

19 种中药提取物对海洋致病溶藻弧菌生长和生物被膜的影响

李百元, 张叶敏, 夏晶晶, 姜红宇, 曹林艳, 陈丹*

湖南科技学院化学与生物工程学院 湖南南岭地区植物资源研究开发湖南省工程研究中心 湘南优势植物资源综合利用湖南省重点实验室, 永州 425199

摘要: 溶藻弧菌爆发和流行给海水养殖造成巨大经济损失, 生物被膜的形成导致溶藻弧菌的致病性和耐药性进一步加强。目前, 中草药已经在防治病原性细菌感染疾病中展现出积极的潜力。本研究选取 19 种中药(枸杞、重楼、紫菀、何首乌、鸡血藤、厚朴、墨旱莲、广金钱草、栀子、桃金娘、连翘、公丁香、白英、黄柏、艾叶、知母、盐知母、酒知母、炒知母), 采用不同溶剂进行提取, 旨在深入探究这些中药提取物对溶藻弧菌的生长和生物被膜形成的影响。通过采用牛津杯法和 96 孔培养法, 系统地分析了其提取物对溶藻弧菌生长的影响; 利用结晶紫染色法, 探究了这些中药提取物在其亚抑制浓度下对溶藻弧菌生物被膜形成的潜在影响。结果发现其中 12 种中药的水提物有抑菌活性, 17 种中药的乙醇提取物和 15 种中药的乙酸乙酯提取物有抑菌活性; 此外, 公丁香水提取物、重楼和知母乙醇提取物、桃金娘和连翘乙酸乙酯提取物对溶藻弧菌生物被膜的形成产生了明显的抑制效果; 同时, 我们还发现知母及其炮制品在抑菌活性方面存在一定差异, 但在对生物被膜形成的作用表现出一定的相似性。本研究的发现为细菌的防治和抗生物被膜制剂的研发具有重要的指导意义。这些发现有望为应对溶藻弧菌暴发提供新的、可持续的策略, 有助于保护海洋养殖业的可持续性, 维护食品安全, 以及维护人类健康。

关键词: 溶藻弧菌; 中药提取物; 生物被膜; 抑菌

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

Effects of 19 Chinese herbal medicines extracts on the growth and biofilm formation of *Vibrio alginolyticus*

LI Bai-yuan, ZHANG Ye-min,

XIA Jing-jing, JIANG Hong-yu, CAO Lin-yan, CHEN Dan*

College of Chemistry and Bioengineering, Hunan Engineering Research Center for Research and Development of Plant Resources in Nanling Area, Hunan Province, Key Laboratory of Comprehensive Utilization of Advantage Plants Resources in Hunan South, Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou 425199, China

Abstract: The outbreak and prevalence of *Vibrio alginolyticus* caused huge economic losses on marine aquaculture, with the formation of biofilms exacerbating the pathogenicity and antibiotic resistance. At present, Chinese herbal medicines has shown positive potential in the prevention and treatment of pathogenic bacterial infections. To further explore this potential, a study was conducted which 19 Chinese herbal medicines (Lycii Fructus, Paridis Rhizoma, Asteris Radix et Rhizoma, Polygomi Mul Tiflori Radix, Spatholobi Caulis, Magnoliae Officinalis Cortex, Ecliptae Herba, Desmodii Styracifolii Herba, Gardeniae Fructus, Downy Rosemyrtle, Forsythiae Fructus, Caryophylli Flos, Solani Lyrati Herba, Phellodendri Chinensis Cortex, Artemisiae Argyi Folium, Anemarrhenae Rhizoma, salt processed Anemarrhenae Rhizoma, wine processed Anemarrhenae Rhizoma, stir-frying processed Anemarrhenae Rhizoma) were carefully selected and subjected to extraction using various solvents to explore the effects of these extracts on the growth and biofilm formation of *V. alginolyticus*. The effects

of these extracts on the growth of *V. alginolyticus* were systematically assessed through the utilization of the Oxford cup method and the 96-well plate method. Additionally, the potential influence of sub-inhibitory concentrations of these herbal extracts on biofilm formation of *V. alginolyticus* was investigated by means of crystal violet staining. The findings indicated that water extracts of 12 Chinese herbal medicines, alcoholic extracts of 17 Chinese herbal medicines and ester extracts of 15 Chinese herbal medicines displayed noteworthy antibacterial activity. Significantly, the water extracts of Caryophylli Flos, alcoholic extracts of Paradisi Rhizoma and Anemarrhenae Rhizoma, and ester extracts of Downy Rosemyrtle and Forsythiae Fructus demonstrated noteworthy inhibitory effects on the formation of biofilm by *V. alginolyticus*. Furthermore, distinctions in antibacterial activity were discerned between the unprocessed and processed forms of Anemarrhenae Rhizoma, despite their some similar impacts on biofilm formation. The results of this investigation carry substantial guiding significance for the prevention and management of bacterial infections and the development of agents that counteract biofilm formation. These findings are expected to provide new and sustainable strategies for responding to outbreaks of *V. alginolyticus*, helping to protect the sustainability of marine aquaculture, safeguard food safety, and safeguard human health.

