

# 抗菌-抗炎双功能穿龙薯蓣天然产物靶向调节蛋白质翻译后修饰的活性评价及机制研究

沈如旭<sup>1</sup>, 叶子晨<sup>2</sup>, 赵嘉琦<sup>1</sup>, 张倩<sup>3\*</sup>, 汤海峰<sup>3\*</sup>, 曲迪<sup>4,5\*</sup>

(1. 辽宁大学生命科学院, 辽宁 沈阳 110036; 2. 中国人民解放军空军军医大学空军卫勤训练基地, 卫生勤务学教研室, 陕西 西安 710032; 3. 中国人民解放军空军军医大学药理学系, 中药与天然药物学教研室, 陕西 西安 710032; 4. 中国人民解放军西部战区总医院, 临床药学科, 四川 成都 610000; 5. 胰腺损伤与修复四川省重点实验室, 四川 成都 610000)

**摘要:** 细菌耐药现象日益严重亟需研发新的抗菌物质。天然产物作为一种重要的药物研发资源, 其能够通过调节与细菌感染和炎症反应相关的蛋白质翻译后修饰来发挥作用, 这为抗菌新药物的研发提供宝贵的化合物库。本研究从穿龙薯蓣中分离鉴定的薯蓣皂苷和薯蓣皂苷元均具有一定的抗菌活性, 且对革兰阳性菌 (G<sup>+</sup>) 的抗菌活性优于革兰阴性菌 (G<sup>-</sup>)。对比两种成分, 薯蓣皂苷元的活性强于薯蓣皂苷。体内实验证实薯蓣皂苷元相比于薯蓣皂苷对 MRSA 感染脓毒症小鼠具有更好的保护作用, 能够提高感染小鼠生存率、降低感染脏器菌落数、降低感染脏器病理损伤、降低小鼠体内炎症因子水平。体内实验获得中国人民解放军空军军医大学动物伦理委员会批准 (批准号: 20230188)。网络药理学靶点预测显示天然产物薯蓣皂苷元能够靶向体内炎症通路, 并可能通过调节蛋白质翻译后修饰在细菌感染中发挥抗菌和抗炎双重活性。

**关键词:** 天然产物; 穿龙薯蓣; 抗菌抗炎; 脓毒症; 靶点预测; 蛋白质翻译后修饰

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)11-2981-09

## Activity evaluation and mechanism study of antibacterial-anti-inflammatory bifunctional *Dioscoreae Nipponicae* Rhizoma natural components targeting regulatory protein posttranslational modification

SHEN Ru-xu<sup>1</sup>, YE Zi-chen<sup>2</sup>, ZHAO Jia-qi<sup>1</sup>, ZHANG Qian<sup>3\*</sup>, TANG Hai-feng<sup>3\*</sup>, QU Di<sup>4,5\*</sup>

(1. School of Life Sciences, Liaoning University, Shenyang 110036, China; 2. Department of Health Service, Medical Service Training Base, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; 3. Department of Chinese Materia Medica and Natural Medicines, School of Pharmacy, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; 4. Department of Clinical Pharmacy, General Hospital of Western Theater Command, Chengdu 610000, China; 5. Pancreatic Injury and Repair Key Laboratory of Sichuan Province, General Hospital of Western Theater Command, Chengdu 610000, China)

**Abstract:** The phenomenon of bacterial drug resistance is becoming more and more serious. Natural products, as an important resource for drug discovery, can play a role by regulating protein post-translational modifications related to bacterial infection and inflammatory responses. This provides a valuable compound library for the

收稿日期: 2024-05-07; 修回日期: 2024-09-10.

基金项目: 国家自然科学基金 (82304573); 中国博士后基金会特别资助 (曲迪); 陕西省重点研发计划 (2023-YBSF-514); 西部战区总医院院管课题 (2021-XZYG-B14).

\*通讯作者 E-mail: qianqiangoodok@163.com; tanghaifeng71@163.com; qvdi@sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0428

research and development of new antibacterial drugs. In this present research, dioscin and diosgenin were isolated and identified from *Dioscorea nipponica* Rhizoma, which both exhibited antibacterial activities, with stronger inhibitory on Gram-positive bacteria ( $G^+$ ) than Gram-negative bacteria ( $G^-$ ). Compared these two compounds, diosgenin showed stronger antibacterial activity than dioscin. *In vivo* experiments confirmed that diosgenin provided better protection against MRSA-induced sepsis in mice compared to dioscin, which could significantly improve survival rates, reduce bacterial colony counts in infected organs, alleviate pathological damage, and decrease inflammatory cytokine levels in mice. The *in vivo* study was approved by the Animal Ethics Committee of the PLA Air Force Military Medical University (Grant No. 20230188). Network pharmacology results also revealed that diosgenin could target inflammatory pathways, exerting dual antibacterial and anti-inflammatory activities during bacterial infection therapy.

**Key words:** natural product; *Dioscorea nipponica* Rhizoma; antibacterial and anti-inflammatory; sepsis; target prediction; protein post-translational modification

近年来,随着抗生素滥用导致的细菌耐药问题的日益严重,目前临床大多数细菌对抗生素均已产生耐药性<sup>[1-3]</sup>。专家预测,此情形如果不加以控制截止到2050年全球每年因耐药菌感染死亡的人数将高达1 000万人。与此同时,新研发上市的抗生素数量呈现锐减的趋势,且新上市的抗生素均无法避免诱导耐药的发生,因此寻找新型的抗菌药物成为抗感染治疗的当务之急。

