



淫羊藿中黄酮苷类化合物的群体感应抑制作用研究

江洗芮, 段雅倩, 刘畅, 张成中

Quorum-sensing inhibition of flavonoid glycosides from *Epimedium brevicornum*

JIANG Xianrui, DUAN Yaqian, LIU Chang, ZHANG Chengzhong

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202409060>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

铜绿假单胞菌合并按蚊伊丽莎白菌肺部感染的病例分析

Analysis of pulmonary infection of *Pseudomonas aeruginosa* combined with *Elizabethkingia anophelis*

药学实践与服务. 2024, 42(5): 223-226 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202310042

黄芪甲苷衍生物治疗慢性心力衰竭小鼠的药效评价及作用机制研究

Efficacy and mechanism of astragaloside IV derivatives on chronic heart failure in mice

药学实践与服务. 2024, 42(5): 190-197 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202310004

上海某二级医院革兰阴性菌流行特征的回顾性分析

Retrospective analysis of the epidemic characteristics of Gram-negative bacteria in a second-class hospital in Shanghai

药学实践与服务. 2024, 42(12): 528-532 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202305005

具核梭杆菌小分子抑制剂的筛选及其抗结直肠癌活性研究

Screening and anti-colorectal activity of small molecule inhibitors of *Fusobacterium nucleatum*

药学实践与服务. 2024, 42(12): 503-507 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202405009

HPLC-MS/MS同时测定感冒安颗粒中5种黄酮成分的含量

Simultaneous determination of five flavonoids in Ganmao' an granules by HPLC-MS/MS

药学实践与服务. 2024, 42(9): 402-406 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202403030



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

淫羊藿中黄酮苷类化合物的群体感应抑制作用研究

江洗芮, 段雅倩, 刘畅, 张成中 (海军军医大学药理学系, 上海 200433)

[摘要] 目的 从淫羊藿中发现具有群体感应抑制作用的黄酮苷类成分, 并对其活性进行评价。方法 首先测定淫羊藿中 5 个主要的黄酮苷类化合物(宝藿苷、淫羊藿苷、朝藿定 A/B/C)及淫羊藿提取物的抑菌最小浓度 MIC 值, 随后利用酶标仪测定对紫色杆菌 CV026 的紫色色素产生的抑制作用, 再利用对铜绿假单胞菌 PAO1 的生物被膜以及几丁质酶进行定量测定。结果 淫羊藿提取物及其主要成分具有群体感应抑制活性作用, 其中, 淫羊藿苷、朝藿定 C(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)作用明显。结论 中药淫羊藿具有对紫色杆菌 CV026 和铜绿假单胞菌 PAO1 的群体感应系统有抑制作用, 其中, 淫羊藿苷和朝藿定 C 有望发展成为一种群体感应抑制剂的潜在新药。

[关键词] 淫羊藿; 群体感应; 紫色杆菌 CV026; 铜绿假单胞菌 PAO1

[文章编号] 2097-2024(2025)00-0001-05 **[DOI]** 10.12206/j.issn.2097-2024.202409060

Quorum-sensing inhibition of flavonoid glycosides from *Epimedium brevicornum*

JIANG Xianrui, DUAN Yaqian, LIU Chang, ZHANG Chengzhong (School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To identify flavonoid glycosides with quorum sensing inhibitory activity from *Epimedium brevicornum* and evaluate their bioactivity. **Methods** The minimum inhibitory concentrations (MICs) of five major flavonoid glycosides (baohuoside, icariin, epimedin A/B/C) and the extract of *E. brevicornum* were first determined. Subsequently, the inhibitory effects on the production of purple pigments in *Chromobacterium violaceum* CV026 were measured. Additionally, the biofilm formation and chitin quantification of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 were assessed. **Results** The extract of *E. brevicornum* and its primary components exhibited significant quorum sensing inhibitory activity. Particularly, icariin and epimedin C demonstrated superior inhibitory activity. **Conclusion** *E. brevicornum* demonstrates the ability to inhibit the quorum sensing system of *Chromobacterium violaceum* CV026 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Furthermore, icariin and epimedin C (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) show promise for development into novel drugs for quorum sensing inhibitor.

