

扁枝槲寄生提取物对金黄色葡萄球菌抑菌机理的研究

张兴梅¹, 薛桥丽², 肖蓉¹, 赵灵芝¹, 林奇¹, 胡永金¹

(1. 云南农业大学食品科学技术学院, 云南昆明 650201) (2. 云南农业大学图书馆, 云南昆明 650201)

摘要: 本论文主要研究了 95% 乙醇扁枝槲寄生提取物的抑菌效应, 并研究了抑菌机理。研究发现, 95% 乙醇扁枝槲寄生提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、李斯特杆菌、铜绿假单胞菌、鼠伤寒沙门氏菌及变异微球菌均有明显抑菌效果, 对枯草芽孢杆菌和纳豆芽孢杆菌无明显作用, 对金黄色葡萄球菌抑菌效果最好(最低抑菌量为 0.1 mg/mL)。进一步研究发现, 提取物可增加金黄色葡萄球菌的细胞壁及细胞膜的通透性, 引起细胞内含物如可溶性糖类、蛋白质等外泄, 导致电导率上升。光学显微镜、扫描电镜以及透射电镜观察证实了提取物不仅能作用于菌体的壁膜系统, 破坏菌体细胞的正常结构, 还能通过抑制细胞分裂等方式来杀灭菌体。本文研究结果表明扁枝槲寄生具有开发成天然食品添加剂的良好前景。

关键词: 扁枝槲寄生; 乙醇提取物; 金黄色葡萄球菌; 抑菌机理; 电子显微镜

文章编号: 1673-9078(2016)1-82-88

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.1.013

Antimicrobial Mechanisms of Mistletoe (*Viscum articulatum*) Extracts Against *Staphylococcus aureus*

ZHANG Xing-mei¹, XUE Qiao-li², XIAO Rong¹, ZHAO Ling-zhi¹, LIN Qi¹, HU Yong-jin¹

(1. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

(2. Library, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The antibacterial effects and mechanisms of 95% ethanolic extracts of *Viscum articulatum* were studied. The result showed that 95% ethanolic extracts of mistletoe had significant antagonistic activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, and *Micrococcus varians* and had no effect on *Bacillus subtilis* and *B. natto*. The best antibacterial effect was observed in controlling *Staphylococcus aureus* (minimum inhibitory concentration (MIC): 0.1 mg/mL). Further studies showed that 95% ethanolic extracts increased the permeability of bacterial cell walls and membranes and caused the leakage of cellular contents such as soluble saccharides and proteins, thus increasing the conductivity. The observations from light microscopy, scanning electron microscopy, and transmission electron microscopy further demonstrated that the extracts could not only target the bacterial cell wall and membrane systems to destroy their normal structures, but also killed bacteria by inhibiting cell division. The results suggest that *Viscum articulatum* presents potential as a natural food additive.

Key words: *Viscum articulatum*; ethanolic extract; *Staphylococcus aureus*; antimicrobial mechanisms; electron microscopy

扁枝槲寄生系桑寄生科槲寄生属植物, 半寄生于古茶树上, 形状似小珊瑚。因其寄生枝条和小枝扁平, 成节状且带毫, 呈绿色(采摘晒干后变成棕黄色), 形如蟹枝, 俗称“螃蟹脚”^[1], 主要分布于我国南方的一些省区, 在云南省主要分布于西双版纳、迪庆、怒江、禄劝、普洱以及丽江等州市。

收稿日期: 2015-02-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31260404)

作者简介: 张兴梅(1988-), 女, 硕士, 主要从事食品质量及安全性研究

通讯作者: 胡永金(1972-), 男, 博士, 教授, 硕导, 主要从事功能性食品与生物技术研究

扁枝槲寄生是一种常见的中药材, 其内富含多种活性成分, 除了具有抗肿瘤、抗衰老、抗氧化等作用外, 也对微生物具有一定的抗生活性^[2]。国内外有很多关于从其体内分离活性物质的研究报道。杨燕军^[3-5]先后分离出色原酮类化合物、反式-桂皮酸、齐墩果酸、白杨素、圣草酚、扁枝槲寄生昔以及三萜、甾醇类化合物, 发现三萜和甾醇类化合物具有一定的抗肿瘤活性。槲寄生植物的提取物抗肿瘤机制目前认为主要与诱导细胞凋亡以及免疫系统调节有关^[6,7]。Amabeoku^[8]等发现槲寄生植物 *Viscum capense* 的二氯甲烷、甲醇及水提取物对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、白色念球

菌(*Candida albicans*)等病原菌具有一定的抑制效果; Yusuf^[9]等以寄生可可树的白果槲寄生(*Viscum album*)的叶子为材料, 60%甲醇浸提后发现提取物对接种有金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)等的小白鼠兼有治疗和安全效果。但目前对扁枝槲寄生抗菌及其作用机理方面的研究较少。

