

黄连素对3种水产动物致病菌的抑制作用研究

谢丽玲, 赵水灵, 余飞, 成凯, 朱炎坤, 张勇

(汕头大学生物学系, 广东 汕头 515063)

摘要: 文章研究了黄连素对副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)等3种致病菌的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC), 检测了黄连素对病原菌菌体形态和生长曲线的影响, 并以此解析黄连素对这3种致病菌的抑制特点和抑菌机制。结果显示, 黄连素对副溶血弧菌、溶藻弧菌、嗜水气单胞菌的MIC和MBC分别为 $0.391 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $0.391 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.391 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $0.781 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.781 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $1.563 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 说明黄连素对3种致病菌均有明显的抑制作用, 其中对副溶血弧菌的抑制效果最佳。同步结果显示, $1.00 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 黄连素不仅会严重破坏致病菌的菌体形态, 而且使致病菌的迟缓期延长2~7 h, 这暗示黄连素可能通过影响致病菌的细胞结构和生长繁殖来达到抑菌的效果。由此可见, 黄连素在防治水产类细菌性疾病上有很好的应用潜力。

关键词: 黄连素; 水产动物致病菌; 抑菌作用; 抑菌机制

中图分类号: S 949

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2013)04-0045-05

Antibacterial effects of Berberine on three aquatic pathogens *in vitro*

XIE Liling, ZHAO Shuiling, YU Fei, CHENG Kai, ZHU Yankun, ZHANG Yong

(Biology Department of Shantou University, Shantou 515063, China)

Abstract: In order to reveal antibacterial effects of Berberine on three aquatic pathogens and its mechanisms, we determined the minimal inhibitory concentration/the minimal bactericidal concentration (MIC/MBC) of Berberine on *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* and *Aeromonas hydrophila*, as well as the effects of Berberine on the cell morphology and the cell growth curve of three bacteria. The results show that the MIC and MBC of Berberine on *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* and *A. hydrophila* are $0.391 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $0.391 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.391 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $0.781 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.781 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $1.563 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. These results indicate that Berberine has significant antibacterial effects on tested bacteria, especially its inhibitory effect on *V. parahaemolyticus*. Besides, $1.00 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ of Berberine can seriously destroy the cell morphology of pathogens, and extend the lag phase of pathogens to 2~7 h, which suggests that the antibacterial effects of Berberine might be achieved through affecting the cell structure and growth of pathogens. In conclusion, Berberine is a potential drug against aquatic bacterial diseases.

Key words: Berberine; aquatic animal pathogens; antibacterial effects; antibacterial mechanism

细菌性疾病是水产养殖业中最严重的疾病之一^[1], 弧菌属的副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)以及气单胞菌中的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是常见的水产动物致病菌。副溶血弧菌、溶藻弧菌是海水养殖

鱼类弧菌病的主要病原, 可分泌多种溶血素使鱼类致病^[2]; 鱼类感染嗜水气单胞菌会导致败血症、溃疡等疾病^[3]。此外, 副溶血弧菌、溶藻弧菌和嗜水气单胞菌也是人类的致病菌, 可导致食物中毒或肠胃炎等^[4]。细菌性疾病的恶化导致了抗生素

收稿日期: 2012-09-18; 修回日期: 2013-03-25

资助项目: 广东省海洋渔业科技推广专项(A201005D06-2); 汕头市科技计划项目(2011-158)

作者简介: 谢丽玲(1964-), 女, 副教授, 从事生物活性物质研究。E-mail: llxie@stu.edu.cn

的滥用,由此而来的药物残留、水产品安全等问题也一直困扰着人们,寻找环保、健康的新型细菌抑制剂,促进中国渔业可持续发展是当务之急^[5]。

黄连(*Coptis chinensis*)是中国的传统中药,具有一定的抑菌消炎作用,研究发现,黄连发挥抑菌作用的主要成分是黄连素(Berberine)^[6-8]。黄连素又名小檗碱,对大肠杆菌(*Escherichia coli*)、变形杆菌(*Proteus*)及痢疾杆菌(*Shigella*)等有良好的抑制作用^[9]。黄连素能与细菌形成某种复合物,影响细菌增殖^[10]。PRERNA等^[11]指出黄连素在中国与美国印第安人一直用于细菌、真菌和原生动物的抗感染,并发现黄连素作用于大肠杆菌细胞分裂期的FtsZ靶蛋白。然而黄连素对副溶血弧菌等水产类致病菌的作用特点目前缺乏系统的报道。笔者研究探讨黄连素的抑菌效果及机制,为其应用于水产动物细菌性疾病的控制提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

