

肉桂提取物对铜绿假单胞菌生物膜产生的抑制作用研究

綦国红, 陈金辉, 陈贵堂, 杨志萍, 王海翔, 王岁楼

(中国药科大学 工学院, 江苏 南京 211198)

摘要: 为研究肉桂提取物在最小抑菌浓度(MIC)以下对铜绿假单胞菌 PAO1 生物膜产生的抑制作用, 首先以紫色杆菌 CVO26 为初筛菌, 研究了肉桂提取物对其紫色素产生的抑制作用, 在此基础上利用酶标仪对铜绿假单胞菌 PAO1 产生的生物膜进行了定量测定, 利用光学显微镜对其生物膜概貌进行观察。结果表明: 肉桂提取物在 MIC 以下对紫色杆菌 CVO26 紫色素的产生量以及铜绿假单胞菌 PAO1 生物膜的产生量具有抑制作用, 且抑制率随着肉桂提取物浓度的升高而升高; 对 PAO1 形成的生物膜概貌特征也具有明显的影响。因此, 肉桂提取物在 MIC 以下对铜绿假单胞菌 PAO1 生物膜的形成具有抑制作用。

关键词: 群体感应抑制; 肉桂; 紫色杆菌; 铜绿假单胞菌; 生物膜

中图分类号: TS 201.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2018)08—0807—05

Inhibition of Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* by Cinnamon Extract

QI Guohong, CHEN Jinhui, CHEN Guitang, YANG Zhiping, WANG Haixiang, WANG Suilou
(School of Engineering, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

Abstract: The inhibition effect on biofilm production of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by the cinnamon extract was studied under the minimum inhibitory concentrations (MIC). Firstly, it was studied the inhibition effect of the cinnamon extract on the purple pigment production by *C. violaceum* CVO26 as screening bacteria. Biofilm formation by *P. aeruginosa* PAO1 was quantitatively determined based on Microplate reader. The profile of the biofilm of PAO1 was observed under light microscope. The results showed that the cinnamon extract under MIC inhibited the purple pigment production of *C. violaceum* CVO26 and biofilm formation by *P. aeruginosa* PAO1, and the inhibition rate increased with the increase of the concentration of cinnamon extract. Also, it had obvious influence on the formation of *P. aeruginosa* PAO1 biofilm profile characteristics. Therefore, the cinnamon extract under MIC had inhibitory effect on the biofilm formation of *P. aeruginosa* PAO1.

Keywords: quorum sensing inhibition, cinnamon, *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm

收稿日期: 2015-10-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(30700627)。

作者简介: 綦国红(1972—), 女, 内蒙赤峰人, 工学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品生物技术方面的研究。

E-mail: qghepu@163.com

引用本文: 綦国红, 陈金辉, 陈贵堂, 等. 肉桂提取物对铜绿假单胞菌生物膜产生的抑制作用研究[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(08): 807-811.

很多革兰氏阳性菌通过产生自诱导的小分子信号物质 N-酰基高丝氨酸内酯(N-Acyl homoserine lactones, AHLs), 以群体感应(Quorum sensing, QS)方式调控某些性状的表达, 如生物浮游、生物膜的形成、毒性因子的表达等^[1]。研究表明一些食源性致病菌的致病性以及腐败菌的腐败特性也受群体感应现象调控。如果存在于食品及食品机械上的腐败性细菌通过产生由 QS 现象调控的生物膜进行自我保护, 将降低杀菌剂或抑菌剂的作用效果^[2]。因此, 以调控这些菌的 QS 现象为切入点来控制腐败菌腐败特性成为可能, 即利用群体感应抑制剂(Quorum sensing inhibitors, QSIs)来抑制由 QS 调控的因子的表达^[3-5]。其机制不同于目前抑菌或杀菌的原理, 而是通过阻断其群体感应通路来减少腐败因子的表达, 从而降低其致腐性能, 与抑菌剂共同使用, 可以降低抑菌剂的使用浓度, 为新型生物防腐剂的开发提供新思路。

最早发现的革兰氏阴性菌群体感应抑制剂是源于海洋红藻的呋喃酮类化合物, 但此化合物具有毒性^[6], 因此从食品原料中寻找群体感应抑制剂成为此领域研究的热点^[7-10]。

