

蓝莓多酚提取物的抑菌抗炎活性研究

朱 泓, 赵慧芳, 吴文龙, 李维林*

江苏省中国科学院植物研究所, 南京 210018

摘要:以分离纯化自牛鼻间隔软骨的多重耐药奇异变形杆菌为主要测试菌种,通过体外抑菌圈实验、最小抑菌浓度实验以及软骨体外培养实验,对蓝莓多酚提取物的抑菌及抗炎活性进行了考察,结果发现蓝莓多酚提取物能够有效抑制奇异变形杆菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌等革兰氏阳性菌及阴性菌的生长,并能显著降低软骨细胞受奇异变形杆菌感染产生的炎症反应强度。明胶酶谱检验表明蓝莓多酚提取物的抗炎作用主要是由于它能够强烈抑制培养液中软骨细胞间胶原组织蛋白的降解,从而抑制糖胺聚糖(GAG)的释放。

关键词: 蓝莓;多酚;抑菌;抗炎;奇异变形杆菌

中图分类号: Q946. 887

文献标识码: A

Anti-*Proteus mirabilis* Effect of Polyphenolic-enriched Blue Berry Extract by *In Vitro* Evaluation

ZHU Hong, ZHAO Hui-fang, WU Wen-long, LI Wei-lin *

Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Science, Nanjing 210018, China

Abstract: The blue berry (*Vaccinium corymbosum*) fruit contains bioactive polyphenols with reported anti-bacterial properties. This study sought to investigate the anti-bacterial, cartilage-protecting and anti-inflammatory effects of a polyphenolic-enriched blue berry extract using a plate inhibition test, a minimum inhibitory concentration (MIC) test, and an *in vitro* bovine nasal explant cell culture model. Results showed that not only gram-positive *Bacillus subtilis* and gram-negative *Escherichia coli* were inhibited but a multiply antibiotic resistant bacterium *Proteus mirabilis* was also susceptible to blue berry extract. Gelatin zymography test showed the protease activity was significantly decreased in bovine nasal explant cell culture samples after blue berry extract addition, which was infected with antibiotic resistant bacterium *Proteus mirabilis*. This confirmed the release inhibition of glycosaminoglycan (GAG), which was a signal of inflammatory, was in according with protease inhibition by blue berry extract.

Key words: blue berry; polyphenols; anti-bacterial; anti-inflammatory; *Proteus mirabilis*

奇异变形杆菌是一类人和动物的寄生菌和病原菌,广泛分布在自然界中,如土壤、水、垃圾、腐败有机物及人或动物的肠道内,可引起多种感染。近年来奇异变形杆菌耐药率逐渐上升,给临床抗感染治疗带来了困难^[1,2]。一些植物来源的非抗生素类抗菌天然化合物能够有效抑制该类耐药细菌的生长,如王瑞君等人于2012年报道了一株分离自石蛙的致病性奇异变形杆菌,并发现中草药忍冬藤对该菌有显著抑制效果^[3]。蓝莓是一类在我国广泛种植的小浆果,其果实富含微量营养元素和生物活性物质,具有明目、健齿、抗衰老等营养保健功能,被称作

“抗氧化之王”,如今已制成果汁、果酒、果酱、果糕等产品,广受消费者欢迎。蓝莓果中富含多酚类物质,其多酚提取物被证实具有多种对人体健康有益的生物学活性,如抗氧化、抗癌等^[4-6]。近年来,国内外少数研究者报道了蓝莓等几种浆果多酚提取物的抗菌消炎作用^[7-9],本实验室于2013年报道了黑莓、蓝莓冻干粉对奇异变形杆菌的抑制作用^[10],但至今仍未见蓝莓多酚提取物抑制奇异变形杆菌引起的感染的相关研究报道。

本研究以一株分离纯化自牛鼻间隔软骨的多重耐药奇异变形杆菌为主要指示菌种,通过体外抑菌圈实验、最小抑菌浓度实验以及软骨体外培养实验,对蓝莓多酚提取物抑制细菌生长和炎症发生的效果进行了观测和分析,以期蓝莓多酚提取物在抗菌消炎方面的应用开发提供参考。

