

DOI: 10.3969/j.issn.1005- 8982.2017.03.004

文章编号: 1005- 8982 (2017) 03- 0018- 04

不同提取方法的紫地榆提取物对常驻口腔细菌的研究*

杨晓珍, 蓝海

(大理大学 药学与化学学院, 云南 大理 671000)

摘要:目的 研究不同方法提取紫地榆正丁醇部分和乙酸乙酯部分对变形链球菌、黏性放线菌和血链球菌生长及产酸的影响。**方法** 首先分别测定不同方法提取的紫地榆正丁醇部分和乙酸乙酯部分对变形链球菌、黏性放线菌及血链球菌的最低抑菌浓度 (MIC) 和最低杀菌浓度 (MBC), 再以低于 MIC 的 4 个浓度配制含药的胰酶解酪蛋白 - 植物蛋白胨 - 酵母提取物液体培养基, 测定紫地榆正丁醇部分和乙酸乙酯部分对 3 种常驻口腔细菌产酸的影响。**结果** 热提的紫地榆正丁醇部分对变形链球菌、黏性放线菌及血链球菌的 MIC 分别为 3.0、3.0 和 6.0 g/L, MBC 分别为 6.0、6.0 和 12.0 g/L。热提的紫地榆乙酸乙酯部分对变形链球菌、黏性放线菌及血链球菌的 MIC 均为 6.0 g/L, MBC 均为 12.0 g/L。冷提的紫地榆正丁醇部分对变形链球菌、黏性放线菌及血链球菌的 MIC 均为 6.0 g/L, MBC 均为 12.0 g/L。冷提的紫地榆乙酸乙酯部分对变形链球菌、黏性放线菌及血链球菌的 MIC 均为 6.0 g/L, MBC 均为 12.0 g/L。一定浓度的紫地榆正丁醇部分和乙酸乙酯部分对 3 种常驻口腔细菌的产酸有一定的抑制作用, 但提取方法的不同对其抑制产酸的能力差异无统计学意义。**结论** 紫地榆正丁醇部分和乙酸乙酯部分能有效抑制口腔致龋菌的生长和产酸, 可能是一种潜在的天然防龋药物。

关键词: 紫地榆; 变形链球菌; 粘性放线菌; 血链球菌; 产酸

中图分类号: R781.1

文献标识码: A

Effect of *Geranium Strictipes* extracts extracted by different methods on acid production of three strains of oral bacteria*

Xiao-zhen Yang, Hai Lan

(College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali, Yunnan 671000, China)

Abstract: Objective To inquire into the effect of N-butyl alcohol and ethyl acetate extracts of *Geranium Strictipes* extracted by different methods on growth and acid production of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* and *Actinomyces viscosus*. **Methods** Firstly, minimum bacteriostatic concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of N-butyl alcohol and ethyl acetate extracts of *Geranium Strictipes* extracted by different methods on *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* and *Actinomyces viscosus* were respectively determined and then the effect of these *Geranium Strictipes* extracts on the acid production was determined. **Results** The MIC of N-butyl alcohol extract of *Geranium Strictipes* extracted reflux on *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* and *Actinomyces viscosus* were 3.0, 3.0 and 6.0 g/L respectively, while the MBC were 6.0, 6.0 and 12.0 g/L respectively. The MIC of ethyl acetate extract of *Geranium Strictipes* extracted reflux on the three bacteria strains were all 6.0 g/L, and the MBC were all 12.0 g/L. The MIC of N-butyl alcohol extract of *Geranium Strictipes* extracted maceration on the three bacteria strains were all 6.0 g/L, the MBC were all 12.0 g/L. The MIC of ethyl acetate extract of *Geranium Strictipes* extracted maceration on the three bacteria strains were all 6.0 g/L, the MBC were all 12.0 g/L. A certain concentration of N-butyl alcohol and ethyl acetate extracts of *Geranium Strictipes* could inhibit acid production of the three bacteria strains, but there was no significant difference in the inhibition of acid production by different extraction methods.

收稿日期: 2016-03-25

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81260512); 云南省大理学院应用开发研究基金 (No: Kyy201102)

[通信作者] 蓝海, E-mail: lanhai8696@126.com; Tel: 13769225179

Conclusions N-butyl alcohol and ethyl acetate extracts of *Geranium Strictipes* can effectively inhibit the growth and acid production of oral bacteria, may be effective anti-caries agents.

