

# 甘草根提取物对变形链球菌和嗜酸乳杆菌的体外抗菌能力研究

霍存录<sup>1, 2</sup> 陈国宝<sup>1, 2</sup> 朱志贤<sup>1, 2\*</sup>

1. 甘肃泛植制药有限公司 甘肃兰州 730010

2. 甘肃省甘草制品开发与应用技术创新中心 甘肃兰州 730010

**摘要:** 目的 体外评价甘草提取物对变形链球菌和嗜酸乳杆菌的抗菌效果, 并将其与氯己定抗菌效果进行对比。方法 在实验室制备了不同浓度的甘草水提取物和乙醇提取物, 然后对其进行微生物抑制能力进行分析, 以使用琼脂扩散试验确定其抑制区直径, 并使用系列肉汤稀释法确定对变形链球菌和嗜酸乳杆菌的最小抑制浓度(MIC)。同时使用氯己定(CHX)作为阳性对照。结果显示: 甘草水提取物和甘草乙醇提取物对变形链球菌和嗜酸乳杆菌的MIC分别为25%和12.5%。甘草的水和乙醇提取物在48小时时对变形链球菌的平均抑制区直径分别为22.8mm和26.7mm。甘草的水和乙醇提取物在48小时时对嗜酸乳杆菌的平均抑制区直径分别为14.4mm和15.1mm。CHX对变形链球菌和嗜酸乳杆菌在48小时分别为20.5mm和13.2mm, 结论: 甘草乙醇提取物对变形链球菌和嗜酸乳杆菌的抑制作用优于甘草水提取物和CHX。

**关键词:** 甘草提取物; 抑菌能力; 变形链球菌; 嗜酸乳杆菌

口腔健康是整体健康的重要组成部分, 而龋齿作为全球范围内普遍面临的口腔健康问题之一, 已经引起了广泛的关注。它不仅影响人们的进食、说话, 还可能引起疼痛、感染, 甚至导致全身健康问题。龋齿是一种慢性、传染性疾病, 会贯穿整个生命周期。这种疾病的基本过程包括细菌粘附在牙齿表面, 形成牙菌斑, 以及饮食碳水化合物发酵产生的细菌来源的酸对牙釉质的局部脱矿。有相当多的证据表明变异链球菌和嗜酸乳杆菌是实验动物和人类釉质龋发生的重要病原体。通过定期刷牙或使用牙线清洁能够去除部分口腔致病菌, 但这种机械手段很难将牙齿表面凹坑或缝隙中的变形链球菌完全清除。因此刷牙过程中需要结合一些具有抑菌药物的成分比如氯己定等来抑制微生物数量减少牙菌斑的生成, 进而有效预防龋齿的发生。然而, 这些抑菌药物存在一些副作用, 比如口腔黏膜刺激、牙齿染色和细菌耐药性的出现等。所以寻找一些更加安全有效的天然提取物做为牙膏抑菌剂是非常有必要的。

甘草是多年生草本豆科甘草属植物, 作为一种传统中药有补脾益气、缓急止痛、清热解毒、调和诸药的功效, 在现代口腔健康相关研究中有较多和甘草制品相关的研究。陈钢、许海燕等<sup>[1]</sup>发现甘草酸二钾对牙龈卟啉单胞菌具有抑制作用, 最小抑菌浓度1.875g/L; 含0.2%甘草酸二钾的牙膏具有抑制牙龈卟啉单胞菌的作用, 抑菌环直径为20.5mm。郑晓霞<sup>[2]</sup>等对甘草酸二钾的抗炎活性进行了评价,

实验结果显示1000 μg/mL的甘草酸二钾能够显著抑制LPS刺激RAW264.7细胞分泌NO和IL-6, 且含甘草酸二钾的牙膏对二甲苯致小鼠耳肿胀也具有明显的抑制作用。陈巧<sup>[3]</sup>等研究了甘草提取物对牙龈卟啉单胞杆菌、中间普氏菌、具核梭杆菌和伴放线放线杆菌的MIC值分别为1.50、1.50、0.75和1.50mg/mL, MBC值分别为6、3、3和3mg/mL。当甘草提取物达到对四种细菌的MBC值时, 对牙龈卟啉单胞杆菌、中间普氏菌、伴放线放线杆菌可在2h后可达到杀菌效果, 对于具核梭杆菌可在4h后达到杀菌效果。徐天生<sup>[4]</sup>等研究单体溶菌酶和甘草提取物的抑菌能力, 作为两款功效物质的复配基础, 以抑菌率为指标, 优选出溶菌酶和甘草提取物的最佳复配比例为3:1时的复配物具有较好且全面的抑菌能力, 使得溶菌酶对革兰氏阴性菌的抑菌能力较同等用量下单体溶菌酶的抑菌能力有了较大的提升。将此复配物应用在不含任何功能剂和防腐剂的4种体系的牙膏配方中, 验证其抑菌能力, 结果与复配物的抑菌能力基本一致, 说明复配物在牙膏中抑菌能力没有受到影响。