副溶血弧菌(L-2490)、溶藻弧菌(CGMCC 1.1587)、嗜水气单胞菌(NBRC 12658)为汕头大学生物系分子免疫学实验室所赠。

黄连素标准品购于中国药品生物制品检定所(批号110713-200609)。

将购买的黄连在干燥状态下粉碎至粉末,称取10.0 g粉末加入50%乙醇,料液质量(g)体积(mL)比1:20,90℃回流提取1.5 h,2次,过滤合并上清液,得到黄连素粗提液。将提取液浓缩烘干,0.5%硫酸(H₂SO₄)加热溶解,饱和石灰水调至pH为9,热过滤;浓盐酸(HCl)调至pH为2~3,加入10%氯化钠(NaCl)固体,冷却至室温后置冰箱内,析出黄连素晶体即为黄连生物碱晶体,重结晶至纯度大于85%,备用^[12-14]。

1.2 试验方法

1.2.1 最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)的测定 采用二倍稀释法测定副溶血弧菌、溶藻

弧菌、嗜水气单胞菌的MIC和MBC^[15]。

1.2.2 电镜扫描细菌形态变化 据MIC/MBC试验结果,称取25 mg、50 mg、100 mg黄连素分别加入100 mL液体LB培养基。接种副溶血弧菌、溶藻弧菌、嗜水气单胞菌(1×10^9 cfu·mL⁻¹),以不加黄连素药液的菌液作为空白对照,35℃摇床培养12 h。将菌液调至 1×10^6 cfu·mL⁻¹,取1滴菌液于10×5 mm²盖玻片,进行爬片15 min、洗涤3次,每次20 min、2%戊二醛固定、PBS清洗15 min、梯度乙醇逐级脱水、无水乙醇处理、干燥、喷金,分析型扫描电镜观察^[16-17]。

1.2.3 生长曲线测定 取12只无菌锥形瓶,菌液配置方法同1.2.2。置摇床后每隔1 h取样于600 nm下测光密度(OD_{600 nm}),以不加药液的培养基作为空白对照^[18]。

1.2.4 核酸电泳检测细菌DNA与黄连素的结合活性^[19] 黄连素代替溴化乙锭(EB),配琼脂糖凝胶时加入并使其终质量浓度为5 μg·mL⁻¹,另制胶加入EB(终质量浓度为0.5 μg·mL⁻¹)作为对照。提取副溶血弧菌、溶藻弧菌、嗜水气单胞菌的DNA进行电泳。

2 结果

2.1 MIC与MBC

黄连素对副溶血弧菌、溶藻弧菌和嗜水气单胞菌的MIC和MBC见表1。黄连素对嗜水气单胞菌抑制作用相对较弱, MIC、MBC分别为0.781 mg·mL⁻¹、1.563 mg·mL⁻¹。黄连素对副溶血弧菌、溶藻弧菌具强烈的抑制作用,其MIC均达0.391 mg·mL⁻¹,MBC分别为0.391 mg·mL⁻¹、0.781 mg·mL⁻¹。

2.2 电镜扫描细菌形态变化

不同质量浓度黄连素下供试菌的形态变化见图1。副溶血弧菌、溶藻弧菌在0.25 mg·mL⁻¹黄连素质量浓度下菌体粘连,表面出现皱褶。在0.50 mg·mL⁻¹黄连素质量浓度下(大于2种菌的MIC)菌体

表1 黄连素对受试细菌的最小抑菌浓度和最小杀菌浓度

检测指标 detection index	Tab.1 MIC and MBC of Berberine on tested bacteria			mg·mL ⁻¹
	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolytica</i>	溶藻弧菌 <i>V. algenolyticus</i>	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	
最小抑菌浓度 MIC	0.391	0.391	0.781	
最小杀菌浓度 MBC	0.391	0.781	1.563	

