

贯叶连翘总提取物对黄色短杆菌的抗菌作用

李宏¹, 姜怀春²

(1. 重庆教育学院生命科学和化学系, 重庆 400067; 2. 重庆工商大学, 重庆 400067)

摘要: 报道了贯叶连翘总提取物作用于黄色短杆菌并经光照和未光照处理后对该菌的抗菌作用, 目的是探讨贯叶连翘总提取物在光照和非光照处理时抗菌作用的异同。采用光密度(OD)值、活菌数(CFU)、最低杀菌浓度(MBC)值检测方法, 测定了在 12 h 的培养过程中, 提取物作用时黄色短杆菌的 OD_{640 nm} 值、CFU、MBC 值。结果表明提取物对该菌有很强的抑菌和杀菌作用, 且这两种作用与其浓度有关, 不需光照。

关键词: 贯叶连翘提取物; 黄色短杆菌; 抗菌作用

中图分类号: Q949.95 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2005)04-0362-04

Antibacterial effect of the total extract of *Hypericum perforatum* on *Brevibacterium flavum*

LI Hong¹, JIANG Huai-chun²

(1. Department of Life Sciences and Chemistry, Chongqing College of Education, Chongqing 400067, China;
2. Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China)

Abstract: The effects of the total extract of *Hypericum perforatum* L. on *Brevibacterium flavum* with and without illumination in the course of 12 hours' incubation were studied, the purpose of which was to determine the conditions in which *Hypericum perforatum* L. could show its most effective antibacterial effects. The optical density(OD_{640 nm}), colony forming unit(CFU) and minimum bactericidal concentration(MBC) were tested. The results showed that it had strong bactericidal and inhibitory effects on *Brevibacterium flavum* and its effects depended on its concentrations but was independent of illumination.

Key words: extract of *Hypericum perforatum* L.; *Brevibacterium flavum*; antibacterial effects

在西方国家, 贯叶连翘 (*Hypericum perforatum* L., HPL) 总提取物 (TEHPL) 为广泛使用的临床抗抑郁药 (Hubner 等, 1994), 其研究人员还证明 HPL 中的金丝桃素经光照处理后可抗肿瘤及 HIV (Ebermann 等, 1996; Prince 等, 2000), 但金丝桃素无抗菌作用 (Kubin 等, 1999)。迄今为止, 尚无 TEHPL 抗菌作用的报道。因 TEHPL 已用作临床抗抑郁药 (Hippius, 1998), 如果还能抗菌, 将会增加其临床应用价值。现以黄色短杆菌 (*Brevibacterium flavum*) 研究其对革兰氏阳性无芽孢杆菌的抗菌作用, 结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

黄色短杆菌 (*B. flavum*) AB92062, 源于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC)。培养基: 范秀容等 (1989) 的配方。53WB 分光光度计: 上海光学仪器厂。

1.2 TEHPL 的制备

采花期 HPL、干燥、粉碎。按北京大学生物系所编教材 (1979) 的方法用无水乙醇提取, 得褐色膏

收稿日期: 2004-08-16 修订日期: 2005-01-12

基金项目: 重庆市教委科研基金项目 (编号: 021501)

作者简介: 李宏 (1963-), 女, 重庆市人, 硕士, 副教授, 研究方向: 微生物学、生物化学与分子生物学。

状 TEHPL。精确称取 TEHPL, 用 40% 乙醇配成浓度分别为 0.1、1.0 和 10.0 mg/mL 的 TEHPL 储备液。

1.3 TEHPL 抗菌作用的检测

1.3.1 处理设计 取该菌对数期培养物($OD_{640\text{ nm}} = 0.2$)各 660 mL 分别加入 5 个 1 000 mL 三角瓶中, 其中 3 瓶分别加入浓度为 0.1、1.0、10.0 mg/mL 的 TEHPL 储备液各 40 mL, 另 2 瓶中分别加 40% 乙醇、液体培养基各 40 mL 分别作溶剂、空白对照。将所有三角瓶于 4 °C 静置 3 h 以便 TEHPL 进入细菌细胞。然后, 将每瓶混合物等分为 10 份(每份 70 mL)。其中 5 份(5 组)光照处理(37 °C 水浴, 180 W 光照 1 h), 另 5 份(5 组)不光照处理(37 °C 黑暗恒温箱中静置 1 h), 以探讨光照对 TEHPL 抗菌作用的影响。

