

南蛇藤果实提取液对弧菌的体外抑菌作用

黄晓玲, 刘倩倩, 杨振美, 张现峰, 王丙乾, 韩晓弟

(山东大学威海分校 海洋学院 山东 威海 264209)

摘要: 用平板牛津杯法和试管二倍稀释法比较南蛇藤乙酸乙酯相、水相、乙醇相 3 种提取液对弧菌的抑菌活性和最小抑菌浓度(MIC)。探讨南蛇藤果实提取液对鳃弧菌、副溶血弧菌的体外抑菌作用。结果表明: 3 种提取液的 MIC 值分别是 145.8、208.3、291.7 mg/mL(鳃弧菌); 125.0、187.5、208.33 mg/mL(副溶血弧菌)。南蛇藤果实的 3 种提取液对鳃弧菌、副溶血弧菌有不同程度的抑制作用, 其中乙酸乙酯相提取液抑菌效果最佳, 水相和乙醇相次之。

关键词: 南蛇藤; 鳃弧菌; 副溶血弧菌; 抑菌作用

中图分类号: Q 949.96 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)11-0173-03

鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)是对海水养殖鱼类危害最大的弧菌, 每年给水产养殖业造成巨大的经济损失。目前报道至少有 40 种鱼可被鳃弧菌感染, 其中重要的养殖品种有鲑、虹鳟、鳊、香鱼、鲈、鳙、大菱鲆、牙鲆、黄鱼等^[1]。副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种嗜盐性细菌, 主要存在于近海岸的海水、海底沉积物和鱼类、虾类、贝类等海产品中^[2], 是海产品中主要的食源性致病菌。据国家食源性致病菌监测网统计, 我国近年由副溶血弧菌引起的中毒呈显著上升趋势, 且有从沿海向内地发展的势头^[3]。长期以来, 国内外渔药大多数采用化学性农药(如敌百虫等有机磷类和菊酯类)或兽药(如甲苯咪唑、阿维菌素)等作为母体药源。这些化学药物不但在水体中不易降解、污染环境和易在动物体内富集, 而且长期使用易产生耐药性而加大用量或失去药效。因此国内外对渔药的要求日趋严格, 大多数渔药由于潜在性毒害而被禁用^[4]。

与其它抗菌药物和化学合成药相比, 许多中草药及其有效成分因天然、无残留、无耐药性和无毒副作用等一系列优点而得到广泛应用。中草药及其有效成分的研究已经取得了很大的进展。随着研究的不断深入, 其在体外抗菌、抗病毒方面的药理作用不断被发现。中草药含有多种有效成分, 它们在抗菌、抗毒素、消除耐药性质粒的同时, 还能促进动物生长, 增强机体免疫力^[5-9]。

第一作者简介: 黄晓玲(1988-), 女, 福建省三明市人, 在读本科, 研究方向为海洋生物学。

通讯作者: 韩晓弟(1963-), 男, 山东省莱州市人, 副教授, 现主要从事植物生物学及海洋生物学研究工作。E-mail: liuqianqian880706@yeah.net。

基金项目: 山东大学威海分校大学生科技立项资助项目(A08056); 威海市海洋研究院资助项目(0000413420904)。

收稿日期: 2010-03-05

南蛇藤(*Celastrus orbiculatus* Thunb.)系卫矛科南蛇藤属植物, 又名过山风、黄藤、苦树皮等。南蛇藤分布广、产量大, 主要分布于我国东北、华北、华东、西北、西南、广东及两湖地区^[7]。卫矛科植物大多具有杀虫、抗肿瘤活性, 含有生物碱、倍半萜、三萜及黄酮类等化合物, 是天然活性成分的重要来源之一^[8]。药理学研究表明, 南蛇藤具有抗炎、抗菌、抗病毒、抗生育、昆虫拒食及毒杀等活性, 目前多用于治疗风湿性及类风湿性关节炎、血液病及皮肤病, 也用作农用杀虫剂^[8,9]。在南蛇藤抑菌作用研究方面, 仅有利用南蛇藤根皮提取物对金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、大肠杆菌、福氏痢疾杆菌抑制作用的相关报道^[7], 而利用南蛇藤提取液对海水养殖领域重要的病原菌—弧菌(*Vibrio* spp.)的抑菌作用未见报道。该试验以南蛇藤果实为原料, 对鳃弧菌和副溶血弧菌进行体外抑菌作用进行探讨, 旨在拓宽南蛇藤资源的应用范围, 为鱼病的防治提供参考, 并为新药的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用南蛇藤果实采自山东省威海市玛珈山, 由通讯作者鉴定, 标本保存在山东大学威海分校环境与生态研究所。果实自然阴干 1 周, 低温(50℃)烘干 24 h, 中草药粉碎机粉碎, 干燥瓶保存备用。