Keywords: *Geranium Strictipes*; *Streptococcus mutans*; *Streptococcus sanguis*; *Actinomyces viscosus*; acid production

紫地榆是牻牛儿苗科老鹳草属植物的根,在云南的白族、彝族等少数民族地区长期用作厌食症的治疗,具有消炎、止痢和收敛的功效。有研究证明,紫地榆有良好的抗体外常见胃肠道细菌的作用,并能降低被痢疾志贺菌感染的小鼠死亡率^[1-3]。此外,紫地榆不同溶剂提取物有抑制釉质脱矿和促进再矿化的作用,且其水提物能有效抑制口腔致龋菌变形链球菌和血链球菌的生长和产酸^[4-12]。本实验旨在比较研究紫地榆不同提取方法的正丁醇部分和乙酸乙酯部分对3种常驻口腔细菌产酸的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

紫地榆购于大理药材市场,由大理大学药学与化学学院鉴定为紫地榆的根。变形链球菌 *streptococcus mutans*, ATCC25175)、血链球菌 (*actinomyces viscosus*, ATCC9246)、黏性放线菌 (*streptococcus sanguis*, ATCC27044) 均购自广东微生物菌种保藏中心。胰酶解酪蛋白-植物蛋白胨-酵母提取物 (*trypticase-phytone-yeast extract medium*, TPY) 固体及液体培养基, 0.5 和 0.1 mol/L 氢氧化钠, 0.05% 洗必泰 (*chlorhexidine acetate*, CA), 0.5 mol/L 磷酸盐缓冲液 (*phosphate buffer saline*, PBS)、蔗糖、无水乙醇、葡萄糖、石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇均为分析纯。

1.2 紫地榆粗提物的提取

1.2.1 冷提 95%乙醇常温浸泡粉碎的原药材 24 h, 抽滤, 把滤液旋转蒸发成浸膏后加适量蒸馏水溶解, 分别用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 所得石油醚和三氯甲烷部分多为色素且提取物含量较少故舍去, 其余部分冷冻干燥后得粉末备用。

1.2.1 热提 95%乙醇 50℃回流提取, 提取 6 次, 2 h/次, 抽滤, 把滤液旋转蒸发成浸膏后加适量蒸馏水溶解, 分别用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 所得石油醚和三氯甲烷部分多为色素且提取物含量较少故舍去, 其余部分冷冻干燥后得粉末备用。

1.3 菌液的制备

将 3 株冻干菌株复苏 48 h 后接种于 TPY 液体培养基中厌氧条件下 37℃、80%氮气 N₂, 20%二氧化碳 CO₂) 培养 18 h。经生化鉴定及涂片检查为纯培养后, 3 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 菌细胞用无菌生理盐水洗涤。再次离心, 重复离心洗菌 3 次。分别将洗净的 3 种菌细胞用无菌生理盐水稀释, 用 0.5 麦氏单位标准比浊管调菌悬液的浓度约 5 × 10⁷ CFU/ml。

1.4 最低抑菌浓度和最低杀菌浓度的测定

将紫地榆各萃取物按 2 倍稀释法分别溶于含 1%葡萄糖的 TPY 液体培养基中, 使其终浓度分别为 48.000、24.000、12.000、6.000、3.000、1.500、0.750 和 0.375 g/L。将菌悬液与含药液的培养基按 1:10 (V/V) 比例, 加入 96 孔板后置 37℃、80% N₂, 20%CO₂ 下厌氧培养 48 h。肉眼观察是否有菌生长, 以无菌生长的紫地榆萃取物浓度为其最低抑菌浓度 (*minimum inhibitory concentration*, MIC)。选择大于 MIC 浓度的各孔, 分别取 20 μl 涂布于 TPY 固体培养基上, 在相同条件下培养 48 h, 肉眼观察菌落数少于 5~6 个的最低萃取物浓度为最低杀菌浓度 (*minimum bactericidal concentration*, MBC), 实验重复 3 次。

