

头花蓼内生真菌 *Aspergillus terreus* 油脂类代谢物的鉴定及其抗多药耐药菌和抗炎作用研究[△]

刘俊^{1,2,3*}, 张青艳¹, 杨馨¹, 周孟², 廖尚高¹, 徐国波^{1,2#} (1. 贵州医科大学药学院, 贵阳 550025; 2. 国家苗药工程技术中心及民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004; 3. 湖南华容县人民医院药剂科, 湖南华容 414200)

中图分类号 O629.9 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)11-1483-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.11.11

摘要 目的: 鉴定头花蓼内生真菌 *Aspergillus terreus* 油脂类代谢物并考察其抗多药耐药菌和抗炎作用。方法: 采用气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)分析、鉴定 *A. terreus* 的油脂类代谢物; 采用96孔板微量稀释法测试油脂类代谢物和主要成分对10株多药耐药菌(肺炎克雷伯杆菌、普通变形杆菌、表皮葡萄球菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、阴沟肠杆菌、铜绿假单胞菌、奇异变形杆菌、屎肠球菌和鲍曼不动杆菌)的最低抑菌浓度(MIC), 用涂布平板法测定各样品对细菌的最低杀菌浓度(MBC)。以脂多糖诱导体外RAW264.7细胞炎症模型, 考察不同质量浓度(50、100、200 μg/mL)油脂类代谢物作用24 h后对细胞中一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)释放的影响。结果: 从 *A. terreus* 的油脂类代谢物中共鉴定了13个化合物, 其中棕榈酸、硬脂酸、亚油酸和油酸为主要成分, 其相对百分含量依次为29.35%、10.87%、21.94%、34.85%。油脂类代谢物对大肠埃希菌和肺炎克雷伯杆菌表现出较好的抗菌活性, MIC分别为12.5、50 mg/mL, MBC分别为25、100 mg/mL; 4个主要成分均具有抑制大肠埃希菌生长的作用, MIC范围为0.5~1 mg/mL, 其中棕榈酸显示出较为广泛的抗菌活性, 且对屎肠球菌活性最强(MIC为0.25 mg/mL)。50、100 μg/mL的油脂类代谢物可显著抑制RAW264.7细胞中炎症因子NO和TNF-α的释放。结论: 头花蓼内生真菌 *A. terreus* 的油脂类代谢物具有抗多药耐药菌和抗炎作用。

关键词 头花蓼; 内生真菌 *Aspergillus terreus*; 油脂类代谢物; 抗多药耐药菌活性; 抗炎作用

Study on Identification of Lipid Metabolites of Endophytic Fungus *Aspergillus terreus* from *Polygonum capitatum* and Their Anti-multidrug Resistant Bacteria and Anti-inflammatory Effects

LIU Jun^{1,2,3}, ZHANG Qingyan¹, YANG Xin¹, ZHOU Meng², LIAO Shangao¹, XU Guobo^{1,2} (1. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. National Miao's Medicine & Engineering Technology Center & Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM, Ministry of Education, Guiyang 550004, China; 3. Dept. of Pharmacy, Huarong County People's Hospital of Hunan Province, Hunan Huarong 414200, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To identify lipid metabolites of endophytic fungus *Aspergillus terreus* from *Polygonum capitatum*, and to investigate their anti-multidrug resistant bacteria and anti-inflammatory effects. METHODS: GC-MS was used to analyze and identify lipid metabolites of *A. terreus*. MIC of lipid metabolites and main composition to 10 strains of multidrug resistant bacteria (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus common*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecium* and *Acinetobacter baumannii*) were determined by 96-well plate microdilution method. The spread plate method was used to determine MBC of samples to bacteria. LPS-induced RAW264.7 inflammatory model was used to investigate the effects of different mass concentrations (50, 100, 200 μg/mL) of lipid metabolites on the release of NO and TNF-α after treated for 24 h. RESULTS: A total of 13 compounds were identified in lipid metabolites of *A. terreus*, among which palmitic acid, stearic acid, linoleic acid and oleic acid were main components, and relative percentages of them were 29.35%, 10.87%, 21.94%, 34.85%. The lipid metabolites displayed anti-bacterial activity against *E. coli* and *K. pneumoniae* with MICs of 12.5 mg/mL and 50 mg/mL, MBC of 25 mg/mL and 100 mg/mL, respectively. The main 4 compositions could inhibit the growth of *E. coli*, with MIC of 0.5-1 mg/mL, among which palmitic acid showed significant antibacterial activity, especially to *E. faecium* (MIC of 0.25 mg/mL). 50, 100 μg/mL lipid metabolites could significantly inhibit the release of inflammatory factor of NO and TNF-α in RAW264.7 *in vitro*. CONCLUSIONS: The lipid metabolites of endophytic

△ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81560570); 贵州省教育厅自然科学研究项目(No.黔教教KY字[2015]441号)

* 硕士研究生。研究方向: 天然活性成分。E-mail: 745150192@qq.com

通信作者: 副教授, 博士。研究方向: 临床耐药菌感染。电话: 0851-88416164。E-mail: xguobo@163.com

fungus *A. terreus* from *P. capitatum* show anti- multi-drug resistant bacteria and anti-inflammatory effects.

KEYWORDS *Polygonum capitatum*; Endophytic fungus *Aspergillus terreus*; Lipid metabolites; Anti-multidrug resistant bacteria activity; Anti-inflammatory effect

头花蓼(*Polygonum capitatum* Buch.-Ham. ex D. Don)为蓼科蓼属植物头花蓼的干燥全草,是贵州省道地药材,临床上主要用于治疗泌尿系统感染疾病^[1]。泌尿系统感染是临床上仅次于呼吸道感染的常见感染性疾病之一^[2],主要致病菌为大肠埃希菌,其次为变形杆菌和克雷伯杆菌^[3]。目前,泌尿系统感染的一线治疗方法仍然为抗生素治疗。然而随着抗生素的不当使用,我国因抗生素滥用导致的耐药问题尤为突出^[4]。寻找新型可抑制因病原菌感染而产生的炎症反应的药物对治疗泌尿系统感染疾病具有重要意义。

植物内生菌因可产生与宿主代谢产物结构密切相关或具有特殊功效的代谢产物,已成为药物开发的重要资源^[5]。目前,有关贵州道地药材头花蓼内生真菌的相关研究鲜见报道。经前期头花蓼内生菌的分离及代谢物抗菌活性筛选研究,发现菌株 *Aspergillus terreus* 的代谢产物对泌尿系统感染多重耐药菌具有抑制作用,对大肠埃希菌的抗多药耐药菌作用明显高于头花蓼提取物,且其油脂类代谢物占据其总代谢物的60%以上。故本研究对头花蓼内生真菌 *A. terreus* 油脂类代谢物的化学成分进行鉴定,并对其抗多药耐药菌和抗炎作用进行评估,旨在为开发头花蓼内生真菌资源及获得抗泌尿系统感染的化学成分奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

HP6890/5975C气相色谱-质谱联用(GC-MS)仪(美国Agilent公司);ELX808全自动酶标仪(美国Bio-Tek公司)。

1.2 药品与试剂

头孢曲松钠医用原料药(山东鲁抗医药股份有限公司,批号:161115,纯度:92%);头花蓼水提醇沉物(AEPC,药材全草来源于贵州贵阳,批号:1705035,经贵州医科大学药学教研室龙庆德教授鉴定为真品);棕榈酸(批号:C10071559,纯度:99%)、亚油酸(批号:C10088568,纯度:≥99%)、油酸(批号:C10095822,纯度:95%)、硬脂酸(批号:C10078692,纯度:98%)对照品均购自上海麦克林公司;DNA提取试剂盒(美国Omega公司,批号:D3390-01);MTS[普洛麦格(北京)生物技术有限公司,批号:M2117];肿瘤坏死因子 α (TNF- α)酶联免疫吸附(ELISA)测定试剂盒(美国Ray Biotech公司,批号:041417081);胎牛血清(美国Hyclone公司,批号:NZE2489);脂多糖(LPS,美国Sigma公司,批号:117M4855V);地塞米松原料药(湖北远成赛创科技有限公司,批号:17090721B,纯度:99%)。

1.3 菌种与细胞

内生真菌菌株是从贵阳市采集的头花蓼的根茎韧皮部分离得到,经rDNA的内部转录间隔区(ITS序列)进行分子鉴定,根据ITS序列相似性鉴定为 *A. terreus* (ITS序列相似性为99%);10株多药耐药菌株(肺炎克