Keywords: *Vibrio alginolyticus*; Chinese herbal medicines extracts; biofilm; antibacterial

弧菌是一类广泛存在于全球范围内的细菌,其引发的弧菌病暴发和流行不仅对海水养殖业造成了巨大的经济损失,同时也严重威胁着人类的健康。溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 是一种嗜盐性革兰氏阴性短杆菌,隶属于弧菌科 (*Vibrionaceae*) 下的弧菌属 (*Vibrio*),其数量居海水类弧菌之首,在全球范围内的海水及河口处广泛分布,是一种常见的海洋致病菌,能够引起海水鱼类、虾类、贝类的大量死亡^[1-3]。在自然生境中,弧菌属的细菌几乎都能形成具自我保护功能的生物被膜 (bacterial biofilms),这种生物被膜不仅让细菌更容易抵御外部环境的压力,同时也提供了一个理想的平台,使它们能够更容易地入侵和感染其他生物体^[4]。

细菌生物被膜是由细菌群落分泌能够包裹自身的胞外基质 (包括胞外多糖,蛋白质和 eDNA) 和细菌所组成的结构性细菌群落,它的形成可使细菌抵御宿主免疫系统和抗菌药物杀伤作用,从而产生对抗菌药物的高度耐药性,导致感染难以清除^[5,6]。目前,关于细菌生物膜防治已成为研究的热点之一,然而由于细菌生物被膜的特点导致其具有较高的耐药性,要想根本上清除细菌,药物不仅需要能够对细菌具有杀灭作用,还需要能够通过生物被膜且不被生物被膜所阻挡或者中和^[7],但是目前能达到这样效果的药物较少。在应对这一挑战时,传统的治疗方法和抗生素使用日益受到限制。因此,研究寻找新的、可持续的方法来控制溶藻弧菌的生长和感染具有重要意义。其中,中药的潜力引起了广泛的兴趣。我国是中草药资源大国,中药使用历史悠久、来源和功效明确,在抗菌药物筛选和研究中有着得天独厚的资源优势。与合成抗生素相比,从中药中提取的活性成分含有大量结构类型独特多样的小分子化学成分,有巨大的治疗潜力和较小的副作用^[8],因而为寻找新作用机制的抗生物被膜药物提供了广阔的空间。本研究选取 19 种中药作为研究对象,采取不同的溶剂进行提取,研究其提取物对海洋溶藻弧菌生长和生物被膜形成的影响,为研发中药抗生物被膜形成的药物提供指导。

1 材料与amp;方法

1.1 实验菌株和药品

实验菌株：海洋溶藻弧菌 ATCC33787 购自广东省微生物菌种保藏中心。

中药：枸杞、重楼、紫菀、何首乌、鸡血藤、厚朴、墨旱莲、广金钱草、栀子、桃金娘、连翘、公丁香、白英、黄柏、艾叶以及不同方式炮制的知母（知母、盐知母、酒知母、炒知母）购自永州市永毅中药饮片有限公司，经湖南科技学院化学与生物工程学院陈小明副教授鉴定，鉴定结果见表 1。

试剂：2216E 液体培养基、2216E 琼脂培养基（批号：20230711、20230515，广东环凯生物科技有限公司）；分析纯 95%乙醇、乙酸乙酯（批号：20230406、20220304，成都金山化学试剂有限公司）；结晶紫染料（纯度>90%，批号：20220918，天津市光复精细化工研究所）。

表 1 中药信息

Table 1 The information of Chinese herbal medicines

编号 No.	中药 Chinese herbal medicine	基源植物 Original plant	编号 No.	中药 Chinese herbal medicine	基源植物 Original plant
		百合科植物云南重楼			
S1	重楼 <i>Paris</i> Rhizoma	<i>Paris polyphylla</i> Smith var. <i>yunnanensis</i> (Franch.) Hand. -Mazz	S11	连翘 <i>Forsythiae</i> Fructus	木犀科植物连翘 <i>Forsythia suspensa</i> (Thunb.) Vahl
S2	广金钱草 <i>Desmodii</i> <i>Styracifolii</i> Herba	豆科植物广金钱草 <i>Desmodium</i> <i>styracifolium</i> (Osborne) Merr.	S12	公丁香 <i>Caryophylli</i> Flos	桃金娘科植物公丁香 <i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. EtPerry
S3	鸡血藤 <i>Spatholobi</i> Caulis	豆科植物密花豆 <i>Spatholobus</i> <i>suberectus</i> Dunn	S13	白英 <i>Solani</i> <i>Lyrati</i> Herba	茄科茄属植物白英 <i>Solanum lyratum</i> Thunb.
S4	墨旱莲 <i>Ecliptae</i> Herba	菊科植物缙肠 <i>Eclipta</i> <i>prostrata</i> L.	S14	黄柏 <i>Phellodendri</i> <i>Chinensis</i> Cortex	芸香科植物黄皮树 <i>Phellodendron</i> <i>chinese</i> Schne
S5	厚朴 <i>Magnoliae</i> <i>Officinalis</i> Cortex	木兰科植物厚朴 <i>Magnolia officinalis</i> Rehd. et Wils	S15	艾叶 <i>Artemisiae</i> <i>Argyi</i> Folium	菊科植物艾 <i>Artemisia</i> <i>argyi</i> Levl. et Vant.
S6	紫菀 <i>Asteris</i> Radix et Rhizoma	菊科植物紫菀 <i>Aster</i> <i>tataricus</i> L. f.	S16	知母 <i>Anemarrhenae</i> Rhizoma	百合科植物知母 <i>Anemarrhena</i> <i>asphodeloides</i> Bge.
S7	何首乌 <i>Pol</i> <i>ygoni</i> Mul Tiflori Radix	蓼科植物何首乌 <i>Polygonum</i> <i>multiflorum</i> Thunb	S16-1	盐知母 Salt processed <i>Anemarrhenae</i>	百合科植物知母 <i>Anemarrhena</i> <i>asphodeloides</i> Bge.