肉桂(*Cinnamomum cassia*)为樟科植物肉桂的干燥树皮, 是卫计委公布的药食兼用植物材料, 产于广东、广西、云南等地, 《神农本草经》记载: 其“味产温, 主百病, 养精神, 和颜色, 利关节, 补中益气, 为诸药先聘通使, 久服通神, 轻身不老”。肉桂对皮肤真菌有很强的抑制作用, 对大肠杆菌、痢疾杆菌、伤寒杆菌、金黄色葡萄球菌也有明显的抑菌作用^[11]。因其气香浓烈, 味甜、辣, 因此可用作香料, 还可作为食品添加剂加入到肉制品中。

我国是肉桂的高产国, 国内对肉桂的研究不在少数, 但关于肉桂在细菌群体感应抑制方面的研究还未见报道。本文以群体感应抑制研究的模式菌铜绿假单胞菌 PAO1 为受试菌, 研究肉桂提取物对其生物膜产生的影响, 为肉桂资源的深度开发和利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

肉桂, 购自南京同仁堂药店; 二甲基亚砜(AP), 上海泰坦化学有限公司; 卡那霉素, 江西鑫瑞动物药业有限公司; N-己酰高丝氨酸内酯(N-hexanoyl-

homoserine lactone, C6-HSL), sigma 公司。

1.2 仪器与设备

Nikon 80I 荧光显微镜, 日本尼康; FLX800 酶标仪, 美国宝特; CR21G 高速冷冻离心机, 日立; TU-1901 双光束紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器; RE-5205 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; JY92-2N 细胞破碎仪, 浙江宁波新芝科技公司。

1.3 菌种与培养条件

紫色杆菌(*Chromobacterium violaceum*)CVO26、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)PAO1 均为本实验室保存。均使用 LB 培养基(氯化钠 10 g, 胰蛋白胍 10 g, 酵母粉 5 g, 水 1 L)培养。紫色杆菌CVO26 培养时添加卡那霉素至终质量浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.4 方法

1.4.1 肉桂提取物的制备 肉桂于 50 $^{\circ}\text{C}$ 烘干, 粉碎, 过 40 目多孔筛, 密封保存备用。称取 10 g 肉桂粉, 加入 100 mL 75% 的甲醇, 600 W 超声破碎 20 min, 静置 24 h, 得上清液。沉淀物加入 100 mL 75% 的甲醇继续静置 24 h。将两次提取的上清液混合, 离心, 上清液于旋转蒸发仪 35 $^{\circ}\text{C}$ 旋蒸至干, 再加入 2% 二甲基亚砜, 定容至 10 mL, 10 000 r/min 离心 5 min 取上清液, 装入无菌离心管中 -22 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻冷藏备用。

1.4.2 最小抑菌浓度的测定 根据文献[12]采用滤纸片法测定肉桂提取物对紫色杆菌 CVO26 和铜绿假单胞菌 PAO1 最小抑菌浓度, 方法如下: 待测菌活化两次后, 按 2% 的接种量接种于新鲜 LB 液体培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至菌液 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 约为 0.4 时, 将等体积 1.5% 的固体 LB 培养基迅速倒入菌液中, 摇匀, 倒平板, 制成含菌(约 1×10^8 cfu/mL)平板。将灭菌滤纸片(直径 6 mm)置于不同浓度提取液中浸泡 5 min, 沥干, 贴在平板上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 观察滤纸片周围的抑菌圈, 无菌水做对照, 每个浓度做 3 个平行。以不出现抑菌圈的最大浓度作为 MIC。

1.4.3 生长曲线的测定 根据文献[2]待测菌活化后, 按 2% 比例接种新鲜 LB 培养基, 振荡培养至 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 为 0.4, 加入不同浓度的提取物后, 28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养, 每隔 2 h 测定 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 值, 每个浓度做 3 个平行, 取平均值, 绘制生长曲线。

1.4.4 紫色杆菌 CVO26 紫色素的测定 根据文献[2], 菌体培养至 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 为 0.4, 取 9 mL 菌液于锥形瓶中, 加入 1 mL 不同浓度的提取物, 添加 C6-HSL

终浓度为 5 μmol/mL,28 °C 过夜振荡培养。无菌水为对照。

取 3 mL 培养液,10 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 1 mL 二甲基亚砜,充分振摇,于 10 000 r/min 离心 10 min,取上清,580 nm 处测定吸光值。按下式计算抑制率:

