

天然药物五倍子提取物对致龋菌生长的影响

谢 倩,李继遥,左渝陵,周学东

(口腔生物医学工程教育部重点实验室,四川大学,四川 成都 610041)

[摘要] 目的 研究五倍子中分离得到的不同组分对致龋菌生长的影响,以期寻找五倍子防龋的有效成分。方法 通过系统溶剂法对五倍子总鞣质分离得到 4 个组分,采用液体稀释法研究五倍子不同组分对 6 种主要致龋菌(变形链球菌,血液链球菌,唾液链球菌,内氏放线菌,粘性放线菌,乳酸杆菌)生长的影响,并使用活菌计数法测量五倍子总鞣质及 1 和 3 组分对变形链球菌生长的影响。结果 五倍子总鞣质对细菌生长的抑制作用最强;五倍子分离物中 2,4 组分对实验菌的抑制作用较分离物中 1,3 组分强,与总鞣质相当;五倍子 1 和 3 组分对变形链球菌生长均有较好的抑制作用,作用 1 h 后效果更明显。结论 五倍子各组分对实验菌都有一定的抑制作用,五倍子对变形链球菌的抑制作用可能通过抑制细菌代谢所需的酶类而产生,而对细菌没有直接杀灭作用。

[关键词] 五倍子; 龋病; 变形链球菌

[中图分类号] R 781.1 [文献标识码] A

The Effect of Galla Chinensis on the Growth of Cariogenic Bacteria in Vitro XIE Qian, LI Ji-yao, ZUO Yu-lin, ZHOU Xue-dong. (Key. Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** The purples of this study was to investigate the role of different components of Galla Chinensis extract on the growth of 6 kinds of cariogenic bacteria, and to find out the most effective components of Galla Chinensis extract. **Methods** Four different components (GCE1, GCE2, GCE3 and GCE4) were separated from Galla Chinensis and there antibacterial activities to *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sanguis* ATCC 10556, *Streptococcus salivarius* SS 196, *Actinomyces naeslundii* WVU 627, *Actinomyces viscosus* ATCC 19246 and *Lactobacillus rhamnosus* AC 413 were checked. There effects on the growth curve of *Streptococcus mutans* ATCC 25175 were also investigated. **Results** The most effective part of Galla Chinensis was found to be GCE2 and GCE4, which were found to be a mixture of polyphenol-rich fractions. All of the different components had an inhibitory effect to the growth of *Streptococcus mutans* ATCC 25175. **Conclusion** All of the 4 different components of Galla Chinensis extract could inhibit the growth of the tested bacteria. These results suggest that the antibacterial activity of Galla Chinensis extract is caused by a synergistic effect of monomeric polyphenols, which can easily bind to proteins.

[Key words] Galla Chinensis; caries; *Streptococcus mutans*

对龋病的预防一直是龋病学研究者们关注的焦点,在过去 30 年中已进行了不少防治龋病的药物研究。抗生素类如青霉素、红霉素、四环素及螺旋霉素等,虽具有一定的防龋效果,但长期使用可引起口腔及肠道菌群失调而导致其他疾病;免疫防龋面临着增强免疫原性与生物活性的问题,同时对口腔菌群生态影响的问题仍亟待解决;氟化物防龋是研究最多且广为认可的方法,但其应用仍有诸多局限性,如氟浓度的稳定性、毒副作用以及口腔耐氟菌株的产生等问题尚未解决。因此,寻找安全而又有效的防龋药物已成为龋病防治研究的重点。

近年来国内外许多学者致力于防龋药物的研究,

有的从化学与生物制剂中寻求,有的则从天然药物中分离活性成分。天然药物包括植物药、动物药和矿物药等,其来源丰富,取材方便,用法简单,疗效显著且副作用甚微,有着广泛的临床应用基础。研究发现¹,五倍子水煎剂对变形链球菌的生长产酸有一定的抑制作用;对口腔致龋菌的体外实验研究也表明²,五倍子可抑制变形链球菌的产酸、粘附,并可阻止龋病的进一步发展。但是目前的研究都只停留于使用五倍子的粗体物,如水提物、醇提物,剂型粗糙,未能鉴定五倍子的抗龋药效活性成分,本研究拟采用现代分离方法,对五倍子具体有效成分进行研究。