各样品均置黑暗摇床上(150 r/min, 37 °C)培养 12 h, 其间每隔 2 h 测 1 次 $OD_{640\text{ nm}}$, 每隔 3 h 测 1 次 CFU/mL, 在培养 2 h 和 12 h 时检测 TCC/mL。

1.3.2 TEHPL 抗菌作用参数的检测方法 $OD_{640\text{ nm}}$ 值检测: 为消除 TEHPL 颜色的干扰, 各样品 $OD_{640\text{ nm}}$ 的空白对照为含相同浓度 TEHPL 储备液的无菌液体培养基。最后求出 5 个重复样品的平均 $OD_{640\text{ nm}}$ 值。

CFU 检测: 十倍稀释法(范秀容等, 1989), 取 CFU 在 30~300 的平板计数 CFU/mL。

TCC(Total Cell Count, 总菌数)检测: 美蓝染液(祖若夫等, 1993)离心(5 000 r/min, 20 min)取上清液。各样品取稀释度为 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 菌悬液 5 mL 于无菌试管中, 沸水浴加热 10 min 杀死细菌。再取 0.5 mL 已加热的各菌悬液于不同试管中, 分别加 4.5 mL 美蓝上清液混匀。染色 10 min, 取各混合菌液于血球计数板中, 将计数板于垫湿滤纸的加盖白瓷盘中静置 20 min, 计数 TCC/mL(祖若夫等, 1993)。

MBC 检测: 按照刘健等(2000)的方法稍加改进, 在一系列 0.95 mL 培养物($OD_{640\text{ nm}} = 0.2$)的试管中分别加不同浓度(表 2) TEHPL 储备液各 50 μL , 同时分别做溶剂、空白对照。按 1.3.1 进行光照和不光照处理, 每处理重复 5 组。置黑暗摇床(150 r/min, 37 °C)培养 24 h, 取 25 μL 培养液涂布无 TEHPL 的培养基平板, 培养 48 h, 无菌生长的平板所对应的最低 TEHPL 试管浓度即为最低杀菌浓度(MBC, mg/mL)。

2 结果

用 A、B、C 分别代表加 0.1、1.0、10.0 mg/mL TEHPL 储备液的样品, D、E 分别代表溶剂、空白对照。

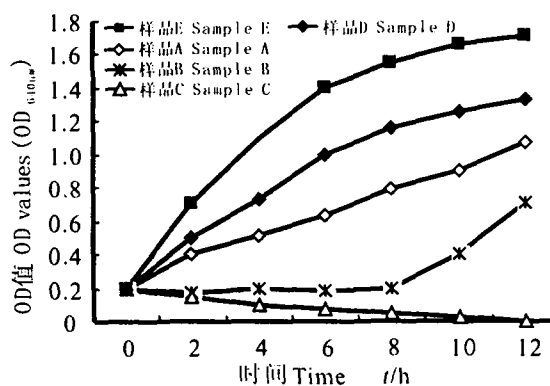


图 1 光照处理时, TEHPL 处理黄色短杆菌后的 $OD_{640\text{ nm}}$ 值

Fig. 1 $OD_{640\text{ nm}}$ values of *Brevibacterium flavum* samples containing TEHPL at different concentrations with illumination

