

山大颜根、茎、叶提取物的体外抑菌活性评价及其作用机制研究[△]

罗晓东^{1*}, 魏丽芳¹, 钟 映¹, 丘 波¹, 张 超¹, 邹浩元², 张声源^{1#} (1. 嘉应学院医学院, 广东梅州 514031; 2. 嘉应学院医学院附属医院, 广东梅州 514031)

中图分类号 R932 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)01-0073-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.01.16

摘要 目的: 考察山大颜根、茎、叶3个部位提取物的体外抑菌活性, 并探究其抑菌作用机制。方法: 将山大颜根、茎、叶的95%醇提物均制备成质量浓度为100 mg/mL(以提取物计)的药液, 并以青霉素钠(0.5 μg/mL)和硫酸链霉素(128 mg/mL)为阳性对照, 采用平板打孔法测定不同药用部位提取物对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、藤黄微球菌、粪肠球菌等的抑菌作用。采用系统溶剂萃取法依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取山大颜抑菌活性部位, 得到相应极性部位萃取物, 制备成质量浓度均为100 mg/mL(以提取物计)药液后, 考察其对上述6种菌的抑菌作用; 并分别采用微量肉汤稀释法和琼脂培养基平板法测定其最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC), 筛选出具有抑菌作用的极性部位及对药物敏感的试验菌株。然后在0.5MIC和MIC药物浓度下绘制敏感菌的生长曲线(作用36 h, 每4 h测定1次), 检测菌悬液中碱性磷酸酶(AKP)和可溶性蛋白含量(作用10 h, 每2 h测定1次), 并以肉汤培养基代替提取物作为空白对照。结果: 100 mg/mL山大颜根、茎和叶的醇提物对上述6种细菌均有较好的抑菌效果, 其作用强弱为茎>叶>根; 在山大颜茎的不同极性部位中, 以乙酸乙酯部位的抑菌作用最强, 尤其是对金黄色葡萄球菌, 其抑菌圈直径为(38.93±0.12) mm, MIC、MBC均为0.39 mg/mL。山大颜茎乙酸乙酯部位可显著抑制金黄色葡萄球菌的增殖, 菌悬液中碱性磷酸酶和蛋白质含量较空白对照显著升高($P<0.05$)。结论: 山大颜茎为抗菌活效部位, 对常见的6种病原菌有不同程度的抑制效果; 其中以山大颜茎的乙酸乙酯部位对金黄色葡萄球菌的抑制作用最为显著, 能逐步破坏其细胞壁和细胞膜的完整性。

关键词 山大颜; 不同部位; 体外抗菌活性; 作用机制; 最小抑菌浓度; 最小杀菌浓度

Evaluation of *in vitro* Antibacterial Activity of the Extracts from Root, Stem and Leaves of *Psychotria rubra* and Its Mechanism Study

LUO Xiaodong¹, WEI Lifang¹, ZHONG Yi¹, QIU Bo¹, ZHANG Chao¹, ZOU Haoyuan¹, ZHANG Shengyuan¹ (1. Medical College of Jiaying University, Guangdong Meizhou 514031, China; 2. Hospital Affiliated to Medical College of Jiaying University, Guangdong Meizhou 514031, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate *in vitro* antibacterial activity of the extracts from the root, stem and leaves of *Psychotria rubra*, and to investigate its mechanism of antibacterial effects. METHODS: 95% ethanol extracts from the root, stem and leaves of *P. rubra* were used to prepare solution with mass concentration of 100 mg/mL (calculated by extract). Using as penicillin sodium (0.5 mg/mL) and streptomycin sulfate (128 mg/mL) as positive control, plat stiletto method was used to determine antibacterial effects of the extracts from different parts of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* and *Enterococcus faecalis*. Using systematic solvent extraction method, the petroleum ether, ethyl acetate and *n*-butyl alcohol were used to extract antibacterial activity parts from *P. rubra* as ad to obtain the extracts of corresponding polar parts. After preparing 100 mg/mL drug solution (calculated by extract), antibacterial effects of above 6 kinds of bacteria were investigated. The micro-broth dilution method and agar culture medium plate method were used to determine minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC), and screen polar parts with bacteriostasis and drug-sensitive strains. Under the concentration of 0.5MIC and MIC, the growth curves of sensitive bacteria were drawn (treated for 36 h, every 4 h); the contents of alkaline phosphatase (AKP) and soluble protein were detected in suspension (treated for 10 h, every 2 h); bouillon culture medium instead of the extract as blank control. RESULTS: 100 mg/mL ethanol

