

文章编号: 1001-1498(2007)06-0872-04

## 地锦叶片正丁醇提取物的抑菌作用

刘华玲<sup>1</sup>, 马欣荣<sup>1\*</sup>, 孙振元<sup>2</sup>

(1. 中国科学院成都生物研究所, 四川 成都 610041; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

关键词: 地锦叶片; 正丁醇提取物; 抑菌作用; 最低抑菌浓度 (MIC)

中图分类号: R282.71

文献标识码: A

## Antimicrobial Activity of n-butanol Extract from *Parthenocissus tricuspidata* Leaves

LIU Hua-ling<sup>1</sup>, MA Xin-rong<sup>1\*</sup>, SUN Zhen-yuan<sup>2</sup>

(1. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China;

2. Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China)

**Abstract:** The n-butanol extract from *Parthenocissus tricuspidata* leaves were examined for antimicrobial activity against five microbes by using filter paper method. The results showed that the extract restrained the growth of *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus*, while inhibited the growth of yeast at a certain extent. And the minimum inhibitory concentrations (MIC) were 0.25, 0.3, 0.25, 0.3, 1.0 g·mL<sup>-1</sup> respectively. Moreover the n-butanol extract also could restrained some bacterium strains, which had antibiotic resistances. After heated at 95 °C for 2~3 h, the n-butanol extract from *P. tricuspidata* leaves still presented strong bacteriostasis to germs. This result indicated that the substance had heat-stability.

**Key words:** *Parthenocissus tricuspidata* leaves; n-butanol extract; antimicrobial activity; minimal inhibitory concentration (MIC)

地锦 [*Parthenocissus tricuspidata* (Sieb. et Zucc.) Planch.], 又名爬山虎、爬墙虎、地锦、常春藤、红葡萄藤、走游藤、枫藤、红葛、三叶茄等, 为葡萄科 (Vitaceae) 爬山虎属 (*Parthenocissus* Planch.) 多年生木质落叶藤本<sup>[1]</sup>。共有 13 个种, 我国有 10 种, 其中 1 种由北美引入栽培<sup>[2]</sup>。地锦枝条粗壮, 多分支, 先端具粘性吸盘, 具有强大的吸附和攀缘能力, 能牢固地吸附在岩石、墙壁等物体向上攀缘伸展, 因而得名爬山虎。在没有攀附物时, 它的茎叶在地面蔓生, 宛如锦被盖地, 故又称地锦。地锦生长迅速, 集观赏、绿化、药用价值于一身, 是一种具有巨大潜在开发利用价

值的优良园林绿化及药用植物。种子含油量高, 可达 28%, 其中含软脂酸、硬脂酸、油酸、棕榈油酸等; 冠瘿中含有羧乙基赖氨酸和羧乙基鸟氨酸等重要化工原料<sup>[1-3]</sup>。其果实可酿酒, 果实中含有丰富的人体必需的微量元素, 具有重要的生理功能、营养作用和临床医疗意义<sup>[4]</sup>。

传统中医认为, 地锦的茎、根可入药, 其味甘性温, 具有祛风通络、活血解毒等功效, 可治产后血淤、腹中有块、赤白带下、风湿关节痛、偏头痛等症; 外用可医治跌打损伤、痈疔肿毒<sup>[5]</sup>。在朝鲜民间, 也利用地锦的叶片治疗关节炎、黄疸病、牙痛、神经痛等<sup>[6]</sup>。

收稿日期: 2006-10-16

基金项目: 国家“863”资助项目 (2001AA244031); 地锦种质资源创新及优良品种培育

作者简介: 刘华玲 (1982—), 女, 山东菏泽人, 硕士研究生, 研究方向: 分子遗传及植物资源研究。

\* 通讯作者: 马欣荣; Tel: 028-85252387; E-mail: maxr@cih.ac.cn

国外已较早展开了对地锦的研究,对其化学成分、冠瘿组织生长发育以及卷须发育附着特性等多方面进行了初步探索<sup>[7~10]</sup>。虽然国内研究起步较晚,但在爬山虎属植物资源开发利用方面取得一定进展<sup>[11,12]</sup>。然而,目前国内外有关地锦的药理研究及其抑菌方面的研究报道极少<sup>[13]</sup>,其药用价值没有得到应有的重视。

本研究以地锦叶片干粉为材料,对其提取物进行抑菌研究,探讨其对几种常见菌的抑制效果,为地锦抑菌活性物质的开发利用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 地锦 本实验所用地锦叶片为三叶地锦(*P. tricuspidata*),于 2005 年 11 月底采自中国科学院成都生物研究所外墙,洗净,烘干粉碎后备用。

