

10 味中草药抑菌作用研究

薛密, 王倩, 王海涛, 谢明杰* (辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁大连 116029)

摘要 [目的] 研究藜芦等10味中草药提取物的抑菌作用。[方法] 以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为指示菌, 测定藜芦等10味中草药乙醇提取物的抑菌作用, 并通过呼吸代谢抑制试验对其中抑菌效果最好的藜芦提取物进行了抑菌机制研究。[结果] 10味中草药藜芦中提取物的抑菌效果最好。藜芦提取物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的最低抑菌浓度均为6.25 ng/ml。呼吸代谢抑制试验结果显示, 藜芦提取物的浓度为6.25 ng/ml时, 可抑制2种指示菌的苹果酸脱氢酶活性, 加药组的大肠杆菌苹果酸脱氢酶(MDH)比活性与对照组相比降低了46.52%; 加药组的金黄色葡萄球菌MDH比活性与对照组相比降低了55.82%。[结论] 10味中草药提取物中藜芦的抑菌效果最佳, 其抑菌机制是通过抑制细菌的呼吸代谢过程的方式实现的。

关键词 藜芦; 抑菌作用; 最低抑菌浓度; 苹果酸脱氢酶

中图分类号 Q946 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)13-05970-03

Study on the Antibacterial Effects of 10 Kinds of Chinese Herbal Medicines

XUE M et al (College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning 116029)

Abstract [Objective] The research aimed to investigate the antibacterial effects of 10 kinds of Chinese herbal medicines. [Method] Using Escherichia coli and Staphylococcus aureus as indicator bacteria, the antibacterial effects of 10 kinds of Chinese herbal medicines were measured. Respiratory metabolism test was used to investigate the antibacterial mechanism of Veratrum nigrum extracts with the best antibacterial effect. [Result] The results indicated that the antibacterial effect of V. nigrum was better than the other nine kinds. The minimum inhibitory concentration (MIC) to Staphylococcus aureus and Escherichia coli were 6.25 ng/ml. The results of respiratory metabolism test showed that the malic dehydrogenase (MDH) activity of two indicator bacteria was inhibited by 6.25 ng/ml V. nigrum. MDH activity of Escherichia coli in medicine group was remarkably reduced by 46.52% than control group, and MDH activity of Staphylococcus aureus in medicine group was remarkably reduced by 55.82% than control group. [Conclusion] The antibacterial effect of V. nigrum was the best among 10 kinds of Chinese herbal medicines. The antibacterial mechanism was realized by the ways of inhibiting the respiratory metabolism of bacteria.

Key words Veratrum nigrum; Antibacterial effects; Minimum inhibitory concentration; Malic dehydrogenase

由于食品中含有丰富的营养物质, 因此在加工、运输和储藏过程中易被微生物污染造成食品腐败变质。为延缓和阻止这种现象, 在食品中加入防腐剂是主要措施之一。常用的化学防腐剂多具有致癌或潜在致癌的可能性, 有些还会引起积累性中毒, 对人体健康造成危害, 已引起了广大消费者对食品安全的高度重视。中草药具有高效、毒副作用小、来源广、价格低廉等优点, 这使得从中草药中筛选天然食品添加剂越来越受到国内外学者的广泛重视^[1-2]。近年来, 虽对某些中草药的抑菌作用进行了研究^[3-4], 但对藜芦、西瓜皮、茵芋等中草药的相关抑菌研究尚未见报道。笔者以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为指示菌, 测定了藜芦、西瓜皮、茵芋、石楠藤、老头草、万年青、母丁香、白薇、萱草、福寿草10味中草药乙醇提取物的抑菌作用, 并通过呼吸代谢抑制试验对其中抑菌效果最好的藜芦提取物进行了抑菌机制研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌种。大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC11411)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC26112), 购于中国医学菌种保藏中心。

1.1.2 供试材料。藜芦、西瓜皮、茵芋、石楠藤、老头草、万年青、母丁香、白薇、萱草、福寿草, 由辽宁师范大学中药现代化实验室提供; 二硫苏糖醇(DTT), 购于碧云天生物技术研究所; 无水乙醇、牛肉膏、蛋白胨、琼脂粉, 购于北京奥博星生物技术责任有限公司; 其他常用生化试剂均为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 中草药粗提物的制备。称取一定量的西瓜皮、茵芋、

藜芦、石楠藤、老头草、万年青、母丁香、白薇、萱草、福寿草, 用浓度95%乙醇在索氏提取器中热回流提取8h, 然后将提取液蒸干制成干粉。称取少量干粉, 用无水乙醇将其配制成浓度为50 ng/ml的药液, 备用。

