

[文章编号] 1000-1182(2009)05-0542-03

# 甘草水煎剂对变异链球菌生长和产酸影响的体外研究

张菲菲 何永红 温艳丽 马琴睿 刘果 万呼春

(口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041)

**[摘要]** 目的 研究甘草水煎剂对体外培养的变异链球菌的抗菌活性。方法 取粒径为0.2~3.2 mm的甘草颗粒加去离子水煎煮后过滤, 滤液为实验用甘草水煎剂。采用液体稀释法测定甘草水煎剂对变异链球菌的最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)。在不同浓度甘草水煎剂中培养变异链球菌, 分别于培养0、3、7、12、23、40 h时测定细菌悬液光密度值和培养液pH值, 绘制变异链球菌的生长曲线和产酸曲线。结果 甘草水煎剂对变异链球菌的MIC为50 mg·mL<sup>-1</sup>, 浓度小于等于100 mg·mL<sup>-1</sup>的甘草水煎剂对变异链球菌无杀菌作用。甘草水煎剂对变异链球菌生长的抑制作用随浓度的增加而增强。甘草水煎剂对变异链球菌的产酸有一定的抑制作用, 在培养12 h时抑制作用最强。结论 甘草水煎剂对体外培养的变异链球菌生长和产酸均有抑制作用。

**[关键词]** 龋病; 变异链球菌; 甘草

**[中图分类号]** R 780.2 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2009.05.019

**Effect of decoction of Radix glycyrrhizae on the growth and acid-production of *Streptococcus mutans* in vitro** ZHANG Fei-fei, HE Yong-hong, WEN Yan-li, MA Qin-rui, LIU Guo, WAN Hu-chun. (State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the antibacterial activity of decoction of Radix glycyrrhizae against *Streptococcus mutans*(*S.mutans*) in vitro. **Methods** The decoction of Radix glycyrrhizae was prepared by boiling particles of Radix glycyrrhizae, the diameter was 0.2-3.2 mm. In distilled water and filtered, the filtrate was collected for study. The minimal inhibitory concentration(MIC) and the minimal bactericidal concentration(MBC) of the decoction against *S.mutans* were detected using double dilution. The effect of decoction on growth and acidogenic profile of *S.mutans* were investigated by detecting the Abs of bacteria suspension and the pH value of medium at definite time intervals(0, 3, 7, 12, 23, 40 h) during cultured. **Results** The MIC determined for decoction was 50 mg·mL<sup>-1</sup> and there was no bactericidal effect when concentration of decoction lower than 100 mg·mL<sup>-1</sup>. The decoction inhibited multiplication of bacteria significantly and the effects became stronger with concentration increasing. The decoction also inhibited *S.mutans* producing acid and the effect became stronger with concentration increasing. The most efficient inhibition were observed when incubated 12 hours. **Conclusion** The decoction of Radix glycyrrhizae can inhibit the growth and acid-production of *S.mutans* in vitro.

**[Key words]** caries; *Streptococcus mutans*; Radix glycyrrhizae

甘草为豆科甘草属植物, 是全世界广泛使用的草本药物<sup>[1]</sup>。变异链球菌(*Streptococcus mutans*, *S.mutans*)是口腔主要的致龋菌之一<sup>[2]</sup>, 有研究显示含有甘草及其他中药的混合物的水煎剂对变异链球菌生长有抑制作用<sup>[3-6]</sup>。本实验旨在探讨单纯甘草水煎剂对变异链球菌生长及产酸的影响, 进一步探索甘

草在龋病防治中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料和仪器

变异链球菌国际标准株ATCC 25175(四川大学口腔疾病研究国家重点实验室提供), TPY液体/固体培养基、甘草根(四川大学华西医院中药房提供), DY-2型厌氧培养箱(浙江义乌冷冻机总厂), AV1601紫外分光光度计(岛津公司, 日本), 所有实验用水均为去离子水。

[收稿日期] 2009-03-30; [修回日期] 2009-05-13

[作者简介] 张菲菲(1983—), 女, 山东人, 硕士

[通讯作者] 万呼春, Tel: 028-61153339

## 1.2 方法

1.2.1 细菌的培养及菌液制备 将-80℃保存的变异链球菌复苏后接种于TPY琼脂平板, 37℃厌氧(80% N<sub>2</sub>、10% H<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>)培养24 h, 涂片镜检后挑单菌落接种TPY液体培养基, 37℃厌氧培养24 h, 收集菌液, 调节菌浓度为 $6.0 \times 10^5$  CFU·mL<sup>-1</sup>。

