

## 盐穗木正丁醇萃取物对金黄色葡萄球菌抑菌作用的机制

王 硕, 陶大勇\*, 美合日古丽·阿卜杜热西提, 刘 强, 蒋秀梅

(塔里木大学动物科学学院, 新疆阿拉尔 843300)

**摘 要:**为研究盐穗木(*Halostachys caspica*)正丁醇萃取物对金黄色葡萄球菌的抑菌机制, 促进抗菌药物的研发, 采用倍比稀释法测定盐穗木正丁醇萃取物的对金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC), 并通过测定培养液中电导率、胞外蛋白和碱性磷酸酶(AKP)含量的变化研究正丁醇萃取物对金黄色葡萄球菌细胞膜和细胞壁的影响。结果表明, 盐穗木正丁醇萃取物的 MIC 和 MBC 分别为 25 mg/mL 和 50 mg/mL, 在试验菌培养液中加入盐穗木正丁醇萃取物后, 其培养液的电导率、蛋白质和碱性磷酸酶含量明显增加。盐穗木正丁醇萃取物可破坏金黄色葡萄球菌细胞壁和细胞膜的完整性, 从而发挥其抑菌作用。

**关键词:**盐穗木; 正丁醇萃取物; 金黄色葡萄球菌; 细胞膜; 细胞壁

DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2019.09.008

中图分类号: S852.611

文献标识码: A

文章编号: 1007-5038(2019)09-0044-04

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是奶牛乳房炎的常见致病菌, 也是一种人畜共患病原菌, 分布广泛, 传播途径众多, 严重危害着动物和人类的健康<sup>[1]</sup>。目前抗生素一直是治疗奶牛乳房炎的主要措施, 但随着抗生素在养殖场的过量使用, 导致金黄色葡萄球菌对某些抗生素的耐药性大大增强, 甚至出现了超级细菌。王秋冬等<sup>[2]</sup>在调查内蒙古部分地区奶牛乳房炎中金黄色葡萄球菌和产色葡萄球菌的耐药性情况, 对分离得到的菌株进行药敏试验, 发现其对林可霉素和青霉素的耐药性均达 66.5% 以上, 对苯唑西林的耐药性为 37.5%。因此, 控制乳房炎的发展和解决耐药性问题已成为兽医工作者当前急需解决的问题。

盐穗木(*Halostachys caspica*)属藜科盐穗木属的盐土旱生植物<sup>[3]</sup>, 在我国主要分布于西北地区的荒漠和半荒漠地区, 如新疆、甘肃北部等, 具有耐盐碱、抗干旱、抗风沙等特点。含有生物碱、黄酮、酚类和鞣质等多种抗菌成分。贾琦珍<sup>[4]</sup>从盐穗木中提取了生物碱, 并研究了生物碱的抑菌效果, 结果显示盐穗木生物碱对金黄色葡萄球菌有较好的抑制效果。有研究表明, 从盐穗木中分离的黄酮类化合物和苯酚类化合物对多种细菌都有抑制作用<sup>[5-6]</sup>。但关于盐穗木的抑菌机制至今仍不明确。本试验通过测定培养液中胞内容物含量的变化, 对盐穗木正丁醇萃

取物的抑菌机理进行研究。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

1.1.1 试验药材 在新疆维吾尔自治区阿拉尔市热电厂附近随机采取盐穗木地上部分, 晾干后粉碎备用。植物鉴定由项目组完成。

1.1.2 主要试剂 无水乙醇, 正丁醇, NaOH 溶液, PBS 缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.2), 生理盐水, 考马斯亮蓝显色剂(称取考马斯亮蓝 G-250 10 mg 加入 950 mL/L 乙醇 5 mL, 850 g/L 磷酸 10 mL, 成分溶解后加蒸馏水稀释至 100 mL, 至棕色瓶中备用)。

1.1.3 菌种与培养基 金黄色葡萄球菌标准株 ATCC 25923(由山东拓普生物工程有限公司提供);

脑心浸液肉汤培养基: 蛋白胨 10.0 g, 脱水小牛脑浸粉 12.5 g, 脱水牛心浸粉 5.0 g, 氯化钠 5.0 g, 葡萄糖 2.0 g, 磷酸氢二钠 2.5 g, 加热溶解于 1 000 mL 蒸馏水中, pH 7.4 ± 0.2, 121℃ 高压灭菌 20 min。