				Rhizoma	
S8	梔子 <i>Gardeniae</i> Fructus	茜草科植物梔子 <i>Gardenia jasminoides</i> J. Ellis	S16-2	酒知母 Wine processed <i>Anemarrhenae</i> Rhizoma	百合科植物知母 <i>Anemarrhena</i> <i>asphodeloides</i> Bge.
S9	枸杞 <i>Lycii</i> Fructus	茄科植物宁夏枸杞 <i>Lycium barbarum</i> L.	S16-3	炒知母 Stir-frying processed <i>Anemarrhenae</i> Rhizoma	百合科植物知母 <i>Anemarrhena</i> <i>asphodeloides</i> Bge.
S10	桃金娘 <i>Downy</i> <i>Rosemyrtle</i>	桃金娘科植物桃金娘 <i>Rhodomyrtus</i> <i>tomentosa</i> (Ait.) Hassk.			

1.2 实验方法

1.2.1 中药的预处理

将购买的 19 种中药用粉碎机进行粉碎，过 50 目筛子，得到药物粉末，烘干备用。

1.2.2 中药提取物的制备

分别使用蒸馏水、95%的乙醇和乙酸乙酯 3 种溶剂，采用回流提取法对 19 种中药进行提取，得到的提取物记为水提取物（E1）、乙醇提取物（E2）和乙酸乙酯提取物（E3）。称取药物粉末 200 g，2 L 提取溶剂 80 °C 回流萃取 3 h，过滤，药渣再用 1.2 L 提取溶剂回流萃取 3 h，过滤，合并两次提取液，真空抽滤，旋转蒸发浓缩，浸膏用真空冷冻干燥至粉末，即为中药提取物，用相应的提取溶剂进行溶解制作药物母液用于后续实验。

1.2.3 牛津杯法测定抑菌活性

将得到的药物母液用 2216E 液体培养基稀释至 100 mg/mL，用于牛津杯实验。将 -80 °C 保存的海洋溶藻弧菌用 2216E 平板进行活化，24 h 后挑取单菌落接种于含有 3 mL 2216E 的试管中，28 °C 培养至 $OD_{600\text{nm}}=0.05$ 左右，取 100 μL 菌液涂布在 2216E 平板上，待菌液充分渗透于培养基中，用无菌镊子夹取牛津杯（7.8×6×10 mm）放至其上，牛津杯与培养基充分接触，不留缝隙，每个平板放置 4 个牛津杯，分别加入 200 μL 的阴性对照（与药液等体积的 2216E 液体培养基和溶剂）、阳性对照（100 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素抗生素）、实验组（2 种药液），重复 3 个平板，于 28 °C 培养箱中培养 18~24 h，观察其抑菌圈大小。

1.2.4 最小抑菌浓度 MIC 的测定

将 -80 °C 保存的海洋溶藻弧菌用 2216E 平板进行活化，24 h 后挑取单菌落接种于含有 3 mL 2216E 的试管中，28 °C 200 r/min 培养过夜，分光光度计测定菌液 $OD_{600\text{nm}}$ 数值，并将其稀释至 $OD_{600\text{nm}}$ 值为 0.1。采用二倍稀释法，用 2216E 液体培养基对中药提取物进行梯度稀释 8 个浓度，运用 96 孔板细菌培养法^[9]测定弧菌的 MIC 值：实验组为 100 μL 稀释菌液和 100 μL 稀释的中药提取物混匀加入 96 孔板中，阳性对照组为 100 μL 稀释菌液和 100 μL 2216E 液体培养基混匀加入 96 孔板中作为，空白对照组为 100 μL 2216E 液体培养基，各 3

个平行，于 28 °C 培养箱静置培养 24 h，酶标仪测定 OD_{600 nm} 数值，以阳性对照和空白对照作为参考分析实验组 MIC 值。

1.2.5 生物被膜的测定及分析

采用改进后的 96 孔细菌培养法和结晶紫染色法^[10]测定中药提取物对海洋溶藻弧菌生物被膜的作用。基于部分中药提取物对溶藻弧菌有抑制作用，为了避免其抑制作用的影响，选择 1/2~1/8 MIC 的药物浓度作为生物被膜实验浓度，以不含中药提取物的 2216E 液体培养基为空白对照组；于 28 °C 培养箱静置培养 6 h 和 12 h 后测定 OD_{620 nm} 值；然后蒸馏水清洗 3 次，加入结晶紫溶液染色 20 min 后倒去染液，用蒸馏水清洗 2 次；最后再加入无水乙醇溶解结晶紫 5 min，用酶标仪测定 OD_{540 nm} 值。以上实验均重复 3 次。运用 SigmaPlot 软件，以 [实验组 OD_{540 nm}-空白对照组 OD_{540 nm}] 为纵坐标，时间为横坐标构建柱状图，分析中药提取物对溶藻弧菌生物被膜的作用。

1.2.6 数据处理

用直尺量取抑菌实验的抑菌圈直径，并且运用 Excel 计算 3 组平行的平均值和标准偏差 ($\bar{x} \pm s$)，即为抑菌圈大小。运用 Excel 计算生物被膜实验的实验组与对照组 OD_{540 nm} 数值的标准偏差 (standard deviation, SD)，以实验组与对照组 OD_{540 nm} 数值的 SD 作为中药提取物对溶藻弧菌生物被膜作用的判断标准。

2 实验结果及分析

2.1 牛津杯实验测定中药提取物对溶藻弧菌的抑菌活性

牛津杯实验结果如表 2 所示，19 种中药中，水、乙醇和乙酸乙酯提取的栀子和桃金娘对溶藻弧菌均无抑菌活性，其他中药提取物表现出不同的抑菌活性，其中 12 种中药的水提取物对溶藻弧菌有抑菌作用，17 种中药的乙醇提取物对溶藻弧菌有抑菌作用，15 种中药的乙酸乙酯提取物对溶藻弧菌有抑菌作用。总体来说，不同溶剂提取物对溶藻弧菌表现出不同的抑菌活性，有机溶剂提取物中有活性的药物种类高于水提取的药物种类，推测可能是因为中药中水溶性的成分比较单一且过高的提取温度破坏了热稳定性较差的成分，使得提取液的抑菌效果减弱，因此，选用最合适的提取溶剂对于筛选高活性的药物以及防止漏筛活性成分具有重要意义。

