文章编号:1009-038X(2004)02-0058-04

叶绿酸酯的光敏杀菌作用

唐 蕾, 曹建平, 吴 亢, 邵蔚蓝, 胡慧中, 张高峰
(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 广泛使用抗生素治疗细菌感染是导致抗生素抗性菌增加的重要原因,研究杀菌的其他方法,如光敏杀菌法等十分必要. 研究结果表明,叶绿素的降解产物叶绿酸酯对白葡萄球菌(*Staphylococcus albus*)有显著的光动力杀伤作用,而对大肠杆菌(*Escherichia coli*)的生长没有影响; 葡萄球菌较大肠杆菌能更有效地吸附叶绿酸酯,导致对生长的抑制.

关键词: 叶绿素;叶绿酸酯;光动力杀伤作用
中图分类号:Q 939.92 **文献标识码**: A

Lethal Photosensitization of Chlorophyllin Ester

TANG Lei, CAO Jian-ping, WU Kang, SHAO Wei-lan,
HU Hui-zhong, ZHANG Gao-feng
(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

Abstract: The extensive use of antibiotics has resulted in an increase of antibiotic resistant strains of bacteria. Alternative methods such as photodynamic therapy are necessary for the inhibition of bacteria. In the present study, the chlorophyllin ester was found its efficacy in killing *Staphylococcus albus*, whereas no effect was found on the growth of *Escherichia coli*. *Staphylococcus albus* cells bound to the chlorophyllin ester more effectively and were later killed by the photodynamic effect.

Key words: chlorophyll;chlorophyllin ester;photosensitization

---

近年来,由于抗生素的大量使用,不仅使得许多病菌产生抗药性,而且抗菌素的毒副作用以及对自然微生物群落的破坏日益受到人们的关注. 因此,寻找毒性小、对环境无污染的廉价新型抗菌剂成为研究者的努力方向之一. 光敏剂在这方面显示出诱人的前景[1].

光敏剂是一些具有光活性的化合物,它可以选择性地富集在特定组织,在紫外或可见光的激发下,产生光动力杀伤作用[2]. 光敏剂在杀灭有害菌的同时不伤及邻近组织和环境中固有的有益菌,因而成为现行抗菌素的安全替代品之一[3].

卟啉类光敏剂诸如血卟啉、光敏素等已经被成功地用于血液制品中病毒的处理,杀灭口腔致病菌、治疗口腔疾病等光动力治疗中[4~6]. 叶绿素作

收稿日期:2003-08-15; 修回日期:2003-10-14.
作者简介: 唐蕾(1966-),女,江苏无锡人,副教授,工学硕士.

万方数据

为植物光合作用的主要化合物,是自然界中广泛存在的一类卟啉类化合物,如能将其开发成一种有效的光敏杀菌剂,将有利于降低卟啉类光敏剂的化学合成成本,减少毒副反应. 为此,本研究从植物中提取叶绿素,通过碱法降解发现产物叶绿酸酯对革兰氏阳性菌具有显著的光动力杀伤作用.

1　材料与方法

1.1　菌种

大肠杆菌(*Escherichia coli*)、白葡萄球菌(*Staphylococcus albus*)由江南大学生物工程学院生物科学系提供.

1.2　培养基

营养肉汤培养基:牛肉浸膏 3 g/L, 蛋白胨 10 g/L, NaCl 5 g/L, 固体培养基另加 20 g/L 琼脂. pH 7.2, 121℃ 灭菌 20 min.

1.3　主要仪器设备

UV-2100 紫外可见分光光度计:上海龙尼柯仪器公司生产; MULTI-RF 多用途高速冷冻离心机:美国 Thermo -IEC 公司生产;720 型回转式振荡恒温培养箱:台湾 TSAO HSIN 公司生产.

1.4　叶绿素的提取及叶绿酸酯的制备

新鲜菠菜,去除茎及叶脉,洗净晾干,加入甲醇,在组织搅碎机中搅碎后抽滤,弃去滤渣,得到深绿色甲醇提取液. 在提取液中加入 1/7 体积的 1,4-二氧六环,不断搅拌并滴加去离子水,直至出现绿色絮状沉淀. 4 ℃, 8 000 r/min 离心 20 min 得到叶绿素沉淀,避光风干.

称取上述叶绿素溶解在甲醇中,用 NaOH 溶液调至 pH 值为 8.5,10 000 r/min 常温下离心 20 min,制成叶绿酸酯储备液. 将储备液用甲醇适当稀释,测定 665 nm 和 652 nm 处的吸光值,根据 Lichtenthaler[7] 的方法计算储备液的质量浓度.