1 材料和方法

1.1 五倍子提取物的制备

称取五倍子粉 1 000 g,以去离子水 3 000 ml 60~70℃ 恒温水浴 10 h,振摇 过滤 滤液重复上述

[收稿日期 2004-09-10; 修回日期 2004-10-28]

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(30430800)

[作者简介]谢 倩(1977-),女,四川人,博士

[通讯作者]周学东, Tel: 028-85501439

操作,合并两次滤液,加活性炭 50 g,60 搅拌加热半小时,放置过夜,过滤,滤液浓缩至干即得淡黄色五倍子总鞣质(Galla Chinensis extract, GCE)约 160 g。

取总鞣质 5 g,使其溶解后通过葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20(凝胶用量 200 g)。以水-甲醇系统梯度洗脱,收集各组分,硅胶 G 薄层板点样检查合并各组分(展开系统为氯仿-甲醇-甲酸=40:10:0.5,磷钼酸显色)。按洗脱先后顺序先后得到 4 个组分,五倍子 1(GCE1),五倍子 2(GCE2),五倍子 3(GCE3),五倍子 4(GCE4)。经过高效液相色谱,光谱分析($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$),其中五倍子 1 及五倍子 3 分别为没食子酸及没食子酸甲酯;而五倍子 2、五倍子 4 含量少,极不稳定,在空气中易变色。

1.2 实验菌株及菌液制备

变形链球菌 *Streptococcus mutans* ATCC 25175, 血链球菌 *Streptococcus sanguis* ATCC 10556, 唾液链球菌 *Streptococcus salivarius* SS 196, 内氏放线菌 *Actinomyces naeslundii* WVU 627, 粘性放线菌 *Actinomyces viscosus* ATCC 19246, 乳酸杆菌 *Lactobacillus rhamnosus* AC 413 由口腔生物医学工程教育部重点实验室(四川大学)提供。将复苏 48 h 的菌种接种于 TPY 液体培养基, 80 %N₂、20 %CO₂、37 下厌氧培养 18 h,涂片检查为纯培养后将菌液在 4 下 3 000 r/min 离心 15 min,收集细菌,无菌生理盐水洗菌 2 次,并用无菌生理盐水调整,使菌悬液 540 nm 处吸光度 OD 为 1.0,备用。

1.3 五倍子精提物及各组分对各菌的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)的测定

使用 96 孔板法测定药物对 6 种细菌的 MIC。将五倍子总鞣质及各不同组分按 2 倍稀释法溶于含 1 %葡萄糖的 TPY 液体培养基中,使其生药终浓度达到 16 000、8 000、4 000、2 000、1 000、500、250、125、63 mg/L。按配制的菌液与含药的 TPY 液体培养基 1:1 比例分别接种 6 种细菌于 96 孔板中,80 %N₂、20 %CO₂、37 下厌氧培养 48 h。以肉眼观察无细菌生长的最低药物浓度为其 MIC 值。

1.4 五倍子精提物及各组分对变形链球菌生长的影响

使用活菌计数法测量五倍子精提物及 GCE1, GCE3, GCE1 及 GCE3 混合物(重量比为 1:1)对变形链球菌生长的影响。以 0.05 %洗必泰溶液为阳性对照,以 TPY 液体培养基为阴性对照。将五倍子精提物及各组分配制成为含有五倍子药物的 TPY 液体培养基,浓度为 8 g/L。将复苏 48 h 的菌种接种于 TPY 液体培养基中,80 %N₂、20 %CO₂、37 下厌氧培养 18 h,涂片检查为纯培养后使用比浊仪,调整菌悬液最终浓度达到 5×10^7 cfu/ml,按菌悬液与 TPY 液体培养基

