

苦豆子总碱及 4 种单体生物碱对幽门螺杆菌的体外抑菌作用研究

作者：段玲，严祥，韩俭 作者单位：兰州大学第一医院，甘肃 兰州 730000；兰州大学 病原生物学研究所，甘肃 兰州 730000

【摘要】 目的 探讨苦豆子总碱、苦参碱、苦参素、槐定碱、槐果碱体外抑制幽门螺杆菌（*Helicobacter pylori*, Hp）的作用。方法选用 5 种苦豆子生物碱，纸片扩散法粗测抑菌浓度范围；依据粗测范围，液体倍比稀释法测定 5 种生物碱的最小抑菌浓度(MIC)。结果苦豆子总碱的 MIC 为 32 mg/ml，在体外对 Hp 有一定的抑制作用。苦参碱、苦参素的 MIC 为 64 mg/ml，槐定碱的 MIC 为 128 mg/ml，体外抑菌活性微弱。槐果碱在体外对 Hp 无明显抑制作用。结论苦豆子总碱有可能成为替代抗生素的抗 Hp 候选药物。

【关键词】 幽门螺杆菌； 苦豆子总碱； 苦参碱； 苦参素； 槐定碱； 槐果碱

幽门螺杆菌（*Helicobacter pylori*, Hp）感染是慢性胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关淋巴组织（MALT）淋巴瘤、胃腺癌的主要病因 [1]。根除 Hp 已成为现代治疗 Hp 相关性胃肠疾病的重要措施。近年来，由于甲硝唑、阿莫西林等抗菌药物的广泛应用，使得 Hp 的耐药日益严重 [2]。因此，寻找新型抗 Hp 药物取代或辅助抗生素进行 Hp 根除治疗，减少耐药菌株发生，有重要的临床意义。苦豆子 *Sophora alopecuroides*. L. 属豆科槐属植物，具有清热解毒、抗菌消炎作用，民间用其治疗胃痛、腹泻等症。苦豆子类生物碱是从苦豆子的干燥全草和种子中提取的生物碱。有研究报道，苦豆子类生物碱对大肠杆菌、痢疾杆菌、结核杆菌、金黄色葡萄球菌等具有良好的抗菌作用 [3]。本研究从文献报道中遴选了 5 种抗菌作用明显的生物碱，进行了抗 Hp 作用的体外实验研究，以期发现有效的非抗生素类抗 Hp 药物。

1 材料

1.1 材料苦豆子总碱(Total alkaloids of *sophora alopecuroides*, TASA, 批号：20081125)、苦参碱(matrine, 批号：20080904)、苦参素(oxymatrine, 批号：20080301)、槐定碱(sophoridine, 批号：20081226)、槐果碱(sophocarpine, 批号：20090115)均购自宁夏紫荆花药业公司。

1.2 试剂 BBLTM Columbia Agar Base (Becton,Dickinson and Company, REF 211124, 批号：7184335)；布氏肉汤(青岛高科园海博生物技术有限公司, 批号：20081029)；无支原体新生牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司, 批号：080816)；万古霉素(上海生工, 批号：V0990)；两性霉素 B(上海生工, 批号：A0414)；多粘菌素(Sigma 公司, 批号：81334)；TMP(BIO BASIC INC, 批号：T714208)。

1.3 菌株 Hp 标准菌株 NCTC11637 购自中国疾病预防控制中心传染病预防控制所；用于分离 Hp 的胃黏膜样本采自兰州大学第一医院胃镜室。

1.4 培养基哥伦比亚固体培养基: Columbia Agar Base 4.25 g, 三蒸水 100 ml, 万古霉素 250 mg/L, 两性霉素 B 200 mg/L, 多粘菌素 220 mg/L, TMP 300 mg/L, 脱纤维羊血 5 ml, 10%葡萄糖 5 ml; 液体培养基: 布氏肉汤粉 2.8 g, 新生牛血清 2 ml, 10%的葡萄糖 1 ml, 淀粉 0.1g。

1.5 仪器

幽门螺杆菌厌氧培养罐(HP015, 广州海太光电生物科技有限公司); SW-CJ-2F 型洁净工作台(苏州净化设备有限公司); BMC-1300 II A/B3 型生物洁净安全柜(苏州净化设备有限公司); 光学显微镜(OLYMPUS); 分析天平(上海光学仪器厂)。

2 方法

2.1 Hp 的分离培养于慢性浅表性胃炎、胃溃疡患者胃窦部用灭菌活检钳钳取活组织 1 块(标本采集前作快速尿素酶试验, “++”以上者取材), 划线接种于哥伦比亚培养基, 微需氧条件(85%N₂, 10%CO₂ 和 5%O₂), 温度 37℃, 湿度 95%培养 3~5 d。菌落通过形态学鉴定和生化鉴定进行判断。刮取培养的阳性菌落并复苏冻存的 Hp 标准菌株, 固体增菌培养 48 h, 转种于液体培养基, 置于振荡培养箱中, 于 85%N₂, 10%CO₂ 和 5%O₂, 温度 37℃条件下, 转速 120 r/min, 振荡培养 24 h, 调整细菌浓度为 1×10⁷~10⁸ CFU/ml, 备用。