收稿日期: 2014-01-23 接受日期: 2014-06-11

基金项目: 江苏省产学研联合创新基金(BY2011198)

* 通讯作者 E-mail: lwlcng@mail.cnbg.net

1 材料与方法

1.1 菌株来源

奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*) 分离自江苏省南京市麒麟镇灵山屠宰场新鲜肉牛鼻间隔软骨, 枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 购于中国工业微生物保藏中心, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 由南京大学赠予。

1.2 试剂与仪器

DMEM/F12 培养液购自 Gibco 公司, 考马斯亮蓝 G250 购自 Amersco 公司, 硫酸软骨素、泰勒氏兰 (1,9-二甲基亚甲蓝) 购自北京偶合科技有限公司, 氨苄青霉素、链霉素购自 Biosharp 公司; 全自动酶标仪购自 Biotech 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 蓝莓多酚提取物的制备

称取蓝莓冻干果粉 60 g, 加入 0.3% 三氟乙酸甲醇, 料液比 1:5, 30 °C 下超声 (180 W) 提取 3 次, 每次 30 min。提取液合并, 4500 rpm 离心 5 min, 取上清在 40 °C 下减压浓缩至浸膏。浸膏用 300 mL 纯净水溶解, 过滤后为上样液。

经预处理的 LS-305 大孔树脂 200 mL 装柱, 柱直径 2.5 cm, 用纯净水冲洗至水清晰、无气味、无细碎树脂后上样 (流速约 1.5 BV/h)。先用 0.3% 三氟乙酸水溶液 (约 400 mL) 冲洗除去糖、酸等杂质, 再用 0.3% 三氟乙酸甲醇溶液 (约 100 mL) 富集多酚, 收集洗脱液在 40 °C 下减压浓缩、冷冻干燥得到蓝莓多酚粉末约 4.68 g。

1.3.2 抑菌圈实验

取配成 OD600 比浊为 0.2 的供试菌悬液各 0.1 mL 涂布于 LB 固体平板上, 将直径为 10 mm 的无菌滤纸片用镊子轻放在固体培养基上, 分别滴加去离子水 (对照) 和浓度为 2.5、10、20 mg/mL 的蓝莓多酚提取物水溶液各 10 μ L。将平板置于恒温培养箱中, 37 °C 下培养 24 h, 取出测定菌圈直径。

1.3.3 最小抑菌浓度 (MIC) 测定

采用琼脂平板稀释法^[11]使 LB 琼脂平板中蓝莓多酚提取物终浓度为 5、2.5、1.26、0.63、0.32、0.16、0.08、0.04 mg/mL, 以超纯水 LB 琼脂平板为实验对照组。用超纯水将处于对数生长期的供试菌种稀释为 OD600 比浊为 0.2 的种子液, 取 0.1 mL 种子培养液涂布于药敏平板表面, 37 °C 下培养 24 h, 肉眼观察, 无细菌菌落形成的最低稀释浓度即为

MIC。

1.3.4 牛鼻间隔软骨体外培养实验

从江苏省南京市麒麟镇灵山屠宰场现宰肉牛上割取感染多重耐药奇异变形杆菌的鼻间隔软骨, 切成 3 mm 见方的小块, 浸泡于含抗生素的 DMEM/12 培养液 (氨苄青霉素、链霉素各 100 μ g/mL) 中洗涤后, 转移到 48 孔板中, 加入含抗生素的培养液, 24 h 后收获培养液作为空白对照样品, 并重新加入含抗生素培养液作为对照组, 加入含不同浓度 (25、50、100 μ g/mL) 的蓝莓多酚提取物水溶液的含抗生素培养液作为实验组。培养液每隔 4 日回收并更换一次, 收获的培养液于 -80 °C 冻存。添加新培养液前用高浓度抗生素 (10 mg/mL 的青霉素、链霉素) 浸泡软骨 30 min 以控制细菌的生长速度, 浸泡结束后用无菌水浸洗两次去除残留的抗生素, 测定培养液中的细菌浓度、可溶性蛋白、总蛋白多糖含量及基质中蛋白酶的活力。