[△] 基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(No.81703662); 广东省科技计划项目(No.2015A090905019, 2014A020221061); 广东省医学科学技术基金项目(No.A2015354); 梅州市产业技术研究与开发资金计划项目(No.201408); 嘉应学院大学生创新创业训练计划项目(No.201710582158)

* 助教, 硕士。研究方向: 微生物与免疫学。E-mail: lqjatai@163.com

通信作者: 讲师, 博士。研究方向: 中药及天然药物活性成分。E-mail: mcdullzhang@yeah.net

extracts from the root, stem and leaves of *P. rubra* showed good antibacterial effect to above 6 kinds of bacteria, in descending order as stem>leaves>root. Among different polar parts from the stem of *P. rubra*, antibacterial effect of the ethyl acetate extract was best, especially for the *S. aureus*, the diameter of inhibition zone reached (38.93±0.12) mm, and both MIC and MBC were 0.39 mg/mL. The ethyl acetate extract could significantly inhibit the proliferation of *S.*

aureus, and its alkaline phosphatase and protein content in suspension were increased significantly compared with blank control ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: The stem from *P. rubra* is effective antibacterial parts, and exhibit good antibacterial activity to 6 kinds of common pathogens. The ethyl acetate extract from the stem of *P. rubra* shows strongest antibacterial effect on *S. aureus*, and could gradually destroy the integrity of cell wall and cell membrane.

KEYWORDS *Psychotria rubra*; Different parts; Antibacterial activity *in vitro*; Mechanism of effect; Minimum inhibitory concentration; Minimum bactericidal concentration

随着抗生素的过度和不合理使用,细菌对药物的耐药性不断增加,人类或即将面临无药可用的“后抗生素时代”。相对于化学药,中草药具有作用靶点多、抗菌谱广、不易耐药、毒副作用小等优势^[1-2]。因此,从中草药中寻找新的、毒副作用小的抗菌活性化合物已成为药物研究中的一个热点。

山大颜 [*Psychotria rubra* (Lour.) Poir.] 又名山大刀、脂红叶、九节木等,为茜草科九节属植物,以根、叶入药,是我国南方常用中草药,也是国家非物质文化遗产广东凉茶的常用中药之一^[3-4]。山大颜对白喉、小儿夏季热、急性痛性关节炎等均具有一定的疗效,梅州客家地区常用其茎、叶水煎液治疗白喉、口腔炎症^[5-6]。目前,对于山大颜的化学成分及药理活性的研究较少。有文献资料^[7-8]显示,九节属植物中的化学成分主要以生物碱类为主,此外还有萜类、甾体类、酚类以及少量脂肪族化合物,具有一定的抗真菌、抗病毒活性。而本课题组在前期研究中亦发现,山大颜茎、叶水煎液对金黄色葡萄球菌等人体常见致病菌有一定的抑菌活性。因此,为进一步明确山大颜的药理活性部位及作用机制,本研究拟对山大颜根、茎和叶3个部位的提取物分别进行体外抑菌活性评价,并以抑菌活性部位及其敏感菌为对象,探究其抑菌作用机制。