2.2 苦豆子生物碱的抑菌活性检测

2.2.1 纸片琼脂扩散法测定药物抑菌浓度以三蒸水为溶剂, 1%HCl 调整 pH 值为 7.6, 倍比稀释配制药物溶液, 浓度分别为 200, 100, 50, 25, 13 mg/ml。取无菌新华滤纸, 用打孔器制为直径 6 mm 的纸片, 于上述药物溶液中浸泡过夜, 干燥、备用。取 50 μl 浓度约 1×10⁸ CFU/ml 的 Hp 对数期菌液于哥伦比亚培养基, L 棒涂布均匀。自然干燥后, 放入药敏纸片, 微需氧条件(85%N₂, 10%CO₂ 和 5%O₂), 温度 37℃, 湿度 95%, 继续培养 48 h 后取出, 采用十字交叉法测量抑菌圈直径, 取其平均值。同一种药物重复 3 次。

2.2.2 试管倍比稀释法测定药物最小抑菌浓度(MIC)待测药物用布氏肉汤稀释, 其终浓度为 512 mg/ml, 并用 1%HCl 调整 pH 值为 7.6。取无菌试管 10 支, 每支试管中加入液体培养基 1 ml, 以 2 倍倍比稀释法调整药物浓度依次为 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 mg/ml。第 9 管不加药液加菌液, 作为阴性对照。第 10 管不加菌液不加药液, 作为阳性对照。各管分别加入 100 μl 浓度约 1×10⁷ CFU/ml 的 Hp 对数期菌液, 于 85%N₂, 10%CO₂ 和 5%O₂, 温度 37℃条件下, 转速 120 r/min, 振荡培养 24 h。肉眼观察浑浊度并取样涂片于镜下观察。同时取 100 μl 至哥伦比亚培养基划线接种, 继续培养 48 h 后取出, 观察菌落情况并涂片于镜下观察。以无细菌生长平皿的最小药物浓度作为该药物的 MIC。同一种药物重复 3 次, 取均值。

3 结果

3.1 Hp 的分离培养及鉴定培养 3~5 d 后, 肉眼观察到培养基表面的菌落为无色半透明, 针尖大小, 湿润似露滴状。涂片染色后镜检, 呈革兰染色阴性, 细长, 弯曲, 螺旋状、

S 型、弧形或海鸥状。尿素酶及氧化酶试验强阳性，触酶试验阳性。经鉴定可确定所分离的细菌为 Hp。Hp 标准株 NCTC11637，通过哥伦比亚固体及布氏肉汤液体培养基复苏均成功。

3.2 纸片琼脂扩散法测定抑菌浓度苦豆子总碱 ≥ 50 mg/ml 时出现抑菌圈，其直径 10 mm；苦参碱 ≥ 100 mg/ml 时出现抑菌圈，其直径 9 mm；苦参素 ≥ 100 mg/ml 时出现抑菌圈，其直径 10 mm；槐定碱 ≥ 200 mg/ml 时出现抑菌圈，其直径 8 mm；槐果碱在所有浓度下均无抑菌圈出现。表明苦豆子生物碱在体外可能对 Hp 存在抑制作用。

3.3 MIC 的测定 5 种苦豆子生物碱 MIC 比较见表 1。采用液体稀释法对 5 种待测生物碱的 MIC 进行测定。结果表明其中 4 种生物碱对供试细菌具有不同的抑制作用：苦豆子总碱对 Hp 的抑菌活性较强，MIC 为 32 mg/ml。苦参碱与苦参素对 Hp 的 MIC 为 64 mg/ml，槐定碱的 MIC 为 128 mg/ml，体外抑菌活性微弱。槐果碱在体外对 Hp 无明显抑制作用。表 1 各生物碱抗 Hp 的 MIC 值（略）

4 讨论

目前 Hp 的首治根除率只有约 70%，补救疗法也有 9%~10% 的失败率。抗生素耐药是导致根除率下降的主要原因 [4]。中药抗菌药物具有安全性高、副作用小，耐药性低，治疗费用少等优势。寻求中西医结合治疗方案已经成为解决根除幽门螺杆菌治疗问题的众多出路之一 [5]。

本实验采用体外微生物敏感性测定方法 [6]，首次评价和比较了苦豆子总碱及其 4 种主要单体生物碱对 Hp 的体外抑菌效果。实验结果表明，其中 4 种生物碱对 Hp 有一定的体外抑菌作用，效果顺序为：苦豆子总碱 $>$ 苦参碱 $=$ 苦参素 $>$ 槐定碱。槐果碱体外对 Hp 无抑制作用。其中，苦豆子总碱的 MIC 最小，为 32 mg/ml，有望开发成为一种新型的抗 Hp 中药制剂。

此次实验结果为研究苦豆子生物碱抗菌活性、抗菌机理以及更合理的开发、利用苦豆子提供了理论依据。下一步研究工作我们将对所筛选出的生物碱成分进行耐药诱导与消除实验、联合药物敏感实验及初步的毒理学评价，为进一步研究打下基础。

【参考文献】

[1] Montalban C, Norman F. Treatment of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: Helicobacter pylori eradication and beyond [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2006, 6(3): 361.

[2] H. Wu, X. D. Shi, H. T. Wang, et al. Resistance of Helicobacter pylori to metronidazole, tetracycline and amoxycillin [J]. Antimicrobial Chemotherapy, 2000, 46(1): 121.

[3] 张为民, 张彦明, 张涛, 等. 苦豆子生物碱抑菌抗炎作用研究 [J]. 动物医学进展, 2005, 26(10): 82.

[4] 胡品津,胡伏莲.中华医学会第四次全国幽门螺杆菌学术会议纪要[J].中华消化杂志,2005,25(11):698.

[5] 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.

[6] Francis Megraud,Norbert Lehn,Tore lind,et al.Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in a large multicenter trial: the MACH 2 study [J].Antimicrobial Agents and Chemotherapy,1999,43(11):2747.