本文以引起食物腐败变质、动物及人类疾病的一些细菌为研究对象, 探究扁枝槲寄生提取物抗菌的具体作用机理, 这对充分开发利用云南茶树上寄生的扁枝槲寄生这一独特的植物源资源有着非常重要的理论意义和应用价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试细菌: 大肠杆菌(*E. coli*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、李斯特杆菌(*L. monocytogenes*)、铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)、鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、纳豆芽孢杆菌(*B. natto*)以及变异微球菌(*M. varians*)均为云南农业大学微生物实验室保存。

培养基: 营养琼脂或营养液体培养基、Baird-Parker 卵黄亚碲酸钾培养基。

试验材料: 扁枝槲寄生, 采自云南普洱景东古茶树上。

1.2 方法

1.2.1 扁枝槲寄生粗提取物的制备

扁枝槲寄生样品自然干燥至恒重, 植物粉碎机粉碎后过80目筛成直径<1 mm的粉末。精确称取2.50 g粉末, 按料液比为1: 10的比例添加提取剂于室温下浸泡8 h, 再用分液漏斗萃取过滤, 收集滤液; 过滤的残渣按相同料液比再次浸泡4 h, 分液漏斗过滤, 最后将两次滤液合并; 真空抽滤后于50 °C真空旋转蒸发浓缩至恒重, 在冷冻干燥机上干燥后保藏于4 °C冰箱中备用。所选用的提取溶剂为95%乙醇、75%乙醇以及蒸馏水。

1.2.2 受试细菌的活化及菌悬液的制备

细菌的活化: 从斜面试管挑取上述8种受试细菌, 分别转接到营养液体培养基中, 37 °C培养24 h后10倍梯度稀释, 吸取适当稀释梯度(10^5 或 10^6)的菌悬液200 μ L均匀涂布于营养琼脂或Baird-Parker 卵黄亚碲酸钾平板上, 37 °C倒扣培养过夜, 挑取相应的单菌落分别划线于斜面营养琼脂上, 37 °C活化培养24 h。

菌悬液的制备: 向活化培养有供试细菌的斜面试管中加入一定体积的无菌生理盐水, 用无菌接种环刮取菌苔并混匀以制备菌悬液。10倍稀释菌悬液后, 再采用二倍管法进行梯度稀释。吸取不同稀释度的菌悬液各200 μ L到相应的培养平板上, 均匀涂布, 37 °C倒扣培养, 选择各自适宜的菌悬液梯度开展下一步试验(选择标准: 要求在此稀释梯度下, 200 μ L的供试细菌悬液可以铺满直径为9 cm的培养皿)。

1.2.3 供试细菌的最低抑菌浓度(Minimal inhibition concentration, MIC)的测定

参照文献方法^[10], 加热融化固体营养培养基, 待其温度冷却至50~60 °C时, 加入不同质量的95%或75%乙醇所提取出的扁枝槲寄生粉末, 加入配制10个不同浓度梯度提取物终浓度分别为0.1 mg/mL、0.15 mg/mL、0.2 mg/mL、0.25 mg/mL、0.3 mg/mL、0.35 mg/mL、0.4 mg/mL、0.45 mg/mL、0.5 mg/mL及0.55 mg/mL的液态固体营养培养基, 倒板, 待其凝固冷却后, 吸取1.2.2中适宜浓度(约为 10^9 CFU/mL)的供试细菌悬液各200 μ L, 分别转移到含有不同浓度提取物的平板上并涂布均匀, 37 °C培养24 h(如有必要, 培养时间可延长至72 h), 观察平板上菌体的生长情况。以第一个没有菌落生长的培养皿出现为止, 记录下该培养皿中提取物的浓度处理, 作为提取物对相应细菌的最低抑菌浓度(MIC)。

1.2.4 扁枝槲寄生提取物对金黄色葡萄球菌生长动力学的影响

将事先制备好的金黄色葡萄球菌细胞悬液(10^6 稀释倍数)按一定比例转接到含有最小抑制浓度提取物的液体营养培养基中, 37 °C培养, 每隔5 h, 用分光光度计测定其OD₄₅₀以及稀释涂板计数。以取样时间为X轴, 测得的OD₄₅₀为Y轴绘制金黄色葡萄球菌的生长曲线。以培养初始阶段(0 h)和对数中期(8 h)加入提取物分别为处理1和处理2, 以未加入提取物的液体营养培养基为处理3, 每个处理设置3个重复。