表 2 不同溶剂中药提取物的抑菌圈直径

Table 2 The inhibition zone diameter of Chinese herbal medicines extracts

中药 Chinese herbal medicine	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)			中药 Chinese herbal medicine	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)		
	E1	E2	E3		E1	E2	E3
S1	N	0.6±0.2	0.7±0.4	S12	0.9±0.7	6.2±0.1	3.7±0.5
S2	5.2±0.1	1.2±1.0	3.7±0.5	S13	4.7±2.5	8.2±1.0	9.0±0.7
S3	0.7±0.3	6.7±2.5	12.2±5.0	S14	N	2.2±1.0	2.4±0.2
S4	6.2±1.0	4.7±0.5	2.2±0.1	S15	0.7±0.5	3.2±1.0	1.5±0.3
S5	4.7±2.5	2.2±0.5	1.2±1.0	S16	3.3±0.8	3.0±1.1	5.7±2.5

S6	N	1.7±0.5	N	S16-1	5.4±1.7	7.7±6.5	1.2±0.5
S7	N	3.2±0.1	6.7±0.5	S16-2	N	1.0±0.8	1.4±0.2
S8	N	N	N	S16-3	5.7±0.5	8.2±0.7	N
S9	0.4±0.2	0.9±0.2	1.9±0.2	NC	N	N	N
S10	N	N	N	PC	21.3±0.4	21.3±0.4	21.3±0.4
S11	0.7±0.5	5.7±1.5	0.4±0.2				

注：“N”：没有抑菌效果；NC：阴性对照；PC：阳性对照。

Note: "N": No antibacterial effect. NC: Negative control; PC: Positive control.

2.2 不同溶剂提取物对溶藻弧菌的 MIC 的测定

MIC 测定结果如表 3 所示，19 种中药中，水、乙醇和乙酸乙酯提取的栀子和桃金娘对溶藻弧菌均无抑菌活性，其他中药提取物表现出不同的抑菌活性。12 种中药的水提物对溶藻弧菌有抑菌作用，MIC 为 25~50 mg/mL；17 种中药的乙醇提取物有不同程度的抑菌效果，其中公丁香抑菌效果最明显，MIC 为 1.6 mg/mL，何首乌和鸡血藤的抑菌效果次之，MIC 为 6.3 mg/mL，枸杞、重楼、墨旱莲、连翘、黄柏、盐知母、酒知母和炒知母的 MIC 为 12.5 mg/mL，紫菀、厚朴、白英和艾叶的 MIC 为 25 mg/mL，广金钱草和知母的 MIC 为 50 mg/mL；15 种中药的乙酸乙酯提取物也表现出不同的抑菌效果，其中鸡血藤和公丁香有明显抑菌效果，MIC 为 3.1 mg/mL，枸杞、何首乌、广金钱草、艾叶和知母的抑菌效果次之，MIC 为 6.3 mg/mL，重楼、白英和盐知母的 MIC 为 12.5 mg/mL，厚朴、墨旱莲和黄柏的 MIC 为 25 mg/mL，连翘和酒知母的 MIC 为 50 mg/mL。

中药的炮制是我国独有的一项中药制药技术，中药材在炮制过程中会发生各种生物转化和化学变化^[11]，因此，我们选取知母及 3 种临床常用炮制品盐知母、酒知母和炒知母，以不同溶剂进行提取，研究炮制方式对溶藻弧菌生长的影响，结果发现，4 种知母水提物中，盐制法的抑菌效果最好，MIC 为 25 mg/mL，酒制法知母无抑菌效果；4 种知母的乙醇提取物均有抑菌活性，其中盐制法、酒制法和炒制法的 MIC 均为 12.5 mg/mL；4 种知母的乙酸乙酯提取物除炒制法无抑菌活性外，其他三种均有抑菌活性（见表 3）。由此可见，知母的不同炮制方式，对其抑菌活性存在一定影响。

表 3 不同溶剂中药提取物对溶藻弧菌的 MIC

Table 3 MIC of different solvent extract of Chinese herbal medicines against *V. alginolyticus*

中药 Chinese herbal medicine	MIC (mg/mL)			中药 Chinese herbal medicine	MIC (mg/mL)		
	E1	E2	E3		E1	E2	E3
S1	N	12.5	12.5	S11	25	12.5	50
S2	25	50	6.3	S12	50	1.6	3.1
S3	25	6.3	3.1	S13	50	25	12.5
S4	25	12.5	25	S14	N	12.5	25
S5	25	25	25	S15	50	25	6.3
S6	N	25	N	S16	50	50	6.3
S7	N	6.3	6.3	S16-1	25	12.5	12.5
S8	N	N	N	S16-2	N	12.5	50

S9	50	12.5	6.3	S16-3	50	12.5	N
S10	N	N	N				

注：“N”：没有抑菌效果。

Note: "N": No antibacterial effect.