1.3.5 细菌浓度测定

培养液中细菌浓度测定采用比浊法, 用酶标仪于 600 nm 测定收获的培养液吸光值, 新鲜培养液为对照。抑菌率 I (%) 采用以下公式: $I(\%) = (A_{t,CK} - A_{0,CK}) - (A_{t,I} - A_{0,I}) / (A_{t,CK} - A_{0,CK}) \times 100\%$, 其中 $A_{0,CK}$ 和 $A_{t,CK}$ 分别作为对照的样品在未培养和培养 t 日的吸光度, $A_{0,I}$ 和 $A_{t,I}$ 分别为含蓝莓多酚提取物样品在未培养和培养 t 日的吸光度。

1.3.6 可溶性蛋白含量测定

可溶性蛋白含量使用 Bradford 法测定。每 100 μ L 考马斯亮蓝 R250 工作液与 10 μ L 待测样品混合后常温放置 10 min 后于 595 nm 测定吸光值。参照标准品为牛血清白蛋白 (BSA)。

1.3.7 总蛋白多糖测定

牛鼻软骨中主要的蛋白多糖为聚集蛋白聚糖, 该多糖结构为一个核心蛋白共价结合一个或多个带有负电荷的糖胺聚糖 (GAG)。GAG 的含量可以通过泰勒氏蓝 (DMMB) 染色法测定, 其原理为带正电荷的 DMMB 和带负电荷的 GAG 结合后遇 DMMB 染料会发生颜色变化。200 μ L DMMB 染色液 (40 mM 甘氨酸、40 mM 氯化钠、16 μ g/mL DMMB、0.01 mol HCl) 与 50 μ L 培养液于 96 孔板中混合后, 立即用酶标仪在 525 nm 测定吸光值。参照标准品为硫酸软骨素。

1.3.8 明胶酶谱测定

将培养液 10 000 rpm 离心取上清, 以适当 pH

缓冲液稀释后,取 200 μL 加入 2 mL 离心管中,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴预热 1 min,加入 200 μL 2% 酪素溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 10 min,迅速加入 600 μL 0.4 mol/L 三氯乙酸终止反应,室温静置 15 min,10 000 rpm 离心 10 min,取上清 500 μL ,置于试管中,加入 2 500 μL 0.4 mol/L 碳酸钠溶液及 500 μL 福林酚工作液,混匀,40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min 后,测定 680 nm 吸光度。对照在加入酪素溶液前先加入三氯乙酸,其余反应条件相同。将每分钟水解酪素释放 1 μg 酪氨酸的酶量定义为一个蛋白酶活力单位。

1.4 数据分析

采用 Excel 2003 绘图,采用 SPSS19.0 进行多重

表 1 三种常见致病菌和食物腐败菌对蓝莓多酚提取物的敏感性

Table 1 The sensitivity of Blue Berry Extract to Common food pathogenic and corruption bacteria

供试菌种 Bacteria	蓝莓多酚提取物浓度 Content of blue berry extract (mg/mL)			
	0	2.5	10	20
大肠杆菌	-	-	++	+++
枯草芽孢杆菌	-	+	+++	+++
奇异变形杆菌	-	++	+++	+++

-表示无抗菌性(抑菌圈直径 6 mm);+ 表示有抗菌性(抑菌圈直径 6~10 mm);++ 表示轻度敏感(10 mm);+++ 表示敏感(11~15 mm);空白滤纸片直径为 6 mm。

2.2 蓝莓多酚提取物对细菌 MIC 测定结果

分别以大肠杆菌、枯草芽孢杆菌及奇异变形杆菌为指示菌,采用琼脂平板稀释法测定其 MIC 浓

度,结果见表 2。由表 2 可见,蓝莓多酚提取物对大肠杆菌的 MIC 为 5 mg/mL,对枯草芽孢杆菌的 MIC 为 2.5 mg/mL,对奇异变形杆菌的 MIC 为 5 mg/mL。

