

陈琛,李鑫鑫,付昀东,等. 汉中天麻多糖抗菌活性研究[J]. 江苏农业科学,2018,46(11):156-159.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.11.041

汉中天麻多糖抗菌活性研究

陈琛¹,李鑫鑫¹,付昀东¹,刘祥¹,郑红星¹,吴三桥¹,李晓东²

(1. 陕西理工大学中德天然产物研究所/陕西理工大学生物科学与工程学院/陕西省天麻山茱萸工程技术研究中心/陕南秦巴山区生物资源综合开发协同创新中心,陕西汉中 723000; 2. 陕西省略阳县中药材技术推广服务中心,陕西略阳 724300)

摘要:采集湿天麻,通过常压蒸煮、切片、烘干、粉碎、超声辅助水提醇沉、脱色等工艺处理,得到天麻粗多糖。利用薄层平板琼脂糖孔穴扩散法定性测定天麻粗多糖抗菌活性,进而采用微量肉汤稀释法测定 40 株菌株(包括标准株和临床分离株)的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration,简称 MIC)。天麻多糖具有广谱抗菌活性,对 G⁻ 的 MIC 范围为 0.468 75 ~ 15 mg/mL,对 G⁺ 的 MIC 范围 0.937 5 ~ 120 mg/mL,对真菌的 MIC 范围 0.937 5 ~ 30 mg/mL,其中对嗜麦芽假单胞菌 090223、黏质沙雷氏菌 1379、产酸克伯杆菌 3 株菌的抑菌活性最好, MIC 为 0.468 75 mg/mL。汉中天麻多糖粗提物对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌具有一定的抗菌活性。

关键词:天麻多糖;提取;抗菌活性;最小抑菌浓度

中图分类号: Q949.95;R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)11-0156-04

天麻(*Gastrodia elata* Bl.)别称赤箭、定风草、水洋芋等,为兰科天麻属与密环菌特殊共生的多年生草本植物,属国家三级保护物种,是一种名贵的中药材,药用部位为其块茎^[1],其味甘、性平,具有息风止痉、平抑肝阳、祛风通络的功能,用于治疗头痛眩晕、肢体麻木、小儿惊风、癫痫、抽搐、破伤风等病症^[2],同时具有镇静、催眠、镇痛、增强免疫等作用^[3-9]。天麻中主要含有天麻素、天麻苷元、天麻多糖等多种成分^[10-11],其中天麻多糖含量高达 25%^[12]。

多糖是由 10 个以上的单糖通过糖苷键连接而成的一种

天然大分子化合物,其种类繁多,广泛存在于动物、植物、微生物中,目前对植物多糖和微生物多糖的研究较多。大量研究表明,多糖具有多种药理活性,如增强机体免疫力、抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、降血糖、抗辐射和抗衰老等作用^[13-14]。通过中国知网(China National Knowledge Infrastructure,简称 CNKI)和美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,简称 NCBI)检索发现,目前关于天麻多糖的研究主要集中在天麻多糖的提取工艺优化、天麻多糖的分离纯化、分子组成分析及结构表征、天麻多糖的增强免疫作用、改善睡眠等方面,未见有关天麻多糖的抗菌活性的研究报道。因此,本试验以汉中天麻为研究对象,从天麻块茎中提取多糖并研究抗菌活性,为其进一步开发研究提供理论依据。

收稿日期:2017-10-06

基金项目:国家高端外国专家项目(编号:GDW20146100228、GDT20176100048);国家重点引智项目(编号:W20166100045);陕西省科技统筹创新工程(编号:2015KTTSSF01-03、2015HBGC-18);陕西省科技研究发展计划(编号:2015NY-070、2017NY-180);陕西省教育厅科研项目(编号:17JK0135);陕西省协同创新计划(编号:2016XT-13);陕南秦巴山区生物资源综合开发协同创新中心项目[编号:QBXT-Z(P)-15-21]。

作者简介:陈琛(1978—),男,陕西宝鸡人,硕士,副教授,主要从事天然产物研究与开发。E-mail: cchen2008@yahoo.com。

通信作者:郑红星,博士,讲师,主要从事功能食品的研究与开发。E-mail: zhenghongxing100@126.com。

1 材料与amp;方法

1.1 供试药材

鲜天麻,2016年11月采集于陕西省汉中市略阳县。

1.2 供试菌株

选取的 40 株菌株中革兰氏阴性菌(G⁻)20 株、革兰氏阳性菌(G⁺)12 株、真菌 8 株。40 株菌株中标准菌株库菌株 2 株,临床分离致病菌 38 株。菌株由大连理工大学生命科学院于海宁教授、苏州大学药学院王义鹏副教授提供,具体见表 1。

西医药杂志,2003,32(2):107-109.