1.2.5 扁枝槲寄生提取物对金黄色葡萄球菌细胞膜渗透性的影响

将金黄色葡萄球菌置于37 °C连续培养24 h, 每隔一定时间取样, 2000 \times g离心10 min; 弃上清, 用0.1 mol/L的磷酸缓冲液(pH 7.0)洗涤菌体沉淀3次并稀释至 10^6 CFU/mL左右。取一定体积的上述金黄色葡萄球菌稀释悬液, 向其中加入适量的95%乙醇扁枝槲寄生提取物溶液以配成提取物终浓度为MIC的菌体悬浮液, 均匀混合, 37 °C静置, 每隔2 h测定混合液的电导率, 研究扁枝槲寄生提取物对金黄色葡萄球菌细胞膜渗透性的影响。以添加提取物的为处理组,

以未加提取物的为空白对照组, 每个处理设置 3 个重复。

1.2.6 扁枝槲寄生提取物对金黄色葡萄球菌培养液中可溶性糖和蛋白质含量的影响

将金黄色葡萄球菌置于 37 °C 连续培养 24 h, 每隔一定时间取样, 2000 g 离心 10 min; 弃上清, 用 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 7.0) 洗涤菌体沉淀 3 次并稀释至 10⁶ CFU/mL 左右。取一定体积的上述金黄色葡萄球菌稀释悬液, 加入适量的 95% 乙醇扁枝槲寄生提取物溶液, 均匀混合, 37 °C 静置, 每隔 2 h 取样, 直至第 18 h。分别采用蒽酮比色法^[11]和考马斯亮蓝染色法^[12]测定混合溶液内可溶性糖及蛋白质含量。以添加提取物的为处理组, 以未加提取物的为空白对照组, 每个处理设有 3 个重复。

1.2.7 扁枝槲寄生提取物对金黄色葡萄球菌抑菌作用的形态学观察

光学显微镜 (LM) 观察 通过光学显微镜观察扁枝槲寄生粗提取物作用后金黄色葡萄球菌的形态学变化。从斜面试管中挑取金黄色葡萄球菌单个菌落, 转接入含有 50 mL 液体营养培养基的三角瓶中, 37 °C 静置培养 24 h, 10 倍梯度稀释至 10⁶ CFU/mL 左右, 移取 200 μL 的上述菌稀释悬液至预先制备好的营养琼脂平板并均匀涂布, 37 °C 培养至单菌落出现, 向培养平板上加入最低抑制浓度的扁枝槲寄生提取物 200 μL, 37 °C 继续培养, 48 h 后取样涂片, 革兰氏染色并镜检, 在光学相差显微镜下观察菌体细胞形态。以添加有等体积 95% 乙醇溶剂的金黄色葡萄球菌为对照组。

扫描电镜 (SEM) 观察: 为了更清晰地分析金黄色葡萄球菌形态变化, 使用扫描电镜对其进行观察。单菌落的获取及前半部分处理, 与光学显微镜观察时相同。后半部分处理具体为: 挑取单菌落, 经 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液冲洗后再使用 3.5% (V/V) 戊二醛 (电镜级) 于室温下固定, 1% (V/V) 锇酸 4 °C 浸泡过夜 (约 18 h) 进行二次固定, 冲洗并用乙醇梯度脱水, 冷冻干燥以及喷重金属, 在扫描电镜下观察并拍摄细胞的形态。

透射电镜 (TEM) 观察: 通过透射电镜对细胞的内部情况进行进一步观察金黄色葡萄球菌的形态及细胞内变化。样品细胞通过离心收集后用 3.5% (V/V) 戊二醛 (电镜级) 固定, 1% (V/V) 锇酸二次固定, 乙醇梯度脱水后用环氧树脂予以包埋, 超薄切片并使用乙酸双氧铀和柠檬酸铅染色, 然后在透射电镜下观察并拍摄细胞的形态及内部结构。

1.2.8 数据分析

用 origin 软件作图和 DPS 数字处理软件进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 扁枝槲寄生提取物对供试细菌的最低抑菌浓度 (MIC)

表 1 扁枝槲寄生提取物对所选细菌的最低抑菌浓度

Table 1 MICs of mistletoe extracts against selected bacteria

处理	95% 乙醇提取物/(mg/mL)	75% 乙醇提取物/(mg/mL)	蒸馏水提取物/(mg/mL)
大肠杆菌	0.2	0.3	0.4
金黄色葡萄球菌	0.1	0.15	0.35
李斯特菌	0.25	0.35	0.45
铜绿假单胞菌	0.45	-	-
鼠伤寒沙门氏菌	0.3	0.35	0.45
枯草芽孢杆菌	-	-	-
变异微球菌	0.45	-	-
纳豆芽孢杆菌	-	-	-