[Key words] *Epimedium brevicornum*; Quorum sensing; *Chromobacterium violaceum* CV026; *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

抗生素的发现是人类健康史的一大进步, 但由于抗生素在医疗卫生领域和动物卫生领域的过度使用, 导致耐药性的产生, 临床效果减弱。伴随着抗生素耐药性的产生, 很多人类赖以生存的药物正在迅速失效, 治疗手段日益减少, 人类的健康和生命受到严重威胁^[1]。因此开发新的抗生素和建立新的治疗模式迫在眉睫。

群体感应(quorum sensing, QS)是病原菌自发产生某些特定的小分子物质, 随着浓度变化, 调节自身特定基因的表达, 从而改变群体行为的现象。

群体感应抑制剂(quorum sensing inhibitor, QSI)作为一种新型抑菌方式, 在治疗病原菌感染方面有重要作用, 通过不同的方式干扰或阻断病原菌群体感应现象的产生^[2]。其作用机制不同于目前抗生素以抑制或杀灭病原菌为目的, 而是在不对病原菌生长产生压力的前提下, 通过阻断病原菌群体感应通路来减少紫色色素、生物被膜、几丁质酶等毒力因子的产生或表达, 达到降低病原菌致病性。由于不影响细菌正常生长, 因此避免了细菌的生存选择压力, 也就减少严重的耐药性问题^[3]。

研究表明, 很多中药活性成分具有群体感应抑制作用, 如肉桂中的肉桂醛对荧光假单胞菌生物膜形成的抑制作用^[4], 药用植物金丝雀花中提取的邻苯三酚及其类似物对群体感应信号分子喹啉酮二酯具有拮抗作用^[5], 槲皮素和柚皮素能抑制哈维菌 BB120 和大肠杆菌 O157 : H7 的生物膜形成^[6]。

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(82104326)

[作者简介] 江洗芮, 硕士研究生, 助理工程师, Tel: 15901726263, Email: jiangxianrui@163.com

[通信作者] 刘畅, 博士, 讲师, 研究方向: 中药学活性成分发现研究, Email: mniliuchang@163.com; 张成中, 博士, 副教授, 研究方向: 中药炮制, Email: zhangchzh09@163.com

川白芷提取物对铜绿假单胞菌生物膜形成的具有抑制作用^[7], 马齿苋、板蓝根等中药提取物能明显地抑制了铜绿假单胞菌的浮游迁移, 这些研究为筛选新型抗感染药物提供新的思路, 具有重要的研究意义和实用价值^[8]。

黄酮类化合物因其抗氧化、抗菌和抗癌作用而成为研究的热点^[9-11]。淫羊藿 *E. brevicornum* 为小檗科(Berberidaceae)淫羊藿属植物, 其主要有效成分中黄酮类化合物含量最高, 如宝藿苣、淫羊藿苣、朝藿定 A/B/C 等黄酮苣类化合物。淫羊藿具有抗炎, 提高人体免疫力, 抗氧化等多种药理活性, 而且黄酮类成分在抗感染以及抗菌防霉有良好的应用前景^[12-13]。但淫羊藿在群体抑制方面的研究目前是鲜有报道。

因此, 本实验拟测定淫羊藿提取物及 5 个主要的黄酮苣类化合物对常见条件病原菌(紫色杆菌 CV026 和铜绿假单胞菌 PAO1)的群体感应抑制作用, 为寻找高效的群体感应抑制剂奠定基础, 为淫羊藿的进一步开发应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 仪器

超声细胞破碎仪, 宁波新芝 JY99-IIDN, 中国; 低温高速离心机, 贝克曼 Avanti J-26S XP, 美国; 高压灭菌锅, SANYO MLS-3020, 日本; 真空干燥箱, 上海一恒科技有限公司 DHG-9053A, 中国; 酶标仪, TECAN infinite M200 pro, 瑞士; 旋转蒸发仪, BUCHI Rotavator R-200, 瑞士; 光学显微镜, 尼康 80i, 日本。