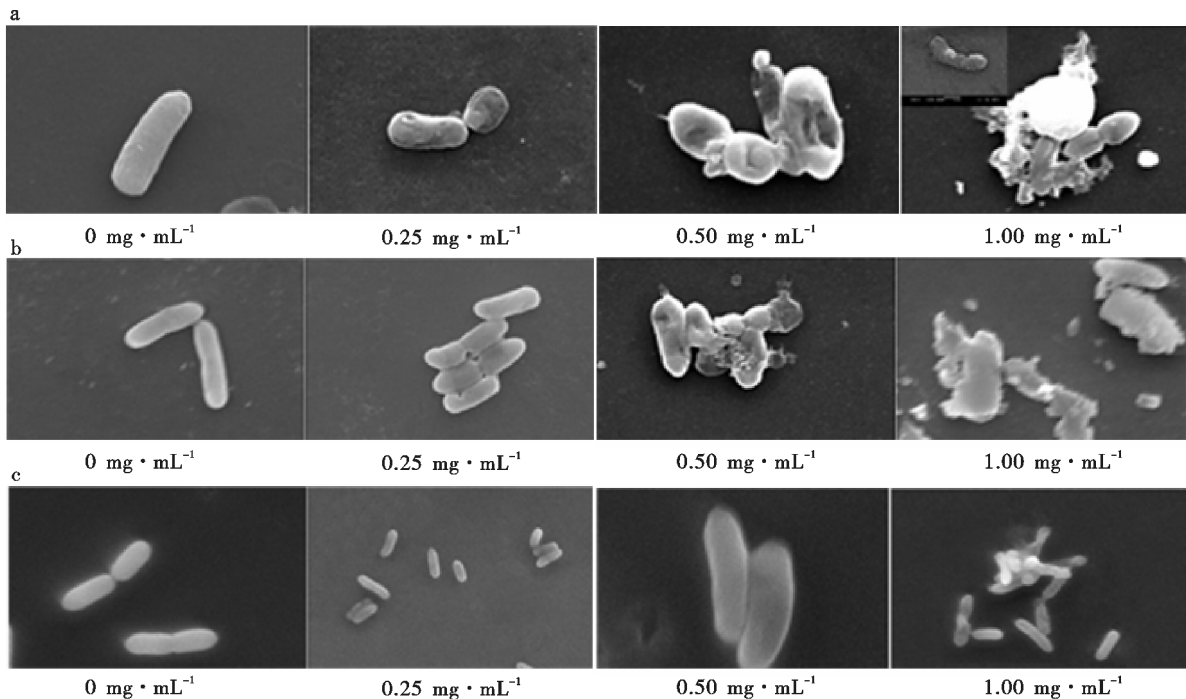


图1 黄连素对副溶血弧菌(a)、溶藻弧菌(b)和嗜水气单胞菌(c)形态变化的影响

Fig. 1 Effects of Berberine on the cell morphology of *V. parahaemolyticus* (a), *V. alginolyticus* (b) and *A. hydrophila* (c)

粘连成团, 菌体皱缩或突起, 边缘模糊, 生长被抑制。黄连素质量浓度上升为 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时细菌几乎完全破损, 菌体溶解, 破裂至碎片, 内容物流出(图1-a, b)。黄连素对嗜水气单胞菌作用效果相对较小(图1-c), 药液质量浓度为 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时菌体几乎正常; $1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时菌体多聚集成团, 部分菌体出现破损、溶解现象, 但个别细菌形态仍然较完整。表明副溶血弧菌和溶藻弧菌比嗜水气单胞菌对黄连素敏感。

2.3 生长曲线测定

黄连素对3种供试菌的生长曲线影响见图2。结果表明, 对照组的3种供试菌均正常生长, 曲线大致呈“S”型, 有明显的迟缓期、对数期生长期、稳定期3个生长特征。黄连素药液明显延长细菌生长迟缓期的时间, 且药物质量浓度越大, 延长时间越长; 副溶血弧菌受 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 黄连素处理时几乎没有生长趋势, 而溶藻弧菌与嗜水气单胞菌受 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 黄连素处理时都存在对数期。