1.2.2 不同中草药提取物抑菌作用的测定。采用杯碟法, 在培养皿中倒入牛肉膏蛋白胨固体培养基, 待凝固后, 在培养基上分别均匀地涂上大肠杆菌和金黄色葡萄球菌, 在其上等距离放3个无菌牛津杯(内径 6.0 ± 0.1 mm, 外径 8.0 ± 0.1 mm, 高 10.0 ± 0.1 mm), 在杯内分别注入200 μ l浓度为50 ng/ml的不同中草药的粗提物, 用无水乙醇作为对照, 每2种药为一组, 每组做3个平行试验。37 $^{\circ}$ C恒温箱中培养24h后, 用直尺测量各种药品的抑菌圈直径, 取其平均值。

1.2.3 不同浓度的藜芦提取物抑菌作用的测定。取浓度为50 ng/ml的藜芦提取物药液, 按二倍稀释法依次稀释得到50、25、12.5、6.25、3.13 g/ml 5个不同浓度梯度的粗提物药液, 按照“1.2.2”的方法分别测定其抑菌效果, 每组做3个平行试验。

1.2.4 藜芦提取物最低抑菌浓度(MIC值)的测定。将藜芦药液与培养基充分混合使药品终浓度分别达到50、25、12.5、6.25、3.13 ng/ml, 倒制平板, 用平板划线法分别接种大肠杆菌和金黄色葡萄球菌2种供试菌, 其中以不含药液的牛肉膏蛋白胨平板作为对照, 以含药液但不加供试菌的平板作为空白对照, 以无水乙醇与牛肉膏蛋白胨平板作为助溶剂对照^[5], 在37 $^{\circ}$ C恒温箱中培养24h, 检测出不生长供试菌的平板中所含药液浓度为该药液对供试菌的最低抑菌浓度, 每组做3个平行试验。

1.2.5 苹果酸脱氢酶粗提液的制备(超声波破碎法)。将大肠杆菌和金黄色葡萄球菌培养至对数期, 按2%接种量分别加入到藜芦提取物终浓度为6.25 ng/ml的牛肉膏蛋白胨培

基金项目 辽宁省自然科学基金(20072153)资助。

作者简介 薛密(1987-), 女, 辽宁鞍山人, 本科生, 专业: 生物科学。

* 通讯作者, 教授, E-mail: wangqian19860223@163.com。

收稿日期 2009-02-23

培养基中,以不加藜芦提取物组为对照,各 50 ml,37 ℃,120 r/min 摇床中振荡培养。待培养到 12、16、20 h(金黄色葡萄球菌)和 8、12、16 h(大肠杆菌)后,分别将菌悬液于 6 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,无菌水洗涤菌体 3 次,再用粗酶制备缓冲液(浓度 0.1 mol/L Tris-HCl,20 mmol/L KCl,5 mmol/L MgSO₄,2 mmol/L DTT,0.1 mmol/L EDTA,pH 值 7.0)洗涤 2 次后,悬浮于 20 ml 缓冲液中。用超声波破碎仪破碎细胞(强度为 80%),每次工作 10 s,间隔 30 s,循环 10 次,共计 7 min。4

置于冷冻离心机 12 000 r/min 离心 15 min,除去细胞碎片,得到的上清液即为粗酶液,于 -20 ℃ 冰箱中保存,用于酶活的测量。试验操作均在冰浴中进行。

1.2.6 苹果酸脱氢酶的活性测定。将 2.5 ml 浓度 0.1 mol/L Tris-HCl(pH 值 8.8),0.1 ml 浓度 0.1 mmol/L sodium malate(苹果酸钠),0.1 ml 浓度 10 mmol/L NAD⁺[6] 的混合物顺次加入石英比色皿中,然后快速加入 0.3 ml 粗酶液引发反应。每隔 0.5 min,在 340 nm 用可见光-紫外分光光度计连续测定 3 min,以 A_{340 nm} 为纵坐标,时间 t(min) 为横坐标作图,取反应过程中的线性部分,计算 A_{340 nm}/min 的增加值。以每分钟 A 值增加 0.01 为 1 个酶活力单位。以小牛血清蛋白为对照,测定粗酶液中苹果酸脱氢酶的含量,按照下列公式求出苹果酸脱氢酶的比活性。

酶的比活性 U (ng 蛋白·min)

$$= \frac{A \div 0.01}{\text{反应时间}(\text{min}) \times \text{样品中蛋白量}(\text{ng})}$$