#### 1.1.2 供试菌

革兰氏阴性菌:

大肠杆菌 [*Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers] 菌株 JM109,不具有抗生素抗性;

大肠杆菌 (*E. coli*) 菌株 Rosetta-gami pLyss,具卡那霉素、氯霉素、四环素抗性;

根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens* Starr et Weiss) EHA105,具利福平抗性。

革兰氏阳性菌:

枯草芽孢杆菌 [*Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn] WB600,不具有抗生素抗性;

短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus* Meyer et Gottheil) BA06,不具有抗生素抗性。

真菌:

巴斯德毕赤酵母菌 [*Pichia pastoris* (Guilliem.) Phaff] X-33。

1.1.3 培养基 细菌培养用 LB 培养基,酵母菌培养用 YPD 培养基<sup>[14]</sup>。

1.1.4 试剂 实验试剂均为国产分析纯试剂。

### 1.2 方法

1.2.1 地锦叶片正丁醇提取物的制备 取地锦叶干粉 10 g,用 15 倍的 80%乙醇(质量:体积)室温下浸泡两次,每次 24 h,合并滤液得到叶的乙醇浸提物。此浸提物加适量的水,依次经石油醚、乙酸乙酯萃取,取水相;再经正丁醇萃取,取上层正丁醇萃取液置于 95 的水浴浓缩 2~3 h 至 10 mL,得到地锦叶片的正丁醇提取物,浓度即为 1 g·mL<sup>-1</sup>原生药

液(指 1 g 地锦叶片干粉,经过提取后获得的物质,全部溶于 1 mL 提取液中,即 1 mL 提取液中所含生药量为 1 g)。置于 4 冰箱保存备用。

#### 1.2.2 提取物的抑菌试验——滤纸片法

1.2.2.1 菌种活化 上述供试菌原种从 -70 冰箱取出后,分别接种于适宜的新鲜培养基平板划线培养,挑取单菌落分别接种于相应的 5 mL 液体培养基中扩大培养。大肠杆菌、短小芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌分别接种于 LB 培养基中,37 恒温培养过夜。将农杆菌接种于 LB 培养基中,28 恒温培养过夜。将酵母接种于 YPD 培养基中,28 恒温培养过夜。用无菌生理盐水配制成 1×10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>的菌液,备用。

1.2.2.2 滤纸片的制备 将新华 1 号滤纸用打孔器制成直径为 6 mm 的圆片,经高压蒸汽灭菌后,分别置于地锦叶片正丁醇提取物试液、无菌水、正丁醇试剂中浸泡 6 h,取出晾干备用。

1.2.2.3 抑菌活性测定 滤纸片直径为 6 mm,抑菌圈直径 > 15 mm 为高度敏感、10~15 mm 为中度敏感、7~9 mm 为低度敏感<sup>[15,16]</sup>。抑菌圈直径为 7 mm,定义为最低抑菌浓度(MIC),低于 7 mm 视为没有抑菌效果。

1.2.2.4 最低抑菌浓度(MIC)的测定 用正丁醇稀释地锦叶片正丁醇提取物,配成若干不同的浓度,使含生药量分别为 1、0.75、0.5、0.3、0.25、0.1、0.05 g·mL<sup>-1</sup>的药液,浸泡无菌滤纸片。同时设正丁醇和无菌水作阴性对照。将各浸泡滤纸片置于加有菌液的平板上,分别在供试菌适宜条件下培养。16 h 后取出观察各菌的生长情况,分别找出产生抑菌圈的被浸泡滤纸片,其中的最低浓度即为最低抑菌浓度(MIC)。如此重复 3 次,取其平均值。

1.2.3 提取物对携抗生素抗性菌的抑制作用——滤纸片法 取大肠杆菌菌株 Rosetta-gami pLyss 的菌液 0.1 mL 加入冷至 50 的相应培养基中,混合均匀后倒板。用无菌镊子夹取浸有地锦原液(1.0 g·mL<sup>-1</sup>)滤纸片于培养皿中,同时用分别浸有卡那霉素(50 mg·L<sup>-1</sup>)、氯霉素(50 mg·L<sup>-1</sup>)、四环素(50 mg·L<sup>-1</sup>)和正丁醇的滤纸片做空白对照。37 培养 24 h 后,取出测量滤纸片抑菌圈的直径大小,看其抑菌效果。如此重复 3 次,取其平均值。