注: “-”表示在所使用的浓度梯度内均有菌落生长。

95% 乙醇、75% 乙醇和蒸馏水作为溶剂提取出的扁枝槲寄生提取物对 8 种供试菌的抑菌效果见表 1。从表 1 可以看出, 三种不同溶剂提取物对 *E. coli*、*S. aureus*、*L. monocytogenes* 和 *S. typhimurium* 都有明显抑菌效果, 但最低抑菌量并不相同, 其中 95% 乙醇扁枝槲寄生提取物抑菌效果最好, 75% 乙醇扁枝槲寄生提取物及蒸馏水扁枝槲寄生提取物的抑菌谱相同, 但前者对抑菌谱内细菌的最低抑制浓度略低于后者。95% 乙醇扁枝槲寄生提取物对 8 种供试细菌中的 6 种细菌都有明显的抑菌效果, 且对 *S. aureus* 抑菌效果最好, 最低抑菌量 (MIC) 为 0.1 mg/mL, 仅对 *B. subtilis* 和 *B. natto* 无明显作用。据此实验结果, 后续试验以金黄色葡萄球菌以及 95% 乙醇扁枝槲寄生提取物为试验材料。

2.2 扁枝槲寄生提取物对金黄色葡萄球菌生长动力学的影响

95% 乙醇提取的扁枝槲寄生提取物对金黄色葡萄球菌生长的影响见图 1。

由图 1 可知, 与未加入提取物的处理组 3 相比, 在培养起始阶段就加入提取物的实验组, 菌体进入对数生长期的时间明显滞后, 且整个生长阶段明显受抑制, 具体表现为相同时刻点, 其菌液的 OD_{450nm} 均低

于前者。在进入生长对数中期（8 h）时加入提取物，菌体细胞的生长速度表现为立刻减缓，但是其 OD_{450nm} 仍高于起始阶段加入提取物的处理组。初步猜测进入生长对数中期的金黄色葡萄球菌代谢旺盛、细胞壁及膜合成活跃，加入提取物后会对这些生命活动的某个或某些环节的进行产生抑制，从而延缓细胞的生长。

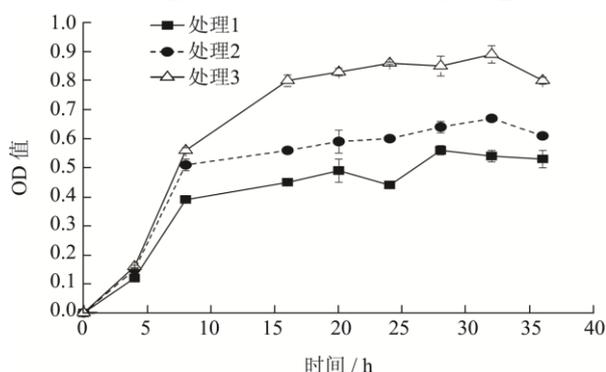


图1 不同处理下金黄色葡萄球菌菌液生长曲线的测定

Fig.1 Effect of different treatments on the growth curve of *Staphylococcus aureus*

注：处理1，0 h加入95%乙醇扁枝槲寄生提取物；处理2，8 h加入95%乙醇扁枝槲寄生提取物；处理3，未加入扁枝槲寄生提取物。

2.3 扁枝槲寄生提取物对金黄色葡萄球菌胞膜渗透性的影响

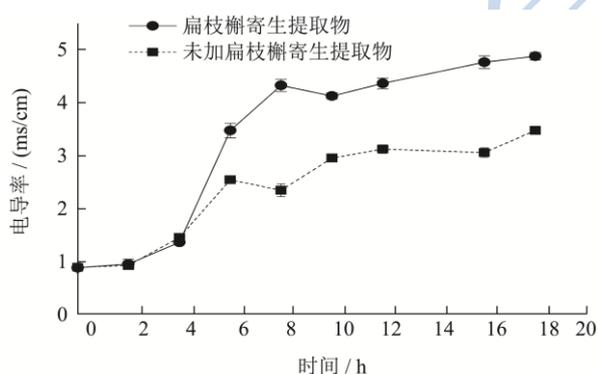


图2 金黄色葡萄球菌菌液电导率变化的测定

Fig.2 Determination of the conductivity change in *Staphylococcus aureus*

由图2可知，在0~4 h，未加入提取物的对照组和加入提取物的处理组的电导率变化趋势相同且两者电导率相差不明显。4 h后，对照组和处理组的电导率都呈上升趋势，但对对照组和处理组电导率存在明显的差异，对照组电导率上升幅度明显不及处理组（图2）。菌体电导率的变化说明95%乙醇扁枝槲寄生提取物可能导致金黄色葡萄球菌细胞内电解质外泄，致使溶液的电导率急剧增大。