1:10 比例将细菌接种于含有五倍子药物的 TPY 液体培养基中,80 %N₂、20 %CO₂、37 下厌氧培养。分别于培养 5、10、30 min,1、2、4、6、18、24 h 提取菌液, PBS 缓冲液梯度稀释后取 5 μl 菌液接种于 TPY 固体培养基上,80 %N₂、20 %CO₂、37 下厌氧培养 48 h 后计算活菌菌落计数(cfu/ml),以活菌数(lg cfu/ml)为纵坐标,时间为横坐标,作图绘制生长曲线。活菌计数减少 99.9 %即差异 ≥ 3 lg cfu/ml 者视为有杀菌作用,活菌计数减少 1~3 lg cfu/ml 者视为有抑菌作用³。

2 结果

2.1 五倍子精提物及各组分的 MIC 值

五倍子精提物及各组分对致龋菌生长的 MIC 值见表 1,从表 1 可以看出,五倍子 2、4 对实验菌株的抑制作用较五倍子 1、3 更强,但是与五倍子总鞣质抑菌作用相当。

表 1 五倍子精提物及各组分对致龋菌生长的 MIC 值(g/L)

Tab 1 The MIC values of Galla Chinensis extract(g/L)					
细菌	五倍子总鞣质	五倍子 1	五倍子 2	五倍子 3	五倍子 4
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	8	8	4	4	8
<i>Streptococcus sanguis</i> ATCC 10556	8	16	8	16	8
<i>Streptococcus salivarius</i> SS 196	8	8	8	8	8
<i>Actinomyces naeslundii</i> WVU 627	8	4	4	8	8
<i>Actinomyces viscosus</i> ATCC 19246	4	8	8	4	4
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> AC 413	8	16	8	16	8

2.2 五倍子精提物及各组分对变形链球菌生长的影响

五倍子提取物对变形链球菌生长的影响见图 1,从图 1 可以看到五倍子 1+3 对于细菌生长的抑制作用最强,但是各组对变形链球菌生长均有较好的抑制作用,在 1 h 后作用更明显。而在 0.05 %洗必泰溶液中细菌的生长被完全抑制。

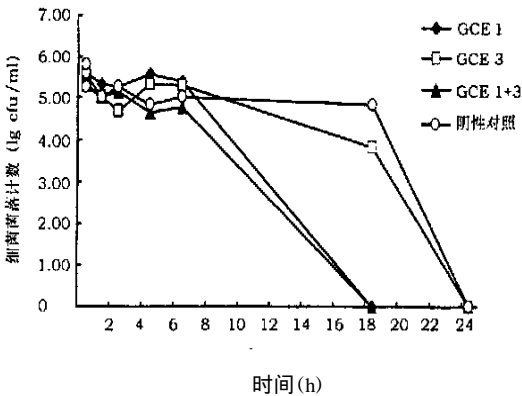


图 1 五倍子提取物对变形链球菌生长的影响

Fig 1 The effect of Galla Chinensis extracts on the growth curve of *Streptococcus mutans*

3 讨论

研究表明,许多天然药物都具有较强的防龋作用,如茶多酚等能抑制口腔细菌的产糖与产酸能力。天然药物五倍子是一种五倍子虫刺伤盐肤木叶子而生成的虫瘿,具有收敛止血的作用。国内研究表明五倍子水提物对一些致龋菌的生长、产糖、产酸及对羟磷灰石的粘附有抑制作用⁴,对牙本质龋胶原的分解有抑制作用⁵。然而这些研究使用的都是五倍子的粗提物,对五倍子的有效成分的研究尚未见报道。本实验通过使用 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶从五倍子鞣质中分离得到 4 个组分,通过测量其最低抑菌浓度发现他们在抗菌活性上差异不大,其中五倍子 1 及五倍子 3 经鉴定,分别为没食子酸及没食子酸甲酯,并发现其对口腔致龋菌的生长具有明显的抑制作用。而五倍子 2 及五倍子 4 由于含量少,极不稳定,目前无法进行进一步的分离纯化。因此在对变形链球菌生长的影响研究中没有使用五倍子 2 和五倍子 4。