取根癌农杆菌 EHA105 菌液 0.1 mL 加入冷至 50 的相应培养基中,混合均匀后倒板。用无菌镊子夹

取浸有地锦原液 (1.0 g · mL<sup>-1</sup>) 滤纸片于培养皿中, 同时用浸有利福平 (50 mg · L<sup>-1</sup>) 的滤纸片做空白对照。37 °C 培养 24 h 后, 取出测定滤纸片抑菌圈的直径大小, 看其抑菌效果。如此重复 3 次, 取其平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 提取物的抑菌作用

滤纸片法测定抑菌作用, 每种菌 3 次重复结果, 均值见表 1。

表 1 地锦叶片正丁醇提取物的抑菌效果  
(抑菌圈直径, mm)

供试试剂	实验菌种				
	大肠杆菌	根癌农杆菌	枯草芽孢杆菌	短小芽孢杆菌	酵母菌
正丁醇提取物	14.5	13.1	14.0	13.7	7.0
无菌水(对照)	/	/	/	/	/
正丁醇(对照)	/	/	/	/	/

注: 表中数据为抑菌圈直径平均值, 其中“/”表示无抑菌圈。

由表 1 中抑菌圈的大小可以看出, 地锦叶片正丁醇提取物对大肠杆菌、根癌农杆菌、枯草芽孢杆菌、短小芽孢杆菌的抑菌圈直径均值都在 13 ~ 15 mm 之间, 说明 4 种细菌对该提取物都达到了中度敏感。表明正丁醇提取物对这几种革兰氏阳性和革兰氏阴性菌均表现出良好的抑菌效果。但该提取物对酵母菌仅有微弱抑菌作用。对照浸泡无菌水和正丁醇的纸片无抑菌作用。

### 2.2 提取物的最低抑菌浓度

取每种菌 3 次重复结果, 该提取物对大肠杆菌、根癌农杆菌、枯草芽孢杆菌、短小芽孢杆菌及酵母菌的最低抑菌浓度分别为 0.25, 0.3, 0.25, 0.3, 1.0 g · mL<sup>-1</sup> 原生药液 (表 2); 随着浓度增加, 抑菌圈增大, 表明抑菌能力强弱与浓度成正比。以对大肠杆菌 JM109 的抑制作用为例说明, 结果见图 1。

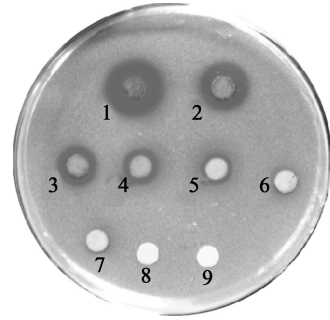
表 2 地锦提取物最低抑菌浓度测定结果

实验菌种	浓度 / (g · mL <sup>-1</sup> )						
	1	0.75	0.5	0.3	0.25	0.1	0.05
大肠杆菌	+	+	+	+	+	-	-
根癌农杆菌	+	+	+	+	-	-	-
枯草芽孢杆菌	+	+	+	+	+	-	-
短小芽孢杆菌	+	+	+	+	-	-	-
酵母菌	+	-	-	-	-	-	-

注: “+、-” 表示抑菌作用的有无。

### 2.3 提取物对一些抗性菌的抑制作用

对某些具有抗生素抗性的细菌, 同样用滤纸片



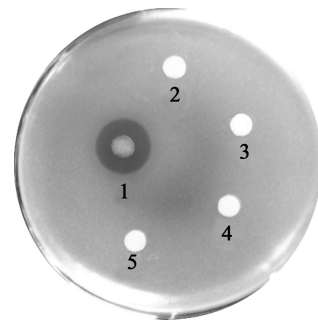
以不同浓度的原生药液, 滤纸片法测定对 *E. coli* JM109 的抑制作用。1~7: 浓度分别为 1.0, 0.75, 0.5, 0.3, 0.25, 0.1, 0.05 g · mL<sup>-1</sup>, 8 为正丁醇, 9 为无菌水。

图 1 正丁醇提取物的抑菌作用

法, 检测地锦叶片正丁醇提取物的作用。结果表明地锦正丁醇提取物对某些抗性菌仍表现出同样的抑菌效果。

大肠杆菌菌株 Rosetta-gami pLyss 同时具一定的卡那霉素、氯霉素、四环素抗性, 根癌农杆菌 EHA105 具利福平抗性。本实验结果表明, 地锦叶片正丁醇提取物对这两种菌株表现出良好的抑制作用, 抑菌圈直径平均值分别达到了 14.2 mm 和 13.2 mm。结果见图 2、3。