1.5 紫地榆提取物对 3 种常驻口腔细菌产酸能力影响的测定

根据紫地榆各萃取部分对上述 3 种常驻口腔细菌的 MIC 测定结果, 将含 1%葡萄糖和紫地榆萃取物的 TPY 液体培养基配成 MIC 以下浓度梯度的 4 个实验组, 另设 1 个含 0.05%洗必泰的阳性对照组、1 个不含药物的阴性对照组, 共 6 组, 每组设 3 个平行管, 实验重复 2 次。调定初始 pH 值为 7.4 并按菌悬液: TPY 液体培养基为 1:10 (V/V) 的比例接种细菌后置于 37℃、80% N₂, 20% CO₂ 厌氧条件下培养 48 h。用 pH 酸度计测定培养物上清液的 pH 值并计算其变化值 ΔpH, ΔpH = 初始 pH 值 - 终末 pH 值^[13-14]。

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组比较用单因素方差分析 (*analysis of variance*, ANOV), 若方差齐, 则两两

比较用 Dunnett- *t* 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05, P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 紫地榆各提取物部分对 3 种常驻口腔细菌生长的影响

紫地榆各提取物对 3 种常驻口腔细菌均有生长抑制和杀菌作用, 热提的紫地榆正丁醇部分的抑菌与杀菌效果最好, 而用不同方法提取的紫地榆乙酸乙酯部分抑菌与杀菌效果相近。见表 1。

2.2 紫地榆各提取物部分对 3 种常驻口腔细菌产酸的影响

各组与阴性对照组比较, 差异有统计学意义 $F =$

280.121, $P = 0.000$), 热提的紫地榆正丁醇提取物浓度 ($\geq 1.500 \text{ g/L}$) 对血链球菌产酸的抑制效果与洗必泰的相近 ($P = 0.664$); 热提的紫地榆乙酸乙酯部分,

表 1 紫地榆各提取物部分对 3 种口腔常驻细菌的影响 (g/L)

组别	变形链球菌		黏性放线菌		血链球菌	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
热提						
正丁醇部分	3.0	6.0	3.0	6.0	6.0	12.0
乙酸乙酯部分	6.0	12.0	6.0	12.0	6.0	12.0
冷提						
正丁醇部分	6.0	12.0	6.0	12.0	6.0	12.0
乙酸乙酯部分	6.0	12.0	6.0	12.0	6.0	12.0

