文章编号:1000-5404(2011)15-1643-02

短篇论著

半枝莲中的黄酮抗幽门螺杆菌作用研究

肖兰青,熊小虎 (430205 武汉,湖北经济学院医院内科)

[摘要] **目的** 从中药半枝莲中分离提取具有抗幽门螺杆菌(*helicobacter pylori*)活性的成分,并对其抗菌活性进行验证。**方法** 以活性为导向,采用硅胶、Sephadex LH-20、ODS RP-18反向硅胶等柱色谱方法进行分离纯化,最后通过对照品进行色谱法比对鉴定化合物结构,并通过测定最小抑菌浓度(MIC)明确其活性。**结果** 从中药半枝莲中分离得到活性明确的黄酮类化合物3个,分别为山奈酚-3-O-鼠李糖苷(MIC 15.63 μg/ml)、山奈酚-3-O-葡萄糖苷(MIC 15.63 μg/ml)、山奈酚-3-7-二鼠李糖苷(MIC 31.25 μg/ml)。**结论** 从半枝莲中分离得到的这3个化合物均具有较好的抗幽门螺杆菌活性,并能降低氨苄西林对幽门螺杆菌的MIC,具有较好的开发应用前景。

[关键词] 半枝莲;幽门螺杆菌;黄酮
[中图法分类号] R282.71; R285.5; R516.9 [文献标志码] A

幽门螺杆菌(*helicobacter pylori*)是寄居于胃及十二指肠中的一种微需氧螺旋形革兰阴性菌。研究表明,*H. pylori* 与大多数胃及十二指肠疾病有关[1-2]。青霉素类抗生素常被用于治疗 *H. pylori* 的感染,但是,随着抗生素在 *H. pylori* 治疗中的大量使用,细菌对抗生素产生了严重的耐药性。来源于植物的天然产物是治疗胃肠道疾病的宝藏[3];各国的学者都开始对植物药进行深入的研究,并从中发现了一些可能用于对抗 *H. pylori* 感染的药物[3-6]。

半枝莲 *Scutellaria barbata* D. Don 为唇形科植物,具有清热解毒和利尿消肿的功效[7]。临床上,半枝莲常用于治疗包括胃癌在内的各种癌症及抗菌和抗感染等;有研究表明半枝莲提取物具有较好的体外抗 *H. pylori* 的作用[8]。在本研究中,我们旨在从半枝莲中分离得到抗 *H. pylori* 效果明显的活性成分,明确半枝莲抗 *H. pylori* 的药效物质基础,为将其开发成为可能的新型抗 *H. pylori* 药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

H. pylori 标准菌株 NCTC11637(中国疾病预防控制中心传染病预防控制所),半枝莲药材购买于重庆太极大药房。

1.2 提取与分离

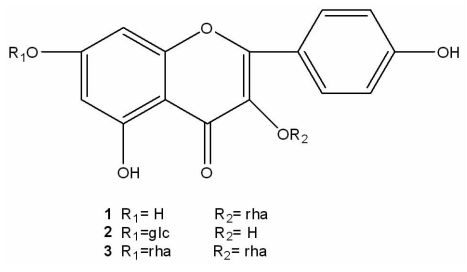
半枝莲全草2.5 kg,干燥后粉碎,用10倍量体积85%的乙醇冷浸提取,减压回收溶剂至无醇味,减压蒸干得到总浸膏300 g。总浸膏以水混悬,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,回收溶剂至干,得到石油醚部分53.5 g,乙酸乙酯部分69.5 g,正丁醇部分85 g和水部分约90 g。经活性跟踪,选取抗 *H. pylori* 活性最好的正丁醇部分进行分离提取。正丁醇部分浸膏经硅胶柱色谱分离,二氯甲烷-甲醇梯度洗脱(20∶1~1∶1)得到10个组分(BU1~BU10);经活性跟踪后,选取组分3和4再经硅胶柱色谱反复分离,二氯甲烷-甲醇梯度洗脱(30∶1~1∶1),结合 Sephadex LH-20(GE公司)和 ODS RP-18(YMC公司)色谱纯化,从组分3和4中分离得化合物1(45 mg),2(35 mg),3(40 mg)。见表1。