天然产物作为一种重要的药物研发资源,其具有资源丰富、毒副作用小的独特优点,此外,蛋白质翻译后修饰 (PTMs) 是调节蛋白质功能和活性的重要机制,天然产物独特的结构能够调节许多靶点蛋白质翻译后修饰从而发挥广泛的生物活性,这引起了科学家们的重点关注<sup>[4-6]</sup>。穿龙薯蓣 (*Dioscorea nipponica* Makino) 为薯蓣科薯蓣属植物,又名穿山龙、穿地龙、穿龙骨等。穿龙薯蓣多以根茎入药,是我国的传统中药材 (*Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*), 主产于我国东北、华北、西北地区。穿龙薯蓣主要成分之一的薯蓣皂苷,广泛存在于薯蓣科植物中,如穿龙薯蓣、盾叶薯蓣、紫萹黄、黄山药等。薯蓣皂苷元已报道具有显著抗肿瘤、抗炎、调节血脂和抗血小板聚集的活性<sup>[7-9]</sup>。在穿龙薯蓣中也有少量薯蓣皂苷元,但其主要是作为薯蓣皂苷的苷元存在,因具有多种生物活性也备受关注。研究发现,薯蓣皂苷元具有抗癌、抗糖尿病、抗血栓、抗凝、抗炎、抗衰老和抗病毒等多种活性,因此可能成为治疗多种疾病的潜在药物<sup>[10]</sup>。但是薯蓣皂苷和薯蓣皂苷元对于细菌感染性炎症的保护作用还未得到证实。因此本研究作者提取了穿龙薯蓣中的主要成分薯蓣皂苷和薯蓣皂苷元,经结构鉴定后对于体内外抗菌保护作用进行评价,同时使用网络药理学的方法对活性成分的潜在作用机制进行了阐述。

本研究以穿龙薯蓣为研究对象,提取并鉴定其主

要成分薯蓣皂苷和薯蓣皂苷元。在体外通过最低抑菌浓度 (MIC) 和生长曲线评价天然产物的抗菌活性。同时构建小鼠耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 脓毒症感染模型,通过菌落形成单位 (CFU) 计数、苏木精-伊红 (HE) 染色和 PCR 基因表达测定来评价天然产物的体内抗菌抗炎保护作用。进一步,通过网络药理学预测天然产物抗菌活性的潜在作用机制。研究结果发现,薯蓣皂苷元的抗菌活性显著优于薯蓣皂苷,其能够同时抑制细菌的生长并降低小鼠感染部位的炎症水平。网络药理学预测结果显示薯蓣皂苷元在细菌感染性疾病中具有显著的抗炎活性。综上所述,薯蓣皂苷元在细菌感染治疗中有更优的应用价值,其通过抑制细菌生长和炎症水平发挥抗菌抗炎的双重功效。

## 材料与方法

**仪器与材料** 电子分析天平 (赛多利斯科学仪器有限公司); XT5 型显微熔点测定仪 (北京科仪电光仪器厂); Quattro 质谱仪 (美国 Waters 公司); PL343 型旋光仪 (美国 Perkin-Elmer 公司); AVANCE 400 型超导核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); P680 高效液相色谱仪 (美国 Dionex 公司); Agilent GC-6820 气相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Sephadex LH-20 柱 (北京欧亚新技术公司); ODS-C18 填料 (德国 Merck 公司); CN-(三甲基硅基)咪唑、对照品 *D*-葡萄糖 (*D*-Glc) 和 *L*-鼠李糖 (*L*-Rha) (德国 Sigma 公司); 柱色谱和薄层色谱用硅胶 (青岛海洋化工厂)。提取分离用试剂均为分析纯。

穿山龙药材由空军军医大学中药与天然药物学教研室汤海峰教授鉴定为穿龙薯蓣 (*Dioscorea nipponica* Makino) 的根茎,标本保存在空军军医大学中药与天然药物学教研室,编号为 20231212。

**试剂、菌株、细胞与动物** 二甲亚砜 (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)。本研究使用的

金黄色葡萄球菌 (ATCC29213)、表皮葡萄球菌、大肠杆菌 (ATCC25922)、铜绿假单胞菌、肺炎链球菌 (ATCC49619) 购自美国典型菌株保藏中心, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的条件下培养于琼脂平板上。人肾皮质近曲小管上皮 HK-2 细胞株购于 ATCC 用于进行分离产物的细胞毒性评价。体内感染使用 Balb/c 小鼠 (6~7 周, 18~20 g, 雌雄各半), 购于中国人民解放军空军军医大学动物中心。本实验获得中国人民解放军空军军医大学动物伦理委员会批准 (批准号: 20230188)。

#### 薯蓣皂苷和薯蓣皂苷元分离及表征

**穿龙薯蓣根茎的粗提** 取穿龙薯蓣干燥根茎 3.0 kg 研磨粉碎, 在 10 倍体积的 75% 乙醇中分批浸泡过夜, 85 °C 冷凝回流提取 3 次, 每次 3 h, 合并醇提液并减压浓缩得浸膏。将醇提取浸膏加 5 L 水分散, 并以脱脂纱布将其进行粗滤, 然后以相同体积的石油醚萃取 3 次, 弃去石油醚层, 将水层萃取液用等体积的水饱和正丁醇萃取多次, 至水层近乎澄清为止。将所有饱和正丁醇层减压浓缩合并, 最终得到浸膏 210.0 g。

**薯蓣皂苷的分离** 取 100 g 浸膏用硅胶搅拌后进行硅胶柱色谱分离, 用三氯甲烷-甲醇-水系统 (8:2:0.2~6.5:3.5:1.0) 梯度洗脱, 再结合 Sephadex LH-20 柱色谱和半制备高效液相色谱 (流动相为 75% 甲醇) 纯化, 得到薯蓣皂苷 400 mg。