2.4 核酸电泳检测 DNA 与黄连素作用

黄连素结构类似 EB, 具有荧光性^[19](图3-a), 用黄连素代替 EB 进行核酸电泳, 副溶血弧菌、溶藻弧菌、嗜水气单胞菌的 DNA 条带十分明

显, 与 EB 作为荧光染料的 DNA 条带(图3-b)相比荧光强度稍弱。说明黄连素与 DNA 发生了结合。

3 讨论

细菌性鱼病发生的影响因素复杂, 包括水质、养殖密度、营养状况、品种搭配等, 一旦爆发即对养殖户造成重大损失。中国自古以来就有应用中草药防治鱼类病害的经验。中草药的抑菌机制已经研究清楚, 其途径包括干扰微生物的酶系, 破坏其正常的新陈代谢, 使微生物蛋白质凝固、变性以干扰其生存和繁殖, 改变细胞膜的渗透性使细胞内的酶类和代谢产物逸出导致其失活^[20]。中草药应用于水产渔业已受到很多研究人员的青睐。何爱华等^[21]用包括黄连在内的6种中药浸提液对4种淡水鱼致病菌的抑制作用进行了研究; 王瑞旋等^[22]研究了31种中草药对6株海水养殖致病菌的体外抑制作用, 发现黄连、番石榴(*Psidium guajava*)、黄芩(*Scutellaria*)等中药有很高的抑菌活性, 但都没有深入探讨抑制机理。笔者试验以黄连为试材, 提纯其主要活性成分黄连素, 研究黄连素对副溶血弧菌、溶藻弧菌和嗜水气单胞菌3种水产致病菌的抑制作用。结果表明, 黄连素对3种水产致病菌均有明显的抑制作用, 尤其对副溶血弧菌、溶藻弧

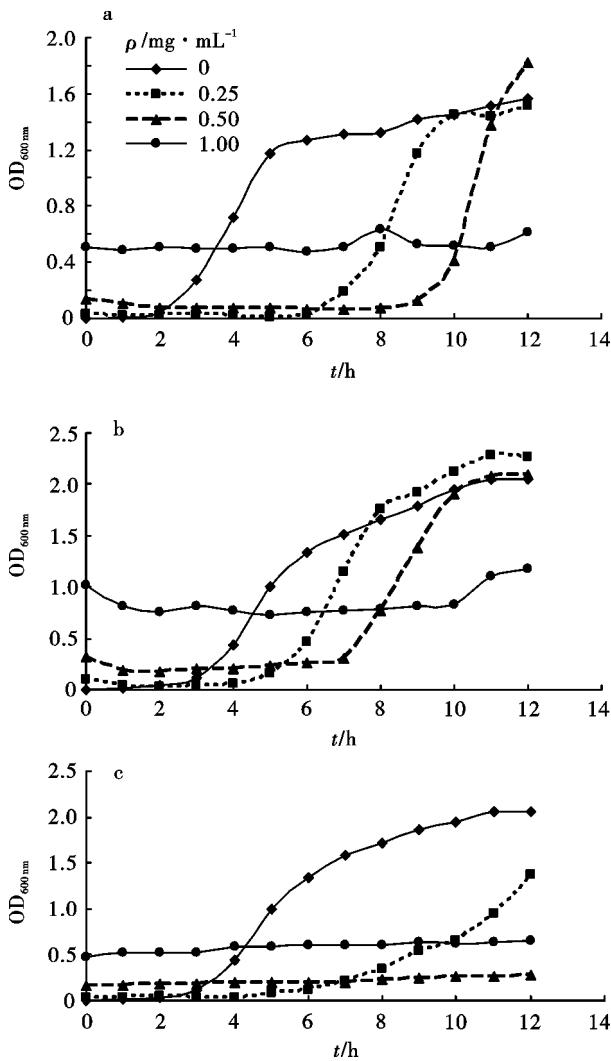


图2 黄连素对副溶血弧菌(a)、溶藻弧菌(b)和嗜水气单胞菌(c)生长曲线的影响

Fig. 2 Effects of Berberine on the cell growth curve of *V. parahaemolyticus*(a), *V. algenolyticus*(b) and *A. hydrophila*(c)