2.3 不同溶剂提取物对溶藻弧菌生物被膜形成的影响

为了尽可能筛选出有活性的组分，我们分析了三种不同溶剂提取物对弧菌生物被膜的活性，结果如表 4 和图 1 所示，公丁香的水提取物对溶藻弧菌生物被膜的形成有明显的抑制作用；白英的水提取物能促使溶藻弧菌生物被膜提前瓦解；鸡血藤、墨旱莲、厚朴、栀子、连翘和艾叶的水提取物对溶藻弧菌生物被膜的形成有明显的促进作用，其中厚朴和栀子表现出强烈的促进作用；黄柏水提取物在 6 h 抑制溶藻弧菌生物被膜的形成，而在 12 h 促进溶藻弧菌生物被膜的形成。重楼和知母的乙醇提取物对溶藻弧菌生物被膜的形成有明显的抑制作用；广金钱草、鸡血藤、墨旱莲、厚朴、何首乌、栀子、枸杞、桃金娘和连翘乙醇提取物对溶藻弧菌生物被膜的形成有明显的促进作用，且除广金钱草和墨旱莲外，均有强促进作用；紫菀和黄柏的乙醇提取物在 6 h 抑制溶藻弧菌生物被膜的形成，而在 12 h 促进溶藻弧菌生物被膜的形成。桃金娘和连翘的乙酸乙酯提取物对溶藻弧菌生物被膜的形成有明显的抑制作用；墨旱莲、厚朴、何首乌、枸杞、黄柏和知母的乙酸乙酯提取物对溶藻弧菌生物被膜的形成有明显的促进作用，其中知母表现出强烈的促进作用。

表 4 中药水提取物对溶藻弧菌生物被膜形成的影响

Table 4 Effects of water extract of Traditional Chinese medicine on the biofilm formation of *V. alginolyticus*

中药 Chinese herbal medicines	浓度 Concentration (mg/mL)			培养 6 h Incubation for 6 h			培养 12 h Incubation for 12 h		
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3
S1	12.5	6.3	6.3	N	---	+	N	-	N
S2	6.3	12.5	3.1	+	N	N	N	+	N
S3	6.3	3.1	1.6	N	+	--	+	+++	N
S4	6.3	6.3	6.3	+	N	+	++	++	+
S5	6.3	6.3	6.3	++	+++	N	+++	+++	++
S6	12.5	6.3	12.5	N	--	---	N	+++	N
S7	12.5	3.1	3.1	+	N	+	N	+++	++
S8	12.5	12.5	12.5	+++	+	-	+++	+++	N
S9	12.5	6.3	3.1	+	++	+	N	+++	++
S10	12.5	12.5	12.5	-	N	---	N	+++	-
S11	6.3	6.3	12.5	N	N	---	+	+	-
S12	12.5	0.8	0.8	-	-	-	-	N	+
S13	12.5	6.3	6.3	N	--	---	-	N	++
S14	12.5	6.3	6.3	-	---	N	++	++	+
S15	12.5	6.3	3.1	++	N	-	+	N	N
S16	12.5	12.5	3.1	--	---	+++	N	-	+++
S16-1	6.3	6.3	6.3	-	---	+++	N	-	+++
S16-2	12.5	6.3	12.5	--	--	+++	-	N	+++

S16-3 12.5 6.3 12.5 -- --- - - - N

注：“-”表示抑制生物膜的形成；“+”表示促进生物膜的形成；“N”表示无作用（SD<0.1）；“-”“+”表示弱作用（0.1≤SD<0.2）；“-”“++”表示中强作用（0.2≤SD<0.3）；“-”“+++”表示强作用（SD≥0.3）。

Note：“-” means inhibiting the biofilm formation of *V. alginolyticus*; “+” means promoting the biofilm formation of *V. alginolyticus*; “N” means no effect (SD<0.1); “-” “+” means weak action (0.1≤SD<0.2); “-” “++” means moderate action (0.2≤SD<0.3); “+++” means strong action (SD≥0.3).