雷伯杆菌、普通变形杆菌、表皮葡萄球菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、阴沟肠杆菌、铜绿假单胞菌、奇异变形杆菌、尿肠球菌和鲍曼不动杆菌)为贵州医科大学附属医院检验科馈赠,均为临床分离的多重耐药菌株;小鼠单核巨噬细胞株(RAW264.7细胞)购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

2 方法与结果

2.1 发酵

参考文献[6]方法。一级种子发酵:在无菌室中将斜面上的 *A. terreus* 菌种接种到已灭菌的液体培养基中,于恒温箱中培养3 d。二级发酵:将一级种子按12%的接种量均匀地接种到已灭菌的固体培养基上,并将培养基放在培养箱中26~28℃恒温培养29 d。

2.2 油脂类代谢物的获得

取 *A. terreus* 固态发酵物3 kg,在50℃下用乙酸乙酯浸提2次,每次2 d,减压浓缩得浸膏8.0 g。浸膏经硅胶柱层析(180 g,400 mm×40 mm,石油醚洗脱)得到油脂类代谢物5.04 g,占总浸膏量的63%。

2.3 油脂类代谢物的成分鉴定

2.3.1 供试品溶液的制备 脂肪酸气化温度会超过色谱柱耐受温度,高温下不稳定、易裂解,分析中易造成损失,因此对脂肪酸组分分析时,先将脂肪酸甲酯化。称取油脂类代谢物0.1 g,置于50 mL锥形瓶中,加入0.5 mol/L氢氧化钾甲醇溶液2 mL,65℃回流30 min,放冷;加入三氟化硼甲醇溶液2 mL,65℃加热回流30 min,放冷;加入庚烷4 mL,65℃加热回流5 min,放冷;加入饱和氯化钠溶液10 mL,静置分层;吸取上层清液,水洗3次,每次2 mL,上层液用无水硫酸钠干燥,即得供试品溶液^[7]。

2.3.2 GC-MS条件 色谱柱为ZB-5MSI 5% Phenyl-95% DiMethylpolysiloxane 弹性石英毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μ m);微量注射器注入1 μ L甲酯化供试品溶液;柱温为170℃,保持38 min,以10℃/min升温至310℃,保持4 min,运行时间56 min;气化室温度为250℃;载气为高纯氦气(He,纯度:99.999%);柱前压为7.62 psi(1 psi=6.895 kPa),载气流量为1.0 mL/min;不分流进样,溶剂延迟时间为4.0 min;离子源为电子轰击离子源(EI),离子源温度为230℃;四极杆温度为150℃;电子能量为70 eV;发射电流为34.6 μ A;倍增器电压为1 671 V;接口温度为280℃;质量范围为29~500 amu(1 amu=1.66×10⁻²⁷ kg)。

2.3.3 数据处理及质谱检索 取“2.3.1”项下供试品溶液,按“2.3.2”项下条件进样测定。对总离子流图中的各峰经质谱计算机数据系统检索及核对Nis t2005和Wiley275标准质谱图,确定油脂类代谢物的化学成分,并用峰面积归一化法测定各化学成分的相对百分含量,结果见表1。

经GC-MS分析鉴定,油脂类代谢物的成分主要为

油酸 (34.85%)、棕榈酸 (29.35%)、亚油酸 (21.94%) 和硬脂酸 (10.87%)。其中, 不饱和脂肪酸占 57.13%, 饱和脂肪酸占 42.83%。

表 1 *A. terreus* 油脂类代谢物的成分鉴定及相对百分含量结果

Tab 1 Composition identification and its relative percentage determination of lipid metabolites of *A. terreus*

保留时间, min	化合物	结构	相似度, %	相对百分含量, %
7.93	十四烷酸	C14:0	98	0.62
11.53	十五烷酸	C15:0	97	0.06
15.46	棕榈油	C16:1	91	0.21
16.56	棕榈酸	C16:0	99	29.35
32.04	亚油酸	C18:2	99	21.94
33.01	油酸	C18:1	99	34.85
36.87	硬脂酸	C18:0	97	10.87
44.94	11-二十碳烯酸酯	C20:1	95	0.12
45.41	花生酸	C20:0	98	0.47
48.13	山萘酸	C22:0	97	0.57
49.24	三油酸	C23:0	91	0.04
49.99	十八烷酸	C24:0	97	0.82
53.23	豆甾-4-烯-3-酮		91	0.05