可见, 地锦正丁醇提取物的抑菌作用不受细菌自身的抗性影响。



1. 地锦提取物; 2. 卡那霉素; 3. 氯霉素; 4. 四环素; 5. 正丁醇  
图 2 地锦提取物对大肠杆菌 Rosetta-gami pLyss 的抑制作用



1. 地锦提取物; 2. 利福平  
图 3 地锦提取物对根癌农杆菌 EHA105 的抑制作用

## 2.4 提取物的热稳定性

叶片正丁醇提取物的浓缩过程是在 95 °C 高温下进行的,浓缩后仍表现出同样的抑菌作用,表明正丁醇提取物的抑菌作用有较强的热稳定性。

## 3 讨论

随着抗生素的广泛应用,微生物的耐药性问题也日趋严重,许多抗菌药物失效。由多重耐药菌和许多新的病原微生物引起的感染对人类健康造成了极大的威胁,因此寻求高效、低残留的天然抗菌物质逐渐成为研究热点。本试验通过地锦提取物的体外抑菌试验,确定了地锦叶片中含有抑制细菌生长的活性物质,而且该物质的抑菌效果不为菌体自身的某些抗性所影响,为开发利用地锦研制新一代抗菌剂提供了理论依据。

我国地锦资源丰富,北起长白山,南至广东、广西,分布广泛。因此,如果能将我国丰富的地锦资源开发成抗菌药,既可有效地利用植物资源,还能带来较高的经济效益,具有良好的开发前景和应用价值。

进一步将开展地锦抑菌活性物质的纯化、结构、性质及其在地锦中的含量研究,以及活性物质的作用机制研究,以期地为地锦资源综合利用打下基础。

### 参考文献:

- [1] 中药大辞典编委会. 中药大辞典(上册)[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1975: 809
- [2] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志(第 48 卷)[M]. 北京:科学出版社, 1998: 12~27
- [3] 余传隆, 黄泰康, 丁志遵, 等. 中药辞海(第一卷)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 1993: 1 967~1 968
- [4] 赵虹桥, 董爱文, 朱炯波, 等. 爬山虎果实中微量元素的快速测定[J]. 中国林副特产, 2005(1): 2~3
- [5] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编(上册)[M]. 北京:人民卫生出版社, 1992: 559~560
- [6] Hwang H K, Sung H K, Wang W K, et al. Flavonol glycosides from *Parthenocissus tricuspidata*[J]. Yakhak Hoechi, 1995, 39(3): 289~296
- [7] Saleem M, Kim H J, Jin C, et al. Antioxidant caffeic acid derivatives from leaves of *Parthenocissus tricuspidata* [J]. Arch Pharm Res, 2004, 27(3): 300~304
- [8] Lins A P, Felicio J D, Braggio M M, et al. A resveratrol dimer from *Parthenocissus tricuspidata* [J]. Phytochemistry, 1991, 30(9): 3144~3146
- [9] Lipetz J, Galston A W. Indole acetic acid oxidase and peroxidase activities in normal and crown gall tissue cultures of *Parthenocissus tricuspidata*[J]. American Journal of Botany, 1959(46): 193~196
- [10] Ragni G, Conti G F, Cinti S, et al. *Parthenocissus tricuspidata*: a plant model of biological adhesion [J]. Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol, 1988, 31(3~4): 189~205
- [11] 孙振元, 巨关升, 张毅功. 爬山虎在绿化中的应用与控制技术[J]. 林业实用技术, 2004(5): 39~39
- [12] 张毅功, 陆诗雷, 孙振元, 等. 爬山虎属植物利用研究[J]. 资源科学, 2005, 27(5): 141~145
- [13] 董爱文, 陈建华, 周辉林, 等. 爬山虎多糖的提取及抑菌作用[J]. 广州食品工业科技, 2003, 19(3): 15~17
- [14] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd Edition [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 1 595~1 604
- [15] 中华人民共和国卫生部医政司. 全国临床检验操作规程(第三版)[M]. 南京:东南大学出版社, 1997: 556~561
- [16] 王萍, 吴冬青, 李彩霞. 旋覆花乙醇提取物的抗氧化性与抑菌作用研究[J]. 中国医学理论与实践, 2005, 15(1): 142~143