**薯蓣皂苷元的分离** 取 10 g 浸膏加入水 300 mL 使其分散均匀, 并加入硫酸 40.8 mL, 配制成浓度为 2.5 mol·L<sup>-1</sup> 的水解体系, 在 90 °C 下进行酸水解, 过滤, 用蒸馏水反复冲洗, 并加入碳酸钠粉末调节 pH 值至中性, 烘干内容物并加入石油醚, 冷却回流提取薯蓣皂苷元, 过滤, 回收石油醚, 得到薯蓣皂苷元的粗品, 再结合 Sephadex LH-20 柱色谱和半制备高效液相色谱 (流动相为 95% 甲醇) 纯化, 得到薯蓣皂苷元 410 mg。

#### 薯蓣皂苷的酸水解及制备单糖衍生物

**酸水解** 将薯蓣皂苷 1.5 mg 加入 2 mL 三氟乙酸 (2 mol·L<sup>-1</sup>) 中, 120 °C 加热 2 h, 蒸干溶剂并加入二氯甲烷和蒸馏水进行萃取, 回收水层得酸水解产物。

**单糖衍生物的制备** 将水层的酸水解产物进行减压浓缩, 配制 0.1 mol·L<sup>-1</sup> L-半胱氨酸甲酯盐酸盐的无水吡啶溶液 2 mL, 并加入 1 mL 无水吡啶, 混合后加入水层, 60 °C 加热 1.5 h, 用氮气蒸干溶液, 在反应物中先后加入 0.5 mL N-(三甲基硅基)咪唑和 1 mL 吡啶, 相同温度条件处理, 蒸干后的样品采用正己烷和水萃取, 取正己烷层进行 GC 分析 (气化室温度 250 °C; 柱温 250 °C; 检测器 280 °C; 进样量 1 μL; 载气为氮气)。通过比较标准糖衍生物和样品单糖衍生物的保留时间确定化合物中单糖的种类。标准糖衍生物的保留时间分

别为 D-葡萄糖为 27.36 min 和 L-鼠李糖为 20.21 min。

**MIC 测定** 采用微量肉汤稀释法测定薯蓣皂苷和薯蓣皂苷元对细菌的 MIC 值。实验方法参照美国临床实验室以及欧洲药敏试验委员会颁布的最新标准<sup>[11]</sup>。具体操作如下所述, 使用 MH 肉汤培养基培养细菌并调节细菌浓度为 2×10<sup>5</sup> CFU·mL<sup>-1</sup> 备用, 使用 MH 肉汤对待测化合物进行倍比稀释使其浓度为 512、256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25 μg·mL<sup>-1</sup>。于 96 孔板中分别接入 100 μL 菌液和 100 μL 化合物培养, 37 °C 培养箱中过夜培养。次日观察各孔中菌液的浑浊情况, 待第一个出现培养基浑浊或孔底部有沉淀的情况时, 此孔所对应的药物浓度即为药物对该菌的 MIC 值。

**细菌生长曲线测定** 向细菌生长曲线分析平板中加入含不同浓度薯蓣皂苷和薯蓣皂苷元的培养基 200 μL, 随后加入菌液 100 μL。将平板置于细菌全自动生长曲线分析仪, 37 °C 培养, 每 4 h 取孔中的样本进行 CFU 计数, 并绘制细菌生长曲线。

**细胞毒性测试** 使用 CCK-8 检测试剂盒评价化合物对 HK-2 细胞的毒性。HK-2 种植于 96 孔板中, 待细胞生长到 70%~80% 覆盖度后, 向孔内加入化合物共孵育, 化合物的浓度为 2、4、8、16、32、64、128、256 μg·mL<sup>-1</sup>。37 °C、5%CO<sub>2</sub> 环境中培养 48 h, 弃掉上清, 加入 100 μL 含 10% 的 CCK-8 空白培养基, 置于培养箱中孵育 4 h, 并使用酶标仪测定 OD<sub>450nm</sub> 值并计算细胞存活率。

**小鼠脓毒症模型构建及评价** 腹腔注射 1×10<sup>8</sup> CFU·mL<sup>-1</sup> MRSA 构建小鼠脓毒症模型。60 只小鼠随机分为对照组、模型组、阳性对照组、化合物治疗组 (10、20 和 30 mg·kg<sup>-1</sup>), 每组 10 只。小鼠感染 3 h 后, 给予不同浓度化合物进行治疗, 阳性对照组给予万古霉素进行治疗<sup>[12,13]</sup>。观察、记录并绘制各组小鼠生存曲线。取各组小鼠感染脏器, 研磨、匀浆、倍比稀释后涂布于琼脂平板, 计数脏器荷菌量。取感染脏器组织固定于 4% 多聚甲醛溶液中, 进行常规石蜡包埋、切片及苏木精-伊红染色, 在显微镜下观察脏器病理损伤情况、炎症细胞浸润情况并拍照。收集感染动物血清, 使用 ELISA 检测试剂盒测定血清中验证因子 TNF-α、IL-18、IL-6 水平。体内实验获得中国人民解放军空军军医大学动物伦理委员会批准 (批准号: 20230188)。

**网络药理学作用靶点预测** 首先将薯蓣皂苷元的化学结构在 SwissADME 数据库中转换成“SMILES”格式, 随后在 TCMSp 数据库、BTAMAN-TCM 数据库、ETCM 数据库中搜索对应的作用靶点。其中 BATMAN-TCM 数据库的靶点筛选条件为“score > 80”,

ETCM 数据库的靶点筛选条件为“score > 0.8”，整理汇总得到结果。以“sepsis”为关键词在 GeneCards 数据库中检索治疗细菌感染的作用靶点，其中 GeneCards 数据库中作用靶点的参数设定为“score > 30”，合并去重得到公共数据库部分。最后使用 R 软件的“Venn”数据包，得到公共数据库靶点与 GEO 数据库靶点的交集，作为薯蓣皂苷元治疗细菌感染的体内作用靶点数据库。对上述靶点进行通路富集分析<sup>[14]</sup>。