1 材料

1.1 仪器

UV1800型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司); BSC-1100 II A2-X超净工作台(济南鑫贝西生物技术有限公司); WGZ-XT细菌浊度仪(杭州齐威仪器有限公司); FA7004B电子天平[(上海)天美天平仪器有限公司]; DH-9162B电热恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司); BY-160C离心机(北京白洋医疗器械有限公司); YXQ-LS-70A立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司)。

1.2 药品、试剂与培养基

山大颜于2017年5月购自广东省梅州市兴宁市罗岗镇袁记草药店,经嘉应学院医学院天然药化教研室罗宝平副教授确认为山大颜真品;青霉素钠原料药(批号:6121010150,纯度:≥99%)、硫酸链霉素原料药(批号:73210101100,美国药典级)均购自美国Genview公司;蛋白定量测定试剂盒(批号:20171111)、碱性磷酸酶(AKP)测定试剂盒(批号:20171117)均购自南京建成生

物工程研究所;乙醇(95%)、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、二甲基亚砜(DMSO)等均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司);水为灭菌蒸馏水;营养琼脂培养基(批号:20170708)、营养肉汤培养基(批号:20170808)、血琼脂培养基(批号:20170708)均购自江门凯林贸易生物公司。

1.3 菌株

金黄色葡萄球菌 ATCC6538、大肠埃希菌 ATCC-25922、铜绿假单胞菌 ATCC9027、枯草芽孢杆菌 ATCC-6633、藤黄微球菌 ATCC49732、粪肠球菌 ATCC29212 等标准菌株均购自广东省菌种保藏中心。

2 方法与结果

2.1 菌种的活化及菌悬液的制备

无菌操作条件下,将安瓿瓶保存的各标准菌株接种在相应的培养基上复苏,其中营养琼脂培养基用于金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌的培养,血琼脂培养基用于藤黄微球菌、粪肠球菌的培养,37℃条件下培养18~24h转接1次,用灭菌生理盐水调整菌悬液浓度与0.5麦氏比浊管相当(菌浓度约为 1.5×10^8 CFU/mL),再取少量菌悬液用灭菌生理盐水稀释100倍(菌浓度约为 1.5×10^6 CFU/mL),备用。

2.2 山大颜不同部位提取物及对照液的制备

2.2.1 山大颜不同部位提取物 称取山大颜干燥根100g,粉碎,加2倍量的95%乙醇浸泡过夜,45℃条件下超声(频率:45kHz,功率:250W)提取30min,过滤,药渣重复上述操作2次,合并3次滤液。将滤液旋转蒸发浓缩,得到山大颜根(10.23g)的醇提取物浸膏。同法分别制得山大颜茎(11.58g)、叶(12.62g)的醇提取物浸膏。将各提取物浸膏用2%DMSO溶解,制成质量浓度均为100mg/mL(以提取物计)的药液。

2.2.2 阳性对照与阴性对照液的制备 将青霉素钠、硫酸链霉素原料药分别用2%DMSO溶解,制成质量浓度分别为0.5μg/mL、128mg/mL的阳性对照液(青霉素钠为革兰氏阳性菌的阳性对照药,硫酸链霉素为革兰氏阴性菌的阳性对照药);以2%DMSO作为阴性对照液。试验前药液均用0.22μm滤膜过滤除菌。

2.3 山大颜不同部位提取物的体外抑菌作用检测

采用平板打孔法^[9]。按无菌操作要求,分别吸取100μL各菌悬液至相应培养基表面,无菌棉签涂布均匀,室温静置2min;用打孔器等距打孔3个,每孔大小均

为5 mm,向每个小孔中分别加入配制好的药液、阳性对照液(青霉素钠或者硫酸链霉素)和阴性对照液各30 μL ,放置30 min让药液充分扩散,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养18~24 h后,取出并测量抑菌圈直径。每种菌株平行操作3次。结果判定按《药理实验方法学》标准^[10]:抑菌圈直径<10 mm为抗药,10 mm为轻度敏感,11~15 mm为中度敏感,16~20 mm为高度敏感。山大颜不同部位对6种细菌的抑菌圈直径测定结果见表1。