1.2 试验材料

化学试剂乙醇(批号 XW00641751), 二甲基亚砜 DMSO(批号 XW00676851)购自国药集团化学试剂有限公司; 本实验中所用的抗生素包括妥布霉素(批号 014241281)、硫酸奈替米星(批号 014138073)、庆大霉素(批号 014321472)、环丙沙星(批号 014252858)、淫羊藿苣(批号 01230870)宝藿苣(批号 014125028)、朝藿定 A(批号 045930800)、朝藿定 B(批号 045930801)、朝藿定 C(批号 041603427)等, 对照品水杨酸(批号 013474062)自上海泰坦科技股份有限公司购买得到; 几丁质酶活性检测试剂盒(批号 BC0825)购自北京索莱宝公司; LB 培养基(批号 041417503)自上海泰坦科技股份有限公司购买得到; 淫羊藿购自湖北十堰丹江口铜架山村毛家坪淫羊藿种植基地, 由海军军医大学中药鉴定学教研室张成中副教授鉴定; 紫色杆菌 CV026 和铜绿

假单胞菌 PAO1 均由广东省微生物菌种保藏中心购买, 菌种均于-80 °C 冰箱冻存。

1.3 淫羊藿提取物的制备及样品配置

淫羊藿药材 50 °C 烘干, 粉碎, 过 40 目筛, 保存备用。称取 5.0 g 淫羊藿粉末, 加入 100 ml 75% 乙醇, 超声破碎 30 min, 过夜静置, 过滤取上清, 上清液减压浓缩至浸膏。溶于 1% DMSO 溶液中, 过滤, 分装, -20 °C 保存备用。淫羊藿提取物的质量浓度为 0.5 mg/ml。

将淫羊藿苣、宝藿苣、朝藿定 A/B/C、水杨酸分别称取 2.00 mg 溶于 1 ml DMSO 溶液(1%)中, 得到浓度为 2 000 μg/ml 的标准品母液, -20 °C 保存备用。将抗生素妥布霉素、硫酸奈替米星、庆大霉素、环丙沙星溶于 1 ml DMSO 溶液(1%)中, 得到浓度为 100 μg/ml 的标准品母液, -20 °C 保存备用。

1.4 对紫色杆菌 CV026 和铜绿假单胞菌 PAO1 最小抑菌浓度(MIC)的测定

菌株活化后按 1% 接种量接种于现配 LB 培养基, 37 °C, 220 r/min 震荡培养至 OD_{600nm} 为 0.4 ~ 0.6。加入上述制备的样品, 采用 2 倍稀释法梯度稀释, DMSO 为阴性对照, 在 2、4、6、8、10 h 分别测定 OD_{620nm} 值, 实验进行 3 个重复, 测定最小抑菌浓度。

1.5 对紫色杆菌 CV026 紫色色素产生的抑制作用

按 1.4 实验结果, 本实验按 200 μg/ml 以下浓度进行, 制备不同浓度样品(最终浓度分别为 25、50、100 μg/ml)的 CV026 菌液, 加入 C6-HSL 终浓度为 5 μmol/L, 28 °C 培养 24 h。DMSO 为阴性对照。取 3 ml 培养液, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入 1 ml 酸化乙醇(4%, 1 mol/L HCl), 充分混匀, 离心, 取上清液, 534 nm 处测定吸光值^[14]。按下式计算抑制率^[15]:

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组OD值} - \text{实验组OD值}}{\text{对照组OD值}} \times 100\%$$

1.6 对铜绿假单胞菌 PAO1 生物被膜形成的抑制作用

将铜绿假单胞菌 PAO1 培养物稀释至现配 LB 中, 将样品(终浓度 100 μg/ml)加入到实验组, 并将 DMSO 作为阴性对照组, 水杨酸作为阳性对照。将 200 μl 样品添加到 96 孔平板中, 在 37 °C 下温育 24 h, 除去悬浮培养物。利用光学显微镜观察后, 用无菌磷酸盐缓冲盐水 PBS(pH 7.2)洗涤, 保持不破坏底部生物被膜。将 200 μl 的 LB 培养基和溶解有样品(终浓度 100 μg/ml)或 DMSO(阴性对照)或具有抗生素的 LB 培养基添加到 96 孔板中。

适当摇动,将平板在 37°C 下再温育 24 h。使用酶标仪在 620 nm(OD₆₂₀)处测量光密度^[16]。

1.7 几丁质酶抑制活性

将铜绿假单胞菌 PAO1 培养物稀释至现配 LB 中,将样品(终浓度 100 μg/ml)加入到实验组,并将 DMSO 作为阴性对照组,水杨酸作为阳性对照。使用几丁质酶活性检测试剂盒,将 1 ml 的提取液加入到 1 ml 培养物中,10 000 r/min,4 °C 离心 20 min,取上清液,分别沸水浴反应 10 min,置于冰上暂存。在 540 nm 下测定每管的吸光度,对比标准曲线计算几丁质酶活性^[17]。