表 2 蓝莓多酚提取物对三种常见致病菌和食物腐败菌的 MIC

Table 2 The MIC results of blue berry extract to common food pathogenic and corruption bacteria

供试菌种 Bacteria	蓝莓多酚提取物含量 Content of blue berry extract (mg/mL)								
	5	2.5	1.26	0.63	0.32	0.16	0.08	0.04	0
大肠杆菌	-	+	+	+	+	+	+	+	+
枯草芽孢杆菌	-	-	+	+	+	+	+	+	+
奇异变形杆菌	-	+	+	+	+	+	+	+	+

-表示无菌生长;+ 表示有菌生长。

2.3 蓝莓多酚提取物对软骨细胞致病菌生长的抑制

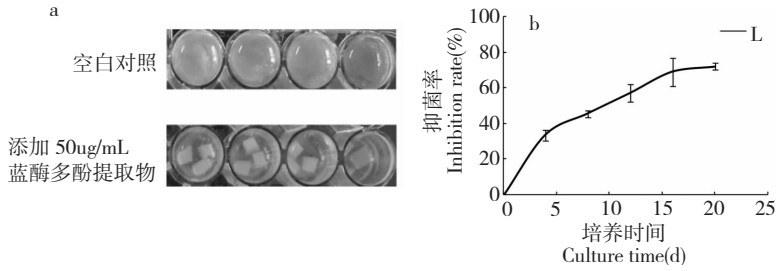
为了确证蓝莓多酚提取物对抗生素多重耐药菌奇异变形杆菌的抑制作用,我们进行了软骨体外培养实验,结果如图 1a 所示蓝莓多酚提取物对该菌的生长有明显的抑制作用。与对照相比,添加微量蓝莓多酚提取物的培养液中细菌浓度显著降低,收获

培养液所测得的蓝莓多酚提取物平均抑菌率为 $55.6 \pm 3.33\%$ 。由图 1b 可以看出,抗性菌对抗生素的耐受性随着培养时间的延长逐步显现,在第 12、16 及 20 日的培养液中细菌浓度逐渐提高,表现出了对青霉素和链霉素的不敏感。而蓝莓多酚提取物对奇异变形杆菌生长的抑制作用则能够长效维持,培养 20 日后添加微量蓝莓多酚提取物的抑菌率为 $72.2 \pm 2.00\%$ 。

2 结果与分析

2.1 抑菌圈实验

以抗生素多重抗性菌奇异变形杆菌及几种常见的致病菌和食品腐败菌为指标菌进行了抑菌敏感性测试。结果(表 1)表明,蓝莓多酚提取物对革兰氏阳性及阴性菌均有抑制作用,其中奇异变形杆菌、枯草芽孢杆菌及大肠杆菌对蓝莓多酚提取物高度敏感。



(a) 不同处理含抗生素(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素和链霉素)培养液中细菌的生长量状况;(b)添加 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蓝莓多酚提取物(L)后培养液在不同培养时间的抑菌率测定结果。

(a) Appearance of the bacteria growth at the end of the culture period with and without treatment with blue berry extract;(b) Inhibition rate of bacteria growth with and without treatment with blue berry extract.

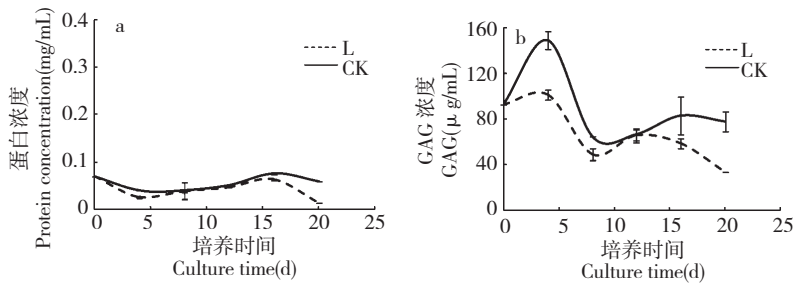
图 1 蓝莓多酚提取物对软骨细胞细菌感染的抑制效果

Fig. 1 The bacteriostatic effect of blue berry extract

2.4 蓝莓多酚提取物对软骨细胞炎症的抑制

将培养液中可溶性蛋白以及 GAG 含量的增加作为鉴别软骨细胞炎症情况的指标。通过测定培养液中可溶性蛋白含量发现,蓝莓多酚提取物实验组中,在培养初期其可溶性蛋白含量与对照组差异不大,到培养第 20 日时才显著低于对照(图 2a);在培养第 4 日和第 20 日时软骨细胞向培养基质中释放了较高浓度的 GAG(图 2b)。对比培养液中细菌生