1.2 试验仪器

DL-5-A 型低速大容量离心机(上海安亭科学仪器厂); RE-3000 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); SPX-250B-Z 型生化培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); SCS-24 型温控培养摇床(上海市离心机机械研究所); YXQ-LS-50SII 型立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); 紫外诱变箱(济南杰康净化设备厂); 101-3 型电热发风干燥箱(龙口市先科仪器公

司);电子游标卡尺(上海恒量量具有限公司)。

1.3 试验菌株

试验用菌株鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)和副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)由山东大学威海分校海洋学院微生物学实验室提供。

1.4 培养基

液体、固体培养基均为 2216E 培养基^[10],常规方法配制,121℃高压蒸汽灭菌 25 min 后备用。

1.5 提取液制备

南蛇藤有效成分提取采用改良的微波辅助法^[11]。称取南蛇藤果实 3 份各 100 g,分别加入 400 mL 乙酸乙酯、400 mL 73%乙醇、400 mL 蒸馏水,常温浸泡 30 min,微波处理 2 min 后,浸泡 3 d,离心(4 000 r/min,6 min),收集上清液,3 种上清液减压蒸馏至提取液 10 mL(提取液生药含量为 10 g/mL 单位)。蒸馏处理条件见表 1。

表 1 减压蒸馏条件

| 上清液(溶剂区别) | 转速/r·min ⁻¹ | 温度/℃ | 时间/min |
|-----------|------------------------|------|--------|
| 乙酸乙酯 | 28 | 30 | 110 |
| 73%乙醇 | 28 | 45 | 135 |
| 蒸馏水 | 28 | 65 | 85 |

1.6 抑菌试验

主要采用平板牛津杯法进行体外抑菌试验^[12]。

1.6.1 预试验 在无菌条件下倒平板,冷却后置于超净工作台内 24 h 干燥备用。取 100 μL 菌悬液于平板上,均匀涂布,自然吹干。均匀放置 3 个无菌干燥牛津杯,分别取 200 μL 不同的提取液于牛津杯中并做好标记。2 种菌各设 3 组平行实验,蒸馏水、乙醇、乙酸乙酯为对照组,于 28℃恒温培养箱内培养 24 h,观察结果。预试验结果表明,对照组无抑菌作用;试验组因抑菌圈有重叠现象而无法测量其直径。因此,应将提取液稀释再做抑菌试验。

1.6.2 溶剂的选择南蛇藤果实脂溶性提取液难溶于一般溶剂,需要寻找一种合适的溶剂。二甲亚砜易溶于水、醇、醚、酯,能溶解除烷烃以外的各种极性有机物气体、液体或聚合物,与水、苯有较强的分子缔合作用,属非质子极性溶剂。由于它对化学反应具有特殊的溶媒效应对许多物质的溶解特性,一向被称为“万能溶媒”^[13]。用 25%二甲亚砜^[14]将 3 种提取液分别稀释五倍,以二甲亚砜作为对照重复预试验。观察试验结果并用电子游标卡尺测定抑菌圈直径。抑菌效果判定:抑菌直径≥20 mm 为极敏,用“+++”表示;15~19 mm 为高敏,用“++”表示;10~14 mm 为中敏,用“+”表示;10 mm 以下为低敏,用“-”表示^[15]。最小抑菌浓度(MIC)的测定:采用试管稀释涂布法测定 3 种提取液对鳃弧菌和副溶血弧菌的 MIC^[16]。先用试管 2 倍稀释法初判 MIC,即取 15 mm×150 mm 灭菌带塞试管 8 支,第

1 管加 5.4 mL 液体培养基,第 2~8 管各加 3 mL;以无菌操作吸取提取液 0.6 mL 加入第 1 管,混匀后吸取 3 mL 移入第 2 管中,依次倍比稀释至第 7 管,混匀后自第 7 管弃去 3 mL,此时,管中药液含量依次为 1 000、500、250、125、62.5、31.25、15.625 mg/mL,第 8 管不加药物作为对照;各管均加入菌悬液 0.15 mL,混匀后置于温控培养摇床(200 r/min,28℃)培养 48 h,肉眼观察结果。由于提取液的色泽判断较难,故每管取 100 μL 对应加入 2216E 平板,涂布,重判 MIC^[16],每个稀释度涂 5 个平板,置于生化培养箱(28℃)培养 24 h。试验重复 3 次,结果取平均值或重复值。