[8] Wang J C. Antitumor and immunoenhancing activities of polysaccharide from culture broth of *Hericium* spp. [J]. Medical Sciences, 2001, 17(9): 4612-4671.

[9] 孙力,于子雯. 猴头多糖对 S180 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用研究[J]. 中国医药指南, 2013, 11(23): 64-64.

[10] 杨雪,张海悦,张鑫,等. 猴头菇多糖对小鼠抗疲劳作用研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(13): 368-370, 375.

[11] 王博,张梦珊,张中玉,等. 菊花蜂花粉多糖的分离纯化及抗肿瘤活性研究[J]. 食品工业科技, 2016(5): 358-360.

[12] Zhang X, Li S S, Sun L, et al. Further analysis of the structure and immunological activity of an RG-I type pectin from *Panax ginseng* [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 89(2): 519-525.

[13] Wang B, Diao Q Y, Zhang Z Y, et al. Antitumor activity of bee pollen polysaccharides from *Rosa rugosa* [J]. Molecular Medicine Reports, 2013, 7(5): 1555-1558.

[14] 葛霞,陈婷婷,蔡教英,等. 青钱柳多糖抗氧化活性的研究[J]. 中国食品学报, 2011, 11(5): 59-64.

[15] 杜志强,王建英. 猴头菇多糖抗氧化活性及耐缺氧功能的研究[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(5): 398-399.

表1 试验所用菌株

类别	菌株	类别	菌株
G ⁻	肺克杆菌 08B343	G ⁺	金黄色葡萄球菌 0902314
	肺克杆菌 1400		金黄色葡萄球菌 08032810
	肺克杆菌 1372		金黄色葡萄球菌 08032712
	大肠杆菌		金黄色葡萄球菌 08032706
	肺克杆菌 08040724		金黄色葡萄球菌
	肺克杆菌 08031012		奴卡氏菌
	变形杆菌		类肠球菌
	甲型副伤寒沙门氏菌		屎肠球菌
	大肠杆菌		表皮葡萄球菌
	大肠杆菌 08040726		枯草芽孢杆菌
	肺克杆菌 1368		蜡样芽孢杆菌
	铜绿假单胞菌 ATCC27853		粪肠球菌
	铜绿假单胞菌 08031014	真菌	白色念珠菌 08030102
	大肠杆菌 ATCC25922		白色念珠菌 08030809
	奇异变形杆菌		光滑念珠菌 08A802
	不动杆菌 2373		灰团网黏菌
	痢疾杆菌		白色念珠菌 08030401
	嗜麦芽假单胞菌 090223		光滑念珠菌
	黏质沙雷氏菌 1379		白色念珠菌 08022710
	产酸克伯杆菌		新型隐球菌

注:肺克杆菌即肺炎克雷伯杆菌。下同。

1.3 主要试剂

酵母浸粉购自英国 OXOID 公司;葡萄糖标准品来自中国食品药品检定研究院;蛋白胨购自索莱宝科技有限公司;双氧水、95%乙醇、无水乙醇、丙酮、乙醚、苯酚、硫酸均为国产分析纯。

1.4 仪器与设备

台式离心机 Rotina 420R 购自德国 Hettich 公司;酶标仪购自美国伯腾仪器有限公司;紫外分光光度计 4802S 购自尤尼柯上海仪器有限公司;旋转蒸发器 RV10 购自德国 IKA 公司;722G 可见分光光度计购自上海仪电分析仪器有限公司;真空恒温干燥箱购自上海实验仪器厂有限公司;冷冻干燥机 LGJ-10D 购自北京四环科学仪器厂有限公司;SW-CJ-2FD 超净工作台购自苏净集团苏州安泰空气技术有限公司。