**统计学分析** 本研究中所有数据结果以平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，*t* 检验用于两组比较，*P* < 0.05 被认为组间有统计学差异。采用 GraphPad Prism 软件进行作图。

## 结果

### 1 穿龙薯蓣化学成分进行的提取鉴定

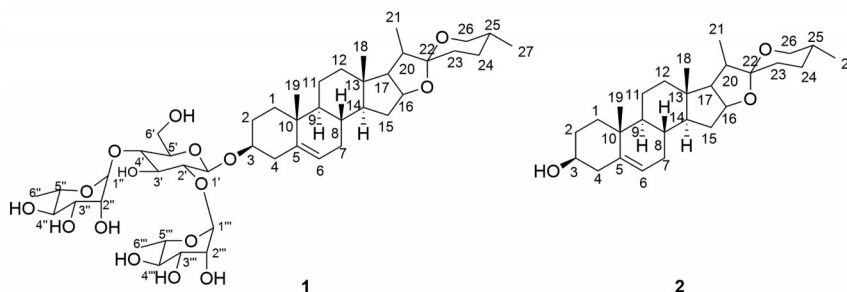
化合物 **1**: 为白色无定形粉末 (氯仿-甲醇), 易溶于吡啶、热甲醇, 微溶于氯仿、乙醇, 不溶于水。Liebermann-Burchard 与 Molish 反应均成阳性, 推测为皂苷类化合物。HR-ESI-MS 显示准离子分子峰  $[M-H]^-$  *m/z* 867.474 8, 结合碳谱数据, 确定该化合物的分子式为  $C_{45}H_{72}O_{16}$ 。  $^{13}C$  NMR (100 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>) 谱中可观察到 45 个碳信号 (表 1), 并对该化合物进行酸水解, 经过 GC 分析, 确定化合物含糖为 *D*-Glc、*L*-Rha, 比例为 1:2。由  $^1H$  NMR (400 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>) 谱中数据得  $\delta$  6.89 (d, *J* = 72.0 Hz, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.78 (s, 1H), 5.28 (t, *J* = 10.8 Hz, 1H), 5.04 (s, 2H), 5.02~4.87 (m, 2H), 4.82 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 4.78 (s, 1H), 4.64~4.60 (m, 1H), 4.58 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 4.56~4.50 (m, 1H), 4.48~4.30 (m, 1H), 4.27~4.18 (m, 1H), 4.10 (dd, *J* = 12.0 Hz, 3.0 Hz, 1H), 3.90~3.82 (m, 1H), 3.60 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 3.52 (t, *J* = 12.4 Hz, 1H), 3.48 (t, *J* = 10.2 Hz, 1H), 2.76 (dd, *J* = 24.8 Hz, 11.0 Hz, 1H), 2.04 (dd, *J* = 12.0 Hz, 8.2 Hz, 1H), 1.96 (dd, *J* = 13.0 Hz, 6.6 Hz, 1H), 1.82 (d, *J* = 14.2 Hz, 1H), 1.80 (dd, *J* = 13.6 Hz, 7.0 Hz, 1H), 1.72~1.70 (m, 1H), 1.64 (dd, *J* = 11.0 Hz, 4.2 Hz, 1H), 1.52 (dd, *J* = 14.3 Hz, 3.8 Hz, 1H), 1.51 (d, *J* = 9.0 Hz,

1H), 1.50~1.38 (m, 1H), 1.30 (d, *J* = 19.0 Hz, 1H), 1.18 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 1.10~1.06 (m, 1H), 1.00~0.96 (m, 1H), 0.80 (dd, *J* = 10.8 Hz, 5.9 Hz, 1H), 0.80 (s, 1H), 0.68 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H)。数据与文献<sup>[15]</sup>基本一致, 故鉴定为薯蓣皂苷, 结构式见图 1。

**Table 1**  $^{13}C$  NMR data of dioscin (**1**) and diosgenin (**2**)

Carbon No.	$\delta_c$		Carbon No.	$\delta_c$	
	1	2		1	2
1	37.1	37.2	3- <i>O</i> -Glc-1'	100.9	
2	29.5	29.6	2'	77.8	
3	77.3	71.3	3'	77.4	
4	40.1	39.9	4'	77.4	
5	140.4	140.5	5'	77.4	
6	121.2	121.2	6'	61.2	
7	31.2	31.6	Rha I-1''	101.8	
8	31.5	31.2	2''	72.7	
9	50.2	50.6	3''	72.5	
10	36.7	36.7	4''	73.4	
11	20.7	20.1	5''	68.9	
12	39.5	39.6	6''	18.5	
13	40.2	40.1	Rha II-1'''	101.9	
14	56.3	56.2	2'''	72.9	
15	31.2	30.9	3'''	72.7	
16	80.6	80.5	4'''	73.5	
17	61.5	61.2	5'''	69.9	
18	16.2	16.3	6'''	18.3	
19	18.9	18.5			
20	39.9	39.4			
21	13.8	13.2			
22	107.9	107.5			
23	31.5	31.2			
24	28.9	28.5			
25	30.6	30.1			
26	67.3	67.2			
27	17.4	17.3			

化合物 **2**: 为白色结晶, 不溶于水, 可溶于甲醇、乙醇、氯仿和乙酸。HR-ESI-MS 显示准离子分子峰  $[M+Na]^+$  *m/z* 437.302 6, 结合碳谱数据, 确定该化合物的分子式为  $C_{27}H_{42}O_3$ 。  $^{13}C$  NMR (100 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>) 谱中可得 27 个碳信号 (表 1), 与化合物 **1** 相比, 缺少 3 个糖的碳信号, 由于 C-3 位未连接糖链, 其碳信号向高场发生位移。由氢谱  $^1H$  NMR (400 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>) 谱中数据得  $\delta$  0.74 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-27), 0.78 (3H, s, H-18), 0.93 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-21), 1.03 (3H, s, H-