2 结果与分析

由图 1 和表 2 可知,3 种南蛇藤果实提取液对鳃弧菌、副溶血弧菌都有一定的抑制作用,其中乙酸乙酯相提取液抑菌效果最佳,水相和乙醇相次之。

由表 3 可知,乙酸乙酯相提取液、水相提取液和乙醇提取液的 MIC 值分别是 145.8、208.3、291.7 mg/mL(鳃弧菌);125.0、187.5、208.33 mg/mL(副溶血弧菌)。

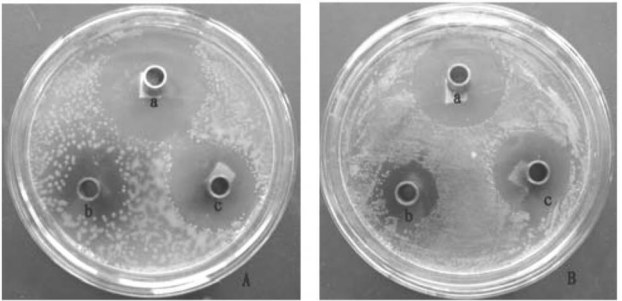


图 1 3 种提取液对鳃弧菌和副溶血弧菌的抑菌效果

注: A、B 分别为 3 种提取液对鳃弧菌和副溶血弧菌的抑菌效果; a、b、c 分别为乙酸乙酯相、乙醇相、水相提取液抑菌圈。

表 2 3 种提取液对弧菌的抑菌圈直径 mm

| | 鳃弧菌 | 敏感程度 | 副溶血弧菌 | 敏感程度 |
|----------|-------|------|-------|------|
| 乙酸乙酯相提取液 | 34.44 | +++ | 32.80 | +++ |
| 水相提取液 | 28.30 | +++ | 27.57 | +++ |
| 乙醇相提取液 | 23.40 | +++ | 18.81 | ++ |
| 25%二甲亚砜 | 7.80 | - | 7.80 | - |

注:牛津杯(外径为 7.80 mm,内径为 5.93 mm,高为 10.00 mm)。

表 3 南蛇藤果实的 3 种提取液对弧菌的 MIC mg/mL

| | 鳃弧菌 | 副溶血弧菌 |
|----------|-------|-------|
| 乙酸乙酯相提取液 | 145.8 | 125.0 |
| 水相提取液 | 208.3 | 187.5 |
| 乙醇相提取液 | 291.7 | 208.3 |

3 讨论

南蛇藤果实的乙酸乙酯、水和乙醇提取液的抑菌效果对比可见,3 种提取液都能有效抑制菌的生长,因此采用南蛇藤来防治由鳃弧菌和副溶血弧菌引起的鱼病是确实可行的,治疗时应根据中草药的 MIC 测定结果调

节其用量,使用药后鱼体内的药物浓度达到抑菌浓度以上。另外,乙酸乙酯相提取液比同浓度的水相和乙醇相提取液的抑菌效果更好,若3种提取液含有同种抑菌成分,则前者该成分的含量多于后两者;若含有不同抑菌成分,那么前者所含成分的抑菌效果好于后两者。但其活性成分的种类和含量以及抑菌机制仍有待进一步研究。

试验同时表明,中草药提取物的抑菌圈大小与其相应的MIC值不一定成平行关系。可能是由于中草药提取物含有多种成分,而各成分的活性强度和扩散速度各不相同^[7],另外,脂溶性物质较难溶于培养基,即使振荡培养,药物也可能分布不均,导致MIC的测定存在较大误差。需要寻找一种理想的助溶剂,以减小试验误差。

4 结论

近年来,植物源药物研究日益受到重视,充分利用我国药用植物资源,开发新的抑菌药物已成为药物研究领域的重要内容。南蛇藤广泛分布于我国^[18],近年来国内外对其化学成分的提取分离鉴定研究较多,并做了相应的药理活性试验^[9],有研究表明其中含有抑菌有效成分,其药用价值尚待开发^[18]。该项目研究发现,南蛇藤果实提取液抑制弧菌的生长,具有潜在的药用开发价值。为更合理地利用南蛇藤,应结合现代科学理论和先进的科技手段对其活性成分进行研究,从而为新药的开发提供理论依据。

