

甘蔗叶黄酮类成分的抗致龋菌活性研究

Study on Anticaries Activity of Flavonoids in Sugarcane Leaves

赖秀娟, 蓝丽华, 尹 茵

LAI Xiu-juan, LAN Li-hua, YIN Yin

(广西博科药业有限公司, 广西南宁 530003)

(Boke Pharmaceutical Co., Ltd., Nanning, Guangxi, 530003, China)

摘要: 为了考察甘蔗叶总黄酮及其各化学组分对致龋菌生长的抑制作用, 采用 96 孔板法, 测定甘蔗叶总黄酮及其各化学组分对主要致龋菌的最低抑菌浓度和杀菌浓度。结果表明: 30% 乙醇流份(S₂)和 50% 乙醇流份(S₃)对变异链球菌 (*Streptococcus mutans*) ATCC 10387 抑菌效果与阳性对照药茶多酚(EGCG)相当, 最小抑菌浓度均为 $4 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$; 95% 乙醇流份(S₅)及 0.1% 乙酸醇液(S₆)对变异链球菌 ATCC 10387 和粘性放线菌 (*Actinomyces viscosus*) ATCC 19246 的最小抑菌浓度, 与阳性对照药 EGCG 抑菌效果相当, 均为 $1 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ 。S₆ 对变异链球菌 ATCC 10387 杀菌效果, 与阳性对照药 EGCG 相当, 均为 $4 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ 。总黄酮和水洗脱流份(S₁)对 2 种致龋菌无杀菌作用。甘蔗叶黄酮类成份具有一定的抗致龋菌活性。

关键词: 甘蔗叶 总黄酮 致龋菌 MIC MBC

中图法分类号: R284.2, R78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9164(2013)03-0261-03

Abstract: To study the inhibitive effect on cariogenic bacterial growth of the flavonoids extracted from the leave (flavonoids S₁) and the other parts (flavonoids S₂~S₆) of sugarcane. The 96-well plate method was applied to measure the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) on the main cariogenic bacteria of these flavonoids. With $1 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ of MIC, 30% ethanol fraction (S₂) and 50% ethanol fraction (S₃) exerted bacteriostatic actions on *Streptococcus mutans* ATCC 10387, which was equal to the positive control drug (EGCG). With $4 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ of MIC, 95% ethanol fraction (S₅) and 0.1% ethyl alcohol solution (S₆) had activities on *Streptococcus mutans* ATCC 10387 and *Actinomyces viscosus* ATCC 19246, which was corresponding to the positive control EGCG. With $4 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ of MBC, the bactericidal effect of S₆ on *Streptococcus mutans* ATCC 10387 was equal to the EGCG. No bactericidal effect of the water elution fraction (S₁) on these two types of cariogenic bacteria was observed. The results show that sugarcane leaf flavonoids have anti-cariogenic bacterial activity to some extent.

Key words: sugarcane leaf, flavonoids, cariogenic bacterial, MIC, MBC

甘蔗 (*Saccharum sinensis* Roxb.) 为禾本科甘蔗属的多年生植物, 广泛种植于海拔 1600m 以下的温带及热带地区。我国甘蔗的种植主要分布于广西、广东、台湾、福建及云南等省区, 其中广西的甘蔗产量占全国一半以上^[1]。甘蔗叶含有丰富的黄酮类成分, 国内文献报道其总黄酮含量约为 $3.87 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ ^[2], 国外报道平均含量达 $1.70 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ ^[3]。

此外, 甘蔗叶中还含有多糖^[4], 叶绿素^[5] 及维生素 C^[6] 等成份。

目前对于致龋菌包括哪些菌株, 学者们的意见还不一致, 但对致龋菌的研究多集中于变异链球菌 (*Streptococcus mutans*)、粘性放线菌 (*Actinomyces viscosus*) 及血液链球菌 (*Sanguinem clostridium*) 等^[7]。本文研究甘蔗叶黄酮类物质对致龋菌的作用, 为合理开发和利用甘蔗叶资源提供研究基础。