菌,其作用远强于同样具有抗菌活性的大黄(*Rheum palmatum*)、黄芩等其他中草药^[23]。在黄连素作用下溶藻弧菌和嗜水气单胞菌迟缓期延长,随后仍呈现出与对照组相同的对数生长期。表明其采取了某种“急救途径”进行增殖,这种自救机制还有待进一步研究。琼脂糖凝胶核酸电泳证明黄连素与细菌遗传物质发生结合,符合 NANDI 等^[24]、CHI 等^[25]的研究结果。目前主要认为黄连素可以抑制微生物的 RNA、蛋白质和脂质的生物合成和糖代谢中丙酮酸的氧化过程,或可能与微生物 DNA 形成复合物而影响 DNA 的复制,干扰微生物繁殖。所以笔者推测黄连素通过结合细菌核酸进行

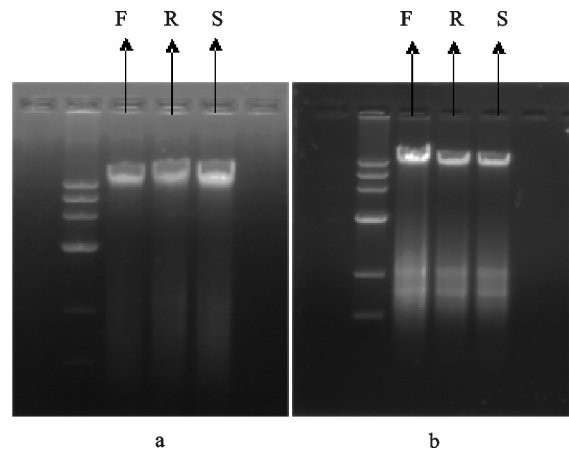


图3 供试菌核酸电泳图

a. 黄连素作为荧光染料; b. EB 作为荧光染料;

F. 副溶血弧菌; R. 溶藻弧菌; S. 嗜水气单胞菌

Fig. 3 Nucleic acid electrophoresis of tested bacteria

a. Berberine was used as fluorescent dye; b. EB was used as

fluorescent dye; F. *V. parahaemolyticus*;

R. *V. algenolyticus*; S. *A. hydrophila*

抑菌。另外电镜扫描观察到细菌受黄连素处理后发生粘连,可能是由于黄连素对细胞膜蛋白和胞外酶也产生了影响,最终使细胞聚集并裂解。致病菌致病性相关因素包括运动性、粘附性与粘附因子、细菌外毒素、胞外蛋白酶等^[1],笔者研究发现3种受试菌在低质量浓度黄连素作用下仍能恢复生长,其毒力在药剂影响下是否发生变化还有待研究。

笔者研究结果表明黄连素对副溶血弧菌、溶藻弧菌和嗜水气单胞菌3种水产致病菌有良好的抑菌效果,尤其是对副溶血弧菌、溶藻弧菌作用更为强烈。但纯化后的黄连素应用于水产养殖将面临成本过高的困境。笔者实验室已经开展了将中草药作为鱼类饲料添加剂的研究,初步证明杜仲(*Eucommia ulmoides*)喂食罗非鱼后有促进生长、改善肉质的功能,而大蒜(*Allium sativum*)则在改善鱼的肠胃道消化上效果更佳,复方药物组的综合作用效果优于单味药物^[26]。黄连及其主要活性成分黄连素通过该方法经济、有效地应用于水产动物疾病防治将有广阔的研究前景。

参考文献:

- [1] 秦玉广,陈秀丽,朱永安,等. 细菌性鱼病研究现状与展望[J]. 井冈山大学学报:自然科学版, 2010, 31(3): 49-57.
- [2] 陈励勋,胡洁. 副溶血弧菌感染分析[J]. 实验与检验医学, 2008, 26(2): 187-188.