1.2.2 甘草水煎剂的制备 取甘草根打碎, 用标准检验筛筛选粒径为0.2~3.2 mm的颗粒, 称取此颗粒10 g, 加去离子水120 mL浸泡30 min, 100℃加热2 h, 过滤, 收集滤液, 用去离子水定容至50 mL, 此液浓度为200 mg·mL<sup>-1</sup>。

1.2.3 甘草水煎剂最低抑菌浓度和最低杀菌浓度的测定 用制备的甘草水煎剂配制TPY培养液(简称甘草药液)。采用液体稀释法<sup>[2]</sup>测定最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC), 具体方法为: 在96孔板中甘草药液从100 mg·mL<sup>-1</sup>浓度开始进行二倍稀释序列, 序列中甘草药液最低浓度为0.2 mg·mL<sup>-1</sup>。每孔甘草药液和菌液各100 μL, 37℃厌氧培养48 h, 肉眼观察无细菌生长的甘草药液最低浓度为MIC<sup>[2]</sup>。同时设阴性对照组和阳性对照组, 阴性对照组为甘草药液和TPY液各100 μL, 其药物浓度对应实验组药物浓度; 阳性对照组为TPY液和菌液各100 μL。每个浓度设3个平行孔。

取肉眼观察清亮的实验组孔中的液体, 划线接种于TPY平板, 37℃厌氧培养48 h, 无细菌生长的最低药物浓度为最低杀菌浓度(minimal bactericidal concentration, MBC)<sup>[2]</sup>。

1.2.4 甘草水煎剂对变异链球菌生长的影响 根据甘草水煎剂的MIC测定结果, 选取MIC值及其上1个浓度和下2个浓度的甘草药液。甘草药液实验组为药液和菌液各100 μL, 同时设阴性对照组和阳性对照组, 阴性对照组为甘草药液和TPY液各100 μL, 其药液浓度对应甘草组药液浓度; 阳性对照组为TPY液和菌液各100 μL。每组设5个平行孔, 37℃厌氧培养, 分别于培养0、3、7、12、23、40 h时在590 nm处测定光密度值(A值), 绘制细菌生长曲线并计算生长抑制率, 阳性对照组生长抑制率为零, 生长抑制率计算公式为:  $\text{生长抑制率} = (A_{\text{阳性}} - A_{\text{样本}}) / A_{\text{阳性}} \times 100\%$ 。

1.2.5 甘草水煎剂对变异链球菌产酸的影响 根据甘草水煎剂的MIC测定结果, 选取MIC值及其上下各1个浓度配制甘草药液。取5 mL试管126支, 平均分为7组, 即3个甘草药液实验组及其对应的3个阴性对照组和1个阳性对照组, 每组每个时间点3支平行管。甘草药液实验组每管甘草药液和菌液各1 mL, 阴性对照组每管甘草药液和TPY液各1 mL, 阳性对

照组每管TPY液和菌液各1 mL。37℃厌氧培养, 分别于培养0、3、7、12、23、40 h时测定各管上清液的pH值, 绘制细菌产酸曲线并计算产酸抑制率, 阳性对照组的产酸抑制率为零, 产酸抑制率计算公式为:  $\text{产酸抑制率} = (\Delta \text{pH}_{\text{阳性}} - \Delta \text{pH}_{\text{样本}}) / \Delta \text{pH}_{\text{阳性}} \times 100\%$ ,  $\Delta \text{pH}_{\text{阳性}} = \text{pH}_{\text{阴性}} - \text{pH}_{\text{阳性}}$ ,  $\Delta \text{pH}_{\text{样本}} = \text{pH}_{\text{阴性}} - \text{pH}_{\text{样本}}$ 。

## 2 结果

### 2.1 甘草水煎剂最低抑菌浓度和最低杀菌浓度的测定结果

实验结果显示, 甘草水煎剂对变异链球菌的MIC为50 mg·mL<sup>-1</sup>。浓度小于等于100 mg·mL<sup>-1</sup>的甘草水煎剂对变异链球菌无杀菌作用。