五倍子鞣质及五倍子 1、3 组分在 6 h 以内对变形链球菌都只能起到抑制作用,而没有明显的杀菌作用,而洗必泰作为一种口腔科常用消毒剂在很短的时间内就杀死了细菌。提示,使用五倍子作为口腔用药对细菌仅仅有抑制其生长增殖的作用,而不会全面杀死细菌,从而能够有效维持口腔内细菌的微生态平衡。据文献报道五倍子的主要成分为水解性没食子鞣酸,因此推测,五倍子 2、4 的主要成分为没食子鞣酸。已有很多研究证明²,鞣质可抑制口腔中变形链球菌、粘性放线菌、唾液链球菌等多种细菌的生长,可降低牙菌斑的聚集,抑制葡糖基转移酶活性,进而影响致龋菌生长代谢。研究证实没食子鞣酸成分能通

过抑制细菌产生水不溶性胞外多糖的关键酶——葡糖基转移酶的活性,在菌斑形成的早期能减少粘附细菌的数量,也可通过细菌间的相互聚集而从口腔中清除。五倍子鞣质的这些作用可能是它与蛋白质结合而使之沉淀,也就是鞣质的收敛性所致⁶。这些结果与本实验的研究结果一致,可以推测,五倍子对细菌的抑制作用主要通过抑制细菌代谢所需的酶类而产生,而对细菌没有直接杀灭作用。

根据以上实验结果,可以认为五倍子鞣质及其各成分均能抑制口腔致龋菌的生长,其最小抑菌浓度在 8 g/L 左右。五倍子鞣质成分的分析发现其中含有没食子酸及没食子酸甲酯,并且这两种成分都有抑制口腔细菌生长的作用。五倍子中可能还含有其他协同作用的成分,有待进一步研究证实。

[参考文献]

- 1 熊炎斌,李德玲,刘持平,等.几种植物药对变形链球菌生长、产酸、粘附影响的体外实验 J. 中华口腔医学杂志,1997,32(5):261.
- 2 黄正蔚,周学东,李继遥,等.中药五倍子对口腔致龋菌影响的体外实验研究 J. 华西药学杂志,2002,17(2):104-106.
- 3 Eliopoulos GM, Moellering RC Jr. Antimicrobial combinations in antibiotics in laboratory medicine. 3rd ed. Baltimore: Williams and Wilkins Co, 1991:432-449.
- 4 肖悦,刘天佳,黄正蔚,等.茶多酚对口腔细菌致龋力影响的实验研究 J. 广东牙病防治,2002,10(1):4-6.
- 5 李艳君,唐荣银,吕昕,等.五倍子提取液对牙本质龋损时胶原蛋白分解的影响 J. 牙体牙髓牙周病学杂志,2002,12(5):252-254.
- 6 石碧,狄莹,何有节,等.鞣质的药理活性 J. 中草药,1998,29(7):487-490.

(本文编辑 汤亚玲)

中外著名医学出版机构携手推出《国际牙科名著系列》

从当今世界口腔出版领域中享有盛名的国际精萃出版集团(International Quintessence Publishing Group)引进的《国际牙科名著系列》,已由人民军医出版社国际口腔医学出版中心推出首批中文版系列。2005 年 1 月 18 日,人民军医出版社、中华口腔医学会和国际精萃出版集团在人民大会堂隆重举行了新闻发布会。与此同时,人民军医出版社国际口腔医学出版中心正式宣布成立。

《国际牙科名著系列》首批图书共 9 本,由国际知名口腔专家执笔,中华口腔医学会张震康会长作序,国内具有多年临床经验和丰富专业理论知识的专家进行挑选并翻译,参照国际标准制作出版。这批专著都是口腔领域内的畅销经典。该套图书紧紧着眼于我国口腔界的实际需求,重点介绍国外口腔医学的最新技术和方法,特别适合于我国口腔医务工作者在口腔实践中进行学习和实际应用。

我社国际口腔医学出版中心衷心希望各位专家不吝赐稿,另外,本中心还备有 Quintessence 出版集团 2005 年的英文原版书目,欢迎来信或来电索取。

人民军医出版社国际口腔医学出版中心:

主任:杨化兵;编辑:杨淮,靳澎

电话:010-51927291 或总机:51927300 转 8025/8027/8133

传真:010-51927290

E-mail: editor-yang @163.com