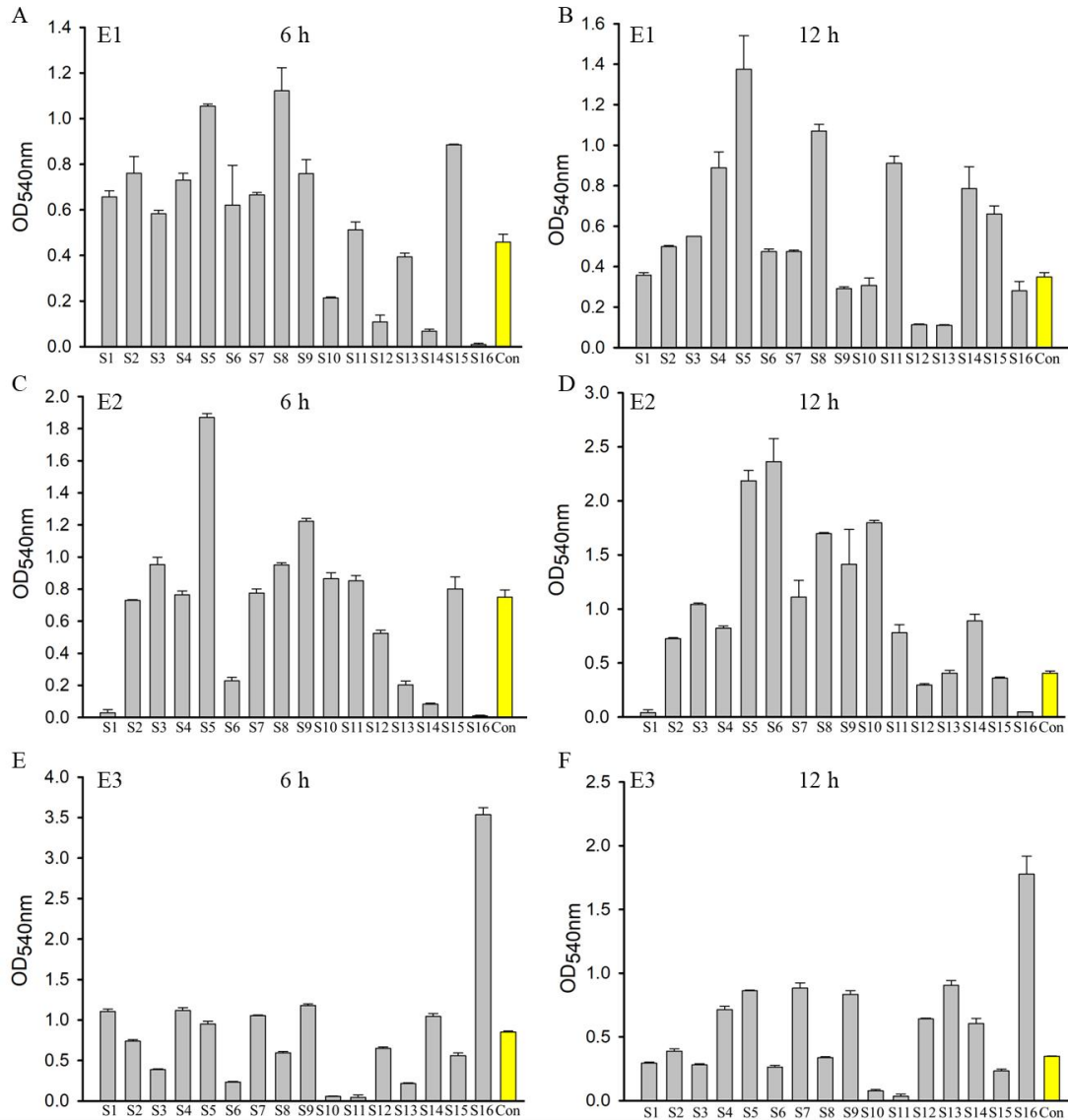


图1 中药的不同溶剂提取物对溶藻弧菌生物被膜的影响

Fig.1 Effect of different solvent extracts of Chinese herbal medicines on biofilm formation of *V. alginolyticus*

注：Con：对照（下同）。Note: Con: Control group (the same below).

此外，研究不同炮制方式制备的知母，其不同溶剂提取物对溶藻弧菌生物被膜形成的影响，结果发现，酒制法和炒制法知母的水提取物对溶藻弧菌生物被膜的形成有明显的抑制作用（见图 2A）；4 种知母的乙醇提取物除酒制法外，其他 3 种知母对溶藻弧菌生物被膜的形成有明显的抑制作用（见图 2B）；4 种知母的乙酸乙酯提取物除炒制法外，其他三种对溶藻弧菌生物被膜的形成具有强烈的促进作用（见图 2C）。由此可见，不同炮制方式制备的知母，

其抑菌活性存在一定差异,但同一溶剂提取物对溶藻弧菌生物被膜形成的影响,呈现出一定的相似性。

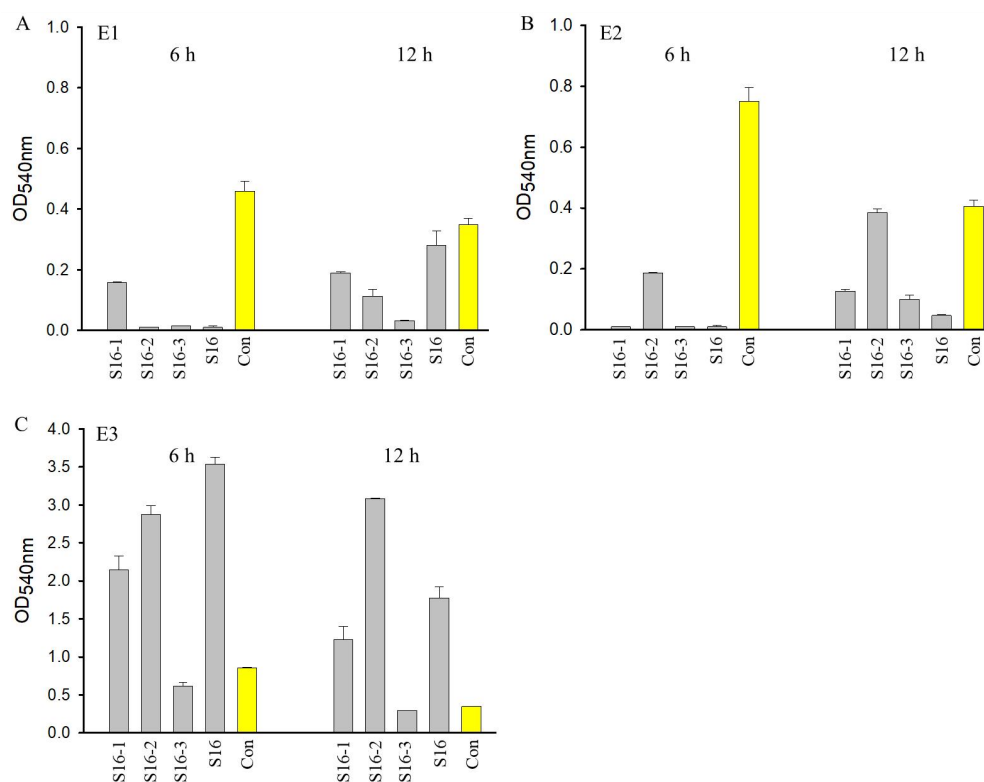


图 2 知母及其不同炮制药材提取物对生物被膜的影响

Fig. 2 Effects of the extracts of Anemarrhenae Rhizoma and its different processed medicinal materials on biofilm