2.4 扁枝槲寄生提取物对金黄色葡萄球菌胞内可溶性糖及蛋白质的影响

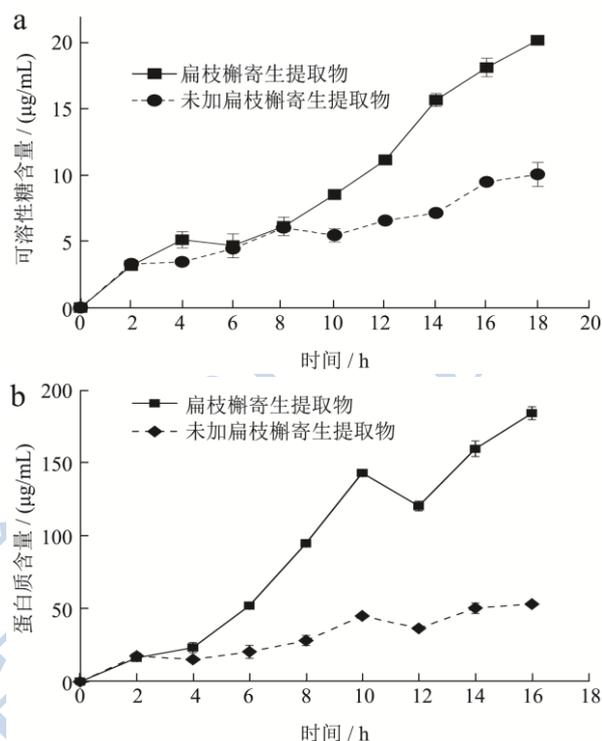


图3 金黄色葡萄球菌菌液内可溶性糖 (a) 及蛋白质 (b) 含量变化的测定

Fig.3 Determination of the changes in the contents of soluble saccharides (a) and proteins (b) in *Staphylococcus aureus*

细菌生长过程中会吸收利用需要糖源等营养物质。当细菌细胞膜遭到破坏，不仅吸收受到影响，而且胞内的可溶性糖类及蛋白质等物质也会外泄。菌液样品是通过0.1 mol/L磷酸缓冲液洗涤悬浮金黄色葡萄球菌并稀释制备而成，不含任何糖源，因此在测定的最初阶段（0 h），未加入提取物的对照组和扁枝槲寄生提取物处理组内样品的可溶性糖含量均为0 μg/mL；0~2 h，两个处理间样品可溶性糖含量及变化趋势也基本相同；随着处理时间的延长，对照组和处理组内菌液样品的可溶性糖含量及变化趋势都有所增加和上升，但增加和上升幅度并不尽相同：与2 h的测定结果相比，对照组内可溶性糖含量增加不是很明显，推测其增加可能是由于部分个体死亡所致；95%乙醇扁枝槲寄生提取物处理组可溶性糖含量增加则极显著，最后（18 h）测定的结果是2 h时的6.36倍，达20.18 μg/mL（图3a）。

两个处理间样品中蛋白质含量的变化与可溶性糖含量变化也基本相同。由于菌液样品不含任何蛋白质，

因此在 0 h 时, 对照组和扁枝槲寄生提取物处理组内样品的蛋白质含量均为 $0 \mu\text{g/mL}$; 0~2 h 时, 对照组和处理组间样品的蛋白质含量及变化趋势也基本相同; 4 h 后, 随着处理时间的推移, 对照组和处理组内蛋白质含量及变化趋势都有所增加和上升, 但增加和上升的幅度并不太相同: 与 2 h 测得的结果相比, 对照组的蛋白质含量增加并不是非常的明显, 初步推测其增加也可能是由于部分菌体死亡引起, 95% 乙醇扁枝槲寄生提取物处理组的蛋白质含量增加则极为明显, 18 h 的测定结果为 $184.57 \mu\text{g/mL}$, 是 2 h 的 11.23 倍, 比对照组相同时段测得的结果高出 2.47 倍 (图 3b)。

2.5 扁枝槲寄生提取物对金黄色葡萄球菌光学显微镜 (LM) 观察结果

在细菌的革兰氏染色过程中, 脱色剂 (95% 乙醇) 可作为脂溶剂破坏革兰氏阴性菌的外膜、肽聚糖层和细胞质膜, 使得被乙醇溶解的结晶紫和碘的复合物从细胞中渗漏出来, 当再用蕃红复染时, 菌体显现红色; 在革兰氏阳性菌细胞中, 乙醇使厚的肽聚糖层脱水, 导致孔隙变小, 由于结晶紫和碘的复合物分子较大, 不能通过细胞壁, 仍保持紫色。金黄色葡萄球菌属于革兰氏阳性菌, 菌体经革兰氏染色后应呈紫色, 但是如果细胞老化或者死亡, 革兰氏染色之后常显阴性, 即将会呈红色^[13]。