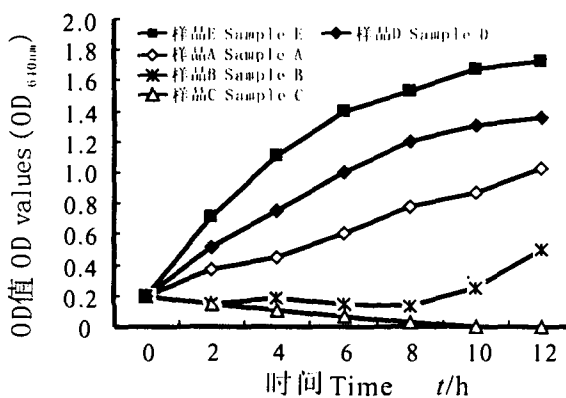


图 2 未光照处理时, TEHPL 处理黄色短杆菌后的 $OD_{640\text{ nm}}$ 值

Fig. 2 $OD_{640\text{ nm}}$ values of *Brevibacterium flavum* samples containing TEHPL at different concentrations without illumination

2.1 TEHPL 处理黄色短杆菌后的 OD 值

在图 1、2 中, 培养相同时间时, OD 值从大到小的顺序是: $OD_E > OD_D > OD_A > OD_B > OD_C$, 表明 40% 乙醇在一定程度上抑制该菌生长, TEHPL 可抗该菌, 且浓度增加作用增加。详细情况是: OD_A 一直缓升, 说明低浓度 TEHPL 只抑制该菌; 光照与

不光照的 OD_B 均在 8 h 时回升,说明较高浓度 TEHPL 使该菌延迟期变长,随时间推移作用消失。图 1 中光照 OD_C 在 12 h 时降至零,图 2 中未光照 OD_C 在 10 h 时降至零,表明高浓度 TEHPL 对该菌有杀菌作用,且不需光照。重复 5 次的结果表明,不同浓度 TEHPL 处理 A、B、C 各样品后,各样品的 OD_{640 nm} 之间以及 A、B、C 分别与 D、E 之间存在显

著差异(P<0.05)。

2.2 TEHPL 作用时培养 3、6、9、12 h 的 CFU 数和 n/n₀ 比

结果见表 1。

表 1 表明,培养时间相同时,A、B、C 的 CFU/mL 分别均比 D 的 CFU/mL 少(相应的 n/n₀<1),表明 TEHPL 抑制该菌生长;并且 TEHPL 的浓度

表 1 TEHPL 处理黄色短杆菌后的 CFU
Table 1 CFU of *Brevibacterium flavum* samples treated with TEHPL

时间 Time(h)	CFU/mL (A)	n/n ₀	CFU/mL (B)	n/n ₀	CFU/mL (C)	n/n ₀	CFU/mL (D)	CFU/mL (E)	n/n ₀
3(光照处理 Illumination)	4.93×10 ⁷	0.812 2	4.01×10 ⁷	0.660 6	6.30×10 ⁶	0.103 8	6.07×10 ⁷	7.50×10 ⁷	1.235 6
3(未经光照处理 Dark)	4.71×10 ⁷	0.741 7	3.86×10 ⁷	0.607 8	3.15×10 ⁶	0.049 6	6.35×10 ⁷	7.63×10 ⁷	1.201 6
6(光照处理 Illumination)	8.02×10 ⁷	0.899 1	4.22×10 ⁷	0.473 1	1.01×10 ⁶	0.011 3	8.92×10 ⁷	1.09×10 ⁸	1.222 0
6(未经光照处理 Dark)	7.59×10 ⁷	0.887 7	3.95×10 ⁷	0.462 0	8.68×10 ⁵	0.010 2	8.55×10 ⁷	1.14×10 ⁸	1.333 3
9(光照处理 Illumination)	1.70×10 ⁸	0.982 7	1.18×10 ⁸	0.682 1	9.05×10 ⁴	0.000 5	1.73×10 ⁸	2.79×10 ⁸	1.612 7
9(未经光照处理 Dark)	1.59×10 ⁸	0.854 8	1.10×10 ⁸	0.591 4	6.50×10 ⁴	0.000 3	1.86×10 ⁸	3.21×10 ⁸	1.725 8
12(光照处理 Illumination)	4.66×10 ⁸	0.772 8	4.20×10 ⁸	0.696 5	0	0	6.03×10 ⁸	1.13×10 ⁹	1.874 0
12(未经光照处理 Dark)	4.42×10 ⁸	0.690 6	3.97×10 ⁸	0.620 3	0	0	6.40×10 ⁸	1.21×10 ⁹	1.890 6

注:“n”表示在光照和未光照处理两种情况下用 TEHPL 处理的样品(A、B、C)和 E 的 CFU/mL 数;n₀ 表示两种情况下样品(D)的 CFU/mL 数;n/n₀ 表示两种情况下样品(A、B、C、E)的相对 CFU 数。

Note:“n”means the CFU/mL numbers of the samples(A,B,C) treated with TEHPL with and without illumination and of the sample E. n₀ means the CFU/mL numbers of the sample D with and without illumination;n/n₀ means the relative CFU numbers of the samples(A,B,C,E) with and without illumination.