1.5 新鲜材料预处理

鲜天麻采收后当天洗净泥沙,常压蒸煮 30 min,冷却,切片,105 ℃烘干,粉碎,过 40 目筛得到天麻粉末^[15]。

1.6 天麻多糖提取

精确称取干天麻 40 g,以水作为提取液,按照液料比 45 mL:1 g,在 66 ℃下超声提取 34 min,在 4 500 r/min 下离心 20 min,减压浓缩至 1/5,收集上清液用双氧水进行脱色^[16],以浓氨水(或氢氧化钠溶液)调节 pH 值至 8.0 左右,50 ℃以下滴加双氧水至浅黄色,低温放置 2 h。然后缓慢加入 5 倍量的 95%乙醇,边加边搅拌后置于 4 ℃冰箱沉淀 24 h,离心过滤后取出沉淀物,并分别用乙醚、石油醚、无水乙醇于 4 500 r/min 离心 6 min 进行洗涤,转入真空干燥箱,在 45 ℃、0.08 kPa 下干燥^[17-18]。

1.7 多糖含量测定

以葡萄糖为对照物,用苯酚-硫酸法^[19]测定多糖含量,以葡萄糖浓度为横坐标、吸光度为纵坐标,得线性回归方程 $y = 0.0626x + 0.1146, r^2 = 0.9991$ 。

1.8 薄层琼脂糖孔穴扩散法

采用薄层琼脂糖孔穴扩散法^[20]定性测定天麻多糖抗菌活性。将稀释后含 2×10^5 CFU/mL 的菌液均匀涂布于固体 LB 培养基表面,将经过灭菌的直径为 6 mm 的滤纸片置于培养基表面,滴加 6 μ L 待测样品溶液,于 37 ℃培养 18 ~ 20 h,观察抑菌圈形成与否,有抑菌圈形成的表明有抑菌活性,抑菌圈的大小可以衡量抑菌活性的强弱。各设 3 个重复,用十字交叉法测量抑菌圈直径,取平均值。有抑菌圈的进一步采用常量肉汤稀释法定量测定最小抑菌浓度。

抑菌效果判断标准:以抑菌圈直径 > 20 mm 为极敏(++++),抑菌圈直径在 15 ~ 20 mm 之间为高敏(+++),抑菌圈直径在 10 ~ 14 mm 之间为中敏(++),抑菌圈直径 < 10 mm 为低敏(+),8 mm 即无抑菌圈(-)^[21]。

1.9 微量肉汤稀释法

采用微量肉汤稀释法定量测定天麻多糖对各种菌株的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration,简称 MIC)。MIC 测定采用 Wiegand 等建立的方法^[22-24]并加以改进。将细菌接种于 LB 固体培养基上,于 37 ℃培养箱中倒置培养。待菌落长出后,用接种环挑取单菌落转接到 LB 液体培养基中,37 ℃振荡培养至对数生长期,调整菌液浓度为 2×10^5 CFU/mL。在无菌环境下操作,在无菌 96 孔板上第 1 孔中加 90 μ L MH 液体培养基,第 2 ~ 11 孔中加入 50 μ L MH 液体培养基。第 1 孔中再加入待测样品 10 μ L,充分混匀后取 50 μ L 加入第 2 孔,依次倍比稀释,从第 10 孔吸出 50 μ L 弃去,在第 11 孔加 50 μ L 菌液(不加样品)作为对照,在第 12 孔加 50 μ L MH 肉汤。混匀后放置于 37 ℃、150 r/min 培养 6 ~ 8 h,于 600 nm 波长处测定吸光度。MIC 为能阻止 50% 以上细菌生长的最小抑菌浓度。用酶标仪在 600 nm 下对平板进行扫描,提取物 MIC 按照比对照孔(第 11 孔)的浑浊程度低 50% 以上的最小质量浓度计算。

1.10 数据统计分析

每组试验做 3 次重复,数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果与分析

2.1 提取及检测

湿天麻经过蒸煮、切片、干燥、粉碎、过 40 目筛得到天麻饮片。取 40 g 天麻饮片制成干粉,经过超声辅助水提醇沉得到 13.5 g 天麻粗多糖,提取率为 33.75%,天麻多糖含量测定结果为 16.4%。

2.2 薄层平板琼脂糖孔穴扩散法定性测定

定性测定菌株共选取 10 株,包括 G⁻、G⁺、真菌,既有标准菌株库菌株,也有临床致病菌。浓度 120 mg/mL 的天麻提取物对 10 株菌株的抑菌圈结果见图 1、表 2。