2 结果与分析

2.1 不同中草药提取物的抑菌作用 对 10 味中草药提取物进行抑菌作用测定,结果显示,藜芦、西瓜皮、萱草、老头草、石楠藤、万年青 6 种中草药提取物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有抑制作用;茵芋只对大肠杆菌有抑制作用(表 1)。其中藜芦提取物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制效果最好,抑菌圈直径分别为 24 mm 和 22 mm,故选其进行进一步的抑菌作用研究。

表 1 10 种中草药提取物的抑菌圈直径

Table 1 The antibacterial circle diameter of 10 kinds of extracts from Chinese herbal medicines

mm			mm		
名称 Name	大肠杆菌 Escherichia coli	金黄色葡萄球菌 Staphylococcus aureus	名称 Name	大肠杆菌 Escherichia coli	金黄色葡萄球菌 Staphylococcus aureus
藜芦 Veratrum nigrum	24	22	万年青 Rohdea japonica	12	13
西瓜皮 Peperomia sandersii	13	17	茵芋 Sium reevesiana	20	-
萱草 Hemerocallis fulva	13	12	白薇 Cynanchum atratum	-	-
老头草 Leonopodium leonopodioides	15	13	母丁香 Fructus caryophylli	-	-
石楠藤 Perhancei	12	14	福寿草 Adonis aestivalis	-	-

注:“-”指无菌落生长。为 3 次试验平均值。下同。

Note:“-” stands for no colonial growth; The data are the average values for three repetitions. The same as below.

2.2 不同浓度藜芦提取物的抑菌作用测定结果 由表 2 可知,藜芦提取物的抑菌作用在一定浓度范围内随药液浓度的增大而增强。根据该特点可进一步测定藜芦提取物对指示

菌的最低抑菌浓度。

表 2 藜芦提取物的抑菌作用对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径

Table 2 The antibacterial effect of Veratrum nigrum extracts on E. coli and S. aureus

浓度 Concentration	大肠杆菌 Escherichia coli	金黄色葡萄球菌 Staphylococcus aureus	浓度 Concentration	大肠杆菌 Escherichia coli	金黄色葡萄球菌 Staphylococcus aureus
50	24	22	6.25	12	10
25	18	17	3.13	-	-
12.5	14	12			

2.3 藜芦提取物 MC 值的测定结果 由表 3 可知,藜芦提取物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MC 值均为 6.25 ng/ml。

表 3 藜芦提取物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MC

Table 3 MC of Veratrum nigrum extracts against Escherichia coli and Staphylococcus aureus

浓度 Concentration	大肠杆菌 Escherichia coli	金黄色葡萄球菌 Staphylococcus aureus	浓度 Concentration	大肠杆菌 Escherichia coli	金黄色葡萄球菌 Staphylococcus aureus
50	-	-	6.25	-	-
25	-	-	3.13	+	+
12.5	-	-			

注:“+”指有菌落生长。

Note:“+” stands for having colonial growth.

2.4 藜芦提取物对 2 种指示菌呼吸代谢的影响 呼吸代谢抑制试验结果显示,藜芦提取物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的苹果酸脱氢酶(MDH)活性具有抑制作用(图 1~2),16 h 大肠杆菌加药组 MDH 比活性与对照组相比降低了 46.52%; 20 h 金黄色葡萄球菌加药组 MDH 比活性与对照组相比降低了 55.82%,统计分析结果显示,2 种指示菌的加药组 MDH 平均比活性均小于空白对照组,大肠杆菌组在 16 h 时呈现显著差异(P<0.05),金黄色葡萄球菌组在 16 h 和 20 h 时呈现显著差异(P<0.05)。

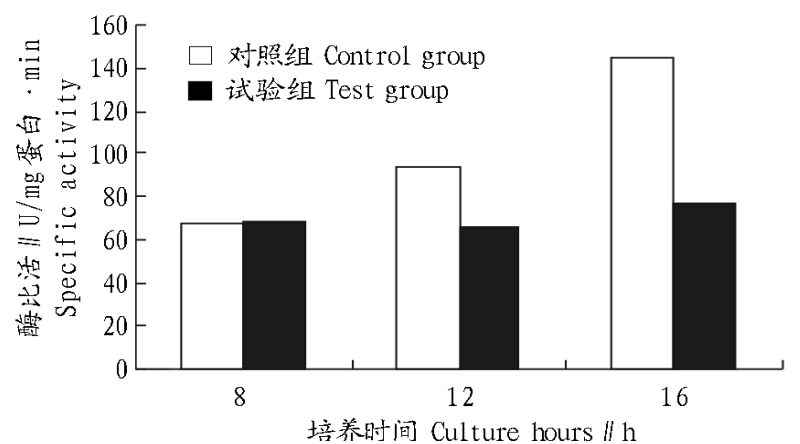


图 1 藜芦对大肠杆菌 MDH 比活性的影响

Fig. 1 Effects of Veratrum nigrum on the specific activity of MDH on Escherichia coli