表 2 紫地榆各提取物部分对 3 种常驻口腔细菌产酸的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别		变形链球菌 ΔpH	黏性放线菌 ΔpH	血链球菌 ΔpH
热提	正丁醇			
	1.500 g/L	0.983 \pm 0.0585 ^{1,2}	0.9733 \pm 0.0629 ^{1,2}	0.5500 \pm 0.0451 ¹
	0.750 g/L	1.1200 \pm 0.0374 ^{1,2}	1.0650 \pm 0.0568 ^{1,2}	0.6533 \pm 0.0704 ¹
	0.375 g/L	1.9083 \pm 0.0475 ^{1,2}	1.3600 \pm 0.0757 ^{1,2}	0.9650 \pm 0.0621 ^{1,2}
	0.187 g/L	1.9800 \pm 0.0663 ^{1,2}	1.4917 \pm 0.0703 ^{1,2}	1.0700 \pm 0.0627 ^{1,2}
	阳性对照组	0.7583 \pm 0.0319	0.6633 \pm 0.0453	0.5650 \pm 0.0364 ^{1,2}
	阴性对照组	3.0717 \pm 0.0343	2.8483 \pm 0.0414	1.6667 \pm 0.0632
	乙酸乙酯			
	3.000 g/L	0.6767 \pm 0.0534 ¹	0.8833 \pm 0.0629 ^{1,2}	0.6800 \pm 0.0640 ^{1,2}
	1.500 g/L	0.9933 \pm 0.0748 ^{1,2}	0.9967 \pm 0.0565 ^{1,2}	0.7917 \pm 0.0297 ^{1,2}
0.750 g/L	1.3883 \pm 0.0853 ^{1,2}	1.3567 \pm 0.1116 ^{1,2}	1.1600 \pm 0.0630 ^{1,2}	
0.375 g/L	1.7183 \pm 0.0596 ^{1,2}	1.5267 \pm 0.0582 ^{1,2}	1.3983 \pm 0.0641 ^{1,2}	
阳性对照组	0.7517 \pm 0.0430	0.6900 \pm 0.0513	0.5633 \pm 0.0382	
阴性对照组	3.0683 \pm 0.0393	2.8467 \pm 0.0591	1.6567 \pm 0.0415	
冷提	正丁醇			
	3.000 g/L	0.6533 \pm 0.0765 ¹	0.6383 \pm 0.0495 ¹	0.6333 \pm 0.0591 ¹
	1.500 g/L	0.9667 \pm 0.0519 ^{1,2}	0.9150 \pm 0.0678 ^{1,2}	0.7900 \pm 0.0513 ^{1,2}
	0.750 g/L	1.3483 \pm 0.0751 ^{1,2}	1.1900 \pm 0.0443 ^{1,2}	0.9683 \pm 0.0672 ^{1,2}
	0.375 g/L	2.0700 \pm 0.0656 ^{1,2}	1.3483 \pm 0.0430 ^{1,2}	1.2767 \pm 0.0547 ^{1,2}
	阳性对照组	0.7650 \pm 0.0496	0.6433 \pm 0.0464	0.5833 \pm 0.0534
	阴性对照组	3.0533 \pm 0.0471	2.8400 \pm 0.0497	1.6583 \pm 0.0471
	乙酸乙酯			
	3.000 g/L	0.8567 \pm 0.0748 ¹	0.8933 \pm 0.0350 ^{1,2}	0.7800 \pm 0.0557 ^{1,2}
	1.500 g/L	1.1017 \pm 0.0524 ^{1,2}	1.0533 \pm 0.0492 ^{1,2}	0.8567 \pm 0.0354 ^{1,2}
0.750 g/L	1.4517 \pm 0.0790 ^{1,2}	1.3750 \pm 0.0585 ^{1,2}	1.2083 \pm 0.0636 ^{1,2}	
0.375 g/L	1.8533 \pm 0.0759 ^{1,2}	1.5167 \pm 0.0499 ^{1,2}	1.5150 \pm 0.0621 ^{1,2}	
阳性对照组	0.7750 \pm 0.0427	0.6567 \pm 0.0394 ^{1,2}	0.5250 \pm 0.0535	
阴性对照组	3.0683 \pm 0.0393	2.8650 \pm 0.0435	1.6683 \pm 0.0334	

注: 1) 与阴性对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与阳性对照组比较, $P < 0.05$

较高质量浓度组 $C \geq 3.000 \text{ g/L}$ 与阳性对照组抑制口腔细菌产酸的效果相近 ($P > 0.05$)。冷提的紫地榆正丁醇部分浓度 $C \geq 3.000 \text{ g/L}$ 对变形链球菌产酸的抑制效果与洗必泰的相近 ($P = 0.012$);冷提的紫地榆乙酸乙酯浓度 $C \geq 3.000 \text{ g/L}$ 对变形链球菌产酸的抑制效果与洗必泰的相近 ($P = 0.149$)。见表2。

3 讨论

龋病是口腔常见病、多发病,其实质是牙菌斑内细菌酵解碳水化合物产生有机酸,引起牙体无机物脱矿,有机质崩解,最终导致龋损形成的慢性进行性疾病。本实验选用的变形链球菌、血液链球菌及黏性放线菌是口腔常驻细菌。这3种细菌都能发酵多种碳水化合物产酸,使菌斑 pH 值降到 < 5 ,因此其生长、产酸代谢与龋病的发生密切相关^[19]。本实验结果显示,紫地榆正丁醇和乙酸乙酯提取物对口腔3种常见菌均有显著的产酸抑制作用,但提取方法的不同对其抑制产酸的能力差异无统计学意义。

在对口腔细菌产酸影响的实验中,为排除药物本身因抑制菌细胞生长而产生的对产酸的抑制表现,采用在 MIC 浓度以下的4个浓度梯度。而实验中所用的洗必泰是一种广谱抗生素,临床上主要用于饮水消毒,角膜溃疡、菌痢、牙周病、狐臭、冻伤、阴道炎及宫颈糜烂的治疗,能减少牙周病和龋病的发生^[19]。在临床上通常首选0.05%洗必泰漱口水治疗各种致龋菌引起的各型口腔疾病,故用含0.05%洗必泰作为阳性对照组。有研究显示,紫地榆乙酸乙酯部分、正丁醇萃取部位及水部分对致龋菌的生长、产酸有一定的抑制作用,但其水部分效果相对较差^[17-18]。