1.3 体外抗菌实验

药物最小抑菌浓度(MIC)的测定参照美国临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute,CLSI)用琼脂稀释法进行药物最小抑菌浓度的测定。样品均用DMSO助溶,以生理盐水稀释成500 μg/ml的溶液,以0.22 μm的微孔滤膜滤过作为母液;氨苄西林(AMP)以生理盐水稀释成62.5 μg/ml的溶液。菌液浓度以培养基稀释为 1×10^7 cfu/ml。样品以含有5%绵羊血的马-欣二氏琼脂(Mueller-Hinton Agar)在45 ℃稀释成浓度为0.12~250 μg/ml,制成含有不同浓度药物样品的血琼脂平板,同时设不含菌的空白平板作为阴性平板,只含菌不含药物的平板作为阳性平板以及DMSO对照平板。取10 μl菌液(1×10^7 cfu/ml)均匀涂布接种于各个培养基上,放置于37 ℃微氧环境下培养72 h。观察细菌在平板上的生长情况,以不出现菌落的平板上的药物浓度为MIC。

2 结果

以抗菌活性为导向,分离得到的化合物1~3经与对照品高效液相、薄层色谱比对,分别确定为黄酮类化合物:山奈酚-3-O-鼠李糖苷(kaempferol-3-O-α-L-rhamnoside,1)、山奈酚-3-O-葡萄糖苷(kaempferol-3-O-α-L-glucoside,2)、山奈酚-3-7-二鼠李糖苷(Kaempferitrin,3)(图1)。



1 R_1= H R_2= rha
2 R_1=glc R_2= H
3 R_1=rha R_2= rha

图1 从半枝莲正丁醇部分分离出的3种化合物结构式

[通信作者] 熊小虎,电话:(027)50653513,E-mail:xiaohu_xiong@126.com

琼脂稀释法测定MIC的结果见表1~2。从表1可以看出各极性试剂萃取得到的部分以正丁醇部分抗菌效果最好,其MIC值为62.5 μg/ml;正丁醇的各个极性组分中又以组分3和4抗菌活性最好,其MIC值为15.63 μg/ml。化合物1~3单独使用时的抗菌效果,其中以化合物1和2效果为最佳,其MIC值为15.63 μg/ml;表2为AMP同化合物1~3联合使用时的抗菌效果,从表中可以看出化合物1~3均能协同AMP增强对幽门螺杆菌的抗菌活性,化合物1~2均能在7.82 μg/ml的亚MIC浓度时将AMP的MIC从0.24 μg/ml降低到0.03 μg/ml。

表1 半枝莲极性部分、正丁醇部位各极性部位和3个化合物对*H. pylori*的MIC(μg/ml)

部位	MIC	部位和化合物	MIC
TE	250	BE-5	31.25
PE	>250	BE-6	31.25
AE	125	BE-7	62.5
BE	62.5	BE-8	2.5
WE	0.24	BE-9	2.5
BE-1	125	BE-10	125
BE-2	31.25	C1	15.63
BE-3	15.63	C2	15.63
BE-4	15.63	C3	31.25
AMP	0.24		

TE:总提取物;PE:石油醚部分;AE:乙酸乙酯部分;BE:正丁醇部位;WE:水部位;BE1~10:正丁醇经硅胶分离后得到的10个组分;C1:山奈酚-3-O-鼠李糖苷;C2:山奈酚-3-O-葡萄糖苷;C3:山奈酚-3-7-二鼠李糖苷

表2 AMP联合3种化合物对*H. pylori*的MIC(μg/ml)

化合物	MIC	FIC
AMP+C1-1	0.03	0.625
AMP+C1-2	0.06	0.5
AMP+C1-3	0.06	0.375
AMP+C2-1	0.03	0.625
AMP+C2-2	0.06	0.5
AMP+C2-3	0.24	1.125
AMP+C3-1	0.06	0.75
AMP+C3-2	0.12	0.75
AMP+C3-3	0.12	0.625