由表 2 可知,薄层平板琼脂糖孔穴扩散法测定结果显示,天麻多糖对 10 株菌均有抑制作用,其中对铜绿假单胞菌 ATCC 27853 抑菌活性最好,抑菌圈直径达到了 36 mm,对铜绿假单胞菌 08031014 的抑菌圈直径为 22 mm,对以上 2 株菌判定为极敏感;金黄色葡萄球菌 08032706、白色念珠菌 08022710、大肠杆菌 ATCC25922、肺克杆菌 08031012、痢疾杆菌表现为高敏;类肠球菌、白色念珠菌 08030401 表现为中敏。

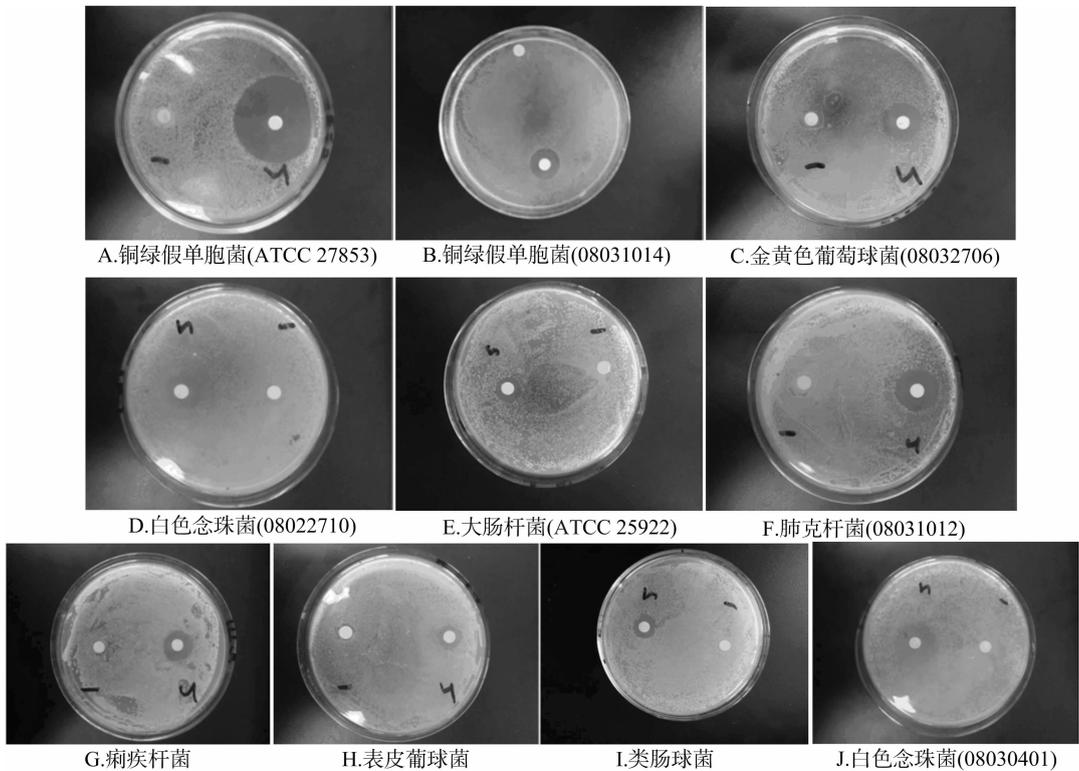


图1 天麻多糖对各种菌株的抑菌圈

表2 天麻多糖对各种菌株的抑菌圈直径

菌株	抑菌圈直径(mm)	敏感程度
铜绿假单胞菌 ATCC 27853	36.0 ± 1.0	++++
铜绿假单胞菌 08031014	22.0 ± 1.0	++++
金黄色葡萄球菌 08032706	18.0 ± 1.0	+++
白色念珠菌 08022710	17.0 ± 0.5	+++
大肠杆菌 ATCC 25922	16.0 ± 1.0	+++
肺克杆菌 08031012	15.0 ± 1.0	+++
痢疾杆菌	15.0 ± 1.0	+++
表皮葡萄球菌	15.0 ± 1.0	+++
类肠球菌	13.0 ± 0.5	++
白色念珠菌 08030401	12.0 ± 1.0	++