收稿日期: 2013-01-26

修回日期: 2013-07-29

作者简介: 赖秀娟 (1979-), 女, 助理工程师, 主要从事药品管理工作。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实 验 材 料

甘蔗叶为桂糖 11 号,采自南宁市马山县百龙滩镇。实验菌株:变异链球菌 ATCC 10387 和粘性放线菌 ATCC 19246 均由四川大学华西口腔医学院提供。实验药物:茶多酚(EGCG)购于成都普瑞法科技开发有限公司;甘蔗叶总黄酮,水洗脱流份(S_1),30%乙醇流份(S_2, S_3),70%乙醇流份(S_4),95%乙醇流份(S_5)及 0.1%乙酸醇液(S_6)均由甘蔗叶提取制备。

1.1.2 实 验 仪 器

UV-2450 型紫外分光光度计为日本岛津制作所产品,FA1104N 型电子天平为上海天平仪器厂产品,旋转蒸发仪为上海亚荣生化仪器厂产品,SW-CJ-2FD 型净化工作台为苏州安泰空气技术有限公司产品,HH·B11-S-II 温度控制仪电热恒温培养箱为上海跃进医疗器械厂产品,LS-B50L 型立式压力蒸汽灭菌器为上海华线医用核子仪器有限公司产品,Multiskan MK3 全自动酶标仪为美国热电产品,MB100-2A 微孔板恒温振荡器为杭州奥盛仪器仪表有限公司产品,厌氧培养袋、 CO_2 产气袋、氧气指示袋为日本三菱产品,96 孔板为美国康宁产品。

1.1.3 实 验 试 剂

TLC 聚酰胺薄-6-薄膜(8cm×8cm)和聚酰胺粉 100~200 目为上海国药集团产品,葡聚糖凝胶 LH-20 为美国进口分装,AB-8 大孔树脂为天津市光复精细化工研究所产品,BHI(Brian Heart Infusion)培养基为北京陆桥技术有限责任公司产品。

石油醚、乙酸乙酯、氯仿、丙酮、甲醇、无水乙醇、95%乙醇、乙酸、三氯化铝、氢氧化钠、盐酸、二甲基亚砷、氢氧化钠均为分析纯,水为超纯水。

1.2 实 验 方 法

1.2.1 菌 株 的 复 苏

取冻干菌种管,用砂轮在冻干菌种管颈部划刻,再将壁用 75%乙醇擦洗消毒,稍干之后,将菌种管划刻端在火焰上烧灼红热,用灭菌滴管吸取 BHI 培养基滴在灼热处,使管口骤冷而炸裂。取灭菌镊子将炸裂的管口打开,吸取适量 BHI 培养基加至菌种管底部,将冻干菌混匀溶解,最后将菌液吸入装有 6ml BHI 的无菌试管中,随即放入厌氧培养袋,37℃恒温培养 48h。同时菌液划线接种于 BHI 平板以便观察和镜检判断。

1.2.2 菌 株 的 传 代

接种培养后,若含 BHI 培养基的试管底部有较多沉淀,则说明菌种复苏,已进行生长繁殖,可进行进一步的增菌和传代。用滴管吹打均匀培养菌液,以无菌操作迅速地用移液枪吸取 2.5ml 菌液,加入装有 22.5ml BHI 培养基的三角瓶中,封口,随即放入厌氧培养袋,37℃恒温培养 48h,平行传代 2 瓶。

1.2.3 菌 株 的 保 藏

将经过 2 次传代后的平板取出,挑取典型菌落,穿刺法分别接种于 BHI 半固体培养基及含血 BHI 半固体培养基中,放入厌氧培养袋,37℃恒温培养 48h。培养 48h 后,将穿刺管塞紧,外用封口膜封严,置 4℃冰箱内存放。