长情况,可以确认这种软骨细胞炎症反应正是由于细菌大量繁殖引起的,而添加蓝莓多酚提取物实验组培养液中 GAG 的释放量均显著减少,分别在第 4 日降低了 $32.0 \pm 2.67\%$,在第 20 日降低了 $57.0 \pm 0.00\%$,平均抑制率达到 $39.0 \pm 4.12\%$ 。该结果表明,蓝莓多酚提取物能有效抑制软骨细胞因为细菌感染产生的炎症。



(a) 添加 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蓝莓多酚提取物(L)后培养液在不同培养时间的可溶性蛋白浓度;(b)添加 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蓝莓多酚提取物(L)后培养液在不同培养时间的 GAG 浓度。

(A) cumulative release of soluble protein;(B) cumulative release of the GAG.

图 2 蓝莓多酚提取物对软骨细胞炎症的抑制效果

Fig. 2 *In vitro* effects of the polyphenol-enriched blue berry extract on nasal bovine cartilage degradation

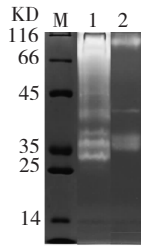
2.5 蓝莓多酚提取物对细菌胞外基质中蛋白降解酶活性的抑制

将培养液中细菌胞外基质中的酶蛋白进行明胶酶谱分析发现,与图 3 中未添加蓝莓多酚提取物的对照处理组相比(泳道 1),蓝莓多酚处理组(泳道 2)培养液中的蛋白数量和含量强度显著下降。以酪素为底物测定培养液样品蛋白酶活力,发现蓝莓冻干粉处理组为 $5.28 \pm 0.10 \text{ U}/\text{mL}$,与对照组相比降低 $81.32 \pm 5.00\%$ 。该结果表明,蓝莓多酚提取

物能够显著抑制细菌对软骨组织中蛋白质组分的酶解强度。

3 讨论

二十世纪 40 年代初青霉素问世后,细菌引起的感染性疾病曾受到较好的控制,但随着青霉素的广泛使用,有些细菌产生了青霉素酶,后者能水解 β -内酰胺环从而表现出对青霉素的耐药性。近年来,能够抵抗多种抗生素的致病菌不断被发现和报道,



M:蛋白分子量标记;1:对照;2:添加 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蓝莓多酚提取物

图 3 蓝莓多酚提取物对细菌胞外蛋白降解酶活性的抑制效果

Fig. 3 *In vitro* effects of the polyphenol-enriched blue berry extract on nasal bovine cartilage degradation

如耐甲氧西林金葡菌 (*methicillin resistant Staphylococcus aureus*, MRSA), 该类细菌在社会上引起了广泛的关注和恐慌。除金黄色葡萄球菌外, 耐药致病性奇异变形杆菌越来越多的被报道。奇异变形杆菌是一种与临床关系密切的条件致病菌, 致病因素有鞭毛、菌毛、内毒素、溶血毒素等, 引起的感染十分常见, 在引起泌尿系统感染中奇异变形杆菌仅次于大肠杆菌, 其中一部分菌株能产生青霉素酶, 并对多种抗生素产生抗性。黄敏锐等^[12] 人于 2009 年对分离于食物中毒患者的 47 株奇异变形杆菌进行了耐药分析, 发现有 59.5% 的菌株出现了 2-3 种抗生素多重耐药现象, 有 21.3% 的菌株出现 5-7 种抗生素多重耐药现象。年华等^[13] 于 2012 年对医院临床标本中分离的 844 株奇异变形杆菌的耐药性变迁情况进行分析, 发现奇异变形杆菌抗生素耐药率随时间延长明显增高, 2008、2009、2010 年超广谱 β -内酰胺酶菌株分别占 45.63%、56.98%、37.2%。近年来, 多重耐药奇异变形杆菌同样在许多患病禽畜中检出。