本研究的主要内容是以水和70%乙醇分别为溶剂对甘草进行提取得到提取液在体外评估它们对变形链球菌和嗜酸乳杆菌的抑制作用。

## 1 实验部分

### 1.1 材料与方法:

试验菌株:



变形链球菌美国菌种保藏中心 ATCC25175;  
嗜酸乳杆菌美国菌种保藏中心 ATCC 4356。

#### 实验材料:

甘草(甘肃泛植制药有限公司)、水、乙醇(国药集团化学试剂有限公司)、氯己定 0.2% (国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 培养基和培养条件: 牛心脑浸液培养基 (BHI 培养基)、BHI 液体培养基 (北京陆桥技术有限责任公司), 液体硫乙醇酸盐培养基 (杭州天和微生物试剂有限公司)。培养条件: 37℃, 80%N<sub>2</sub>、10%CO<sub>2</sub> 及 10% H<sub>2</sub>O。

1.3 主要仪器: 厌氧培养箱 (I)Y- II 型 (义乌冷动机总厂), 麦氏比浊仪 (BIORED 公司), 电子分析天平 (BP211D 型, Sartorius 公司), Millipore 纯水仪 (Millipore 公司), 游标卡尺。

#### 1.4 甘草提取物的制备:

甘草水提取物: 取干燥的甘草根部粉碎后称取 50g, 加水 500ml 煎煮提取 1h, 过滤除去药渣及不溶物, 浓缩至 100ml 保存做为甘草水提取物基准液。

甘草乙醇提取物: 取干燥的甘草根部粉碎后称取 50g, 加 70% 乙醇 500ml 煎煮提取 1h, 过滤除去药渣及不溶物, 浓缩至 100ml 保存做为甘草乙醇提取物基准液。

#### 1.5 微生物的复苏:

通过在血琼脂培养基上铺板使来自原种的细菌菌株复活。在 37° C 下孵育过夜后, 选择分离的菌落并确认生物的身份。将分离的菌落转移到细菌的无菌脑心浸液 (BHI) 肉汤中, 并再次孵育过夜。通过使用 0.5 McFarland 的浊度标准将生长浓度调节至 10<sup>5</sup> 个生物体 /mL。

琼脂沟平板法检测抗菌药物属性, 琼脂扩散试验用于评估提取物的抗微生物潜力。使用拭子技术用约 100μL 微生物菌株接种含有 18 mL 变形链球菌和嗜酸乳杆菌 BHI 琼脂的石化菌。

使用无菌标准装置将直径为 8 毫米的孔切成固化的琼脂培养基。将 100 μl 每种提取物倒入各自的孔中, 并将板在 37℃ 下孵育 48 小时。为了确保所有发现的一致性, 在严格的无菌条件下进行并重复实验。每种提取物的抗菌活性以每种提取物在孵育期结束时产生的抑制区直径 (单位: mm) 的平均值表示。

1.6 甘草水提取物最低抑菌浓度的测定, 将体积为 200 μL 的 BHI 肉汤添加到 10 个 MIC 管 / 菌株中。在含有 200μl 肉汤的第一个 MIC 试管中, 加入 200μL 原液。充分混合后, 将 200 μL 转移到第二个 MIC 管中。这一持续到最后 (第 10) 管。从最后一根试管中丢弃 200μL 最终溶液。

通过连续稀释, 甘草粉的浓度分别为 50%、25%、12.5%、6.25%、3.1%、1.56%、0.78%、0.39%、0.19% 和 0.09%。向 10 个不同浓度的这种制备的 MIC 管中的每一个加入 200μL 早期制备的变异链球菌菌株, 使最终体积 / 管为 400μL。