1.2.4 细 菌 悬 液 的 制 备

将复苏后的变异链球菌和粘性放线菌接种于 BHI 培养液中,放置厌氧培养袋,于 37℃恒温培养 18h,在 UV-2450 型紫外分光光度计下比浊,用生理盐水调 OD_{550nm} (光密度值)值至 1.0,备用。

1.2.5 甘 蔗 叶 总 黄 酮 及 其 各 化 学 组 分 的 分 离 与 纯 化

取甘蔗叶粗粉 10kg,用 70%乙醇回流提取两次,每次 2h,合并提取液浓缩到 1/5 体积,浓缩液用石油醚(60~90℃)萃取,合并萃取物水层共 8L,上 AB-8 大孔树脂柱,用水、10%乙醇、70%乙醇洗脱,收集 70%洗脱流份,回收溶剂得甘蔗叶总黄酮浸膏 140g,称取 70g 甘蔗叶总黄酮浸膏,用少量 30%乙醇溶解,上聚酰胺柱(Φ 8cm×120cm,2kg),用水-乙醇梯度洗脱,收集各梯度洗脱液,得到水洗脱流份(S_1),30%乙醇流份(S_2),50%乙醇流份(S_3),70%乙醇流份(S_4),95%乙醇流份(S_5)及 0.1%乙酸醇液(S_6)6 部分,通过点聚酰胺薄层板确定 S_2 和 S_3 化学成分相同,合并 S_2 和 S_3 流份,得到 $S_{2,3}$ 。

1.2.6 甘 蔗 叶 总 黄 酮 及 其 各 化 学 组 分 药 物 母 液 的 制 备

称取甘蔗叶总黄酮、总黄酮 5 个组分($S_1, S_{2,3}, S_4, S_5, S_6$)用 DMSO 溶解,制成 $3.2 \times 10^5 \mu\text{g/ml}$ 母液,避光,4℃冰箱保存。

1.2.7 甘 蔗 叶 总 黄 酮 及 其 各 化 学 组 分 最 低 抑 菌 浓 度 (MIC) 测 定

用无菌 BHI 液体培养基二倍稀释法将甘蔗叶总黄酮、总黄酮 5 个组分($S_1, S_{2,3}, S_4, S_5, S_6$)药物母液稀释成 $16 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$, $8 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$, $4 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$, $2 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$, $1 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$, $0.5 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$, $0.25 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ 的药物稀释液。将已制备的变异链球菌和粘性放线菌细菌悬液与各组药液按 1:1 比例,各 100 μl 分别接种于 96 孔板,同时设立溶剂对照组

(DMSO),用震荡器震荡 1min 后,放入厌氧袋于 80%N₂,20%CO₂,37℃ 恒温培养 24h。以培养液中无细菌生长的最低稀释浓度为 MIC。实验平行 3 个复空,重复 3 次。

1.2.8 甘蔗叶总黄酮及其各化学组分最低杀菌浓度(MBC)测定

选取给药浓度大于 MIC 的各孔,分别取 20μl 涂布于 BHI 固体培养基上,相同条件下培养 24h,观察菌落数少于 5~6 个的最低浓度为最低杀菌浓度(MBC)。实验平行 3 个复空,重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 甘蔗叶总黄酮及其各化学组分对变异链球菌和粘性放线菌的最低抑制浓度(MIC)

溶剂对照组(DMSO)对实验无干扰,甘蔗叶总黄酮及其各化学组分对变异链球菌和粘性放线菌最低抑制浓度(MIC)见表 1。由表 1 可见,总黄酮水洗流份 S₁ 抑菌效果较差,其他药物均有一定的抑菌效果。对变异链球菌 ATCC 10387 抑菌效果,S₂ 和 S₃ 与阳性对照药 EGCG 相当,最小抑菌浓度均为 4×10³ μg/ml;S₅ 和 S₆ 与阳性对照药 EGCG 抑菌效果相当,对变异链球菌 ATCC 10387 和粘性放线菌 ATCC 19246 的最小抑菌浓度均为 1×10³ μg/ml。