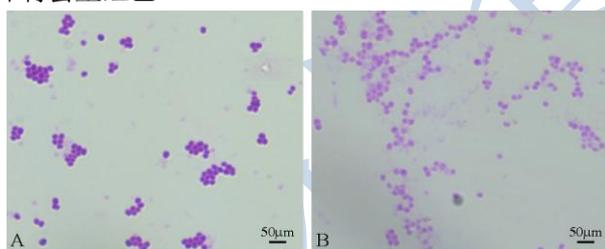


图 4 不同处理下金黄色葡萄球菌的革兰氏染色

Fig.4 Gram stain of *Staphylococcus aureus* treated with or without mistletoe extracts

注: A:未加入 95% 乙醇扁枝槲寄生提取物, B:95% 乙醇扁枝槲寄生提取物。

未加入提取物的对照组内金黄色葡萄球菌革兰氏染色后, 菌体细胞都呈现出相似的形态, 主要表现为菌体细胞排列得紧密, 呈现出均匀的紫色 (图 4-A); 而 95% 乙醇扁枝槲寄生提取物处理过的菌体细胞排列较为疏松, 呈现出紫色和红色两种染色形态, 部分细胞出现变形或破损, 还有的细胞质完全溶解 (图 4-B)。初步怀疑是经扁枝槲寄生提取物处理后, 菌体细胞壁的通透性发生改变所致。

2.6 扁枝槲寄生提取物对金黄色葡萄球菌扫描电镜 (SEM) 观察结果

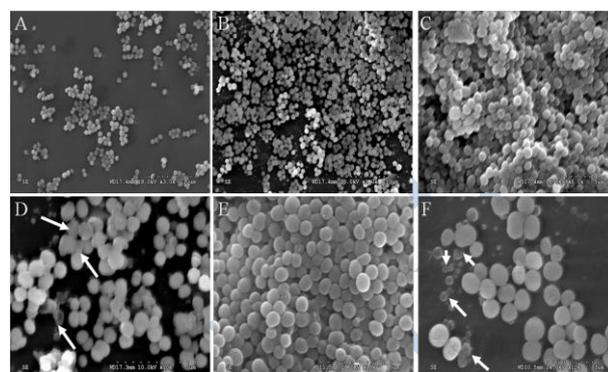


图 5 金黄色葡萄球菌的扫描电镜观察

Fig.5 Scanning electron microscopy images of *Staphylococcus aureus*

注: A、C和E为未加入扁枝槲寄生提取物, B、D及F为扁枝槲寄生提取物, 白色箭头处为破碎的细胞或细胞残片。

由图 5 可以看出, 在扫描电镜下, 对照组的金黄色葡萄球菌菌体细胞大小一致, 排列紧密且呈现出典型的葡萄状 (图 5-A, C 和 E)。经 95% 乙醇扁枝槲寄生提取物处理过的菌体细胞个体数量明显减少, 形态发生改变, 细胞壁和细胞膜结构发生不同程度的破坏 (图 5-B, D 和 F)。在较低的放大倍数下, 可以看到对照组金黄色葡萄球菌细胞呈簇状或少数个体存在 (图 5-A), 而处理组中金黄色葡萄球菌的细胞凝集成团且形态不均一, 有较小的细胞出现 (图 5-B); 高倍镜下, 对照组菌体细胞排列紧密并呈葡萄状, 细胞完整正常且无内容物溢出 (图 5-C), 处理组菌体细胞排列松散, 部分菌体细胞表现出收缩凹陷或破损, 有大量的细胞内容物溢出, 呈空洞状 (图 5-D); 进一步观察发现对照组金黄色葡萄球菌菌体细胞形态完整, 未见任何细胞残体及碎片 (图 5-E), 而处理组中有大量细胞残体和碎片 (图 5-F)。SEM 观察结果表明 95% 乙醇扁枝槲寄生提取物对金黄色葡萄球菌的菌体细胞有较强的破坏作用。

2.7 扁枝槲寄生提取物对金黄色葡萄球菌透射电镜 (TEM) 观察结果

由图 6 可知, 未加入提取物的对照组, 金黄色葡萄球菌具有典型的细菌细胞结构, 此时的细胞正处于分裂阶段, 虽然染色体已经完成复制, 但还没有从横隔壁处断开形成两个子细胞 (图 6-A); 而加有 95%

乙醇扁枝槲寄生提取物的金黄色葡萄球菌的细胞壁、细胞膜出现了破裂、溶解现象, 分裂过程中染色体异常, 也未看到明显的横隔, 细胞的正常分裂受到干扰(图 6-B)。另外, 随着处理时间的延长, 对照组中部分菌体的细胞分裂已基本完成, 细胞壁、细胞膜也未出现破裂, 细胞质较为均匀(图 6-C); 而处理组中部分金黄色葡萄球菌的菌体细胞分裂推迟, 细胞复制裂殖也不是标准的一分为二, 细胞壁、细胞膜破裂, 内容物溢出(图 6-D), 说明 95%乙醇扁枝槲寄生提取物可能破坏了细胞壁或细胞膜, 或者使细胞壁及细胞膜的通透性增加, 使胞内物质流出。