综上所述,一定浓度的紫地榆正丁醇与乙酸乙酯萃取物可抑制3种常驻口腔细菌的生长及产酸,其中热提的紫地榆正丁醇部分的抑菌与杀菌效果最好,用不同方法提取的紫地榆乙酸乙酯部分抑菌与杀菌效果相近,抑酸作用方面,差异无统计学意义。其原因可能是提取方法的改变只是引起其有效成分含量的改变,并未导致其有效成分数量的改变;热提法提取紫地榆会使其各浸膏的提取率分别有所提高。天然药物紫地榆对常驻口腔细菌的生长及产酸

有一定的影响,可考虑开发成牙膏、漱口水等应用形式,但同时天然药物活性成分比较复杂,其具体有效成分目前尚不明确,故有待进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] 洪小凤,王涛,施贵荣,等. 隔山消不同极性提取物抗菌作用实验研究[J]. 中成药, 2011, 33(6): 1052- 1054.
- [2] 耿玲,陈俊雅,李洪文,等. 紫地榆提取物体外抗菌活性研究[J]. 大理学院学报, 2014, 13(10): 14- 17.
- [3] 戴啊师,蔡春木,蓝海,等. 天然药物隔山消促进釉质再矿化的研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2007, 17(11): 635- 637.
- [4] 李龙星,郭利军,蓝海. 紫地榆对口腔致龋菌抑制作用的研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(36): 20600- 20613.
- [5] 戴啊师,蔡春木,蓝海,等. 天然药物隔山消促进釉质再矿化的研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2007, 17(11): 635- 637.
- [6] 蓝海,王毅. 紫地榆对人工脱矿釉质再矿化效果的显微硬度观察[J]. 中成药, 2012, 34(12): 2424- 2426.
- [7] 蓝海,杨颖,杨晓莉. 隔山消水提物对再矿化及抗酸脱矿作用的体外研究[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(24): 3639- 3641.
- [8] 刁水全,陈娜,李翔,等. 隔山消与氟化钠对牛切牙脱矿的动力学研究[J]. 大理学院学报, 2010, 9(8): 12- 14.
- [9] 蓝海,罗常辉. 隔山消和五倍子水提物对牛切牙脱矿与再矿化的动力学研究[J]. 中成药, 2011, 33(4): 692- 694.
- [10] 蓝海,张星星. 天然药物紫地榆不同溶剂提取物对牛切牙脱矿的动力学研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(32): 1812- 1814.
- [11] 杨晓莉,王芳芹,张俊,等. 紫地榆不同溶剂提取物对防龋活性部位的研究[J]. 中成药, 2014, 36(10): 2074- 2078.
- [12] 王丽梅,周学灵,布正兴,等. 紫地榆牙膏对牙釉质脱矿和再矿化作用的研究[J]. 昆明医科大学学报, 2014, 35(10): 15- 18.
- [13] 廖先旻,宝福凯,程永现,等. 中药五倍子酚性与非酚性物质抗变形链球菌和放线菌的实验研究[J]. 昆明理工大学学报, 2014, 39(1): 73- 75.
- [14] 刘学军,姜新亚,张玲玲. 葡萄籽原花青素对粘性放线菌影响的实验研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2011, 27(6): 761- 764.
- [15] 刘天佳. 口腔疾病的微生物学基础 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 43.
- [16] 马鸽,倪根珊. 洗必泰的临床应用[J]. 医学导报, 1994, 13(3): 119- 120.
- [17] 汪春平,吴利先,王涛,等. 紫地榆正丁醇萃取部位对两种致龋菌生长、产酸的影响[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(7): 1569- 1571.
- [18] 杨淋,蓝海. 紫地榆两种不同溶剂萃取物对变异链球菌的体外实验[J]. 中成药, 2015, 27(8): 1843- 1845.

(童颖丹 编辑)