表 1 各化学组分对变异链球菌和粘性放线菌的 MIC
Table 1 MIC of each chemical constituent on *Streptococcus mutans* and *Actinomyces viscosus*

组分 Constituent	MIC(×10 ³ μg/ml)	
	变异链球菌 <i>Streptococcus mutans</i>	黏性放线菌 <i>Actinomyces viscosus</i>
总黄酮 Total flavonoids	4	2
S ₁	>16	>16
S _{2,3}	4	2
S ₄	2	2
S ₅	1	1
S ₆	1	1
EGCG	1	1

2.2 甘蔗叶总黄酮及其各化学组分对变异链球菌和粘性放线菌的最低杀菌浓度(MBC)

由表 2 可见,总黄酮、S₁ 对 2 种致龋菌无杀菌作用。对变异链球菌 ATCC 10387 杀菌效果,S₆ 与阳性对照药 EGCG 相当,均为 4×10³ μg/ml。

3 结论

龋病的防治是多方面的,学术界提倡用抗牙菌斑药防龋,主要通过影响致龋菌的生长、代谢,调节菌斑细菌组成,从而维持口腔正常菌群的生态平衡,其中

表 2 各化学组分对变异链球菌和粘性放线菌的 MBC

Table 2 MBC of each chemical constituent on *Streptococcus mutans* and *Actinomyces viscosus*

组分 Constituent	MBC(×10 ³ μg/ml)	
	变异链球菌 <i>Streptococcus mutans</i>	黏性放线菌 <i>Actinomyces viscosus</i>
总黄酮 Total flavonoids	>16	>16
S ₁	>16	>16
S _{2,3}	16	>16
S ₄	16	>16
S ₅	16	16
S ₆	4	16
EGCG	4	4

中草药抗致龋菌有毒副作用小,不易产生耐药性,且价格低廉等优点,现已成为抗致龋菌研究的热点,茶多酚是典型代表之一。

甘蔗叶提取物具有广谱抗菌、抗肿瘤、抗氧化及抑制血糖升高等多种生物学功能。实验结果表明甘蔗叶黄酮类成分中有多种抗菌成分,对口腔常见致龋菌均有抑制作用,其中总黄酮 95% 乙醇洗脱流份(S₅)和 0.1% 乙酸醇溶液洗脱流份(S₆)对变异链球菌和粘性放线菌有抑菌效果,与茶多酚效果相当;0.1% 乙酸醇溶液洗脱流份(S₆)对变异链球菌有杀菌效果,与茶多酚相当。实验结果提示甘蔗叶黄酮类成分具有一定的抗致龋菌活性,这与许多资料中提及的黄酮类是主要的抗菌成分的说法是一致的,其抗菌谱和抗菌机理,含量、组成、结构与抗菌活性的关系,这些研究对甘蔗叶走向药用开发具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 黄智刚,谢晋波.我国亚热带地区甘蔗产量的模型模拟[J].中国糖料,2007,1(1):77-79.
- [2] 邓家刚,侯小涛,李爱媛,等.甘蔗叶的药效学初步研究[J].广西中医学院学报,2008,11(3):77-79.
- [3] 吴建中,欧仕益,汪勇.甘蔗叶中黄酮类物质的提取及其抗氧化性研究[J].现代食品科技,2009,25(2):165.
- [4] 刘昔辉,杨荣仲,区惠平,等.甘蔗叶多糖的提取与含量测定[J].安徽农业科学,2007,35(34):10960,11035.
- [5] 徐美奕,关雄泰,许学军.甘蔗叶制取叶绿素铜钠盐的研究[J].食品工业科技,2002,23(1):14.
- [6] 蒋瑾华,刘布鸣.紫外标准加入法测定甘蔗叶中的维 C 含量[J].化工技术与开发,1991(3):59-60.
- [7] 刘天佳.口腔疾病的微生物基础[M].北京:人民卫生出版社,1999:42-65.

(责任编辑:陈小玲)