化合物1和2的3个浓度分别为7.82、3.91、1.95 μg/ml;化合物3的3个浓度分别为15.63、7.82、3.91 μg/ml;AMP对*H. pylori*的MIC为0.24 μg/ml,3个化合物样品对*H. pylori*的MIC分别为15.63、15.63和31.25 μg/ml

3 讨论

目前,临床上对于*H. pylori*感染的治疗,仍然以抗生素为主的三联疗法为主。但是长期使用抗生素不良反应大,易引起肠道菌群失调;另外由于抗生素的大量使用,造成*H. pylori*的耐药性增加,三联或四联疗法的灵敏性越来越低。因此,发现新的更为安全有效的治疗*H. pylori*的治疗手段就显得更加迫切了。有报道中药半枝莲提取物具有较好的体外抗*H. pylori*的作用[8],但是没有具体的活性成分报道。在本研究中,我们从半枝莲正丁醇部分,通过活性导向分离的方法,从中分离得到3个具有抗*H. pylori*的黄酮类化合物单体,并且这3个化合物均能不同程度降低氨苄西林对*H. pylori*的MIC。

Kataoka等[9]报道了从植物药中分离的山奈酚类黄酮化合物对*H. pylori*感染的蒙古沙鼠有治疗作用。Fukai等[4]也认为此类黄酮类化合物是一类可能成为体内治疗抗*H. pylori*有效的天然产物,并且治疗作用可能与这类化合物结构上丰富的酚羟基有关系;而日本学者岛田太一[10]也发现月见草种子中的多酚类化合物对感染了*H. pylori*的沙鼠有明显的效果。在本实验中,我们从半枝莲中分离得到了3种山奈酚的衍生物,并通过MIC实验测定出这3种化合物均有较好的体外抗*H. pylori*的作用;并且在和氨苄西林联用时,能够显著降低氨苄西林的最小抑菌浓度,增强氨苄西林的抗菌活性,这些结果也和文献的结论一致。

中药及其制剂因其作用持久、副作用小而著称。结合本实验和文献,我们可以相信,中药半枝莲及其中分离得到的黄酮类化合物具有开发成为治疗*H. pylori*感染的新药制剂的潜力。

参考文献:

[1] Hung H H, Chen T S, Lin H C. Immunoglobulin G antibody against Helicobacter pylori is an accurate test for atrophic gastritis[J]. J Chin Med Assoc, 2010, 73(7): 355-359.

[2] 蒲瑞雪, 郭红, 廖亚玲, 等. 幽门螺杆菌感染对胃内正常菌群结构的影响[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(5): 450-453.

[3] Thompson-Coon J, Ernst E. Systematic review: herbal medicinal products for non-ulcer dyspepsia[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2002, 16(10): 1689-1699.

[4] Fukai T, Marumo A, Kaitou K, *et al*. Anti-Helicobacter pylori flavonoids from licorice extract[J]. Life Sci, 2002, 71(12): 1449-1463.

[5] Wang Y C, Huang T L. Screening of anti-Helicobacter pylori herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plants[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2005, 43(2): 295-300.

[6] Ndip R N, Malange-Tarkang A E, Mbullah S M, *et al*. *In vitro* anti-Helicobacter pylori activity of extracts of selected medicinal plants from North West Cameroon[J]. J Ethnopharmacol, 2007, 114(3): 452-457.

[7] 蒋小岗, 顾振纶. 半枝莲的化学成分和药理作用[J]. 中国野生植物资源, 2004, 23(1): 3-5.

[8] Li Y, Xu C, Zhang Q, *et al*. *In vitro* anti-Helicobacter pylori action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases[J]. J Ethnopharmacol, 2005, 98(3): 329-333.

[9] Kataoka M, Hirata K, Kunikata T, *et al*. Antibacterial action of tryptanthrin and kaempferol, isolated from the indigo plant (Polygonum tinctorium Lour.), against Helicobacter pylori-infected Mongolian gerbils[J]. J Gastroenterol, 2001, 36(1): 5-9.

[10] 岛田太一. 月见草种子中多酚的抗幽门螺杆菌作用[J]. 国外医学: 中医中药分册, 2005, 27(4): 243.

(**收稿**:2011-03-25;**修回**:2011-05-11)

(编辑 王 红)