越大,n/n₀ 越小,说明抑制作用越强(P<0.05)。经光照和未经光照的样品 C 的 CFU/mL 和 n/n₀ 在培养至 12 h 后降至零,说明高浓度 TEHPL 对该菌有杀菌作用,并且与经光照时的各样品相比,未经光照时 TEHPL 的杀菌作用稍强(P<0.05)。

TCC<TCC_B<TCC_A<TCC_D<TCC_E,样品 C 的相应 TCC 几乎下降至零;这进一步证明低浓度 TEHPL 对该菌有抑制作用,而高浓度 TEHPL 对该菌有杀菌作用。5 组重复样品的检测结果表明,在培养 12 h 后,不同浓度 TEHPL 处理的样品 A、B、C 的 TCC/mL 之间,A、B、C 分别与 D 的 TCC/mL 之间存在显著差异(p<0.05)。

2.4 MBC 检测结果

光照处理后 TEHPL 抗该菌的 MBC 是 0.300 mg/mL,未光照处理时 MBC 是 0.275 mg/mL,该检测结果说明 TEHPL 对该菌的杀菌作用不必光照(表 2)。

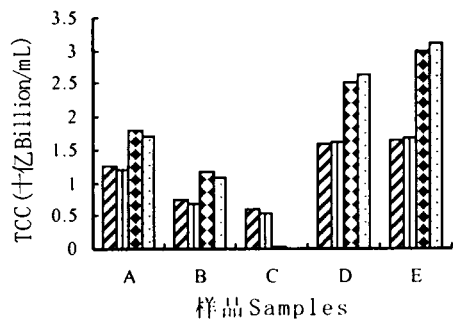


图 3 黄色短杆菌各样品的 TCC
Fig. 3 TCC of all the samples of *Brevibacterium flavum*

2.3 培养 2、12 h 时黄色短杆菌的 TCC

结果见图 3。无论是否光照,在培养至 12 h 时,

3 讨论

由于各处理样品体积均为 70 mL,所以 A、B、C 样品中 TEHPL 实际浓度分别是 0.005 7、0.057 1、0.571 4 mg/mL,前 2 种浓度在 OD_{640 nm}、CFU 和 TCC 检测中对黄色短杆菌有抑菌作用,后 1 浓度有杀菌作用,这与 TEHPL 对该菌的 MBC 分别是 0.300 mg/mL 和 0.275 mg/mL 的结果一致。各项检测均表明 TEHPL 对该菌的抑杀作用依赖于其浓

度且不需光照。

由于 HPL 中金丝桃素的抗肿瘤和抗病毒(包括 HIV)作用需要光照条件来增强(Ebermann 等, 1996; Miccoli 等, 1998; Weller 等, 1997), 但金丝桃素在强光照射下可能引起光敏性皮炎(Gulick 等, 1999), 这一副作用使其抗肿瘤、抗病毒作用的发挥

受到一定限制。但因 TEHPL 的抗抑郁作用不依赖于光照, 避免了光敏化副作用, 所以在临床上得到了广泛应用(Ernst 等, 1998)。例如, 德国每天处方在 1996 年一年中就开出 131.5 百万剂 TEHPL 用于治疗轻度到中度抑郁症(Orth 等, 1999), 表明 TEHPL 在临床上应用的安全性已得到证实。而笔者

表 2 MBC 检测结果
Table 2 Result of MBC measurement

黄色短杆菌 <i>Brevibacterium flavum</i>	TEHPL 储备液浓度 Concentrations of TEHPL stock solutions (mg/mL)																										对照 Controls							
	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0	10.5	11.0	11.5	12.0	12.5	13.0	13.5	14.0	14.5	15.0	D	E			
光照处理 Illumination	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
未光照处理 Dark	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注: “+”表示经培养后试管中有存活的细菌;“-”表示经培养后试管中无存活的细菌。

Note: “+”There were survival bacterial cells in the test tubes after incubation; “-”There were not any survival bacterial cells in the test tubes after incubation.