培养后, 通过肉眼检查试管来测定 MIC 值。在每一批测试中, 都设置了阳性和阴性对照。含有肉汤加菌株的阳性对照显示浑浊, 而含有肉汤的阴性对照仅显示清澈。在每个系列的试管中, 最后一个有澄清上清液的试管被认为没有任何生长, 并作为 MIC 值。MIC 管中的浊度表明细菌菌株的生长, 这意味着这些生物体对甘草水提取物具有耐药性。

甘草醇提取物最低抑菌浓度的测定, 制备 50% 浓度的溶液作为储备溶液。提取物的工作浓度分别为 50%、25%、12.5%、6.25%、3.1%、1.56%、0.78%、0.39%、0.19% 和 0.09%。进行了与上述类似的连续稀释程序试验甘草乙醇提取物的抗菌作用。

#### 1.7 统计分析:

收集的数据在 Microsoft Office Excel 中进行了分类和制表。使用 SPSS for windows version 17 软件 (IBM Corp, Chicago, USA) 进行统计分析。产生了对问题的回答的频率分布。由于数据是连续类型的, 因此使用参数测试进行分析。计算平均值 ( $\bar{x}$ ) 和标准差。单因素方差分析用于多组比较,  $P < 0.05$  被认为具有统计学意义。

#### 1.8 实验结果:

在 48 小时结束时, 本研究中使用的所有试样均显示出统计学上显著的抗微生物活性 ( $P=0.002$ )。

甘草根水提取物、甘草根乙醇提取物、0.2% 氯己定对变形链球菌的抑菌圈直径平均值分别为 22.8mm、26.7mm、20.5mm; 对变形链球菌的抑制能力甘草根乙醇提取物 > 甘草根水提取物 > 0.2% 氯己定; 甘草根乙醇提取物与 0.2% 氯己定相比具有统计学显著差异。

甘草根水提取物、甘草根乙醇提取物、0.2% 氯己定对嗜酸乳杆菌的抑菌圈直径平均值分别为 14.2mm、15.1mm、13.2mm; 对嗜酸乳杆菌的抑制能力甘草根乙醇提取物 > 甘草根水提取物 > 0.2% 氯己定; 甘草根乙醇提取物与 0.2% 氯己定相比具有统计学显著差异。

图 1 显示了甘草根提取物 (水提取物和醇提取物) 在 48 小时对变形链球菌的抗菌活性。甘草提取物对变形链球菌的抑制作用优于 CHX。甘草根提取物中, 乙醇提取物对变形链球菌的抑制作用最强。

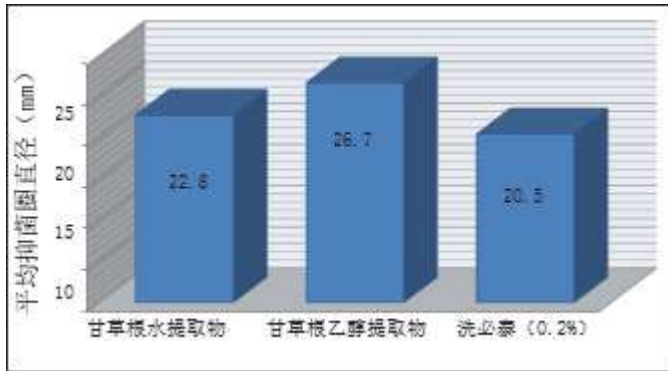
图 2 显示了甘草根提取物 (水提取物和醇提取物) 在 48 小时对嗜酸乳杆菌的抗菌活性。甘草提取物对变形链球菌的抑制作用优于 CHX。甘草根提取物中, 乙醇提取物对嗜酸乳杆

表一：甘草提取物在 48 小时对变形链球菌和嗜酸乳杆菌的抑菌圈直径

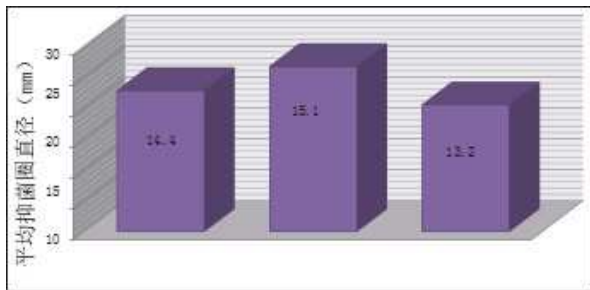
样品	变形链球菌实验组		嗜酸乳杆菌实验组	
	平均抑制圈直径 (单位: mm) ±SD	P 值	平均抑制圈直径 (单位: mm) ±SD	P 值
甘草根水提取物	22.8±0.27	0.002*	14.4±0.21	0.003*
甘草根乙醇提取物	26.7±0.34		15.1±0.12	
氯己定 (0.2%)	20.5±0.42		13.2±0.24	