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组 OD 值} - \text{实验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \times 100\%$$

1.4.5 铜绿假单胞菌 PAO1 生物膜的定性与定量测定

根据文献[13]铜绿假单胞菌 PAO1 接入 LB 培养基中,再加入一定浓度的提取物,用无菌剪刀将医用无菌输液管剪成 0.5 cm×0.5 cm 大小的管片,将管片置于培养基中,37 °C 下静置培养。48 h 后用移液器取出培养基,再加入新鲜 LB 液体培养基和提取液,继续培养 48 h。取出输液管片,用无菌水冲洗,0.2%的结晶紫溶液染色 2 min,40 °C 烘干。取一个输液管片置于离心管中,加入 400 μL 95%乙醇浸泡 3 min,移取 300 μL 乙醇洗脱液至 96 孔板中,酶标仪测定 630 nm 波长处的吸光度。生物膜抑制率的计算方法见 1.4.4 节。另外,干燥的输液管片固定于载玻片上,光学显微镜(400×)下观察生物膜概况,拍照。

2 结果与分析

2.1 提取物对紫色杆菌 CVO26、铜绿假单胞菌 PAO1 的最小抑菌浓度(MIC)

通过滤纸片法分别测定了肉桂提取物对紫色杆菌与铜绿假单胞菌的 MIC,结果表明对紫色杆菌的 MIC 为 100 mg/mL,而铜绿假单胞菌在 100 mg/mL 时也无抑制作用,下述实验提取物的质量浓度全部在 100 mg/mL 以下进行。

2.2 提取物对紫色杆菌和铜绿假单胞菌生长的影响

为进一步证明提取物在 MIC 浓度以下对紫色杆菌与铜绿假单胞菌的生长是否产生影响,在添加提取物的条件下对其生长曲线进行测定。由图 1、2 可知,紫色杆菌 CVO26 与铜绿假单胞菌 PAO1 在添加不同浓度肉桂提取物条件下的生长与无菌水相比基本同步,不存在生长延迟现象。因此,提取物在试验浓度下对二菌没有抑制作用。

2.3 提取物对紫色杆菌紫色素产生的抑制作用

紫色杆菌产生紫色的能力是由群体感应现象调控的,CVO26 不产生 C6-HSL,也不产生紫色,在

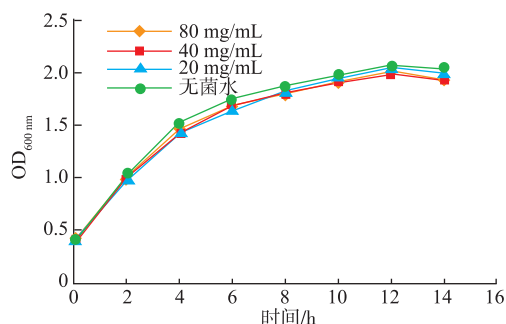


图 1 肉桂提取物对紫色杆菌 CVO26 生长的影响

Fig. 1 Effect of cinnamon extract on *C. violaceum* CVO26 growth

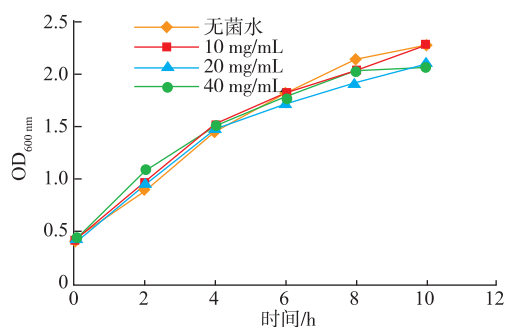
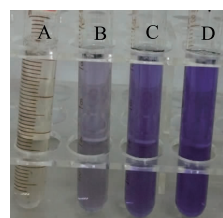


图 2 肉桂提取物对铜绿假单胞菌 PAO1 生长的影响

Fig. 2 Effect of cinnamon extract on *P. aeruginosa* PAO1 growth

添加了 C6-HSL 和提取物的条件下进行培养,提取物对 CVO26 群体感应的抑制作用可以通过检测其紫色素的产生量进行判定。培养物处理后,可以看到不同浓度肉桂提取物对紫色杆菌产生的紫色素量有明显影响(图 3),试验浓度下提取物对 CVO26 紫色素的产生均有抑制作用,且随着肉桂提取物浓度的升高而增强,80 mg/mL 时其抑制率可达 95.45%(图 4),因此提取物在不影响 CVO26 生长的情况下具有很好的抑制其群体感应作用。



