药 *H. pylori* 菌株 MIC 均在 8~16 μg/ml, 表明异乌药内酯对 *H. pylori* 具有良好的抑制作用, 且对不同 *H. pylori* 菌株间抑制作用强度相似, 菌株耐药性对其抑制作用无明显影响。



A. 异乌药内酯的分子结构式; B. 异乌药内酯的质谱图

图 1 异乌药内酯的分子特性

表 1 异乌药内酯对不同 *H. pylori* 菌株的抑制作用

菌株	菌株耐药情况	MIC/($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)
26695	敏感	16
G27	敏感	16
MSD132	敏感	16
NSH57	敏感	16
HPBS001	耐左氧氟沙星和克拉霉素及甲硝唑	16
HPBS002	耐甲硝唑	16
HPBS003	耐克拉霉素	16
HPBS004	耐左氧氟沙星	16
HPBS005	耐左氧氟沙星和甲硝唑	8
HPBS006	耐克拉霉素和甲硝唑	8
HPBS007	耐克拉霉素	8
HPBS010	耐甲硝唑和克拉霉素及左氧氟沙星	16
HPBS011	耐甲硝唑和克拉霉素	16
HPBS012	敏感	8
HPBS013	耐甲硝唑和克拉霉素及左氧氟沙星	16
HPBS014	耐甲硝唑、克拉霉素、阿莫西林及左氧氟沙星	16
HPBS015	敏感	8
HPBS016	敏感	16

2.3 异乌药内酯对非 *H. pylori* 菌株的抑制作用

为筛选异乌药内酯的抗菌谱,选择金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、白色念珠菌、新生隐球菌、奇异变形杆菌、热带假丝酵母、空肠弯曲菌、枯草芽孢杆菌等 20 种细菌及真菌进行检测,见表 2。MIC 均 $>128 \mu\text{g}/\text{ml}$,表明异乌药内酯的对非 *H. pylori* 菌株抑制作用不明显,对 *H. pylori* 菌株的抑制作用明显优于以上 20 种细菌及真菌,可专一作用于 *H. pylori* 菌株。

3 讨论

H. pylori 在人类胃内普遍定植,并成为威胁全人类健康的明确致癌物,抗生素耐药性升高对根除造成严重影响,发现新药物成为迫切需要^[12]。中药是我国

表 2 乌药成分异乌药内酯的对非 *H. pylori* 菌株的 MIC 检测

菌株	菌株药物敏感性	MIC/($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)
奇异变形杆菌	敏感	>128
新生隐球菌	耐药	>128
热带假丝酵母	敏感	>128
空肠弯曲杆菌	敏感	>128
枯草芽孢杆菌	敏感	>128
摩氏摩根菌	敏感	>128
溶血葡萄球菌	敏感	>128
嗜麦芽寡养单胞菌	敏感	>128
醋杆菌	敏感	>128
大肠杆菌	敏感	>128
弯曲乳杆菌	敏感	>128
酿酒酵母菌	敏感	>128
脆弱拟杆菌	敏感	>128
长双歧杆菌	敏感	>128
霍氏肠杆菌	敏感	>128
金黄色葡萄球菌	耐甲氧西林	>128
白色念珠菌	敏感	>128
肺炎克雷伯杆菌	敏感	>128
铜绿假单胞菌	敏感	>128
鲍曼不动杆菌	敏感	>128