脑心浸液琼脂培养基: 牛脑浸粉 4.0 g, 牛心浸粉 4.0 g, 蛋白胨 5.0 g, 酪蛋白胨 16.0 g, 氯化钠 5.0 g, 葡萄糖 2.0 g, 磷酸氢二钠 2.5 g, 琼脂 13.5 g, 加热溶解于 1 000 mL 蒸馏水中, pH 7.4 ± 0.2, 121℃ 高压灭菌 20 min。

1.1.4 主要仪器 酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司

收稿日期: 2018-09-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31560711); 自治区研究生科研创新项目(XJGR1 2017128)

作者简介: 王 硕(1991—), 男, 河南长垣人, 硕士研究生, 主要从事动物营养与饲料研究。\* 通讯作者

产品;电导仪,上海精密科学仪器有限公司产品;紫外分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司产品;旋转蒸发器 RE-52AA,上海亚荣生化仪器厂产品;恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司产品;KQ-400KDE 型高功率数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司产品;SHZ-D(Ⅲ)循环式多用真空泵,上海道京仪器有限公司产品。

## 1.2 方法

1.2.1 菌液的配制 将冷藏的金黄色葡萄球菌菌液取出后在室温下静置 20 min,待其解冻后接种于液体培养基,于 180 r/min 摇床上培养 24 h~48 h,再接种于固体培养基上培养,最后按照麦氏比浊法调配菌液的浓度,再用倍比稀释法将菌液稀释至  $10^6$  CFU/mL。

1.2.2 盐穗木正丁醇萃取物的制备 称盐穗木粉末 500 g,加入适量 850 mL/L 乙醇浸泡,摇 20 h~24 h,超声处理 1 h,抽滤,重复 3 次,收集滤液,用旋转蒸发器减压浓缩,回收乙醇得乙醇浸膏,加蒸馏水混悬后,再加入正丁醇进行萃取,萃取至无色,减压蒸发回收正丁醇,即可得正丁醇萃取物。

1.2.3 最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)的测定 准确称取 1.0 g 盐穗木正丁醇萃取物膏体,用蒸馏水作溶剂溶解膏体,定容至 5 mL,配成 200 mg/mL 的盐穗木正丁醇萃取物溶液。用倍比稀释法制成 200、100、50、25、12.5、6.25、0 mg/mL(蒸馏水作对照组)。分别吸取 1 mL 加入到 6 支试管中,再向 6 支试管中分别加入 970  $\mu$ L 培养液和 30  $\mu$ L  $10^6$  CFU/mL 的金黄色葡萄球菌菌液,使 1 号~6 号试管中药液的终浓度分别为 100、50、25、12.5、6.25、3.125、0 mg/mL。于 37℃ 恒温培养箱中 24 h 后,涂布接种于固体培养基上,培养 16 h~24 h 后观察结果。以菌落数出现最少的最大萃取物浓度为最低抑菌浓度(MIC),以无菌落生长的最小萃取物浓度为最低杀菌浓度(MBC)<sup>[7]</sup>。

1.2.4 电导率的测定<sup>[8]</sup> 在金黄色葡萄球菌菌悬液分别加入不同浓度的盐穗木正丁醇萃取物溶液,使萃取物的终浓度分别为 2 MBC、1 MBC、1 MIC、0.5 MIC,并用等量无菌水作对照,于 37℃、180 r/min 摇床培养,0、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0 h 取样,测培养液的电导率,重复 3 次取其均值。

### 1.2.5 胞外蛋白的测定

1.2.5.1 蛋白质标准曲线的绘制 选牛血清白蛋白溶液作为蛋白质标准液,绘制蛋白质标准曲线。精密称取牛血清白蛋白 20.00 mg,加入蒸馏水稀释至 100 mL,即得 0.20 mg/mL 蛋白质标准液。分别

吸取 1.00、0.75、0.50、0.25、0.125、0.062 5、0 mL 蛋白质标准液加到 7 支带塞试管中,加入蒸馏水稀释至 1 mL,使其终浓度分别为 200、150、100、50、25、12.5、0  $\mu$ g/mL。再向每支试管中加 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 溶液,摇匀后静置 10 min,于 595 nm 处测其吸光度。以其吸光度为纵坐标,蛋白质浓度为横坐标绘制标准曲线。