A-80 mg/mL; B-40 mg/mL; C-20 mg/mL; D-无菌水。

图 3 肉桂提取物对紫色杆菌 CVO26 紫色素产生的抑制作用(定性)

Fig. 3 Violacein production inhibition in *C. violaceum* CVO26 by cinnamon extract (qualitative)

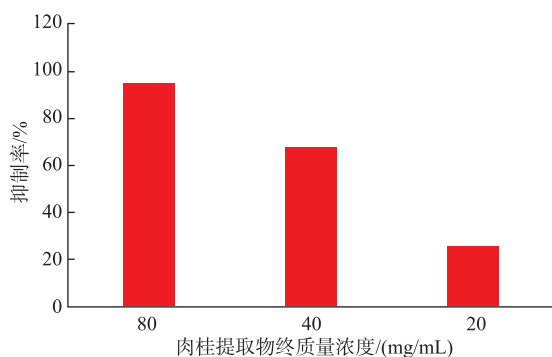


图 4 肉桂提取物对紫色杆菌 CVO26 紫色素产生的抑制作用(定量)

Fig. 4 Violacein production inhibition in *C. violaceum* CVO26 by cinnamon extract (quantitative)

2.4 对铜绿假单胞菌 PAO1 生物膜形成的抑制作用

对 PAO1 形成的生物膜通过光学显微镜进行观察发现,加入肉桂提取物的输液管片与对照相比,形成较少的菌团单位,细胞密度减少,提取物质量浓度在 40 mg/mL 时,形成的生物膜不完整,膜上的细胞密度与菌团单位非常稀疏(图 5)。

为对形成的生物膜进行定量测定,把输液管片上的生物膜用乙醇进行洗脱,并测定洗脱液 OD_{630 nm} 值,计算抑制率。由图 6 可知,对铜绿假单胞菌产生的生物膜的抑制率随肉桂提取物浓度的升高而升高,说明生物膜的形成量随提取物浓度的升高而减少。因此,通过定量与定性试验结果表明,肉桂提取物在不抑制铜绿假单胞菌 PAO1 生长的情况下,对其生物膜的形成具有很好的抑制作用。

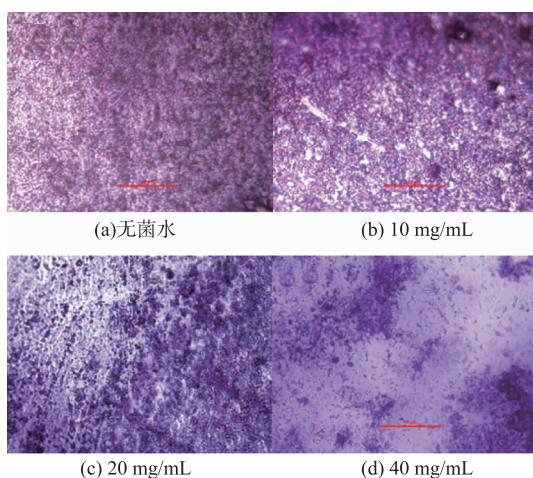


图 5 铜绿假单胞菌 PAO1 产生的生物膜概貌(400×)

Fig. 5 Microscopic images of biofilms by *P. aeruginosa* PAO1 (400×)

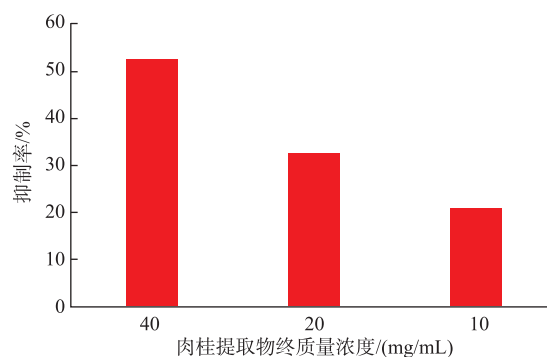


图 6 肉桂提取物对 PAO1 生物膜产生的抑制作用(定量)

Fig. 6 Biofilm production inhibition in *P. aeruginosa* PAO1 by cinnamon extract (quantitative)