注：“++++”表示极敏；“+++”表示高敏；“++”表示中敏；“+”表示低敏。

2.3 MIC 测定

利用二倍稀释法在96孔板上将天麻多糖稀释10个浓度梯度,10个浓度梯度分别为120、60、30、15、7.5、3.75、1.875、0.9375、0.46875、0.234375 mg/mL。对20株G⁻菌、12株G⁺菌、8株真菌共40株菌株的MIC进行了测定,结果见表3。

由表3可知,天麻多糖对20株G⁻菌的MIC范围为0.46875~15 mg/mL,对12株G⁺菌的MIC范围为0.9375~120 mg/mL,对8株真菌的MIC测定范围为0.9375~30 mg/mL。从结果看天麻多糖对G⁻菌的抑菌活性最好,其次为真菌,对革兰氏阳性菌的抑菌活性相对较弱。其中天麻多糖对嗜麦芽假单胞菌090223、黏质沙雷氏菌1379、产酸克伯杆菌3株革兰氏阴性菌的抑菌活性最好,MIC最低,为0.46875 mg/mL。

3 讨论

天麻是兰科天麻属多年生草本植物,根状茎肥厚,无绿叶,蒴果倒卵状椭圆形。其根茎入药用以治疗头晕目眩、肢体麻木、小儿惊风等症并且对一些细菌具有一定的抑制作用^[25-26]。从已有报道中可知,乌天麻挥发油对米曲霉、黄曲霉、小麦纹枯病和茶轮斑病有一定的抑制作用^[27]。

本试验对选取的40株菌(G⁻菌20株、G⁺菌12株和8株真菌)进行了抑菌活性研究。从试验结果可知,天麻多糖具有广谱抑菌活性,无论是革兰氏阳性菌,还是革兰氏阴性菌或真菌都具有抑制作用并且抑制效果较为明显。对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌和真菌的MIC值范围分别为0.46875~15 mg/mL、0.9375~120 mg/mL、0.9375~30 mg/mL,其中对革兰氏阴性菌的抑菌效果更为明显,表现出很强的抑制效果,对嗜麦芽假单胞菌090223、黏质沙雷氏菌1379、产酸克伯杆菌的最小抑菌浓度更是低至0.46875 mg/mL。本研究结果为天麻的进一步研究开发利用提供了一定的依据。

参考文献:

- [1] Chen P J, Sheen L Y. *Gastrodiae Rhizoma* (tiān má): a review of biological activity and antidepressant mechanisms [J]. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2011, 1(1): 31-40.
- [2] Cui J, Zhang M, Zhang Y Q, et al. JNK pathway: diseases and therapeutic potential [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(5): 601-608.
- [3] Wang X L, Wang X L. Identification of four *Gastrodia elata* Bl. variants with DNA fingerprints [J]. *Agricultural Biotechnology*, 2012, 10(4): 1-2, 6.

表3 天麻多糖对各种菌株的最小抑菌浓度

类别	菌株	MIC (mg/mL)	类别	菌株	MIC (mg/mL)
G ⁻	肺克杆菌 08B343	15	G ⁺	金黄色葡萄球菌 0902314	120
	肺克杆菌 1400	15		屎肠球菌	120
	肺克杆菌 1368	15		金黄色葡萄球菌 08032810	60
	大肠杆菌	7.5		金黄色葡萄球菌 08032712	60
	肺克杆菌 08040724	7.5		金黄色葡萄球菌	60
	肺克杆菌 08031012	7.5		奴卡氏菌	60
	变形杆菌	7.5		类肠球菌	60
	甲型副伤寒沙门氏菌	7.5		金黄色葡萄球菌 08032706	3.75
	大肠杆菌	3.75		表皮葡萄球菌	3.75
	大肠杆菌 08040726	3.75		枯草芽孢杆菌	3.75
	肺克杆菌 1368	3.75	类肠球菌	0.937 5	
	铜绿假单胞菌 08031014	3.75	蜡样芽孢	0.937 5	
	大肠杆菌 ATCC25922	3.75	真菌	白色念珠菌 08030102	30
	奇异变形杆菌	3.75		白色念珠菌 08030809	30
	不动杆菌 2373	1.875		光滑念珠菌 08A802	30
	痢疾杆菌	1.875		灰团网黏菌	3.75
	铜绿假单胞菌 ATCC27853	0.937 5		白色念珠菌 08030401	3.75
	嗜麦芽假单胞菌 090223	0.468 75		光滑念珠菌	3.75
	黏质沙雷氏菌 1379	0.468 75		白色念珠菌 08022710	1.875
	产酸克伯杆菌	0.468 75	新型隐球菌	0.937 5	

[4] Zhu H Y, Bai L, Bao H Y, et al. Microstructure of the rhizoma, flower and stem of *Gastrodia elata* [J]. Medicinal Plant, 2014, 5(3): 1-3.