2.4 油脂类代谢物及其主要化学成分抗多药耐药菌活性的测定

表 2 *A. terreus* 油脂类代谢物及其主要成分对 10 株多药耐药菌的 MIC 和 MBC 测定结果

Tab 2 MICs and MBCs of *A. terreus* lipid metabolites and its main components against 10 strains of multi-resistant bacteria

菌株	油脂类代谢物		油酸		棕榈酸		亚油酸		硬脂酸		头孢曲松钠		AEPC	
	MIC, mg/mL	MBC, mg/mL	MIC, μg/mL	MBC, μg/mL	MIC, mg/mL	MBC, mg/mL								
肺炎克雷伯杆菌	50	100	>2	>2	0.5	1	0.5	1	1	>2	32	64	>200	ND
普通变形杆菌	100	200	>2	>2	0.5	1	>2	>2	1	>2	16	32	50	100
表皮葡萄球菌	>200	ND	0.5	1	1	2	0.25	0.5	>2	>2	32	64	50	200
大肠埃希菌	12.5	25	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.5	1	32	64	50	200
金黄色葡萄球菌	>200	ND	1	2	0.5	1	0.25	0.5	0.5	1	8	16	100	400
阴沟肠杆菌	>200	ND	1	2	0.5	1	>2	>2	>2	>2	2	4	50	400
铜绿假单胞菌	>200	ND	0.5	1	0.5	1	>2	>2	>2	>2	32	64	>200	ND
奇异变形杆菌	200	200	0.25	0.5	0.5	1	>2	>2	>2	>2	8	32	100	200
屎肠球菌	>200	ND	0.5	1	0.25	0.5	0.5	1	>2	>2	128	256	50	200
鲍曼不动杆菌	100	200	>2	>2	1	2	>2	>2	>2	>2	8	32	>200	ND

注: “ND” 表述未检测出

Note: “ND” means not detected

药菌肺炎克雷伯菌、普通变形杆菌、大肠埃希菌、奇异变形杆菌和鲍曼不动杆菌具有抗菌活性, 其中对大肠埃希菌的抗菌作用最强 (MIC 为 12.5 mg/mL)。棕榈酸、硬脂酸、亚油酸和油酸均具有抑制多药耐药菌大肠埃希菌生长的作用, MIC 范围为 0.5~1 mg/mL; 棕榈酸具有较为广泛的抗菌作用, 其中对屎肠球菌活性最强, MIC 为 0.25 mg/mL。

2.5 细胞毒性测定

参考文献 [10] 方法。将 RAW264.7 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 细胞培养液中, 将细胞置于温度为 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。取对数生长期细胞, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化, 以 2×10⁵ 个/mL 的密度接种于 96 孔培养板中, 每孔 100 μL, 细胞培养 24 h 后, 弃去

2.4.1 菌液及样品贮备液的制备 将复苏后的试验菌株用接种针挑取一环接种在 MH(B) 培养基中, 37 °C 培养 18 h, 麦氏比浊法调节菌液的最终浓度为 0.8×10⁶~1.2×10⁶ CFU/mL。将油脂类代谢物和主要成分 (油酸、棕榈酸、亚油酸、硬脂酸对照品) 分别制备成 200、2 mg/mL 的贮备液, 将阳性对照品头孢曲松钠和 AEPC 分别制备成 1 mg/mL 和 200 mg/mL (以提取物计) 的贮备液, 试验时二倍稀释至所需浓度。

2.4.2 抗多药耐药菌活性测定 参考美国临床实验室标准委员会 (CLSI 2015) 标准 [8], 采用 96 孔板微量稀释法 [9] 检测油脂类代谢物及其主要成分 (以油酸、棕榈酸、亚油酸、硬脂酸对照品进行试验) 对 10 株多药耐药菌株 (肺炎克雷伯杆菌、普通变形杆菌、表皮葡萄球菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、阴沟肠杆菌、铜绿假单胞菌、奇异变形杆菌、屎肠球菌和鲍曼不动杆菌) 的最低抑菌浓度 (MIC), 并用涂布平板法考察各样品对 10 株多药耐药菌的最低杀菌浓度 (MBC), 以 10% 的二甲基亚砜 (DMSO) 无菌水溶液为阴性对照, 试验重复 3 次。*A. terreus* 油脂类代谢物及其主要化学成分对 10 株多药耐药菌的 MIC 和 MBC 测定结果见表 2。