表1 山大颜不同部位提取物对6种细菌的抑菌圈直径测定结果($\bar{x} \pm s, n=3, \text{mm}$)

Tab 1 The diameter of inhibition zone of the extracts from different parts of *P. rubra* to 6 kinds of bacteria($\bar{x} \pm s, n=3, \text{mm}$)

样品	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	藤黄微球菌	粪肠球菌	铜绿假单胞菌	大肠埃希菌
山大颜根提取物	28.11 \pm 0.61	11.48 \pm 0.57	10.94 \pm 0.23	8.04 \pm 0.05	10.99 \pm 0.56	<5.00
山大颜茎提取物	36.92 \pm 0.73	13.40 \pm 0.02	12.34 \pm 0.31	9.25 \pm 0.35	16.10 \pm 0.57	<5.00
山大颜叶提取物	31.85 \pm 0.64	12.30 \pm 0.14	10.88 \pm 0.42	7.87 \pm 0.47	14.45 \pm 0.07	<5.00
青霉素钠	16.68 \pm 0.12	19.26 \pm 0.20	16.03 \pm 0.62	14.42 \pm 0.14	-	-
硫酸链霉素	-	-	-	-	15.78 \pm 0.05	16.88 \pm 0.12
2%DMSO	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00

注:所有数据均包括5.00 mm的孔径;“-”为未进行试验

Note: all data include aperture of 5.00 mm;“-” was not tested

由表1可见,在相同质量浓度下,山大颜根、茎、叶对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、藤黄微球菌、粪肠球菌和铜绿假单胞菌均具有不同程度的抑菌作用,但对大肠埃希菌无明显抗菌作用。各部位提取物对上述5种敏感菌的抗菌活性大小均表现为茎>叶>根。因此,本研究对山大颜茎的醇提物进行系统溶剂萃取,进一步考察其不同极性部位萃取物的体外抗菌活性。

2.4 山大颜茎不同极性部位的体外抑菌活性测定

2.4.1 山大颜茎不同极性部位的制备 称取山大颜茎1 kg,按“2.2”项下方法制得山大颜茎的醇提物总浸膏(117.02 g)。将得到的浸膏用水分散后,采用系统溶剂萃取法依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,减压浓缩,回收溶剂后分别得到石油醚部位萃取物(7.01 g)、乙酸乙酯部位萃取物(42.61 g)、正丁醇部位萃取物(38.64 g)和剩余的水部位萃取物(28.78 g),所有样品均置于干燥玻璃器中保存,备用。待用时,将各部位萃取物用2% DMSO溶解,制成质量浓度均为100 mg/mL的药液(以提取物计),置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,使用前所有药液均用0.22 μm 滤膜过滤除菌。

2.4.2 山大颜茎不同极性部位的抑菌活性测定 以“2.4.1”项制备的质量浓度均为100 mg/mL的4份药液为试验样品,按照“2.3”项下试验方法测定其对上述6种细菌的抑菌圈大小。山大颜茎不同极性部位对6种细菌的抑菌圈直径测定结果见表2。

由表2可见,山大颜茎乙酸乙酯部位的抑菌活性较另外3个极性部位明显要强,其对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、藤黄微球菌、粪肠球菌和铜绿假单胞菌的抑

表2 山大颜茎不同极性部位对6种细菌的抑菌圈直径测定结果($\bar{x} \pm s, n=3, \text{mm}$)

Tab 2 The diameter of inhibition zone of different polar parts from the stems of *P. rubra* to 6 kinds of bacteria($\bar{x} \pm s, n=3, \text{mm}$)