3 讨论与结论

生物被膜状态下的细菌不仅对抗生素的耐受性显著提高,而且致病菌的致病能力也变得更强大,因此,传统的抗生素治疗细菌生物被膜感染受到极大的限制^[12,13]。目前关于细菌生物被膜防治成为了研究热点。大量研究表明植物提取物及其活性成分具有抗细菌生物被膜感染的能力,且有成本低、加工方便、抗菌性好、细菌不易产生耐药性的优点,因此,探寻合适的植物提取物及其活性成分将成为防治细菌生物被膜感染的有效策略^[14,15]。

本研究选取 19 种中药,采用不同溶剂进行提取,研究其提取物对海洋溶藻弧菌生长和生物被膜形成的影响,结果发现 19 种中药的不同溶剂提取物对溶藻弧菌表现出不同的抑菌活性,其中 12 种中药的水提物有抑菌活性,17 种中药的乙醇提取物有抑菌活性,15 种中药的乙酸乙酯提取物有抑菌活性。19 种中药的不同溶剂提取物中,大部分提取物对溶藻弧菌生物被膜的形成有促进作用,而公丁香水提取物、重楼和知母乙醇提取物、桃金娘和连翘乙酸乙酯提取物对溶藻弧菌生物被膜的形成有明显的抑制作用。

公丁香是经过干燥处理的桃金娘科蒲桃属植物丁香的花蕾,被广泛用作香料和药材^[16]。Chen 等^[17]利用沸水煎煮法进行药物提取研究了 100 种中草药对溶藻弧菌的抑菌效果,结果

发现在药液 pH 值调至中性后, 公丁香能够有效抑杀溶藻弧菌, 公丁香的 MIC 值达到 125 mg/mL。本研究采用回流萃取法以及不同溶剂进行药物提取, 结果发现公丁香的 3 种溶剂提取物均有明显的抑菌效果, 水提取物 MIC 达到 50 mg/mL, 药物活性成分的提取效果明显得到了提高, 且有机溶剂提取的公丁香具有更强的抑菌活性, 乙醇提取物和乙酸乙酯提取物 MIC 分别达到 1.6 mg/mL 和 3.1 mg/mL, 推测这与它含有的抑菌成分的化学性质密切相关。公丁香富含丁香酚、乙酰丁香酚、丁香烯、水杨酸甲酯、甲基正戊基酮以及苯甲醛等, 其中丁香酚是最主要的抑菌成分^[16,18], 因而相比于公丁香的水提取物, 有机溶剂提取物具有更高的抑菌活性。此外, 公丁香水提取物还表现出明显的抑制溶藻弧菌生物被膜形成的作用, 公丁香醇和乙酸乙酯提取物在较低的工作浓度 (0.8 mg/mL) 对溶藻弧菌生物被膜形成前期仍有明显的抑制作用。因此, 公丁香无论是作为抑菌剂还是抗生物被膜制剂都具有很高的利用价值。

重楼为百合科重楼属植物的总称, 目前已从中分离鉴定出 241 种化合物, 如甾体皂苷类、五环三萜类、甾醇类、黄酮类、多糖类、生物碱类等, 具有镇痛、止血、抗肿瘤、抑菌等活性, 其中甾体皂苷有 136 种, 是重楼的主要活性成分^[19-21]。本研究发现重楼的乙醇提取物和乙酸乙酯提取物均有较强的抑菌活性, MIC 均为 12.5 mg/mL, 且乙醇提取物对溶藻弧菌生物被膜形成有明显的抑制作用, 而水提取物既无抑菌活性也无抗生物被膜活性, 这是因为重楼的主要活性成分甾体皂苷不溶于水, 易溶于甲醇、乙醇、氯仿、乙醚等有机溶剂, 因而乙醇提取物具有更好的抑菌和抗生物被膜效果。

中药炮制后活性成分、功效及毒性均会发生变化^[22]。知母为百合科植物知母的干燥根茎, 主要含有甾体皂苷类、黄酮类、多糖类、木脂素类、有机酸类和双苯吡酮类等活性成分, 其中甾体皂苷是知母中最具有生物活性的成分^[23-25]。Bai 等^[26]对比研究了知母炮制前后的皂苷类、黄酮类及多糖类成分含量的变化, 结果发现知母经盐炙后, 多种单体皂苷、芒果苷和多糖类成分含量均升高; 经酒炙后, 知母皂苷 I、知母皂苷 AIII、芒果苷、新芒果苷、异芒果苷和多糖类成分含量均升高; 经炒制后, 菝葜皂苷元、知母皂苷 I、芒果苷和多糖类成分含量均升高。本研究比较分析了知母及其 3 种炮制品盐知母、酒知母和炒知母的不同溶剂提取物对溶藻弧菌生长和生物被膜形成的作用, 结果发现炮制方式不同, 其抑菌活性存在差异, 但对溶藻弧菌生物被膜形成的影响呈现出一定的相似性, 推测其活性的变化与知母炮制后化学成分的变化密切相关, 但与化学成分之间的对应关系还需进一步研究。

植物提取物及其活性成分的研究在抗细菌生物被膜方面展现了广阔的应用前景, 开发抗细菌生物膜制剂的研究对致病性弧菌引起的水产动物疾病防治具有重要的参考意义。接下来的研究我们将进行中药提取物活性成分的鉴定, 进而解析其对致病性弧菌生物被膜形成的抑制机制, 从而开发安全、有效的抗细菌生物膜制剂。

参考文献

- 1 Yang B,Zhai S,Zhang F,et al.Genome-wide association study toward efficient selection breeding of resistance to *Vibrio alginolyticus* in Pacific oyster,*Crassostrea gigas*[J].Aquaculture,2022,548:737592.