1.5　菌体培养及抑菌试验方法

将斜面菌种接入营养肉汤培养基,37 ℃过夜培养. 分别移接适量过夜培养物至新鲜培养基中(250 mL 锥形瓶装液量 25 mL),使得在 528 nm 处的初始 OD 值,大肠杆菌为 0.05～0.10,白葡萄球菌为0.4～0.5. 菌体的生长状况通过测定培养物在 528 nm 处的 OD 值以及菌落形成单位(CFU)来确定.

细菌培养物在其对数生长期加入叶绿酸酯的甲醇储备液与不含叶绿酸酯,pH 值为 8.5 的甲醇溶液为对照,回转式振荡恒温培养箱的转速为 200 r/min,温度为 37 ℃,光照使用培养箱的内置光源.

1.6　细菌细胞对叶绿酸酯的吸附

离心洗涤处于对数生长期的细胞,并将细胞悬浮于 0.05 mol/L, pH 值 6.5 的磷酸缓冲液中,调整菌体数量为 10^8/mL, 加入叶绿酸酯,37 ℃振荡 1 h. 10 000 r/min 离心 20 min,测定上清液在 430 nm 的吸光值,菌体细胞用上述缓冲液洗涤后,用甲醇提取吸附于细胞上的叶绿酸酯,再次离心,测定 430 nm 处的吸光值.

2　结果与讨论

2.1　叶绿素及其衍生物的结构特性

叶绿素是含有植醇基团的卟啉类化合物[8](见图 1).

在酸性、碱性以及叶绿素酶的作用下叶绿素将发生结构上的变化. 在酸性条件下,叶绿素脱镁生成脱镁叶绿素;在植物衰老和果实成熟时,植物中存在的叶绿素酶催化脱植醇反应;在碱性条件下,叶绿素水解生成叶绿酸酯. 叶绿素在脱去植醇,或 V 环开环后,极性有所增强. 在对叶绿素、脱镁叶绿素、脱植醇叶绿素和叶绿酸酯的抗菌活性进行初步比较后,发现叶绿酸酯具有较强的光敏活性[9]. 为此,实验着重对叶绿酸酯的抗菌作用做了进一步的研究.

2.2　叶绿酸酯对细菌生长的抑制作用

实验选用了典型的革兰氏阴性菌大肠杆菌(*E. coli*)和阳性菌白葡萄球菌(*S. albus*)作为供试细菌,在对数生长期加入叶绿酸酯(终质量浓度为 80 μg/mL),同时以添加 pH 值 8.5 的甲醇为对照. 经过检测,添加叶绿酸酯或 pH 值 8.5 的甲醇后,培养基的 pH 值为 7.2,无显著变化. 结果表明,添加叶绿酸酯后菌体的生长明显受到抑制,低于对照菌体(见图 2). 这说明叶绿酸酯对革兰氏阳性菌有较强的抑制作用,而同样质量浓度的叶绿酸酯对大肠杆菌的生长并无影响(见图 3).

叶绿酸酯作用 3 h 后的电子显微镜观察结果显示,白葡萄球菌细胞发生溶解(见图 4),导致菌体死亡.

考察了叶绿酸酯对白葡萄球菌存活率的影响,对于每一组进行了 3 次试验,结果为 3 次的平均值. 对光照处理后的菌落形成单位进行了计算(见表 1). 由表 1 可知,随着菌数的增大,活菌数显著下降,当终质量浓度为 30 μg/mL 时,存活部分仅为 5.37×10^{-6},致死率达到 99.99%.