方差分析：方差分析\*在 0.05 水平上显著，SD：标准差，

菌的抑制作用最强。



图一：甘草提取物在 48 小时对变形链球菌的抑菌圈直径



图二：甘草提取物在 48 小时对嗜酸乳杆菌的抑菌圈直径

甘草根水提取物对变形链球菌和嗜酸乳杆菌的 MIC 测试显示。变异链球菌对浓度为 50%、25% 的甘草根水提取物表现出敏感性，对浓度分别为 12.5%、6.25%、3.1%、1.56%、0.78%、0.39%、0.19% 和 0.09% 的菌株表现出抗性。

嗜酸乳杆菌仅在 50% 的浓度下对甘草根水提取物表现出敏感性，并对 25%、12.5%、6.25%、3.1%、1.56%、0.78%、0.39%、0.19% 和 0.09% 的浓度表现出抗性。因此甘草根水提取物对变形链球菌的最小抑菌浓度是 25%，对嗜酸乳杆菌的最小抑菌浓度是 50%。

甘草根乙醇提取物对变形链球菌和嗜酸乳杆菌的 MIC 测试显示。变异链球菌对浓度为 50%、25% 和 12.5% 的甘草根乙醇提取物表现出敏感性，对浓度分别为 6.25%、3.1%、1.56%、0.78%、0.39%、0.19% 和 0.09% 的菌株表现出抗性。

嗜酸乳杆菌仅在 50%、25%、12.5%、6.25% 的浓度下对甘草根乙醇提取物表现出敏感性，并对 3.1%、1.56%、0.78%、

0.39%、0.19% 和 0.09% 的浓度表现出抗性。因此甘草根乙醇提取物对变形链球菌的最小抑菌浓度是 12.5%，对嗜酸乳杆菌的最小抑菌浓度是 6.25%。

## 2 讨论

目前用于治疗龋齿的抗微生物策略主要包括机械去除牙菌斑或用抗菌化合物广泛杀死口腔细菌。由于清洁的牙齿表面为共生菌和致病菌在口腔的非无菌环境中重新定植提供了平等的机会，这些清除所有细菌、杀死所有细菌的方法显示出有限的效果。致龋细菌通常在治疗后重新占据牙菌斑的主导地位，并开始另一个致龋周期。本研究旨在开发一种针对变异链球菌的靶向抗微生物疗法。通过选择性地杀死或抑制致病性牙菌斑内的致龋细菌，可以建立共生微生物群落。这种健康的牙菌斑将成为有效的屏障，防止随后致龋细菌在牙齿表面定植，从而产生持续的抗龋治疗效果。

本研究考查了甘草根水提取物和乙醇提取物对变形链球菌和嗜酸乳杆菌的体外抑制能力，结果显示甘草根乙醇提取物抑菌能力优于甘草根水提取物。两者抑菌能力的差异可能是和提取组分差异有关。水提取拿到更多的大极性组分如糖类、甘草酸类、黄酮苷类；乙醇提取拿到更多小极性组分如甘草黄酮类、香豆素类。甘草根提取物的抑菌圈直径大于 0.2% 氯己定，是存在替代氯己定进行口腔抑菌应用的开发前景。

另外口腔是一个综合环境，除药物对微生物作用之外，还存在药物对整个环境的调控与传递因素影响，所以体外抑菌试验的最小抑菌浓度并非是口腔清洁护理用品如牙膏、漱口水最低有效使用浓度。

## 参考文献：

- [1] 陈钢, 许海燕, 骆朋. 甘草酸二钾在牙膏中的抑菌作用 [J]. 日用化学工业, 2017(9): 522~525.
- [2] 郑晓霞, 谢晓芳. 甘草酸二钾的抗炎作用研究及其在牙膏中的应用 [J]. 口腔护理用品工业, 2017(05): 17~20.
- [3] 陈巧, 窦磊. 甘草提取物对四种牙周常见致病菌的抑菌作用 [J]. 中国微生态学杂志, 2018, 30(10).
- [4] 徐天生, 褚夫江, 耿帅峰, 等. 复配溶菌酶和甘草提取物的抑菌牙膏研究 [J]. 生物化工, 2020, 6(4): 4.