样品	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	藤黄微球菌	粪肠球菌	铜绿假单胞菌	大肠埃希菌
山大颜茎石油醚部位	28.28 \pm 0.37	<5.00	<5.00	<5.00	11.00 \pm 0.26	<5.00
山大颜茎乙酸乙酯部位	38.93 \pm 0.12	14.40 \pm 0.54	14.41 \pm 0.28	10.73 \pm 0.26	24.83 \pm 0.90	11.75 \pm 0.24
山大颜茎正丁醇部位	35.53 \pm 0.49	9.67 \pm 0.54	11.36 \pm 0.32	9.53 \pm 0.30	22.46 \pm 1.08	8.27 \pm 0.23
山大颜茎水部位	27.50 \pm 0.57	<5.00	<5.00	<5.00	11.93 \pm 0.30	<5.00

注:所有数据均包括5.00 mm的孔径

Note: all data include aperture of 5.00 mm

菌圈直径均大于山大颜茎醇提物总浸膏,且对大肠埃希菌表现出一定的抗菌作用。其中,山大颜茎正丁醇部位的抑菌谱和乙酸乙酯部位相似,但抗菌活性次之;石油醚部位和水部位的抗菌谱和抑菌活性相似。为确定山大颜茎的最佳活性部位,进一步对其不同极性部位进行最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)的测定。

2.4.3 山大颜茎不同极性部位对6种细菌的MIC、MBC测定 (1)MIC的测定 采用微量肉汤稀释法^[11],取96孔微量板,第1~11孔加入肉汤培养基100 μL ,第1孔分别加入100 μL 山大颜4种极性部位药液,混合均匀,自第1孔吸取100 μL 药液加入后1孔中,依次作递倍稀释,至第10孔混合后弃去培养液100 μL 。吸取100 μL 菌悬液依次加入第1~11孔中,充分混匀,此时每孔菌浓度为 7.5×10^5 CFU/mL,吸取200 μL 肉汤培养基加入到第12孔中。最后将96孔微量板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养18~24 h后取出,在黑色背景光下观察,培养基浑浊或孔底有沉淀的为有菌生长,培养基澄清或底部无沉淀者即为MIC。每种菌株平行操作3次。(2)MBC的测定。分别从MIC测定中未见细菌生长的孔内吸取100 μL 培养液,分别接种至营养琼脂培养基或血琼脂培养基中,用无菌棉签均匀涂布,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养18~24 h后取出,观察结果并计数菌落,以平均菌落数小于5的药物最低质量浓度为MBC。每种菌株平行操作3次。山大颜茎不同极性部位对6种细菌的MIC和MBC测定结果见表3。

由表3可见,在山大颜茎4个极性部位中,乙酸乙酯部位的抑菌活性最强,对6种受试细菌均有抑菌作用(MIC、MBC分别在0.39~12.50、0.39~25.00 mg/mL之间),且以对金黄色葡萄球菌的抑菌活性最强,MIC、MBC均为0.39 mg/mL;其次是正丁醇部位,其MIC、MBC分别在0.78~25.00、1.56~50.00 mg/mL之间;再者是山大颜茎石油醚部位,其对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的MIC分别为6.25、100.00 mg/mL,但对其余4种细菌的抑菌活性较小;最后是水部位,其对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的MIC分别为12.50、50.00 mg/mL,

表3 山大颜茎不同极性部位对6种细菌的MIC和MBC测定结果(mg/mL)

Tab 3 MIC and MBC of different polar parts from the stems of *P. rubra* to 6 kinds of bacteria(mg/mL)

样品	金黄色葡萄球菌		枯草芽孢杆菌		蕈黄微球菌		粪肠球菌		铜绿假单胞菌		大肠埃希菌	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
山大颜茎石油醚部位	6.25	6.25	50.00	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	100.00	100.00	>100.00	>100.00
山大颜茎乙酸乙酯部位	0.39	0.39	3.13	6.25	6.25	12.50	6.25	12.50	6.25	12.50	12.50	25.00
山大颜茎正丁醇部位	0.78	1.56	6.25	12.50	12.50	25.00	12.50	25.00	25.00	50.00	25.00	50.00
山大颜茎水部位	12.50	25.00	50.00	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	50.00	100.00	>100.00	>100.00