2 结果与分析

2.1 对紫色杆菌 CV026 和铜绿假单胞菌 PAO1 最小抑菌浓度(MIC)

根据紫色杆菌 CV026 和铜绿假单胞菌 PAO1 的生长情况,以及测定培养物的 OD 值,确定淫羊藿提取物及活性成分对紫色杆菌 CV026 和铜绿假单胞菌 PAO1 的最小抑菌浓度如下表 1。淫羊藿提取物及五种黄酮苷的 MIC 都在 500 μg/ml。因此,后续实验测定选择 200 μg/ml 以下的浓度对于紫色杆菌 CV026 和铜绿假单胞菌 PAO1 生长均无抑制作用。

表 1 样品对紫色杆菌 CV026 和铜绿假单胞菌 PAO1 最小抑菌浓度

样品	MIC(μg/ml)	
	CV026	PAO1
淫羊藿提取物	>2 000	>2 000
宝藜苷I	500	500
淫羊藿苷	500	500
朝藜定A	500	500
朝藜定B	500	500
朝藜定C	500	500
妥布霉素	0.25	0.5
奈替米星	2	1
庆大霉素	1	1
环丙沙星	2	2

2.2 对紫色杆菌 CV026 紫色色素产生的抑制作用

紫色杆菌群体感应的特殊现象就是产生紫色色素,对 6 个样品进行浓度梯度实验,样品对于 CV026 群体感应的抑制作用可以通过检测紫色色素的产生量进行判定。实验结果显示,淫羊藿提取物、淫羊藿苷和朝藜定 C 对 CV026 紫色色素的产生有抑制作用,且随着样品浓度升高而增强,淫羊

藿苷和朝藜定 C 浓度达到 100 μg/ml 时,其抑制率可达到 42.9% 和 31.9%,与阴性对照组(DMSO)相比有显著差异($P<0.05$,图 1)。结果表明,淫羊藿苷和朝藜定 C 在不影响 CV026 生长的情况下,具有良好的群体感应抑制作用。

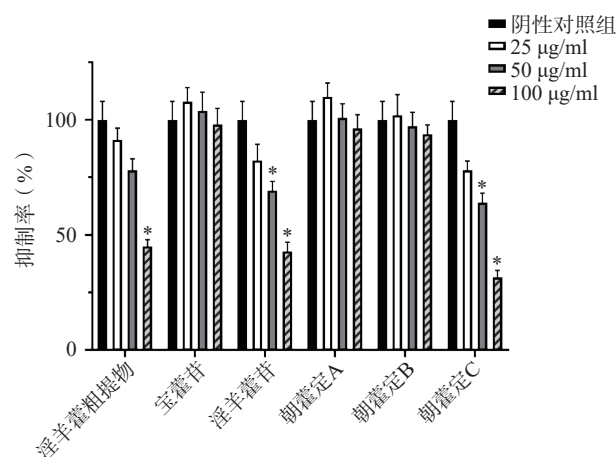


图 1 淫羊藿提取物及黄酮苷类化合物对紫色杆菌 CV016 紫色色素产生的抑制作用
* $P<0.05$,与阴性对照组比较。

2.3 对铜绿假单胞菌 PAO1 生物被膜形成的抑制作用

生物被膜的产生是导致抗生素耐药的主要原因之一。铜绿假单胞菌能生成高度结构化和致密的生物被膜,多与群体感应有关。本实验利用光学显微镜对细胞爬片上的生物膜进行观察,利用酶标仪对其定量测定,结果如图 2 所示。淫羊藿苷与朝