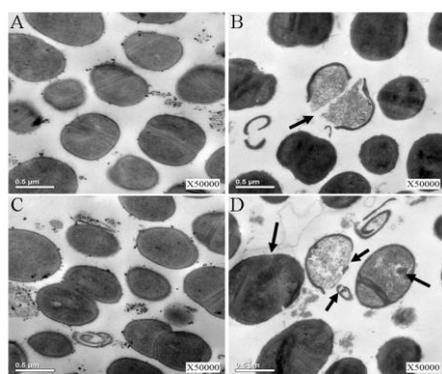


图 6 金黄色葡萄球菌的透射电镜观察

Fig.6 Transmission electron microscopy images of

Staphylococcus aureus

注: A和C: 未加入扁枝槲寄生提取物, B和D:加入95%乙醇扁枝槲寄生提取物; 黑色箭头表示分裂异常或形态结构发生破坏的细胞。

3 讨论

在人类越来越关注生活品质 and 自身健康的今天, 许多传统的中药材已被开发成食材, 或其中的某些成分被提取出来充当食物的添加剂^[14], 如冬虫夏草、人参等。扁枝槲寄生作为一种传统的药用植物, 常被用于茶饮品, 尤其是古茶树上的扁枝槲寄生药用价值更高。本论文主要研究了95%乙醇扁枝槲寄生提取物的抑菌效应, 并研究了抑菌机理, 为今后将扁枝槲寄生用于食品添加剂提供一些依据。

在测定95%乙醇扁枝槲寄生提取物对金黄色葡萄球菌生长动力学影响的试验中, 我们发现其对进入生长对数中期的金黄色葡萄球菌的作用效果不及培养初期阶段, 初步猜测可能是由于此时的菌体有一定的基数, 细胞发育异质化, 形成了部分抗耐性菌群^[15,16], 或者是进入生长对数期的菌体细胞代谢旺盛, 排毒减毒的能力较强等原因所致。

通过测定金黄色葡萄球菌电导率、可溶性糖类以及蛋白质浓度的变化, 初步怀疑95%乙醇扁枝槲寄生

提取物作用于菌体细胞的壁膜系统, 增加壁膜的通透性, 电解质流失, 最终导致细胞死亡。光学显微镜、扫描电镜以及透射电镜的观察结果证实了这种推测。值得一提的是, Kaya^[17]等人借助扫描电镜观察到罗列(*Ocimum basilicum*)的甲醇提取物处理后的金黄色葡萄球菌细胞出现收缩和细胞壁不同程度降解的现象, 与本研究的显微观察结果非常的相似。牛至(*Origanum vulgare*)和百里香(*Thymus mongolicus*)精油对大肠杆菌 O₁₅₇:H₇ 也有类似的现象, 认为可能与细胞壁的降解、细胞质膜蛋白和结合蛋白的破坏、细胞内含物泄漏、细胞质凝聚以及质子动力势损耗相关^[18]。本研究的结果与其很类似, 这说明虽然使用的植物材料不一, 但其抗菌方面部分机理却大体相似。

此外, 本研究还发现95%扁枝槲寄生提取物还可能抑制金黄色葡萄球菌细胞的正常分裂。这是前人研究报道中没有提及的, 显示出扁枝槲寄生提取物抗生机理的多样性。据报道扁枝槲寄生的提取物也具有抗肿瘤活性^[5], 其抗肿瘤活性是否与其抑制金黄色葡萄球菌分裂那样阻缓癌细胞的分裂, 目前依然不得而知, 有待于进一步研究。

4 结论

扁枝槲寄生95%乙醇提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、李斯特杆菌、铜绿假单胞菌、鼠伤寒沙门氏菌均有明显的抑菌效应, 特别是对引起食品腐败的金黄色葡萄球菌抑菌效果更为显著; 提取物主要是通过作用于菌体细胞的壁膜系统, 破坏其通透性和完整性, 引发电导率上升、内容物如可溶性糖类及蛋白质外渗, 从而造成金黄色葡萄球菌生长速率剧减, 干扰细胞分裂, 并最终导致菌体死亡。