[5] 段小花, 李资磊, 杨大松, 等. 昭通产天麻化学成分研究 [J]. 中药材, 2013, 36(10): 1608-1611.

[6] Guo Q L, Wang Y N, Lin S, et al. 4-Hydroxybenzyl-substituted amino acid derivatives from *Gastrodia elata* [J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2015, 5(4): 350-357.

[7] Zhan H D, Zhou H Y, Sui Y P, et al. The rhizome of *Gastrodia elata* Blume - An ethnopharmacological review [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2016, 189: 361-385.

[8] Wang L W, Zhu L, Zhou J M, et al. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of yeast prion protein Ure2p with shortened N-terminal [J]. Chinese Science Bulletin, 2001, 46(12): 1012-1014.

[9] 陈琛, 李新生, 周建军, 等. 天麻素提取纯化及检测技术研究进展 [J]. 陕西理工学院学报(自然科学版), 2013, 29(3): 69-74.

[10] Yang X D, Zhu J, Yang R, et al. Phenolic constituents from the rhizomes of *Gastrodia elata* [J]. Natural Product Research & Development, 2007, 21(2): 180-186.

[11] 王亚男, 林生, 陈明华, 等. 天麻水提取物的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(12): 1775-1781.

[12] 葛进, 张磊, 刘大会, 等. 产地、商品级别和干燥工艺对天麻品质影响研究 [J]. 中药材, 2017, 40(3): 637-640.

[13] Yang L, Yang C Q, Li C Y, et al. Recent advances in biosynthesis of bioactive compounds in traditional Chinese medicinal plants [J]. Science Bulletin, 2016, 61(1): 3-17.

[14] Ma X L, Meng M, Han L R, et al. Immunomodulatory activity of macromolecular polysaccharide isolated from *Grifola frondosa* [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2015, 13(12): 906-914.

[15] 徐顶巧, 周建军. 鲜天麻干制过程中最佳加工条件的探索 [J]. 中药材, 2014, 37(2): 215-218.

[16] 张梦娟. 天麻多糖的提取、纯化及活性研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.

[17] 刘明庆, 罗洁丽. 天麻多糖提取工艺及纯化研究 [J]. 中国药师, 2011, 14(11): 1593-1596.

[18] 陈庆敏. 凤尾兰提取物抑菌活性研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2007.

[19] 王什, 李红玉. 响应面优化提取蚕蛹多糖及其抗肿瘤活性研究 [J]. 中药材, 2017, 40(3): 665-669.

[20] 陈琛, 王新华, 薄新文, 等. 绵羊生殖道提取物生物活性物质检测 [J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(2): 156-159.

[21] 黄晓冬. 赤楠叶醇提取物抗菌活性及成分总黄酮的研究 [J]. 泉州师范学院学报(自然科学版), 2007, 25(4): 98-102.

[22] Wiegand I, Hilpert K, Hancock R E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances [J]. Nature Protocols, 2008, 3(2): 163-175.

[23] Wang Z D, Xiao G S, Zhou N, et al. Comparison of two methods for detection of fecal indicator bacteria used in water quality monitoring of the Three Gorges Reservoir [J]. Journal of Environmental Sciences, 2015, 44(12): 42-51.

[24] 陈琛, 王新华, 薄新文. 绵羊生殖道抗菌肽 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36(11): 1483-1489.

[25] 杨泽雄, 辛培尧. 2种中药材提取液对六出花瓶插寿命的影响 [J]. 江苏农业科学, 2016, 44(4): 355-357.

[26] 王彩云, 王永, 严显进, 等. 黔西北优质蜜环菌菌株的初步筛选 [J]. 江苏农业科学, 2017, 45(1): 117-119.

[27] 关萍, 石建明, 高玉琼. 天麻的挥发性成分分析 [J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 2008, 31(5): 615-618.