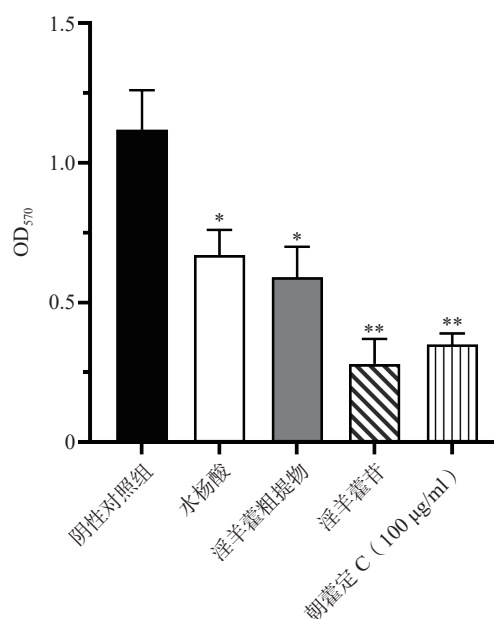


图 2 淫羊藿提取物及黄酮苷类化合物对铜绿假单胞菌 PAO1 生物被膜形成的抑制作用
* $P<0.05$,** $P<0.01$,与阴性对照组比较。

藜定 C(100 $\mu\text{g/ml}$)均表现出优于阳性对照水杨酸的抑制活性,与阴性对照组(DMSO)相比有显著差异($P<0.05$, $P<0.01$)。

2.4 几丁质酶抑制作用

几丁质酶是真菌和细菌生物被膜中的重要成分,是一种中药的毒力因子,能够帮助病原菌穿透组织侵袭宿主。本实验通过淫羊藿提取物、淫羊藿苷、朝藜定 C(100 $\mu\text{g/ml}$)对铜绿假单胞菌 PAO1 培养物进行处理,结果表明淫羊藿提取物、淫羊藿苷、朝藜定 C(100 $\mu\text{g/ml}$)可大大降低几丁质酶活。几丁质酶活分别降低了 41%、38% 和 45%(图 3),与阴性对照组比较有显著差异($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$)。

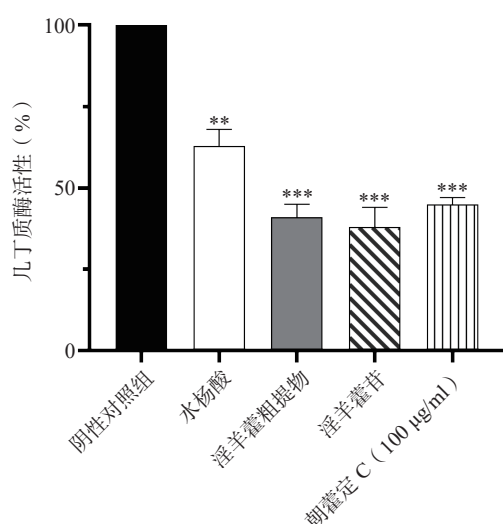


图 3 淫羊藿提取物及黄酮苷类化合物对几丁质酶抑制作用
* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与阴性对照组比较。

3 结论与讨论

本实验利用群体感应抑制研究的模式菌株 CV026 紫色杆菌、PAO1 铜绿假单胞菌对淫羊藿提取物及其主要的黄酮苷类成分进行了最小抑菌浓度 MIC 的测定,发现其在 500 $\mu\text{g/ml}$ 浓度下不影响病原菌的正常生长,随后,分别对紫色色素、生物被膜、几丁质酶等毒力因子进行测定,发现淫羊藿苷、朝藜定 C(100 $\mu\text{g/ml}$)对紫色杆菌 CV026 和铜绿假单胞菌 PAO1 的群体感应具有抑制作用。

随着常见致病菌的耐药性的增多,通过抑制或沉默致病菌群体感应的方法被认为是解决耐药性的途径之一,本实验中涉及到的作为研究群体感应的模式菌株得到了大量的应用,在此基础上挖掘出大量具有潜力的 QSI,例如绿茶中的茶多酚、西柚中的香豆素、百里香中的香芹酚以及白藜芦醇、山奈酚、槲皮素等^[9-11,18,19]。淫羊藿中的黄酮苷类成分

与上述的潜力 QSI 有着结构上的相似性,因此我们推测可能是黄酮类的化合物结构与 QS 系统的信号分子相似,当其处于高浓度时可能会与 QS 系统中的某些信号分子受体产生竞争性结合,以此抢占活性受体靶标,阻断了 QS 系统传导,最终导致细菌毒力因子的表达下降。

黄酮苷类成分作为淫羊藿的主要活性成分,尤其是本实验中发现的淫羊藿苷和朝藜定 C 两个活性单体可以作为抗感染治疗的一种潜在前体,与上述潜力 QSI 有一定差异性,前者大多是以苷元的形式存在,其水溶性较差,而本文中提到的淫羊藿苷和朝藜定 C 分别带有二糖和三糖基修饰,其水溶性大大的增强,在进入生物体后,水解生成黄酮苷元发挥抑制作用,可能具有更高的生物利用度。