- [3] 赵明军, 张洪玉, 周状. 中草药对水产动物疾病防治的药效学研究综述[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(36): 18010-18015.
- [4] 田丁, 林天龙, 许斌福, 等. 创伤弧菌、溶藻弧菌外膜蛋白特性的比较研究[J]. 水产科学, 2011, 30(1): 27-30.
- [5] 贾晓平. 发挥渔业科技的引领作用, 实现现代渔业可持续发展——南海水产研究所近年科研成果回顾[J]. 南方水产, 2008, 4(6): 1-6.
- [6] 吴静, 王克霞, 胡联华. 黄连对幽门螺杆菌的体外抗菌活性研究[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(12): 2486-2487.
- [7] 吴玉娟. 黄连多糖的提取及活性研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2007.
- [8] 李彩虹, 周克元. 黄连活性成分的作用及机制研究进展[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(2): 466-468.
- [9] 任贻军, 高逢喜. 黄连素的研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(1): 50-51.
- [10] 华国强. 小檗碱抑菌特点及其抑菌机制的初步研究[D]. 济南: 山东大学, 2005.
- [11] PRERNA N D, ANIRBAN B, SIVARAMAN J, et al. Berberine targets assembly of *Escherichia coli* cell division protein FtsZ [J]. Biochemistry, 2008, 47: 3225-3234.
- [12] 崔学军. 黄连及其有效成分的药理研究进展[J]. 中国药师, 2006, 9(5): 469-470.
- [13] 冀满丰. 黄连中的盐酸小檗碱的提取、分离及分离物的含量测定研究[J]. 国际医药卫生导报, 2006, 12(24): 75-77.
- [14] 许沛虎, 高媛, 张雪琼, 等. 黄连总生物碱纯化工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(12): 3079-3080.
- [15] 张海宾, 杨桂芳. 12种中草药对嗜水气单胞菌杀伤能力的研究[J]. 水产科学, 2006, 25(1): 16-18.
- [16] 康莲娣. 生物电子显微镜技术[M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 2003: 151-172.
- [17] 汤雪明, 戴书文. 生物样品的环境扫描电镜观察[J]. 电子显微学报, 2001, 20(3): 217-223.
- [18] 李福娟, 石学魁, 张晓莉, 等. 苦参、黄连及其配伍的体外抑菌研究[J]. 牡丹江医学院学报, 2010, 31(3): 17-19.
- [19] GONG G Q, ZONG Z X, SONG Y M. Spectrofluorometric determination of DNA and RNA with berberine [J]. Spectrochimica ACTA Part A, 1999, 55: 1903-1907.
- [20] SHIOTA S, SHIMIZU M, SUGIYAMA J, et al. Mechanisms of action of corilagin and tellimagrandin I that remarkably potentiate the activity of beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Microbiol Immunol, 2004, 48(1): 67-73.
- [21] 何爱华, 张曦, 陶琳丽, 等. 6种中草药对4种淡水鱼致病细菌体外抑菌作用的研究[J]. 南方水产科学, 2011, 7(2): 73-76.
- [22] 王瑞旋, 郭志勋, 冯娟, 等. 中草药对海水动物致病菌体外抑制作用的初步研究[J]. 南方水产, 2009, 5(6): 19-24.
- [23] XIE L L, ZHAO S L, CHENG K, et al. *In vitro* bacteriostatic activity of five Chinese herbal medicines against two common pathogens of *Scylla serrate* [J]. Anim Husb Feed Sci, 2010, 2(8/9): 17-20.
- [24] NANDI R, DEBNATH D, MAITI M. Interactions of berberine with poly(A) and tRNA [J]. Biochimica Biophysica Acta, 1990, 1049(3): 339-342.
- [25] CHI L K, CHIH C C, BENJAMIN Y M. YUN. Berberine complexes with DNA in the berberine-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells [J]. Cancer Lett, 93 (1995): 193-200.
- [26] 谢丽玲, 曹俊辉, 杨素霞, 等. 中草药作为饲料添加剂养殖罗非鱼试验[J]. 水产科学, 2009, 28(1): 11-14.