参考文献

- [1] 孙艳琳, 司民真, 刘仁明, 等. “螃蟹脚”的红外光谱分析[J]. 光谱实验室, 2012, 29(5): 2639-2642
SUN Yan-Lina, SI Min-zhen, LIU Ren-ming, et al. Infrared spectrum analysis of *viscum articulatum burm. f.* Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 2012, 29(5): 2639-2642
- [2] 苏驰, 薛桥丽, 胡永金, 等. 云南古树茶上寄生的“螃蟹脚”提取物的体外抑菌效应研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(13): 7919-7920
SU Chi, XUE Qiao-li, HU Yong-jin, et al. Study on in vitro antibacterial effect of *visum articulatum* extracts on yunnan ancient tea trees [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(13): 7919-7920
- [3] 杨燕军. 枫香槲寄生化学成分的研究[J]. 中药材, 1998,

- 21(1):22-23
- YANG Yan-jun. Studies on the chemical constituents of *viscum liquidambaricum* [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 1998, 21(1): 22-23
- [4] 杨燕军,沙聪威,安洁,等.枫香槲寄生抗肿瘤有效部位总皂苷的提取及含量测定研究[J].时珍国医国药, 2007, 18(12): 2970-2972
- YANG Yan-jun, SHA Cong-wei, AN Jie, et al. Studies on the extraction technology and determination of antitumor saponins in *viscum liquidambaricum hayata* [J]. LiShiZhen Medicine and Materia Medica Research, 2007, 18(12): 2970-2972
- [5] 杨燕军,陈慧云,林洁红,等.枫香槲寄生化学成分及抗肿瘤活性研究[J].广州中医药大学学报,2007,24(2):158-161
- YANG Yan-jun, CHEN Hui-yun, LIN Jie-hong, et al. Studies on chemical constituents and antitumor activity of *viscum liquidambaricum hayata* [J]. Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2007, 24(2): 158-161
- [6] Kim Myung-sunny, Lee Jenny, Lee Kang-min, et al. Involvement of hydrogen peroxide in mistletoe lectin-ii-induced apoptosis of myeloleukemic u937 cells [J]. Life Sciences, 2003, 37(1): 1231-1243
- [7] STEIN G M, EDLUND U, PFÜLLER U, et al. Influence of polysaccharides from *viscum album l.* on human lymphocytes, monocytes and granulocytes *in vitro* [J]. Anticancer Research, 1999, 19(5B): 3907-3914
- [8] AMABEOKU G J, LENG M J, SYCE J A. Antimicrobial and anticonvulsant activities of *viscum capense* [J]. Journal of Ethnopharmacology, 1998, 61(3): 237-241
- [9] YUSUF L, OLADUNMOYE M K, OGUNDARE A O. In-vivo antibacterial activities of mistletoe(*viscum album*) leaves extract growing on cocoa tree in akure north, Nigeria [J]. European Journal of Biotechnology and Bioscience, 2013, 1(1): 37-42
- [10] 廖玉婷,曹光群.两种天然植物提取物的抑菌效果的快速评价与比较[J].天然产物研究与开发,2007,19(4):626-630
- LIAO Yu-ting, CAO Guang-qun. Research on the antimicrobial of two natural plants extract [J]. Natural Product Research and Development, 2007, 19(4): 626-630
- [11] 李晓旭,李家政.优化蒽酮比色法测定甜玉米中可溶性糖的含量[J].保鲜与加工,2013,13(4):24-27
- LI Xiao-xu, LI Jia-zheng. Determination of the content of soluble sugar in sweet corn with optimized anthrone colorimetric method [J]. Storage & Process, 2013, 13(4): 24-27
- [12] Jos Manuel López, Santiago Imperial, Rodrigo Valderrama. An improved bradford protein assay for collagen proteins [J]. Clinica Chimica Acta, 1993, 220(1): 91-100
- [13] XU Hui, WANG Hui, WANG Xiao-fang. Influence of seasonal climate change on hydrogen production by sludge and the analysis of the reason [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2012, 37(17): 12905-12918
- [14] BURT S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-a review [J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 94(3): 223-253
- [15] PRYME I F, BARDOZ S, PUSZTAI A, et al. Suppression of growth tumour cell lines *in vitro* and tumours *in vivo* by mistletoe lectins [J]. Histology and Histopathology, 2006, 21(1): 285-299
- [16] WANG Xiao-rong, KANG Yu, LUO Chun-xiong, et al. Heteroresistance at the single-cell level, adapting to antibiotic stress through a population-based strategy and growth-controlled interphenotypic coordination [J]. mBio., 2014, 5(1): e00942-13
- [17] KAYA I, YIGIT N, BENLI M. Antimicrobial activity of various extracts of *ocimum basilicum l.* and observation of the inhibition effect on bacterial cells by use of scanning electron microscopy [J]. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 2008, 5(4): 363-369
- [18] BURT S A, REINDER R D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7 [J]. Letters in Applied Microbiology, 2003, 36(3): 162-167