MBC分别为25.00、100.00 mg/mL,但对其余4种细菌的抑菌活性较小。因此,本研究将进一步探究山大颜茎乙酸乙酯部位对金黄色葡萄球菌的抗菌作用机制。

2.5 山大颜茎乙酸乙酯部位对金黄色葡萄球菌的体外抑菌作用机制研究

2.5.1 细菌增殖测定 参考文献中方法^[12-13]略作修改。将对数生长的受试菌株(金黄色葡萄球菌)按照1%(V/V)接种至肉汤培养基中,加入适量的山大颜茎乙酸乙酯部位药液,混匀,使药液的终质量浓度分别为0.5MIC、MIC,并以肉汤培养基代替提取物作为空白对照,然后将菌株置于摇床(37℃、100 r/min)上振荡培养。每隔4 h取培养基测定其在630 nm波长处的光密度,研究金黄色葡萄球菌生长曲线变化趋势。金黄色葡萄球菌的生长曲线见图1。

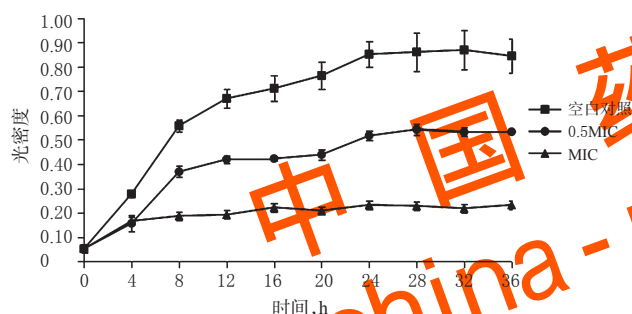
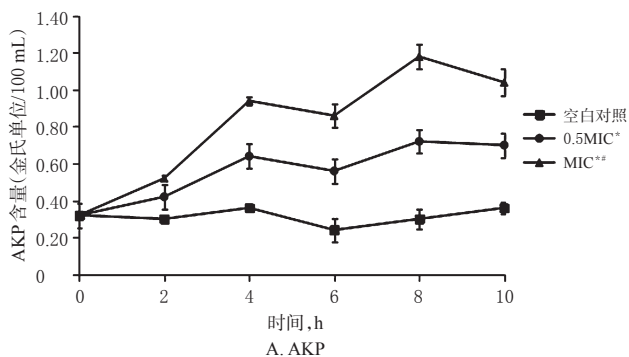


图1 金黄色葡萄球菌的生长曲线
Fig 1 Growth curves of *S. aureus*

由图1可见,金黄色葡萄球菌在空白对照培养基中培养4 h后增殖明显,进入对数生长期,在培养20 h后细菌生长趋于平缓。而在0.5MIC、MIC的药物浓度下,细菌生长明显受到抑制;其中,又以MIC药物浓度下细菌生长抑制更为显著,未出现明显的对数增长,生长曲线稳定在较低水平。

2.5.2 菌悬液中AKP和可溶性蛋白含量测定 按“2.5.1”项下方法制备药液和培养细菌,每隔2 h取细菌混悬液2 mL,以4 000 r/min离心10 min,收集培养液上清液。分别按照各自试剂盒说明书操作,检测上清液中AKP和可溶性蛋白含量。所有数据均采用Excel软件进行整理,应用SPSS 19.0统计学软件进行 χ^2 检验,检验水准: $\alpha=0.05$ 。菌悬液中AKP和可溶性蛋白含量测定结果见图2(1金氏单位/100 mL=7.14 U/L)。

由2A可知,加入0.5MIC及MIC山大颜茎乙酸乙酯部位药液后,菌悬液中AKP的含量明显高于空白对照



注:与空白对照比较,* $P<0.05$;与0.5MIC比较,# $P<0.05$
Note: vs. blank control group, * $P<0.05$; vs. 0.5MIC, # $P<0.05$