3 结语

根据文献[14],肉桂提取物具有很强的抑菌作用,但本试验样品通过甲醇提取后,再用 2%二甲基亚砜进一步分离,其抑菌作用较弱。本文研究了此提取物对铜绿假单胞菌生物膜形成的影响,结果表明,在不抑制 PAO1 生长的情况下,降低了其生物膜的产生量,以及生物膜上菌团密度,而铜绿假单胞菌 PAO1 的这一特性受 QS 现象调控,因此证明,肉桂提取物对 PAO1 生物膜形成的抑制作用不是由抑菌所致而是对其 QS 现象的干扰所致。

据文献 [14] 肉桂甲醇提取物中含有 1.49 mg/g 的肉桂醛,而肉桂醛可溶于二甲基亚砜,肉桂醛的分子结构与自诱导物 AHL 的结构具有相似性,根据国外文献[15]报道,肉桂醛具有群体感应抑制活性,因此推断本试验提取物对 PAO1 的 QS 具有干扰作用的化合物可能是肉桂醛,提取物有效成分分离与鉴定工作将做进一步研究。

参考文献:

- [1] FUQUA W C, WINANS S C. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulator[J]. **Journal of Bacteriology**, 1994, 176: 269-275.
- [2] PACKIAVATHY I A S V, PRIYA S, PANDIAN S K, et al. Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin-Ananti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*[J]. **Food Chemistry**, 2014, 148: 453-460.
- [3] WU Qingping, WU Kui, YE Yingwang, et al. Quorum sensing and its roles in pathogenesis among animal-associated pathogens [J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2009, 49(7): 853-858. (in Chinese)
- [4] RASMUSSEN T B, GIVSKOV M. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs [J]. **International Journal of Medical Microbiology**, 2006, 296: 149-161.
- [5] CADY N C, MCKEAN K A, BEHNKE J, et al. Inhibition of biofilm formation, quorum sensing and infection in *Pseudomonas aeruginosa* by natural products-inspired organosulfur compounds[J]. **PLoS One**, 2012, 7(6): e38492.
- [6] HENTZER M, RIEDEL K, RASMUSSEN T B, et al. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound[J]. **Microbiology**, 2002, 148: 87-102.
- [7] HARJAI K, KUMAR R, SINGH S. Garlic blocks quorum sensing and attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, 2010, 58(2): 161-168.
- [8] ZHANG J M, RUI X, WANG L, et al. Polyphenolic extract from *Rosa rugosa* tea inhibits bacterial quorum sensing and biofilm formation[J]. **Food Control**, 2014, 42: 125-131.
- [9] TRUCHADO P, TOMAS-BARBERAN F A, LARROSA M, et al. Food phytochemicals act as Quorum Sensing inhibitors reducing production and/or degrading autoinducers of *Yersinia enterocolitica* and *Erwinia carotovora* [J]. **Food Control**, 2012, 24(1): 78-85.
- [10] LI Bin, DONG Mingsheng. Inhibition effect of extract from *Auricularia auricular* on quorum sensing and biofilm formation of bacteria[J]. **Food Science**, 2010, 31(9): 140-153. (in Chinese)
- [11] ZHANG Shengjiang, ZHANG Min, LIU Yaping. Study on the extracts of clove/cinnamon and its antiseptics for the *Lentinus edode* Sauce[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014, 33(8): 865-869. (in Chinese)
- [12] 刘湛军. 亚抑菌浓度抗生素对紫色杆菌群体感应系统的调控研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- [13] WANG Yao, DAI Yue. Effect of quorum sensing signal molecules degradation gene on virulence and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. **Science in China (Series C: Life Sciences)**, 2007, 37(2): 234-240. (in Chinese)
- [14] LI Tingting, MA Songtao, FENG Yun, et al. Content comparison of cinnamaldehyde extracted from cinnamon volatile oil by different solvents[J]. **China Pharmaceuticals**, 2010, 19(24): 22-23. (in Chinese)
- [15] BRACHMAN G, DEFOIRDT T, MIYAMOTO C, et al. Cinnamaldehyde and cinnamaldehyde derivatives reduce virulence in *Vibrio* spp. by decreasing the DNA-binding activity of the quorum sensing response regulator LuxR [J]. **BMC Microbiology**, 2008, 8(1): 149-152.