由表 2 可以看出, *A. terreus* 油脂类代谢物对多药耐

上清。对照组和试验组 (200、100、50 μg/mL 的油脂类代谢物) 分别加入 100 μL 完全培养液和相应浓度的油脂类代谢物。培养 24 h 后, 每孔加入 MTS 溶液 10 μL, 继续孵育 3~4 h 后, 于 490 nm 波长处测定光密度 (OD) 值, 每组设 6 个平行孔, 按照公式 细胞存活率 (%) = $\frac{OD_{\text{试验组平均值}}}{OD_{\text{对照组平均值}}} \times 100\%$ 计算细胞存活率。结果, 对照组和 200、100、50 μg/mL 油脂类代谢产物组细胞的存活率分别为 100%、99.31%、100%、99.92%, 可见油脂类代谢物在 50~200 μg/mL 范围内对 RAW264.7 细胞均无毒性 (细胞存活率均 ≥99.31%)。

2.6 炎症因子检测

参考文献 [11] 方法。参照 “2.5.1” 项下方法培养 RAW264.7 细胞, 弃上清, 每孔加入 100 μL 无血清

DMEM 培养基,然后将细胞分为空白组、模型组(1 μg/mL LPS)、阳性组(1 μg/mL LPS+50 μg/mL 地塞米松)和不同质量浓度油脂类代谢物组(1 μg/mL LPS+50、100、200 μg/mL 油脂类代谢产物),每组设6个复孔。培养24 h后,吸取50 μL 培养液上清至酶标板中,加入等体积的 Griess 试剂,室温反应10 min后,于540 nm 波长处测定各孔吸光度(A)值,根据标准曲线计算一氧化氮(NO)的释放量;TNF-α的释放量采用ELISA法进行测定,具体操作按照相应试剂盒说明书进行。采用SPSS 21.0 统计学软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和t检验进行组间比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义,结果见表3。

表3 各组细胞上清液中NO、TNF-α含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 3 Content determination of NO and TNF-α in supernatant in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	NO, μmol/L	TNF-α, pg/mL
空白组	100.00 ± 1.01	195.00 ± 8.48
模型组	188.32 ± 2.22**	1 043.80 ± 7.68**
阳性组	110.65 ± 1.17 ^{##}	428.20 ± 9.38 ^{##}
50 μg/mL 油脂类代谢物组	184.26 ± 4.79	784.75 ± 24.04 ^{##Δ}
100 μg/mL 油脂类代谢物组	146.19 ± 7.41 ^{##}	728.80 ± 31.45 ^{##Δ}
200 μg/mL 油脂类代谢物组	114.21 ± 1.01 ^{##}	150.18 ± 21.64 ^{##ΔΔ}

注:与空白组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,^{##} $P < 0.01$;与阳性组比较,^Δ $P < 0.05$,^{ΔΔ} $P < 0.01$

Note: vs. blank group, ** $P < 0.01$; vs. model group, ^{##} $P < 0.01$; vs. positive group, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$

由表3可知,与空白组比较,模型组细胞上清液中NO、TNF-α含量显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,阳性组和100、200 μg/mL 油脂类代谢物组细胞上清液中NO含量显著减少($P < 0.01$),且200 μg/mL 油脂类代谢物组含量与阳性组相当;阳性组和各质量浓度油脂类代谢物组细胞上清液中TNF-α含量均显著减少($P < 0.01$),且200 μg/mL 油脂类代谢物组含量低于阳性组($P < 0.01$)。

3 讨论

随着人们生活水平的提高,油脂类成分已经不仅仅是作为能量的来源,更是参与人类生活与健康的重要组成部分^[12]。现代药理研究表明,油脂类成分具有多种药理活性,如亚油酸有抑制结核分枝杆菌的活性^[13];棕榈酸、肉豆蔻酸、亚油酸等多种脂肪酸可对金黄色葡萄球菌显示出较高的抑制作用^[14];白木香内生真菌 *Aspergillus SP A14* 的油脂类成分对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和白色念珠菌均表现出抑制作用^[15]。本研究显示,头花蓼内生真菌 *A. terreus* 中有丰富的油脂类成分,并发现其具有抗多药耐药菌的作用,尤其对革兰氏阴性菌(如肺炎克雷伯菌、普通变形杆菌、大肠埃希菌、奇异变形杆菌和鲍曼不动杆菌)具有较强的抗菌活性,且油脂类代谢物比 AEPC 在抗多药耐药菌肺炎克雷伯杆菌、大肠埃希菌和鲍曼不动杆菌方面活性更强。但油脂类代谢物仅对测试耐药菌株肺炎克雷伯杆菌、大肠埃希菌和鲍曼不动杆菌具有活性,而 AEPC 对测试耐药菌株普通变形杆