【参考文献】

- [1] COATES A R M, HU Y M, HOLT J, et al. Antibiotic combination therapy against resistant bacterial infections: synergy, rejuvenation and resistance reduction[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2020, 18(1): 5-15.
- [2] NEALSON K H, PLATT T, HASTINGS J W. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system[J]. *J Bacteriol*, 1970, 104(1): 313-322.
- [3] RASMUSSEN T B, BJARNSHOLT T, SKINDERSOE M E, et al. Screening for quorum-sensing inhibitors(QSI)by use of a novel genetic system, the QSI selector[J]. *J Bacteriol*, 2005, 187(5): 1799-1814.
- [4] 綦国红, 井佳丽, 杨志萍, 等. 肉桂醛对荧光假单胞菌生物膜形成的抑制作用[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(21): 147-150.
- [5] NI N, CHOUDHARY G, LI M, et al. Pyrogallol and its analogs can antagonize bacterial quorum sensing in *Vibrio harveyi*[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18(5): 1567-1572.
- [6] NIKOLAKAKIS K, AMBER S, WILBUR J S, et al. The toxin/immunity network of *Burkholderia pseudomallei* contact - dependent growth inhibition(CDI)systems[J]. *Mol microbiol*, 2012, 84(3): 516-529.
- [7] 刘洋, 冉聪, 刘琼, 等. 川白芷抑菌活性及对铜绿假单胞菌群体感应的抑制作用[J]. *天然产物研究与开发*, 2019, 31: 135-141.
- [8] 石倩, 谢林香, 陈立志, 等. 17 种中草药细菌群体感应抑制剂的筛选[J]. *广东农业科学*, 2014, 41(10): 77-80.
- [9] NICHOLSON R L, HAMMERSCHMIDT R. Phenolic compounds and their role in disease resistance[J]. *Annu Rev Phytopathol*, 1992, 30: 369-389.
- [10] PACKIAVATHY I A, PRIYA S, PANDIAN S K, et al. Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin - an anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*[J]. *Food Chem*, 2014, 148: 453-460.
- [11] MYSZKA K, SCHMIDT M T, MAJCHER M, et al. Inhibition of quorum sensing-related biofilm of *Pseudomonas fluorescens*

- KM121 by *Thymus vulgare* essential oil and its major bioactive compounds[J]. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2016, 114: 252-259.
- [12] 齐芸, 郑永先. 淫羊藿苷抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. 中医药导报, 2022, 28(8): 153-157.
- [13] 胡梅, 梁政, 黎天良, 等. 淫羊藿水提取物联合抗菌药对耐药大肠杆菌的体外抑制效果 [J]. *南方农业学报*, 2016, 47(10): 1778-1783.
- [14] SHEPHERD J, SWIFT T, CHANG C Y, et al. Highly branched poly(N-isopropyl acrylamide)functionalized with an inducer molecule suppresses quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*[J]. *Chem Commun*, 2019, 55(66): 9765-9768.
- [15] EVANS K C, BENOMAR S, CAMUY-VÉLEZ L A, et al. Quorum-sensing control of antibiotic resistance stabilizes cooperation in *Chromobacterium violaceum*[J]. *ISME J*, 2018, 12(5): 1263-1272.
- [16] SETHUPATHY S, ANANTHI S, SELVARAJ A, et al. Vanillic acid from *Actinidia deliciosa* impedes virulence in *Serratia marcescens* by affecting S-layer, flagellin and fatty acid biosynthesis proteins[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 16328.
- [17] D'ALMEIDA R E, MOLINA R D I, VIOLA C M, et al. Comparison of seven structurally related coumarins on the inhibition of Quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa* and *Chromobacterium violaceum*[J]. *Bioorg Chem*, 2017, 73: 37-42.
- [18] 郭冰怡, 董燕红. 细菌群体感应抑制剂研究进展 [J]. 农药学报, 2018, 20(4): 408-424.
- [19] WANG J H, LU X Y, WANG C J, et al. Research progress on the combination of quorum-sensing inhibitors and antibiotics against bacterial resistance[J]. *Molecules*, 2024, 29(7): 1674.
- [收稿日期] 2024-09-29 [修回日期] 2025-01-14
[本文编辑] 李睿旻