图2 菌悬液中AKP和可溶性蛋白含量测定结果

Fig 2 Determination result of the contents of AKP and soluble protein in bacterial suspension

($P<0.05$),且加入MIC浓度药液后菌悬液中AKP含量明显高于加入0.5MIC浓度药液($P<0.05$)。0~4 h内,在0.5MIC、MIC药物浓度下,菌悬液中的AKP含量均持续升高,8 h达到峰值后趋于平稳,而空白对照菌悬液中AKP含量则一直维持在较低水平。

如图2B可知,加入0.5MIC、MIC山大颜茎乙酸乙酯部位药液后,菌悬液中可溶性蛋白含量明显高于空白对照($P<0.05$)。0~4 h内,0.5MIC、MIC药物浓度下菌悬液中可溶性蛋白含量持续升高;6 h后,菌悬液中蛋白含量有所降低,并在培养8 h后趋于平稳。而空白对照菌悬液中可溶性蛋白含量一直维持在较低水平。

3 讨论

体外抗菌结果显示,山大颜根、茎、叶3个部位均具有不同程度的抑菌活性,其中山大颜茎的抑菌活性作用优于叶和根,这也佐证了梅州五华县的民间用法。接着,通过考察山大颜茎不同极性部位对6种常见细菌的抑菌活性,发现山大颜茎乙酸乙酯部位的抑菌活性优于

其他3个极性部位,且其对金黄色葡萄球菌的抑菌作用最为明显。有文献报道,山大颜茎的乙酸乙酯部位和正丁醇部位均含有一定的正丁基苷类、糖类、环烯醚萜类、三萜类、黄酮类及核糖氮苷类化合物,而萜类和黄酮类化合物均具有潜在的抑菌活性^[14-16]。因此,笔者推测山大颜茎的抑菌作用可能与其富含环烯醚萜类、三萜类及黄酮类成分有关。

有研究发现^[17-18],在一定浓度范围内,细菌菌悬液浓度与其光密度之间具有良好的线性关系。金黄色葡萄球菌生长曲线结果显示,与空白对照比较,在0.5MIC药物浓度时,细菌的生长受到了抑制,但进入对数生长和平台期的时间并没有明显改变;而在MIC药物浓度时,细菌的生长被显著抑制,无明显对数生长期。说明山大颜茎乙酸乙酯部位能够明显地抑制细菌的生长繁殖,且药物浓度越大,对细菌生长的抑制作用越强。

当细胞壁受到破坏后其通透性升高,存在于细胞壁与细胞膜之间的AKP会大量渗透到细胞外^[19]。在加入0.5MIC、MIC山大颜茎乙酸乙酯部位药液后,菌悬液中AKP含量均明显高于空白对照,说明山大颜茎乙酸乙酯部位能够破坏金黄色葡萄球菌细胞壁的完整性,且其破坏作用与药物浓度水平有一定的相关性。细菌细胞膜完整性受到破坏后,细胞膜通透性会发生改变,导致跨膜蛋白含量增多^[20]。菌悬液中可溶性蛋白含量测定结果显示,加入0.5MIC、MIC山大颜茎乙酸乙酯部位药液后,菌悬液中可溶性蛋白含量在0~4h内均持续增加,说明山大颜茎乙酸乙酯部位对金黄色葡萄球菌的细胞膜产生了破坏作用,且其破坏程度受药物浓度大小的影响;培养8h后,菌悬液中可溶性蛋白含量趋于平稳,这可能是因为随着作用时间的延长,山大颜茎乙酸乙酯部位的有效抑菌成分逐渐消耗,对菌体细胞膜的破坏作用减弱,胞外蛋白的外渗与细菌的自我修复对蛋白的吸收再利用处于平衡状态。