菌、表皮葡萄球菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、阴沟肠杆菌、奇异变形杆菌和尿肠球菌具有活性,因此油脂类代谢物显示出比 AEPC 更窄的抗菌活性范围。

泌尿系统感染主要是因病原菌感染而引起的一类疾病,当尿路组织或其表皮受到病原菌感染后会产生一系列的炎症反应,而尿路炎症是泌尿系统感染的重要特征。因此,基于炎症辅助治疗也是治疗泌尿系统感染的重要方法之一^[16],本研究采用体外经典抗炎活性检测方法,考察油脂类代谢物对细胞分泌炎症因子 NO 和 TNF-α 的影响。结果表明,头花蓼内生真菌 *A. terreus* 油脂类代谢物在质量浓度为100、200 μg/mL 时均能显著抑制细胞释放炎症因子 NO 和 TNF-α,提示其中的油脂类成分对治疗泌尿系统感染具有辅助治疗的效果。

本研究表明,头花蓼内生真菌 *A. terreus* 中油脂类成分具有抗多药耐药菌和抗炎活性,表现出其代谢成分与头花蓼药材功能相似的特性,这为头花蓼及其内生菌资源在治疗泌尿系统感染疾病方面的进一步研究及应用提供了参考。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典:上册[M]. 上海:上海科技出版社,2005:611-612.
- [2] FIHN SD. Acute uncomplicated urinary tract infection in women[J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(3):259-266.
- [3] WANG A, NIZRAN P, MALONE MA, et al. Urinary tract infections[J]. *Prim Care*, 2013, 40(3):687-706.
- [4] ROSSOLINI GM, ARENA F, PECILE P, et al. Update on the antibiotic resistance crisis[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2014, 18(4):56-60.
- [5] PADHI L, MOHANTA YK, PABDA SK. Endophytic fungi with great promises: a review[J]. *J Adv Pharm Edu & Res*, 2013, 3(3):152-170.
- [6] 徐国波,刘俊,肖耀华,等.球毛壳菌 CIB-160 次生代谢产物的分离鉴定及其免疫活性[J]. *天然产物研究与开发*, 2016, 28(10):1562-1567.
- [7] MUHAMMAD T, SAQIB A, FIAZ A, et al. Identification, FT-IR, NMR (1H and 13C) and GC/MS studies of fatty acid methyl esters in biodiesel from rocket seed oil [J]. *Fuel Process Technol*, 2011, 92(3):336-341.
- [8] CLSI. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fifth informational supplement CLSI document M100-S25*[S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
- [9] 崔玉莹,王宪贝,李玉坤,等.金银花、连翘水煎液对金黄色葡萄球菌的抑制作用研究[J]. *光明中医*, 2017, 32(18):2637-2638.
- [10] WANG P, HENNING SM, HEBER D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols[J]. *PLoS One*, 2010, 5(4):10202-10212.
- [11] 毛艳,贺金华,蔡晓翠,等.维药神香草提取物体外抗炎作用的谱效关系研究[J]. *中国药房*, 2017, 28(10):1364-1367.

红景天苷对对乙酰氨基酚诱导肝损伤模型小鼠 Keap1-Nrf2 信号通路的影响^Δ

左 玮*, 张 波, 梅 丹*(中国医学科学院北京协和医院药剂科/协和转化医学中心, 北京 100730)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)11-1487-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.11.12