万方数据

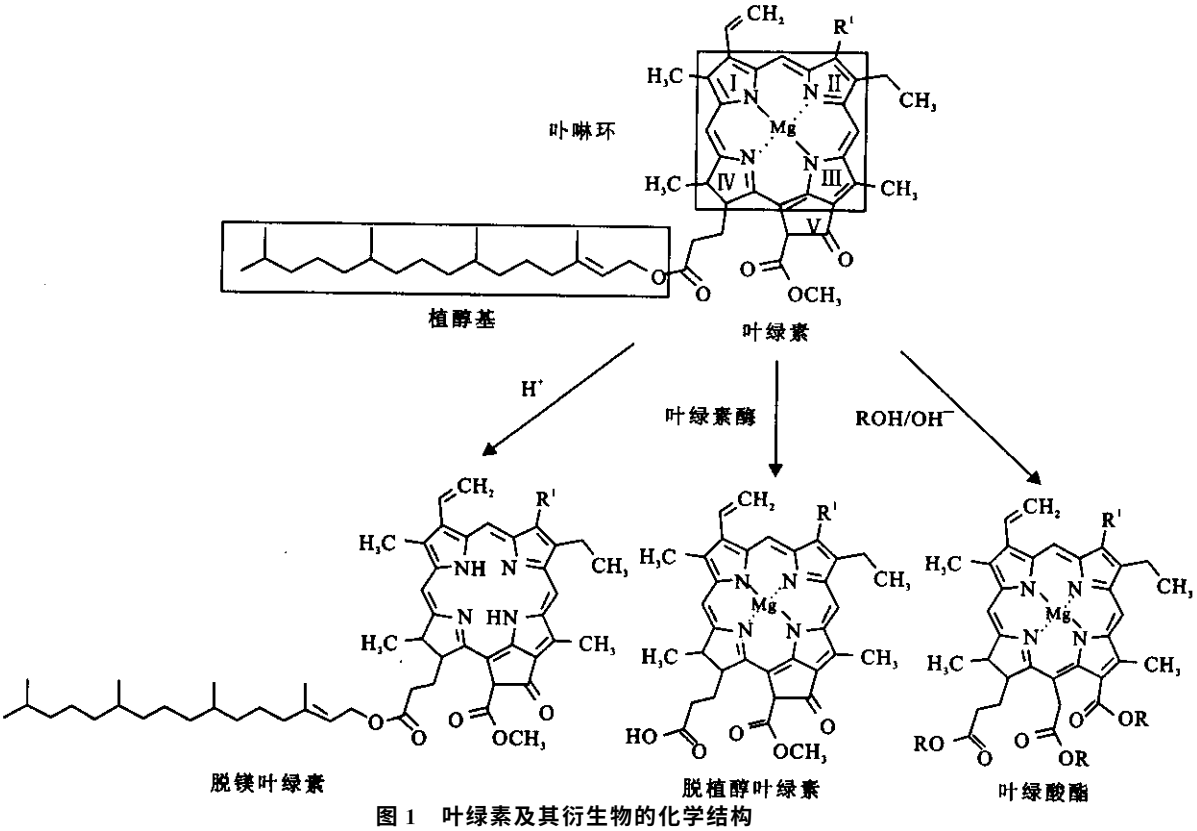


图 1 叶绿素及其衍生物的化学结构

Fig. 1 The chemical structure of chlorophy11 and its derivatives

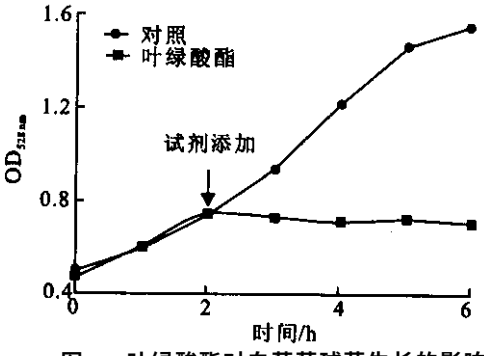


图 2 叶绿酸酯对白葡萄球菌生长的影响

Fig. 2 The effect of chlorophyllin ester on *S. albus* growth

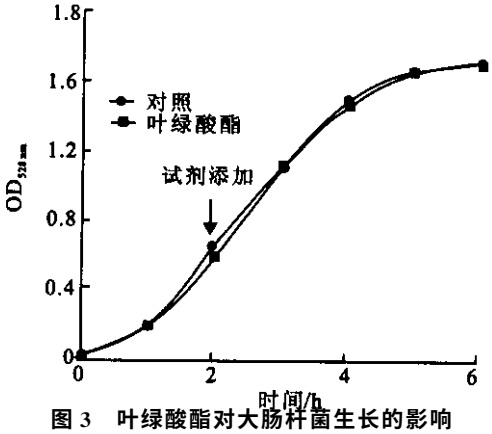


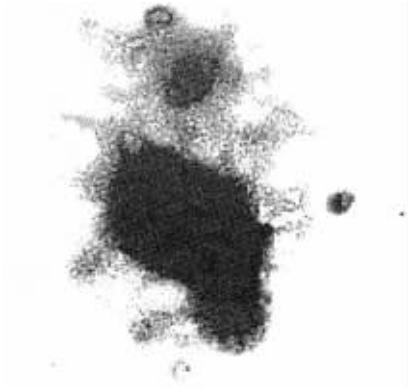
图 3 叶绿酸酯对大肠杆菌生长的影响

Fig. 3 The effect of chlorophyllin ester on *E. coli* growth

万方数据



未加入叶绿酸酯的菌体细胞 放大倍数:45 000 倍



加入叶绿酸酯,光照培养 3 h 的菌体细胞 放大倍数:45 000 倍

图 4 白葡萄球菌在添加叶绿酸酯前后的细胞形态变化

Fig. 4 Morphology change of *S. albus* in the presence of chlorophyllin ester

表 1　白葡萄球菌经叶绿酸酯光照处理后的菌落形成单位和存活率

Tab. 1　Number of colony forming units (CFU) and survival growth of *S. albus* after chlorophyllin ester treatment