3 结论与讨论

(1) 近年来,化学防腐剂对人体造成的损害已越来越引起人们的重视。中草药具有的毒副作用小、来源广、价格低廉等优点,为从中筛选出高效低毒的天然食品添加剂提供了可能。试验结果表明,藜芦、西瓜皮、萱草、老头草、石楠藤、万年青、茵芋 7 味中草药提取物对大肠杆菌具有抑菌作用;藜芦、西瓜皮、萱草、老头草、石楠藤、万年青 6 味中草药提取

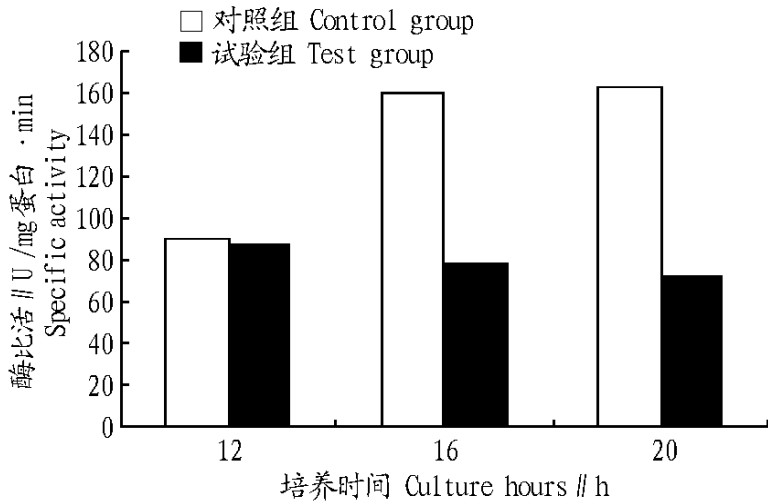


图2 藜芦对金黄色葡萄球菌 MDH 比活性的影响

Fig.2 Effects of *Veratrum nigrum* on the specific activity of MDH on *Staphylococcus aureus*

物对金黄色葡萄球菌具有抑菌作用。选取抑菌效果最明显的藜芦提取物进行了不同浓度梯度抑菌作用的测验以及对指示菌最低抑菌浓度的测定,结果表明,藜芦对2种指示菌的抑菌作用在一定浓度范围内随着药液浓度的增大而增强,呈现出一个明显的趋势,据此测得藜芦对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度均为6.25 ng/ml。

(2) 呼吸代谢是生物体进行生命活动的重要表现形式,三羧酸循环就是一种十分重要的呼吸代谢途径,它不仅供给生物体能量,而且还是糖、脂、蛋白质三大物质转化的枢纽。

(上接第5955页)

含着它们具有相同的形成规律。

3 结论与讨论

(1) 在生长季末期,碱化草甸硬质早熟禾无性系中的冬眠构件由冬眠苗和冬眠芽组成,共同构成硬质早熟禾的潜在无性系。无性系冬眠构件的数量冬眠苗占优势地位,冬眠苗的数量是冬眠芽数量的11.8倍,割草有利于冬眠苗的形成。在松嫩平原,每年更新种群的分蘖株均由冬性和春性分蘖株组成,但要安全越冬,冬性苗比春性苗存活的可能性更大。由于植物普遍具有顶端生长优势,每年8月中旬割草,几乎消除了全部顶端生长优势,从而表现出割草有利于硬质早熟禾无性系冬眠构件的形成,尤其有利于冬眠苗的形成。经过几年的割草利用,人工硬质早熟禾种群以冬性分蘖株占绝对优势地位。

(2) 从相对数量指标变异系数来看,冬眠芽的变异最大,变异系数高达94.97%,丛径最小,为40%;在冬眠构件的结构中,即使冬眠苗的变异系数最小,其变异系数也达到50.55%。由此可知,在松嫩平原碱化草甸,由于定居时间和生长微环境的差异,硬质早熟禾不仅无性系大小具有较大的差异,而且不同无性系冬眠构件的结构也有较大差异。