传统的药材,目前已发现许多中药在抗菌领域中起到一定作用,常见于具有清热解毒功效的中药,例如黄芩、金银花、板蓝根、连翘等^[8]。桓娜等^[13]在针对乌药的中药学及其临床应用进行总结,发现乌药具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、镇痛及抗炎作用,同时对中枢神经、消化系统和预防糖尿病肾病起到有益作用。早在 20 世纪 70 年代就发现乌药具有抑制金黄色葡萄球菌、甲型溶血链球菌、伤寒沙门菌、变形杆菌、大肠埃希菌的作用^[13]。后来张琳等^[14]发现乌药对空肠弯曲菌也起到抑菌作用,但乌药成分异乌药内酯在抗菌中的研究鲜少见报道。通过本研究发现,乌药成分异乌药内酯具有较良好的抗 *H. pylori* 作用,其对敏感及耐药菌株 MIC 均在 $8 \sim 16 \mu\text{g}/\text{ml}$ 之间,但对除 *H. pylori* 以外的细菌及真菌抑制作用远不及对 *H. pylori* 的抑制作用,表明异乌药内酯对 *H. pylori* 作用具有专一性。除了穿心莲内酯、苦地胆内酯、小白菊内酯等外,中药成分内酯类抗菌作用的报道比较少^[15-17],而且其作用机制基本不清楚,对细胞膜或生物膜的作用可能性比较大。乌药成分异乌药内酯特异性作用于 *H. pylori*,这是非常值得探讨的问题,应该不单是对细胞膜或生物膜作用,否则其抗菌特异性不会这么高。本文在乌药中挖掘出异乌药内酯成分能专一抑制 *H. pylori*,不仅对乌药的抗菌成分添加新认知,且为研发抗 *H. pylori* 的先导药物提供非常有意义的候选化合物。

综上所述,异乌药内酯对敏感和耐药的 *H. pylori* 均具有良好的抑制效果,可专一作用于 *H. pylori*,具有较好的研发前景。

(下转第 179 页)

- [8] 吴德,唐久来. 婴幼儿围生期脑损伤的颅磁共振成像影像学临床评估[J]. 中华实用儿科临床杂志,2020,35(24):1846-1852.
- [9] Rose J, Brian C, Woods J, et al. Mitochondrial dysfunction in glial cells: Implications for neuronal homeostasis and survival[J]. Toxicology, 2017, 391:109-115.
- [10] Li MX, Dewson G. Mitochondria and apoptosis: emerging concepts[J]. F1000Prime Rep, 2015, 7:42.
- [11] Birsoy K, Wang T, Chen WW, et al. An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis [J]. Cell, 2015, 162(3):540-551.
- [12] Raefsky SM, Mattson MP. Adaptive responses of neuronal mitochondria to bioenergetic challenges: Roles in neuroplasticity and disease resistance [J]. Free Radic Biol Med, 2017, 102:203-216.
- [13] 苏小明,郑炎,田美媛,等. 线粒体 DNA 拷贝数与缺血性脑卒中的研究进展[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2020, 8(32):99.
- [14] Lu B, Zeng F, Xing W, et al. Decreased mitochondrial DNA copy number in children with cerebral palsy quantified by droplet digital PCR[J]. Clin Chim Acta, 2020, 503:122-127.
- [15] 李俊,王红娟,胡清源. 神经退行性疾病中线粒体 DNA 拷贝数的变化及其调控[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2020, 36(12):1431-1437.
- [16] Fukuda S, Mizuno K, Kawai S, et al. Reduction in cerebral blood flow volume in infants complicated with hypoxic ischemic encephalopathy resulting in cerebral palsy [J]. Brain Dev, 2008, 30(4):246-253.
- [17] Nair J, Kumar VHS. Current and Emerging Therapies in the Management of Hypoxic Ischemic Encephalopathy in Neonates [J]. Children (Basel), 2018, 5(7):99.
- [18] Leaw B, Nair S, Lim R, et al. Mitochondria, Bioenergetics and Excitotoxicity: New Therapeutic Targets in Perinatal Brain Injury [J]. Front Cell Neurosci, 2017, 11:199.
- [19] 卢勇,谭伟明,牛得草,等. 褪黑素对氯胺酮所致大鼠膀胱氧化应激损伤的保护作用[J]. 右江民族医学院学报, 2018, 40(1):13-16.
- [20] Hiebert JB, Shen Q, Thimmesch AR, et al. Traumatic brain injury and mitochondrial dysfunction [J]. Am J Med Sci, 2015, 350(2):132-138.
- [21] Uittenbogaard M, Chiaramello A. Mitochondrial biogenesis: a therapeutic target for neurodevelopmental disorders and neurodegenerative diseases [J]. Curr Pharm Des, 2014, 20(35):5574-5593.
- [22] 王贲士,井楠,乔录新,等. 外周血游离线粒体 DNA 定量检测在结直肠癌患者中的表达及意义[J]. 临床检验杂志, 2019, 37(5):342-344.