### 2.2 甘草水煎剂对变异链球菌生长的影响

甘草水煎剂呈淡褐色, 在以A值绘制细菌生长曲线时, 应扣除甘草水煎剂本底A值的影响。浓度分别为100、50、25、12.5 mg·mL<sup>-1</sup>的甘草药液阴性对照组在各浓度组内不同时间点测得的A值基本一致, 组内变异系数(CV)均小于5%; 在各时间点, 不同浓度之间的A值差异较大, 组间CV均大于30%。因此, 以4个阴性对照组组内A值的平均值作为对应药物浓度甘草组的扣除本底值。

甘草水煎剂对变异链球菌生长抑制作用的结果见图1。由图1可见, 阳性对照组细菌在培养约12 h后进入对数生长期, 培养约23 h后增殖趋于平缓。甘草水煎剂对变异链球菌的生长增殖有明显的抑制作用, 此作用随甘草水煎剂浓度的增加而增强。培养23 h时, 浓度为100、50、25、12.5 mg·mL<sup>-1</sup>的甘草水煎剂对变异链球菌的生长抑制率分别为99.82%、98.69%、49.24%和37.94%。

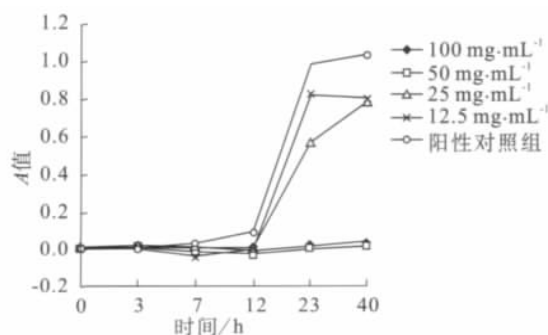


图1 甘草水煎剂对变异链球菌生长抑制作用曲线

Fig 1 Inhibitory effect of decoction of Radix glycyrrhizae on the growth of *S. mutans*

### 2.3 甘草水煎剂对变异链球菌产酸的影响

浓度分别为100、50、25 mg·mL<sup>-1</sup>的甘草药液阴性对照组在各时间点测得的pH值基本一致, 各浓度组内不同时间点和各时间点不同浓度之间pH值的CV均小于1.5%, 因此, 以此3个阴性对照组各测定

时间点的组间均值作为整个实验的阴性对照。

甘草水煎剂对变异链球菌产酸的影响见图2。由图2可见,阳性对照组在培养约7h后培养基pH值急剧下降,12 h时pH值即降至5以下,此后下降趋于平缓。阴性对照组的pH值在整个培养阶段无明显变化,均维持在7左右。甘草水煎剂对变异链球菌的产酸有一定的抑制作用,在12 h时3个实验组抑制作用最强,在23 h时50、25 mg·mL<sup>-1</sup>的抑制作用骤然减弱,在40 h后100 mg·mL<sup>-1</sup>的抑制作用也变得很微弱。培养12 h时,100、50、25 mg·mL<sup>-1</sup>甘草水煎剂对变异链球菌的产酸抑制率分别为83.9%、72%、67.4%;培养23 h时,100、50、25 mg·mL<sup>-1</sup>甘草水煎剂对变异链球菌的产酸抑制率分别为77.4%、9.5%、-17.6%。

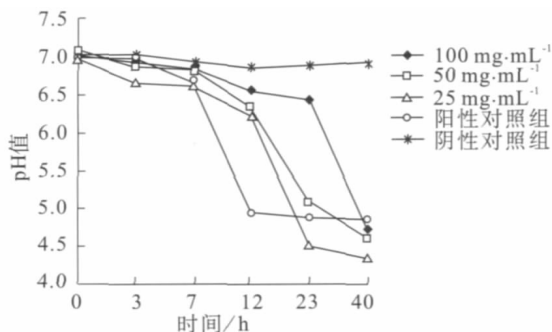


图2 甘草水煎剂对变异链球菌产酸的影响

Fig 2 Inhibitory effect of decoction of Radix glycyrrhizae on the acid-production of *S.mutans*