(3) 硬质早熟禾无性系总蘖数、冬眠苗数和冬眠芽数与无性系空间大小的变化具有较强的规律性。如果把指数函数关系视为由缓速到加速的异速增长过程,把幂函数关系

苹果酸脱氢酶是三羧酸循环中的重要氧化还原酶,这种酶是细胞生长代谢和繁殖所必须的,它们能否正常地催化反应进行,会直接影响到整个三羧酸循环能否顺利地运转,这对整个细胞代谢十分重要。笔者所进行的藜芦提取物对2种指示菌的呼吸代谢抑制试验结果显示,藜芦提取物可抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的苹果酸脱氢酶活性,其作用机理可能是藜芦提取物的有效成分与苹果酸脱氢酶相结合,使酶的分子结构发生了变化,导致酶的活性降低^[7]。藜芦对苹果酸脱氢酶的抑制作用会直接影响到细胞的呼吸代谢过程,从而使藜芦对细菌的生长起到一定的抑制作用。

参考文献

- [1] 王嵩. 中草药抗细菌感染研究[J]. 北京中医杂志, 2002, 21(4): 249-251.
- [2] 蒋丹, 王关林. 22种中草药抑菌活性的研究[J]. 辽宁高职学报, 2003, 5(4): 140-141.
- [3] 余东坡, 王兰菊, 司芳, 等. 21种中草药醇提物抑菌活性研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(3): 1086-1087.
- [4] 王海涛, 石姗姗, 李银霞, 等. 燃料木素的抑菌活性及其机制的研究[J]. 营养学报, 2008, 30(4): 403-409.
- [5] 马绪荣, 苏德模. 药品微生物学检验手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 210-220.
- [6] PARK S J, COTTER P A, GUNSALLUS R P. Regulation of malate dehydrogenase (mdh) gene expression in *Escherichia coli* in response to oxygen, carbon, and heme availability[J]. *Bacteroid*, 1995, 177: 6652-6656.
- [7] 徐明生, 陈锦屏, 上官新晨. 鱼精蛋白对黑曲霉细胞内的琥珀酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶的影响[J]. 食品科学, 2005, 26(4): 48-50.

视为由加速到缓速的异速增长过程,把直线函数关系视为始终不变的同速增长过程,则在硬质早熟禾无性系直径大小范围内,3种构件在数量上表现为不同的生长过程,即总蘖数和冬眠苗数量表现为从加速到缓速的异速增长过程,其中冬眠苗的增长速率略高于总蘖数增长速率,而冬眠芽的数量则表现为始终不变的同速增长过程。

参考文献

- [1] 萧文一, 孙忠晏, 赵云成. 中国草坪植物栽培[M]. 哈尔滨: 黑龙江教育出版社, 1990: 188.
- [2] 杨允菲, 李建东. 松嫩平原寸草苔无性系种群的分株结构[J]. 草业学报, 2001, 10(1): 35-41.
- [3] 董世魁, 胡自治, 蒲小朋, 等. 高寒地区多年生禾草混播草地的生理—生态特性研究[J]. 草业学报, 2002, 11(4): 39-45.
- [4] 董鸣. 资源异质性环境中的植物克隆生长: 觅食行为[J]. 植物学报, 1996, 38(10): 823-835.
- [5] SILVERTOWN J, CHARLESWORTH D. 简明植物种群生物学[M]. 4版. 李博, 译. 北京: 高等教育出版社, 2003: 249-252.
- [6] 张自和. 我国草坪科技进展 Q// 面向21世纪的中国草坪科学与草坪业. 北京: 中国农业大学出版社, 1999: 17-21.
- [7] 何亚丽, 曹卫星, 刘友良, 等. 冷季型草坪草耐热性研究综述[J]. 草业学报, 2000, 9(2): 58-63.
- [8] 文亦带, 朱熙梅, 孙吉雄. 我国与世界草坪草选育地气候带相似性分析[J]. 草业学报, 2000, 9(3): 82-87.
- [9] 刘虎俊, 郭有祯, 王继和, 等. 二十八个冷季型草坪草的耐盐性比较[J]. 草业学报, 2001, 10(3): 52-59.
- [10] 张丽辉, 赵骥民, 杨允菲. 放牧和割草利用对星星草种群冬眠构件的影响[J]. 草业科学, 2006, 23(4): 8-11.
- [11] 刘佩勇, 张庆灵, 杨允菲. 松嫩平原朝鲜碱茅无性系种群构件生物量结构及相关模型分析[J]. 应用生态学报, 2004, 15(4): 543-548.