叶绿酸酯质量浓度/(μg/mL)	菌数/(CFU/mL)	存活率/%
0	1.88×10^{10}	1.0×10^{0}
0.3	6.69×10^{9}	3.56×10^{-1}
3.0	3.75×10^{6}	1.99×10^{-4}
30	1.01×10^{5}	5.37×10^{-6}

2.3　细菌细胞对叶绿酸酯的吸附能力

Malik 等人发现,革兰氏阳性菌能够有效地吸附卟啉类化合物,其中结合在细胞膜上的卟啉对细胞起到光动力杀伤效应;革兰氏阴性菌对卟啉的结合较弱,仅伴有污染的弱光动力作用[10]. 为了验证叶绿酸酯是否具有类似的杀菌机制,实验考察了葡萄球菌和大肠杆菌细胞对叶绿酸酯的吸附能力(见表 2). 由于葡萄球菌对叶绿酸酯的吸附,使得离心后的上清液中,叶绿酸酯的含量下降,表现在 430 nm 处的吸光值减少,并且离心后的菌体细胞呈现绿色,经过甲醇提取后,大部分吸附在菌体细胞上的叶绿酸酯溶解于甲醇中,再次离心,测定 430 nm 处的吸光值,并与经过同样处理的大肠杆菌细胞进行比较. 结果发现,大肠杆菌细胞对叶绿酸酯的吸附能力明显小于葡萄球菌,菌体细胞为白色. 以上结果初步解释了叶绿酸酯对大肠杆菌和白葡萄球菌抑制作用的差异,说明叶绿酸酯只有被细菌细胞吸附后,才能发挥其光敏效应. 革兰氏阴性菌复杂的细胞壁结构可能对叶绿素衍生物的吸附起到了阻碍作用.

表 2　细菌细胞对叶绿酸酯的吸附结果

Tab. 2　The absorption of chlorophyllin ester by bacteria cells

项 目	$OD_{430\ nm}$ 值	
	无细胞上清液	细胞的甲醇提取液
无细胞缓冲液对照	1.030±0.006	
大肠杆菌	0.947±0.020	0.098±0.009
白葡萄球菌	0.751±0.012	0.183±0.003

3　结　论

叶绿素是天然的卟啉类化合物,在高等植物、藻类中普遍存在,其本身并不具备光动力杀伤作用,但其部分衍生物却具有较强的光敏活性,期望能开发成一种廉价有效的光敏杀菌剂. 本文所报道的实验结果仅是初步的,有关叶绿素衍生物结构与相关作用机制正在进一步探讨中.

致谢:衷心感谢江南大学生物工程学院生物科学系微生物教研室在试验菌种方面提供的帮助.

参考文献:

[1] Nitzan Y, Balzam-Sudakevitz A, Ashkenazi H. Eradication of *Acinetobacter baumannii* by photosensitized agents in vitro [J]. **J Photochem Photobiol B:Biol**, 1998,42:211－218.

[2] Karrer S, Szeimies R M, Ernst S, *et al*. Photodynamic inactivation of *Staphylococci* with 5-aminolaevulinic acid or Photofrin [J]. **Lasers Med Sci**,1999,14:54－61.

[3] Zeina B, Greenman J, Purcell W M, *et al*. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy [J]. **Br J Dermatol**, 2002,146(4):568－573.

[4] 彭小彬,梁世强. 卟啉化合物与核酸的相互作用研究 [J]. **化学进展**,2001,13(5):360-367.

[5] Merchat M, Bertolini G, Giacomini P, *et al*. Mesosubstituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of Gram-positive and Gram-negative bacteria [J]. **J Photochem Photobiol,B:Biol**,1996,32:153－157.

[6] Bertolini G, Salvato B, Dall'Acqua M, *et al*. Hematoporphyrin sensitized photoactivation of *Streptococcus faecalis*[J]. **Photochem Photobiol**,1984,39:811－816.

[7] Lichtenthaler H. Chlorophylls and carotenoids[J]. **Methods Enzymol**,1987,148:350－382.

[8] Brown S B, Houghton J D, Hendry G A F. Chlorophylls [M]. Boca Raton: CRC Press,1991. 465－482.

[9] 张高峰. 卟啉化合物光敏抗菌活性的研究[D]. 无锡:江南大学,2002.

[10] Malik Z, Ladan L, Nitzan Y. The bactericidal activity of a deuteroporphyrin-hemin mixture on Gram-positive bacteria [J]. **J Photochem Photobiol,B:Biol**,1990,6:419－430.

(责任编辑:杨 勇)

万方数据