### 3 讨论

水煎剂是中国草本药物在治疗中最常用的形式,单纯用水煎煮不会在提取物中混入其他干扰物质,故本研究选用去离子水煎煮提取甘草的有效物质。

有研究显示金银花、紫花地丁和甘草等7味中药组成的混合物的水煎剂对变异链球菌的MBC为7.812 5 mg·mL<sup>-1</sup>[6]。甘草的65%乙醇提取物对变异链球菌的MIC、MBC为3.91 mg·mL<sup>-1</sup>、15.63 mg·mL<sup>-1</sup>[3]。本实验结果显示单纯的甘草水煎剂对变异链球菌的MIC为50 mg·mL<sup>-1</sup>,其对变异链球菌的抑制作用主要出现在细菌进入对数生长期后,且抑制作用随水煎剂浓度提高而增强,50 mg·mL<sup>-1</sup>以上浓度的抑制率达到98%以上,12.5 mg·mL<sup>-1</sup>的抑制率也达到30%。100 mg·mL<sup>-1</sup>水煎剂仍未显示有杀菌作用,提示甘草水煎剂通过抑制变异链球菌增殖使细菌总数减少。

变异链球菌可代谢产生乳酸、乙酸等多种酸类,使菌斑pH值持续低于临界pH值(5.0~5.5)而导致牙体硬组织酸蚀脱矿,最终导致龋病的形成和发展[7]。本实验结果显示变异链球菌尚处于生长迟缓

期时,其产酸作用已经开始,当进入对数期时,产酸基本达到最大限度,然后维持稳定,说明变异链球菌产酸具有时间早、速度快的特点。甘草水煎剂对变异链球菌产酸存在抑制作用,在细菌刚进入对数期时最强,细菌进入稳定期后,实验所用水煎剂即失去对细菌产酸的抑制作用。结果提示,在变异链球菌增殖仍受到甘草水煎剂抑制的情况下,其产酸能力却从受抑制中逐渐恢复,说明甘草水煎剂对变异链球菌产酸的抑制作用可能不是通过抑制细菌增殖而产生的。变异链球菌通过透性酶转运系统和磷酸酶转运系统将糖由胞外转入胞内,在氧不足时通过乳酸脱氢酶生成乳酸,甘草水煎剂可能通过影响变异链球菌与产酸有关的酶的活性而抑制其产酸,同时这种抑制作用是可逆的。而变异链球菌产酸能力的恢复,是由于药物有效成分被耗尽,还是变异链球菌对药物产生了适应,值得进一步研究。

### 【参考文献】

- [1] Fiore C, Eisenhut M, Ragazzi E, et al. A history of the therapeutic use of liquorice in Europe[J]. J Ethnopharmacol, 2005, 99 (3) :317-324.
- [2] 周学东,肖晓蓉. 口腔微生物学[M]. 成都:四川大学出版社, 2002 :107.  
ZHOU Xue-dong, XIAO Xiao-rong. Oral microbiology[M]. Chengdu: Sichuan University Publishing House, 2002 :107.
- [3] 黄冰冰,樊明文,杨祥良,等. 桔梗、甘草及其组成的复方对口腔病原菌生长影响的体外实验[J]. 实用口腔医学杂志, 2003, 19 (2) :148-150.  
HUANG Bing-bing, FAN Ming-wen, YANG Xiang-liang, et al. Effects of Platycodon grandiflorum, Glycyrrhiza uralensis Fisch or the compound of both on the growth of oral pathogens *in vitro* [J]. J Pract Stomatol, 2003, 19(2) :148-150.
- [4] He J, Chen L, Heber D, et al. Antibacterial compounds from Glycyrrhiza uralensis[J]. J Nat Prod, 2006, 69(1) :121-124.
- [5] Tsukiyama R, Katsura H, Tokuriki N, et al. Antibacterial activity of licochalcone A against spore-forming bacteria[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(5) :1226-1230.
- [6] 沈家平,陆平成,王一均. 中药提取物对牙周病相关致病菌和部分致龋菌杀菌作用的体外研究[J]. 江苏中医药, 2007, 39(8) : 76-77.  
SHEN Jia-ping, LU Ping-cheng, WANG Yi-jun. Study on the bactericidal effect of Chinese herbs on periodontal and carious pathogenic microbes *in vitro*[J]. Jiangsu J Trad Chin Med, 2007, 39(8) :76-77.
- [7] Xiao J, Liu Y, Zuo YL, et al. Effects of Nidus Vespae extract and chemical fractions on the growth and acidogenicity of oral microorganisms[J]. Arch Oral Biol, 2006, 51(9) :804-813.

(本文编辑 王晴)