**Figure 1** The structures of **1** and **2**

19), 3.80 (1H, m, H-3), 5.22 (1H, t,  $J = 2.0$  Hz, H-6), 以上波谱数据与文献<sup>[16]</sup>报道基本一致, 故鉴定为薯蓣皂苷元, 结构式见图1。

## 2 薯蓣皂苷和薯蓣皂苷元最低抑菌浓度和细胞毒性

本研究用微量肉汤稀释法对薯蓣皂苷和薯蓣皂苷元的体外抗菌活性进行评价。所测得的MIC结果如表2所示, 薯蓣皂苷和薯蓣皂苷元均呈现一定的抗菌活性且二者对于 $G^+$ 的抗菌活性优于 $G^-$ 。相比较两种化合物, 薯蓣皂苷元的抗菌活性强于薯蓣皂苷, 尤其对于金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌和MRSA (MIC 4~8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  vs 16  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。作者使用不同质量浓度的化合物处理细菌, 并测定细菌的生长曲线。结果表明, 2种化合物均能够不同程度抑制细菌的生长, 但薯蓣皂苷元的活性比薯蓣皂苷的活性略强(图2A、B)。这一结果与MIC测定结果相一致。进一步作者评价了薯蓣皂苷和薯蓣皂苷元对于HK-2的细胞毒性。结果显示, 薯蓣皂苷和薯蓣皂苷元在质量浓度100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 细胞的存活率依然大于90%, 证明这两种化合物具有较低的细胞毒性(图2C)。

**Table 2** MIC values of dioscin and diosgenin against bacterial strains ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). SA: *Staphylococcus aureus*; SE: *Staphylococcus epidermidis*; MRSA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; E. coil: *Escherichia coli*; PA: *Pseudomonas aeruginosa*; KP: *Klebsiella Pneumoniae*; MIC: Minimum inhibitory concentration

Chemical composition	MIC					
	SA	SE	MRSA	E. coil	PA	KP
Dioscin	16	16	16	32	16	16
Diosgenin	4-8	4-8	4	16	16	8

## 3 薯蓣皂苷和薯蓣皂苷元的体内抗感染活性

为明确薯蓣皂苷和薯蓣皂苷元的体内抗感染保护作用, 作者使用临床最常见的致病菌MRSA感染Balb/c小鼠构建脓毒症模型, 并分别给予薯蓣皂苷、薯蓣皂苷元、PBS和万古霉素进行治疗。小鼠感染后生存曲线如图3A所示, PBS治疗组小鼠在48 h时的生存率为0%, 薯蓣皂苷和薯蓣皂苷元能够显著提高小鼠生存率, 且存在剂量依赖性。且在30  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 质量浓度下薯蓣皂苷元的治疗效果甚至优于万古霉素的效果(生存率分别为85% vs 70%)。CFU计数结果显示, 薯蓣皂苷元能够呈剂量依赖性降低腹腔灌洗液中的荷菌量, 且其活性显著优于薯蓣皂苷和万古霉素(图3B,  $P < 0.05$ )。万古霉素具有较强的肾毒性, HE染色的结果同样证实, 万古霉素虽具有较强的体外杀菌活性, 但在体内应用时会造成较严重的肾损伤。而薯蓣皂苷和薯蓣皂苷元治疗后, 小鼠肾脏的病理损伤显著降低, 薯蓣皂苷元的保护作用更优(图3C)。上述结果均表明在体