综上所述,山大颜根、茎、叶3个部位均具有一定的抑菌活性,对常见的6种病原菌有不同程度的抑菌效果。山大颜茎的抑菌活性在3个部位中最强,特别是其乙酸乙酯部位对金黄色葡萄球菌最为敏感,能逐步破坏金黄色葡萄球菌细胞壁和细胞膜的完整性,抑制其生长,从而发挥抑菌活性。本研究为中草药山大颜的开发利用提供了研究依据,也为进一步研究其体内抑菌活性及明确其有效抑菌活性成分提供了方向,但其具体的药效物质基础及抑菌作用机制还有待进一步研究。

参考文献

[1] 战旗,王蕊,李爽,等.中药抗菌作用研究现状[J].山东中医杂志,2014,33(8):697-698.
[2] 吴琳,叶峥嵘,梁瑾.细菌耐药现状及中药应对策略概述[J].实用中医药杂志,2012,28(2):159-160.
[3] 钟莹.岭南草药蔓九节、山大颜化学成分研究[D].广州:

广州中医药大学,2012.

[4] 南京中医药大学.中药大辞典[M].2版.上海:上海科学技术出版社,2014:200-201.
[5] 广东罗定县卫生局.山大颜、新洁尔灭等药对49例白喉带菌者细菌阴转效果的观察[J].新医学,1978,9(Z1):542.
[6] 赫军,李丽华,何宾,等.山大颜合四妙汤治疗急性痛风性关节炎疗效观察[J].中国中医药科技,2014,21(1):30.
[7] YANG H, ZHANG H, YANG C, et al. Chemical constituents of plants from the Genus psychotria[J]. *Chem Biod*, 2016, 13(7):807-820.
[8] 张翠仙,彭光天,何细新,等.九节属药用植物化学成分及药理作用研究进展[J].天然产物研究与开发,2011,23(3):571-576.
[9] 林海,龚又明,邓广海,等.黄柏及其炮制品水提物体内、外抑菌作用研究[J].中国药房,2012,23(31):2900-2902.
[10] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2005:1647-1662.
[11] 刘瑶,蔡进,陈瑞,等.苗药大乌泡叶提取物的体外抑菌作用考察[J].中国药房,2017,28(1):72-75.
[12] 管敏,张力文,徐致远,等.白毛夏枯草对金黄色葡萄球菌的作用规律及抗菌机理[J].中成药,2017,39(11):2393-2398.
[13] DELVIGNE F, DESTAIN J, THONART P. Toward a stochastic formulation of microbial growth in relation to bioreactor performances: case study of an E. coli fed-batch process[J]. *Biotechnol Progr*, 2006, 22(4):1114-1124.
[14] KHAN MR, KIHARA M, OMOLOSO AD. Antimicrobial activity of Psychotria microlabastra[J]. *Fitoterapia*, 2001, 72(7):818-821.
[15] JAYASINGHE UL, JAYASOORIYA CP, BANDARA BM, et al. Antimicrobial activity of some Sri Lankan rubiaceae and Meliaceae[J]. *Fitoterapia*, 2002, 73(5):424-427.
[16] KATO L, CECILIA M.A de O, et al. Antiprotozoal alkaloids from Psychotria prunifolia (Kunth) steyerem[J]. *J Braz Chem*, 2012, 23(2):355-360.
[17] HARA S, YAMAKAWA M. Moricin, a novel type of antibacterial peptide isolated from the silkworm, Bombyx mori[J]. *Biol Chem*, 1995, 270(50):29923-29927.
[18] 肖敏,杨峰,王旭荣,等.分光光度法测定金黄色葡萄球菌液浓度方法的建立[J].动物医学进展,2014,35(11):40-43.
[19] 刘蔚,周涛.ε-聚赖氨酸抑菌机理研究[J].食品科学,2009,30(9):15-20.
[20] ZHANG YB, LIU XY, WANG YF, et al. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against Escherichia coli and Staphylococcus aureus[J]. *Food Control*, 2016, 26(59):282-289.

(收稿日期:2018-08-10 修回日期:2018-11-11)

(编辑:林静)