蓝莓果实中含有大量的多酚成分, 其主要化学成分为花色苷和鞣花酸。Gavrilova 等^[14] 通过色谱法纯化蓝莓多酚后发现花色苷占多酚总量的 35-74% 之多。这些多酚除了具有抗氧化的功能外, 也被认为可能具有抗菌消炎作用。炎症反应是身体的一种自我保护反应, 可由细菌、病毒、霉菌等感染引起, 但是过度的炎症反应则会对机体造成损伤。Osman 等^[15] 发现, 蓝莓可以使结肠炎模型大鼠盲肠肠杆菌数量显著下降, 同时减少菌群异位和炎症的发生。Shukitt 等^[16] 发现, 蓝莓可以抑制 IL-1、TNF- α 、NF-kappaB 的产生, 下调一氧化氮合酶的 mRNA 表达水平, 通过调控基因表达发挥抗炎作用。关于浆

果多酚抑菌消炎的机理, 有研究报道可能是多酚对炎症反应的促进者基质金属蛋白酶活力的抑制^[17,18]。

本研究表明蓝莓多酚提取物能够有效抑制大肠杆菌、枯草芽胞杆菌以及多重耐药奇异变形杆菌的生长, 对革兰氏阴性与阳性菌均具有较强的抑制作用, 且抑菌效果与蓝莓、黑莓冻干粉相比均有显著提升^[10]。在抑制抗性菌生长的同时, 蓝莓多酚提取物能显著降低软骨细胞受奇异变形杆菌感染产生的炎症反应强度, 并初步推断其抗炎作用是同时通过抑制细菌生长、抑制基质中蛋白降解酶活性以及蛋白多糖释放来实现的。值得关注的是, 蓝莓多酚提取物对细菌生长和炎症发生的抑制作用有良好的抑制时效性, 不会在短期让菌体产生耐受性和抗性, 也不会对细菌的蛋白酶分泌产生诱导作用。

参考文献

- 1 Ying CM(应春妹), He C(何澄), Wang YP(汪雅萍), et al. The genotypes of extended-spectrum β -lactamases in 119 clinical isolates of *Proteus mirabilis*. *Chin J Infection and Chemotherapy*(中国感染与化疗杂志), 2009, 9:343-346.
- 2 Wang H(王辉), Chen MJ(陈民钧), Ni YX(倪语星), et al. Antimicrobial resistance analysis among nosocomial gram-negative bacilli from 10 teaching hospitals in China. *Chin J Infection Chemotherapy*(中华检验医学杂志), 2005, 28: 1295-1303.
- 3 Wang RJ(王瑞君), Xiong XJ(熊筱娟). Isolation, identification and drug sensitivity tests of *Proteus mirabilis* from rotten-skin disease of *Rana spinosa*. *Freshwater Fisheries*(淡水渔业), 2012, 42(4): 31-34.
- 4 Lydia K, Luke R H, Latha D. The blackberry fruit: A review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. *J Agric Food Chem*, 2012, 60: 5716-5727.
- 5 Arpita B, Timothy JL. Strawberries, Blueberries, and Cranberries in the Metabolic Syndrome: Clinical Perspectives. *J Agric Food Chem*, 2012, 60: 5687-5692.
- 6 Karine F, Mark F, Vu DL, et al. Cranberry Proanthocyanidins: Natural Weapons against Periodontal Diseases. *J Agric Food Chem*, 2012, 60: 5728-5735.
- 7 Meng XJ(孟宪军), Liu XJ(刘晓晶), Sun XY(孙希云), et al. Antioxidant and antimicrobial activities of blueberry polysaccharides. *Food Science*(食品科学), 2010, 31: 110-113.