摘 要 目的:探讨红景天苷(SALD)对对乙酰氨基酚(APAP)诱导肝脏损伤模型小鼠的保护作用及机制。方法:将60只小鼠随机分为正常组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、阳性组(乙酰半胱氨酸,150 mg/kg)和SALD低、中、高剂量组(100、200、300 mg/kg),每组10只。除正常组外,其余各组小鼠均灌胃500 mg/kg的APAP复制肝损伤模型。造模前1 h,各组小鼠灌胃相应药物,连续5 d。给药结束后,测定小鼠血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、乳酸脱氢酶(LDH)含量,苏木精-伊红(HE)染色观察肝组织病理学改变,Western blot法检测肝组织中Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Keap1)(细胞核内)、核转录因子NF-E2相关因子(Nrf2)(细胞核内)、血红素氧合酶1(HO-1)(细胞质中)、还原型辅酶/醌氧化还原酶(NQO1)(细胞质中)以及谷氨酰半胱氨酸连接酶(GCLC)(细胞质中)蛋白表达。结果:与正常组比较,模型组小鼠血清中ALT、AST、ALP和LDH含量显著增加($P<0.01$),肝组织发生肝小叶结构紊乱辨别不清、肝细胞嗜酸性坏死等病变,肝组织中Nrf2、Keap1、HO-1、GCLC蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,除SALD低剂量组小鼠血清中LDH含量减少和阳性组小鼠肝组织中Nrf2、Keap1表达水平升高不显著外,其余各组小鼠上述指标均显著改善($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且各给药组小鼠肝组织中NQO1蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);各给药组小鼠肝组织病理变化均得到不同程度好转。结论:SALD对APAP诱导的肝损伤具有保护作用;其机制可能与促进Keap1、Nrf2入核,增强肝组织中NO-1、NQO1和GCLC蛋白表达有关。

关键词 红景天苷;对乙酰氨基酚;肝损伤;小鼠;Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1;核转录因子NF-E2相关因子

Effects of Salidroside on Keap1-Nrf2 Signal Pathway in Acetaminophen-induced Liver Injury Model Mice

ZUO Wei, ZHANG Bo, MEI Dan (Dept. of Pharmacy/Union Translational Medicine Center, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the protection role and mechanisms of salidroside (SALD) on acetaminophen (APAP)-induced liver injury model mice. METHODS: 60 mice were randomly divided into normal group (normal saline), model group (normal saline), positive group (acetylcysteine, 150 mg/kg), SALD low-dose, medium-dose and high-dose groups (100, 200, 300 mg/kg), with 10 mice in each group. Except for normal group, other groups were given APAP 500 mg/kg intragastrically to induce liver injury model. 1 h before modeling, mice were given relevant medicine intragastrically for consecutive 5 d. After medication, the serum contents of ALT, AST, ALP and LDH were determined, and the pathohistological changes of the liver tissue were observed by HE staining. The protein expressions of Keap1 (in tranuclear), Nrf2 (in tranuclear), HO-1 (in tracytoplasm), NQO1 (in tracytoplasm) and GCLC (in tracytoplasm) in liver tissue were determined by Western blot assay. RESULTS: Compared with normal group, serum contents of ALT, AST, ALP and LDH in model group were increased

[12] IBARGUREN M, LOPEZ DJ, ESCRIBA PV. The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1838(6): 1518-1528.

[13] ESQUIVEL-FERRINO PC, FABELA-HERNANDEZ JMJ, GARAZA-GONZALEZ E. et al. Antimycobacterial activi-

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81601033);北京市自然科学基金资助项目(No.7174342);中国医学科学院医学与健康科技创新工程(No.2017-I2M-1-011)

* 药师, 博士。研究方向:医院药学、神经药理、药物毒理。E-mail: eileenzuo@163.com

通信作者:主任药师。研究方向:医院药学、临床药学。E-mail: meidanpumch@163.com

ty of constituents from *Foeniculum vulgare* var. dulce grown in Mexico[J]. *Molecules*, 2012, 17(7):8471-8482.

[14] KELSEY JA, BAYLES KW, SAHFII B, et al. Fatty acids and monoacylglycerols inhibit growth of *Staphylococcus aureus*[J]. *Lipids*, 2006, 41(10):951-961.

[15] 彭可, 梅文莉, 吴娇, 等. 白木香内生真菌 *Aspergillus* sp. A14 的挥发性成分及其抗菌活性[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(1):85-88.

[16] GORAN B, BJOM W, CATHARINA S. *Escherichia coli*, fimbriae, bacterial persistence and host response induction in the human urinary tract[J]. *Int J Med Microbiol*, 2005, 295(6):487-502.

(收稿日期:2017-12-21 修回日期:2018-03-18)

(编辑:林 静)