实验发现 TEHPL 具有抗菌作用且不需光照, 因此, 将其用作临床抗菌药对人体既安全, 又可避免可能出现的光敏化副作用, 还可控制病人因细菌感染可能引起的抑郁症状, 具有较好的临床应用前景。我国 HPL 资源丰富, 如果能将此资源开发成抗菌和抗抑郁药物, 既可有效利用植物资源, 还可对我国医药事业做出一份贡献。

参考文献:

北京大学生物系生物化学教研室. 1979. 生物化学实验指导 [M]. 北京: 人民教育出版社, 43-45.
 范秀容, 李广武, 沈 萍. 1989. 微生物学实验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 260-261, 138-141.
 祖若夫, 胡宝龙, 周德庆. 1993. 微生物学实验教程 [M]. 上海: 复旦大学出版社, 119-125.
 Ebermann R, Alth G, Kreitner M, et al. 1996. Natural products derived from plants as potential drugs for the photodynamic destruction of tumor cells[J]. *J Photochem Photobiol B*, 36(2): 95-97.
 Ernst E, Rand JI, Barnes J, et al. 1998. Adverse effects profile of the herbal antidepressant St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 54(8): 589-594.
 Gulick RM, McAuliffe V, Holden-Wiltse J, et al. 1999. Phase I studies of hypericin, the active compound in St. John's Wort, as an antiretroviral agent in HIV-infected adults. AIDS clinical trials group protocols 150 and 258 [J]. *Ann Intern Med*, 130(6): 510-514.
 Hippus H. 1998. St John's Wort (*Hypericum perforatum*)—a herbal antidepressant [J]. *Curr Med Res Opin*, 14(3): 171-184.

Hubner WD, Lande S, Podzuweit H. 1994. Hypericum treatment of mild depressions with somatic symptoms [J]. *J Geriatr psychiatry Neurol*, 7(Suppl): 12-14.
 Kubin A, Wierrani F, Jindra RH, et al. 1999. Antagonistic effects of combination photosensitization by hypericin, meso-tetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC) and Photofrin II on *Staphylococcus aureus* [J]. *Drugs Exptl Clin Res*, 25(1): 13-21.
 Liu J (刘 健), Chen Y (陈 扬), Hou F (侯 芳), et al. 2000. Comparative in vitro activity of Cefitibuten (头孢布烯体外抗菌作用) [J]. *Chin J Clin Pharmacol* (中国临床药理学杂志), 16(4): 243-250.
 Meruelo D, Lavie G, Lavie D. 1988. Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85(14): 5 230-5 234.
 Miccoli L, Beurdeley-Thomas A, De Pinieux G, et al. 1998. Light-induced photoactivation of hypericin affects the energy metabolism of human glioma cells by inhibiting hexokinase bound to mitochondria [J]. *Cancer Res*, 58(24): 5 777-5 786.
 Orth HC, Rentel C, Schmidt PC. 1999. Isolation, purity analysis and stability of hyperforin as a standard material from *Hypericum perforatum* L. [J]. *J Pharm Pharmacol*, 51(2): 193-200.
 Prince AM, Pascual D, Meruelo D, et al. 2000. Strategies for evaluation of enveloped virus inactivation in red cell concentrates using Hypericin [J]. *Photochem Photobiol*, 71(2): 188-195.
 Weller M, Trepel M, Grimm C, et al. 1997. Hypericin-induced apoptosis of human malignant glioma cell is light-dependent, independent of bcl-2 expression, and does not require wild-type p53 [J]. *Neurol Res*, 19(5): 459-470.