内感染模型中, 薯蓣皂苷元的活性优于薯蓣皂苷。

## 4 薯蓣皂苷和薯蓣皂苷元对感染小鼠炎症水平的抑制作用

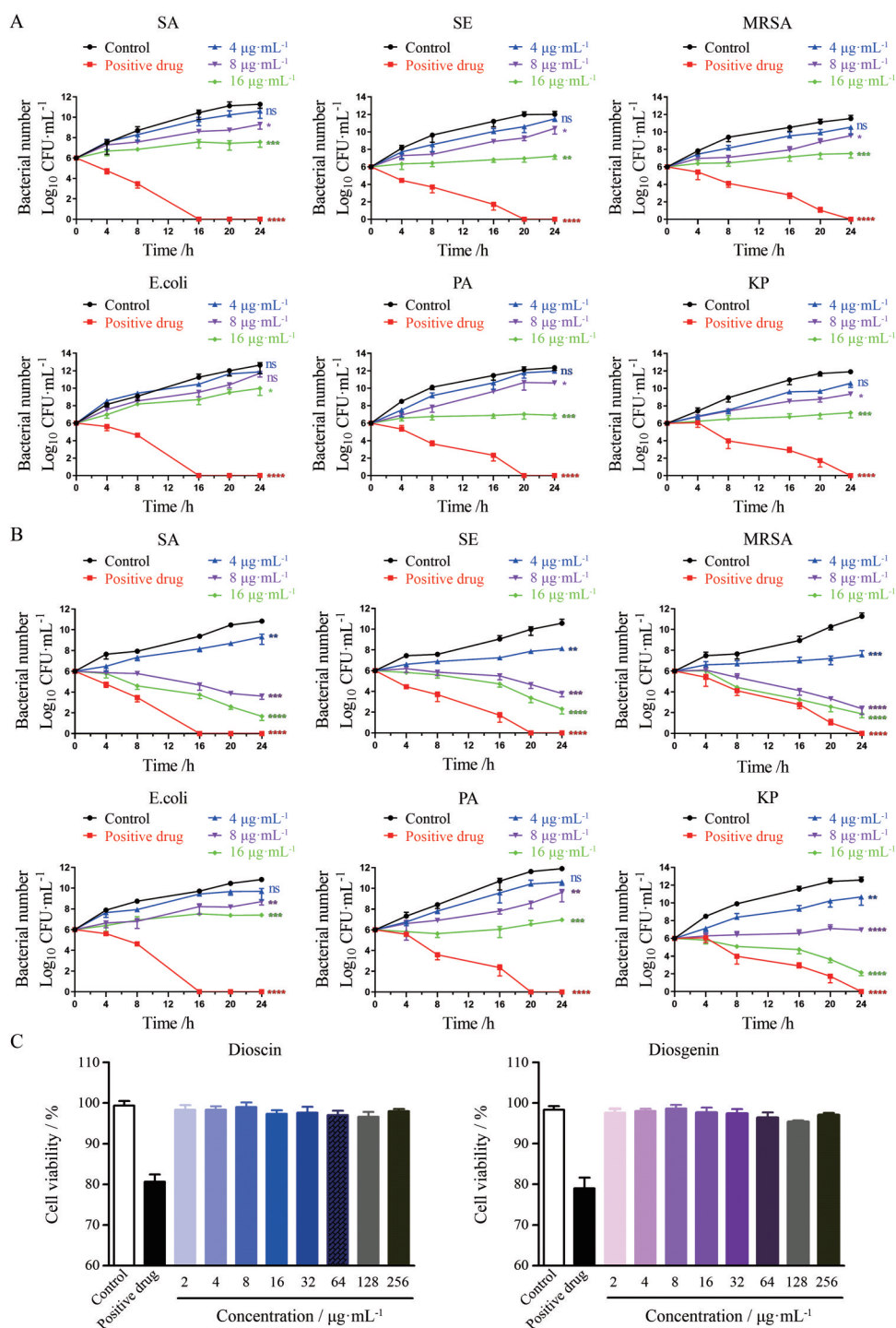
细菌感染会诱导机体免疫细胞产生大量的炎症因子, 而过度的炎症因子会形成“炎症风暴”, 对正常组织细胞造成损伤, 导致肺、肾、心等器官受损甚至功能衰竭, 在小鼠体内实验中作者发现薯蓣皂苷元对于小鼠后期死亡具有较好的保护作用, 猜测这可能是由于其具有体内抗炎活性。因此, 作者进一步检测了感染小鼠体内的炎症因子水平和腹腔巨噬细胞中验证相关基因的表达。结果显示, 薯蓣皂苷和薯蓣皂苷元均能够剂量依赖性降低感染小鼠体内炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-18和IL-6的水平, 且薯蓣皂苷元的活性强于薯蓣皂苷(图4A)。NF- $\kappa$ B信号通路能感受细菌刺激调控上述因子的产生, 作者使用qPCR检测了TLR4-NF- $\kappa$ B-P53信号通路的活性, 结果如图4B所示。TLR4-NF- $\kappa$ B-P53通路关键基因的表达在薯蓣皂苷和薯蓣皂苷元处理后受到显著抑制, 且薯蓣皂苷元的抗炎活性优于薯蓣皂苷。

## 5 薯蓣皂苷元作用靶点的网络药理学预测

作者使用SwissTargetPrediction数据库对薯蓣皂苷元的潜在作用靶点进行预测, 得到100个潜在靶点。使用GeneCards数据库中检索脓毒症的作用靶点, 得到3 016个靶点。将筛选出的药物靶点与疾病靶点输入韦恩图制作软件Venny 2.1, 得到56个共有靶点, 作为药物作用于疾病的预测靶点进行分析(图5A)。首先使用STRING工具对共有靶点进行蛋白网络构建并进行聚类分析结果如图5B、C所示, 靶点蛋白共聚为4大类。对上述靶点进行GO富集分析可见, 上述靶点主要参与细胞中磷酸化、细胞运动、膜受体、炎症发生生物学过程(图5D)。由此可见, 薯蓣皂苷元极有可能通过干扰机体免疫细胞的抗菌应答过程和炎症水平发挥体内保护作用。这为作者后续具体作用靶点的炎症提供参考。

## 讨论

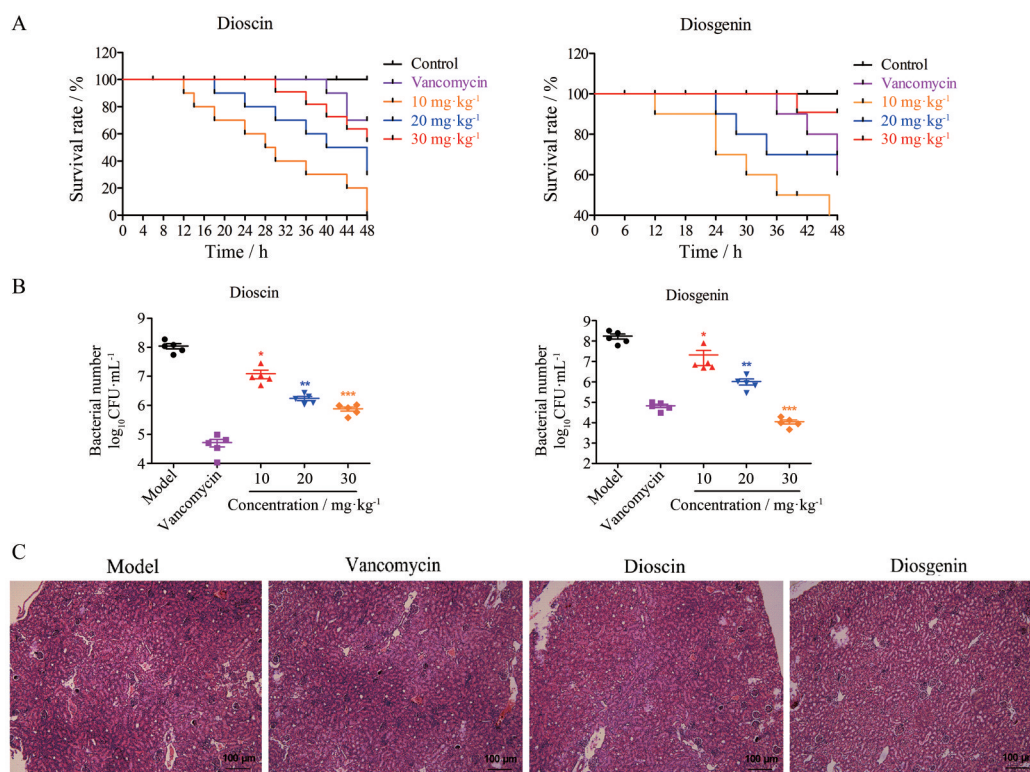
天然产物在抗菌领域发挥重要作用, 通过对天然产物的深入研究和开发, 有望发现更多具有抗菌活性的化合物<sup>[5,17]</sup>。作为穿龙薯蓣的主要成分, 薯蓣皂苷和薯蓣皂苷元被广泛报道具有抗肿瘤、抗炎、调节血脂等功能<sup>[9,18,19]</sup>, 且薯蓣皂苷元是生产甾体激素类药物的重要基础原料, 甾体激素具有很强的抗感染活性, 但截至目前在直接杀菌和体内抗感染治疗中的作用并未充分挖掘。本研究也是首次分离出穿龙薯蓣的主要成分薯蓣皂苷和薯蓣皂苷元, 并对二者进行体外抗菌活性评