- 2 Letchumanan V, Yin WF, Lee LH, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from retail shrimps in Malaysia[J]. *Front Microbiol*, 2015, 6:33.
- 3 Zhang X, Huang BW, Xin LS, et al. Identification and characterization of infectious pathogens associated with mass mortalities of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) cultured in Northern China[J]. *Biology(Basel)*, 2023, 12:759.
- 4 Krupesha Sharma SR, Shankar KM, Sathyanarayana ML, et al. Development of biofilm of *Vibrio alginolyticus* for oral immunostimulation of shrimp[J]. *Aquac Int*, 2011, 19:421-430.
- 5 Kumar A, Alam A, Rani M, et al. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens[J]. *Int J Med Microbiol*, 2017, 307:481-489.
- 6 Gebreyohannes G, Nyerere A, Bii C, et al. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms[J]. *Heliyon*, 2019, 5:e02192.
- 7 Cheng P, Xiong J, Li H, et al. Using plant extracts and their active ingredients to inhibit bacterial biofilms[J]. *Chin J Biotechnol(生物工程学报)*, 2022, 38:1753-1767.
- 8 Liu SW, Xu XY, Jie X, et al. Multi-drug resistant uropathogenic *Escherichia coli* and its treatment by Chinese medicine[J]. *Chin J Integr Med*, 2017, 23:763-769.
- 9 Flentie K, Spears BR, Chen F, et al. Microplate-based surface area assay for rapid phenotypic antibiotic susceptibility testing[J]. *Sci Rep*, 2019, 9:237.
- 10 Santajit S, Kong-Ngoen T, Tunyong W, et al. Occurrence, antimicrobial resistance, virulence, and biofilm formation capacity of *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. isolated from raw seafood marketed in Bangkok, Thailand[J]. *Vet World*, 2022, 15:1887-1895.
- 11 Zheng SY, Zhou J, Wong J. Research progress on processing quality analysis of traditional Chinese medicine[J]. *Tianjin Pharm(天津药学)*, 2022, 34:59-63.
- 12 Supardy NA, Ibrahim D, Nor SRM, et al. Bioactive compounds of *Pseudoalteromonas* sp. IBRL PD4.8 inhibit growth of fouling bacteria and attenuate biofilms of *Vibrio alginolyticus* FB3[J]. *Pol J Microbiol*, 2019, 68:21-33.
- 13 Hall CW, Mah TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2017, 41:276-301.
- 14 Ćirić AD, Petrović JD, Glamočlija JM, et al. Natural products as biofilm formation antagonists and regulators of quorum sensing functions: a comprehensive review update and future trends[J]. *S Afr J Bot*, 2019, 120:65-80.
- 15 Xu XJ, Li XH, Ma YF, et al. *In vitro* bacteriostasis of 49 kinds of Chinese herbs, antibiotics and their compound prescriptions against *Vibrio alginolyticus*[J]. *J Guangdong Ocean Univ(广东海洋大学学报)*, 2019, 39:30-38.
- 16 Chang H, Ma CD, Yang YC, et al. Advance in studies on non-volatile components of Caryophylli Flos and their pharmacological activities[J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2020, 32:1954-1968.
- 17 Chen H, Zhang QZ. Antibacterial effect of 100 Chinese herbal medicines against *Vibrio alginolyticus* *in vitro*[J]. *Chin J Prev Vet Med(中国预防兽医学报)*, 2012, 34:452-455.
- 18 Zhang YN, Chen Y, Peng XL, et al. Bioassay-guided extraction of antimicrobial substances from clove[J]. *Food Sci(食品科学)*, 2010, 31:25-27.
- 19 Wei JC, Gao WY, Yan XD, et al. Chemical constituents of plants from the genus *Paris*[J]. *Chem Biodivers*, 2015, 45:1277-1297.
- 20 Guan X, Li RS, Duan BZ, et al. Advances in research on chemical constituents and pharmacological effects of *Paris* genus and prediction and analysis of quality markers[J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2019, 50:4838-4852.
- 21 Gu WC, Zhao SX, Yang M, et al. Simultaneous determination of amino acids in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* fibril from different habitats by UPLC[J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2020, 32:1562-1575.

- 22 Qiu HM.Study on the effect of processing of Chinese medicinal materials on the efficacy and toxicity of active components of Chinese medicinal materials[J].Chin J Med Clin(中国药物与临床),2021,21:3325-3326.
- 23 Liu Y,Lu DX,Gao YL.Chemical constituents of *Anemarrhenae Rhizoma*[J].J Chin Med Mater(中药材),2021,44:1370-1374.
- 24 Cao RA, Ji RX, Tabarsa M, et al.Purification, characterization and immunostimulatory effects of polysaccharides from *Anemarrhena asphodeloides* rhizomes[J].Int J Biol Macromol,2021,172:550-559.
- 25 Li QT,Xiong YH,Hu L,et al.Advances in pharmacological research of *Anemarrhena* at home and abroad[J].Kexue Zixun(科学咨询),2023,2:120-124.
- 26 Bai HD,Zhang ZD,Su HL ,et al.Research progress on the effects of processing on chemical constituents and pharmacological actions of *Anemarrhena asphodeloides*[J].Chin Pharm(中国药房),2021,32:2159-2163.

收稿日期: 2023-10-19 接受日期:

基金项目: 湖南科技学院科学研究一般资助项目(23XKYZZ03); 广东省海洋药物重点实验室开放项目(LMM2020-1); 湖南省科技创新计划资助(2022RC1169); 国家自然科学基金青年基金(32100151)

*通信作者 Tel: 13467495113; E-mail: cd409698080@126.com