收稿日期:2021-12-13;修回日期:2022-02-11

(上接第 157 页)

参考文献:

- [1] O'Brien VP, Koehne AL, Dubrulle J, et al. Sustained *Helicobacter pylori* infection accelerates gastric dysplasia in a mouse model [J]. Life Sci Alliance, 2020, 4(2):e202000967.
- [2] 周艳萍. 幽门螺杆菌耐药机制的研究进展[J]. 中国社区医师, 2020, 36(25):5-6.
- [3] 左美玲. 乌药中异乌药内酯的含量考察[J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(33):58-60.
- [4] 魏国清,蒋合众,陈惠,等. 乌药化学成分研究进展[J]. 成都中医药大学学报, 2013, 36(3):103-105.
- [5] Rajina S, Kim WJ, Shim JH, et al. Isolinderalactone induces cell death via mitochondrial superoxide- and STAT3-mediated pathways in human ovarian cancer cells [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(20):7530.
- [6] Chuang CH, Wang LY, Wong YM, et al. Anti-metastatic effects of isolinderalactone via the inhibition of MMP-2 and up regulation of NM23-H1 expression in human lung cancer A549 cells [J]. Oncol Lett, 2018, 15(4):4690-4696.
- [7] Yen MC, Shih YC, Hsu YL, et al. Isolinderalactone enhances the inhibition of SOCS3 on STAT3 activity by decreasing miR-30c in breast cancer [J]. Oncol Rep, 2016, 35(3):1356-1364.
- [8] 刘小凤,侯雯倩,刘东玲,等. 7 种单味中药及其组方体外抑菌效果及复方溶液脱色方法研究[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2021, 35(10):791.
- [9] 陈方亮,黄瑞平,陈青华,等. 乌药醚内酯对肝损伤模型大鼠的保护作用[J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(12):1512-1515.
- [10] 王军伟,谭明明,季梦漂,等. 酒精性肝损伤与肠内毒素渗漏的关系及乌药的干预作用[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(10):2515-2517.
- [11] 谢巍. 天然活性产物乌药醚内酯和姜黄素 A 对肝脏糖代谢的调控作用及机制研究[D]. 上海:中国科学院大学(中国科学院上海药物研究所), 2018.
- [12] 黄永毅,李如佳,黄干荣,等. 抗幽门螺杆菌的泽兰有效成分筛选[J]. 右江民族医学院学报, 2020, 42(6):698-700, 709.
- [13] 桓娜,于俊生,刘玉萍. 乌药的中药学及临床应用文献综述[J]. 中国中医药现代远程教育, 2017, 15(9):148-150.
- [14] 张琳,杨连文,郑晓光,等. 中药对空肠弯曲菌与幽门螺旋菌的抑菌作用[J]. 中国中西医结合脾胃杂志, 1994, 2(1):32-33.
- [15] 母育成,邢相宜,晏子俊,等. 穿心莲内酯的抗菌作用研究进展[J]. 贵州中医药大学学报, 2021, 43(1):85-89.
- [16] 刘勇. 苦地胆内酯类化合物体外抗菌作用机理的初步研究[D]. 湛江:广东海洋大学, 2010.
- [17] 曹妍. 小白菊内酯对水稻白叶枯病菌的生物学活性及其应用研究[D]. 南京:南京农业大学, 2019.

收稿日期:2022-02-20;修回日期:2022-02-23