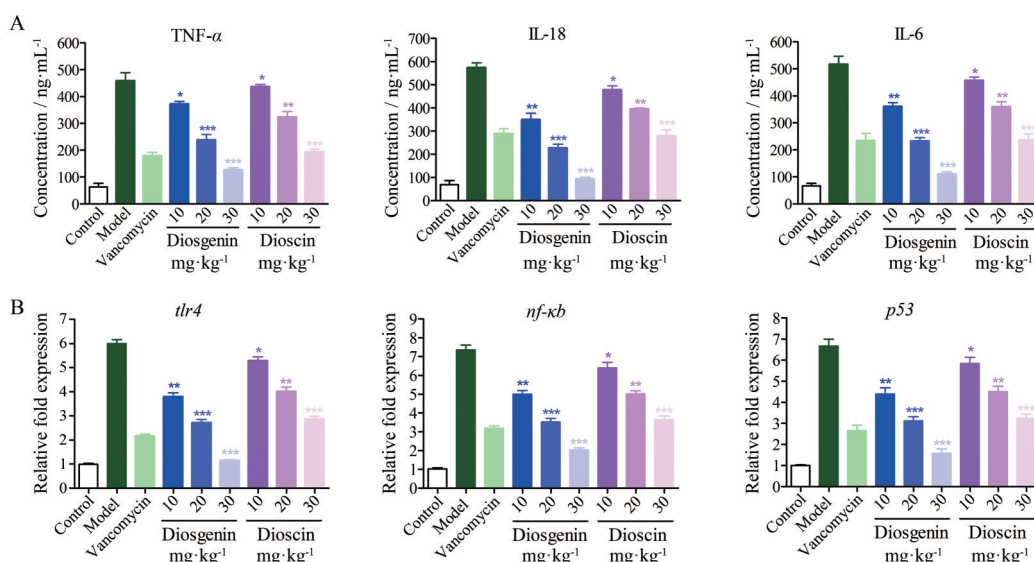
**Figure 2** Influence of dioscin and diosgenin on bacterial growth. A: The bacterial growth were measured with microbial growth automatic analyzer after dioscin treatment; B: The bacterial growth were measured with microbial growth automatic analyzer after diosgenin treatment; C: Cytotoxicity of dioscin and diosgenin on HK-2 cells. Positive drug: Vancomycin.  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs control

价和体内抗感染保护作用的评价。在研究中作者发现虽然二者在体外具有一定的抗菌活性,但是均弱于万古霉素的抗菌活性。然而,作者意外发现,薯蓣皂苷元对于脓毒症小鼠的保护能力略胜于万古霉素的疗效。由于细菌感染时会导致机体产生大量的炎症因子,而

过“炎症风暴”的产生则是小鼠致死的首要原因。对此,作者猜测,薯蓣皂苷元的良好体内保护作用也归功于其抗炎功能。比较两种化合物的构效关系发现,薯蓣皂苷元的体内外抗菌活性略优于薯蓣皂苷,这可能是因为相比于薯蓣皂苷元,薯蓣皂苷元结构中含有大量



**Figure 3** Anti-bacterial activity of dioscin and diosgenin. A: The survival rats of MRSA infected mice under indicated treatment; B: Bacterial numbers in the peritoneal lavage; C: HE pathological changes of kidney after infection and treatment from three repeated experiments.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs model



**Figure 4** Anti-inflammatory activity of dioscin and diosgenin. A: TNF- $\alpha$ , IL-18 and IL-6 in peritoneal lavage measured with ELISA assay; B: Relative expression of inflammatory genes in macrophages determined with qPCR.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs model

的羟基带有负电, 而细菌的表面通常也带有负电, 化合物由于静电排斥无法接触细菌发挥有效的抗菌作用。在体内活性比较中, 薯蓣皂苷元的抗菌活性显著强于薯蓣皂苷, 根据化合物结构推测极易在体内弱酸性化境中发生成脂和成盐反应, 不仅提高化合物的溶解还

进一步增加了化合物的活性。除此之外, 薯蓣皂苷元的分子小于薯蓣皂苷, 这可能更有利于其进入靶点蛋白的“口袋”中, 与靶蛋白的结合更加牢固。此部分的实验值得作者在后续研究中进一步探讨。