参考文献

[1] 莫照兰. 养殖牙鲆细菌性疾病调查及鳃弧菌致病性研究[R]. 中国科学院海洋研究所博士后研究报告, 2001: 11-12.
[2] 谭翰清, 万成松. 副溶血性弧菌快速检测研究进展[J]. 华南预防医学, 2004, 30(1): 21-23.
[3] 林东明, 吴利楠, 杨福荣. 番禺区水产品副溶血性弧菌污染调查

[J]. 热带医学杂志, 2009(8): 973-974.
[4] 张明, 王建华, 赵毅, 等. 20 中草药对鳃弧菌的药敏试验[J]. 动物医学进展, 2005, 26(8): 77-79.
[5] 施云, 汪朋宇, 李瑾年. 等. 禽源致病性大肠埃希菌的耐药性与中草药有效成分的抑菌活性测定[J]. 中国微生态学杂志, 2009, 21(8): 727-729, 734.
[6] 傅文栋. 中草药及其有效成分体外抗菌抗病毒研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 2006(5): 66-67.
[7] 阎克里, 路平, 方翠芬. 等. 中药南蛇藤的研究进展[J]. 西北药学杂志, 2003, 18(4): 187-189.
[8] 马怀宇. 南蛇藤活性成分的研究[J]. 中国医药指南, 2006(12): 56-57.
[9] 杨蒙蒙, 佟丽. 南蛇藤化学成分及药理研究的进展[J]. 中药新药与临床药理, 2004, 15(3): 222-224.
[10] 暴增海, 孔德平, 王增池, 等. 抗弧菌海洋细菌的分离筛选及其抗菌作用测定[J]. 水产科学, 2009, 28(1): 24-27.
[11] 傅荣杰, 冯怡. 微波萃取技术在中药及天然产物提取中的应用[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(9): 804-807.
[12] 刘冬梅, 李理, 杨晓泉. 等. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(3): 110-111.
[13] 陈秀仁, 张怀有, 田锡义. 二甲基亚砜的性质和应用[J]. 辽宁化工, 2000, 29(1): 31-35.
[14] 梁玉珍, 王素贤, 曲曾禄. 等. 在二甲基亚砜-水不同配比的溶剂中对硫氰酸钴(II)络合物的紫外光度法研究[J]. 分析化学研究简报, 1993, 21(9): 1071-1074.
[15] 曹红峰, 宋靖芳, 李国庆. 等. 中草药对嗜水气单胞菌 ST-3-3 抑菌作用的研究[J]. 中医药导报, 2007, 13(5): 86-88.
[16] 刘玉庆, 张玉忠, 颜世敬. 等. 大肠杆菌和益生菌对抗生素和化学药物的敏感性试验[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2003, 34(2): 181-184.
[17] 曾健滢, 何耀松, 何春兰. 等. 金银花等 8 种中草药的体外抑菌试验[J]. 兽药与饲料添加剂, 2008, 13(1): 9-10.
[18] 张舰, 刘延庆, 戴小军. 南蛇藤组分对幽门螺杆菌的体外抑菌作用[J]. 2008, 28(12): 23-24.
[19] 杨蒙蒙, 佟丽. 南蛇藤化学成分及药理研究的进展[J]. 中药新药与临床药理, 2004, 15(3): 222-224.

Bacteriostasis *in vitro* on *Vibrio* spp. with *Celastrus orbiculatus* Fruit Extracts

HUANG Xiao-ling, LIU Qian-qian, YANG Zhen-mei, ZHANG Xian-feng, WANG Bing-qian, HAN Xiao-di
(Marine College Shandong University at Weihai, Weihai, Shandong 264209)

Abstract: The oxford cup plate method and two-fold dilution method *in vitro* were used to compare the antibacterial activity and MIC of ethyl acetate phase and water phase, ethanol-phase extraction of raw material on *Vibrio* spp. to exploring bacteriostasis *in vitro* of *Celastrus orbiculatus* fruit extracts on *Vibrio anguillarum*, *Vibrio parahaemolyticus*. The results showed that the MIC of the three kinds of extracts were 145.8, 208.3, 291.7 mg/mL (to *Vibrio anguillarum*) and 125.0, 187.5, 208.33 mg/mL (*Vibrio parahaemolyticus*), respectively. The three kinds of extract of the *Celastrus* fruits had different degrees of inhibition on *Vibrio anguillarum* and *Vibrio parahaemolyticus*. The ethyl acetate extract showed the best inhibitory effect, followed by the extract of water phase and alcohol phase.

Key words: *Celastrus orbiculatus*; *Vibrio anguillarum*; *Vibrio parahaemolyticus*; bacteriostasis