为了探明薯蓣皂苷元在体内的作用机制, 作者使



用网络药理学的方法对薯蓣皂苷元的体内作用靶点和通路进行初步预测。预测结果也证实,薯蓣皂苷元主要靶向于免疫细胞膜受体表达、免疫细胞迁移、PI3K-AKT炎症通路活化等生物学过程<sup>[20]</sup>。由此作者可以初步推断,薯蓣皂苷元能够在体内作用于多靶点同时发挥抗菌和抗炎双重功能,抑制感染过程中引发的炎症风暴和过度激活的免疫反应,及时阻断感染机体向重症转化,提高感染生存率进而发挥保护作用。关于具体作用机制,文献证实很多天然产物可能通过调节与细菌感染和炎症反应相关的蛋白质翻译后修饰来发挥作用。例如,一些天然产物可能通过抑制细菌蛋白质的磷酸化或甲基化来干扰其生长和代谢,从而实现抗菌作用。同时,它们也可能通过调节宿主细胞的PTMs来减轻炎症反应,如通过抑制NF- $\kappa$ B等炎症相关信号通路的磷酸化来降低炎症因子的产生。作者推测薯蓣皂苷元极有可能通过这种方式发挥抗菌-抗炎的双重功效。综上所述,薯蓣皂苷元在抗感染应用中具有更优的应用价值,为后续新型抗菌新药物的研发提供参考。

**作者贡献:** 曲迪、叶子晨负责研究方案设计及网络药理学研究;沈如旭、赵嘉琦完成中药单体的体内外活性评价;张倩负责中药单体的分离;汤海峰负责单体成分鉴定。

**利益冲突:** 本文不存在任何利益相关问题。

## References

- [1] Huemer M, Mairpady Shambat S, Brugger SD, et al. Antibiotic resistance and persistence – implications for human health and treatment perspectives [J]. EMBO Rep, 2020, 21: e51034.
- [2] Chen L, Kumar S, Wu H. A review of current antibiotic resistance and promising antibiotics with novel modes of action to combat antibiotic resistance [J]. Arch Microbiol, 2023, 205: 356.
- [3] Li T, Wang Z, Guo J, et al. Bacterial resistance to antibacterial agents: mechanisms, control strategies, and implications for global health [J]. Sci Total Environ, 2023, 860: 160461.
- [4] Kumar G, Engle K. Natural products acting against *S. aureus* through membrane and cell wall disruption [J]. Nat Prod Rep, 2023, 40: 1608-1646.
- [5] Song X. Antibacterial, antifungal, and antiviral bioactive compounds from natural products [J]. Molecules, 2024, 29: 825.
- [6] Bader CD, Nichols AL, Yang D, et al. Interplay of emerging and established technologies drives innovation in natural product antibiotic discovery [J]. Curr Opin Microbiol, 2023, 75: 102359.
- [7] Ren Q, Wang Q, Zhang X, et al. Anticancer activity of diosgenin and its molecular mechanism [J]. Chin J Integr Med, 2023, 29: 738-749.
- [8] Mohseni-Moghaddam P, Khanmohammadi M, Roghani M. Literature review on hepatoprotective effects of diosgenin: possible mechanisms of action [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1226548.
- [9] Gao H, Wang Z, Zhu D, et al. Dioscin: therapeutic potential for diabetes and complications [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 170: 116051.
- [10] Passos FRS, Araújo-Filho HG, Monteiro BS, et al. Anti-inflammatory and modulatory effects of steroidal saponins and saponins on cytokines: a review of pre-clinical research [J]. Phyto-medicine, 2022, 96: 153842.
- [11] Kowalska-Krochmal B, Dudek-Wicher R. The minimum inhibitory concentration of antibiotics: methods, interpretation, clinical relevance [J]. Pathogens, 2021, 10: 165.
- [12] Qu D, Hou Z, Li J, et al. A new coumarin compound DCH combats methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm by targeting arginine repressor [J]. Sci Adv, 2020, 6: eaay9597.
- [13] Tang C, Yang Z, Han K, et al. mRNA-laden lipid-nanoparticle-enabled *in situ* CAR-macrophage engineering for the eradication of multidrug-resistant bacteria in a sepsis mouse model [J]. ACS Nano, 2024, 18: 2261-2278.
- [14] Wang X, Wang ZY, Zheng JH, et al. TCM network pharmacology: a new trend towards combining computational, experimental and clinical approaches [J]. Chin J Nat Med, 2021, 19: 1-11.
- [15] Hu M, Xu L, Yin L, et al. Cytotoxicity of dioscin in human gastric carcinoma cells through death receptor and mitochondrial pathways [J]. J Appl Toxicol, 2013, 33: 712-722.
- [16] Liu FY, Zhang DL, Hou WB, et al. Study on chemical constituents from seeds of *Trigonella foenum-graecum* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51: 31-35.
- [17] Zhang M, Li L, Li C, et al. Natural product gvermectin inhibits guanosine 5'-monophosphate synthetase and confers broad-spectrum antibacterial activity [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 267: 131510.
- [18] Li M, Zhao Q, Liao J, et al. Dioscin inhibiting EGFR-mediated survivin expression promotes apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells [J]. J Cancer, 2023, 14: 2027.
- [19] Ma T, Ge X, Zhu J, et al. Dioscin impedes proliferation, metastasis and enhances autophagy of gastric cancer cells *via* regulating the USP8/TGM2 pathway [J]. Mol Biotechnol, 2023. DOI: 10.1007/s12033-023-00978-7.
- [20] Cong S, Peng Q, Cao L, et al. Diosgenin prevents periodontitis by inhibiting inflammation and promoting osteogenic differentiation [J]. Oral Dis, 2024, 30: 2497-2510.