1.2.5.2 蛋白质含量的测定 参照文献<sup>[9-10]</sup>进行。向金黄色葡萄球菌菌悬液分别加入不同浓度的盐穗木正丁醇萃取物溶液,使萃取物的终浓度分别为 2 MBC、1 MBC、1 MIC、0.5 MIC,并用无菌水作对照。将 5 组培养液混合均匀后放置 37℃ 培养箱中培养,于 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 h 取样。先将各样液稀释 10 倍,再分别吸取 1.0 mL 于 5 支试管中,各加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 显色剂,放置 10 min 于 595 nm 波长处测定吸光值,重复 3 次取其均值。

1.2.6 碱性磷酸酶(AKP)的测定 5 组含药培养液的处理方法同上,于 0、0.5、1、2、3、4、5 h 取样,稀释 10 倍后,3 500 r/min 离心 10 min,取其上清液按照碱性磷酸酶(AKP)试剂盒的操作方法用酶标仪于 520 nm 处测其 OD 值,重复 2 次,分析 AKP 含量的变化。

## 2 结果

### 2.1 盐穗木正丁醇萃取物的 MIC 和 MBC

根据表 1 和图 1 中的试验结果可知,1 号和 2 号试管内无细菌生长,3 号~6 号试管中都大量的细菌生长,即盐穗木正丁醇萃取物对金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度(MIC)为 25 mg/mL,最低杀菌浓度(MBC)为 50 mg/mL。

表 1 正丁醇萃取物的抑菌效果

Table 1 Antibacterial activities of N-butanol extract

项目 Item	1	2	3	4	5	6
药液终浓度 (mg·mL <sup>-1</sup> ) Final concentration of drug	100	50	25	12.5	6.25	0
菌落生长状况 Colony growth status	-	-	++	+++	+++	+++

注:“-”表示无细菌生长,“++”表示有一些细菌生长,“+++”表示细菌生长茂盛。

Note:“-” represents no bacterial growth,“++” represents a few bacteria growth,“+++” represents bacteria grow vigorously.

### 2.2 电导率的测定

电导率随时间的变化情况如图 2 所示,从中可以看出,加盐穗木正丁醇萃取物组的电导率变化情况整体大于空白对照组,且主要的作用时间段为 0 h

~1 h,特别是 2 MBC 组和 1 MBC 组的变化最为明显,而空白对照组的电导率在这 4 h 内基本没有明显变化。说明盐穗木正丁醇萃取物在 1 h 内就可破坏金黄色葡萄球菌的细胞膜,并导致的电解质外泄,从而使菌液的电导率升高。

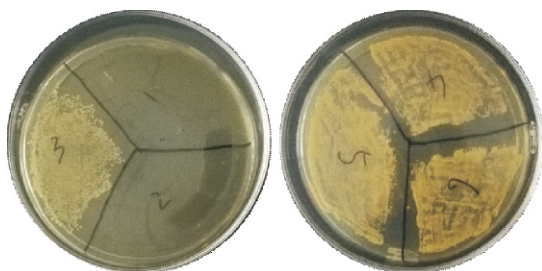


图 1 金黄色葡萄球菌的生长情况  
Fig. 1 Growth of *Staphylococcus aureus*

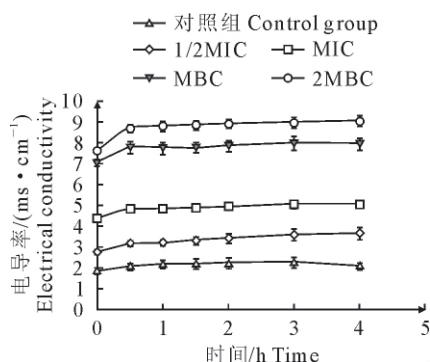


图 2 电导率的变化  
Fig. 2 Changes of electrical conductivity

### 2.3 蛋白质含量的测定

利用 SPSS 软件绘制蛋白质的标准曲线,对 OD 值和蛋白质浓度进行线性拟合后,得到的线性回归方程为  $y=0.007x+0.03$ ,  $R^2=0.994$ ,说明拟合度较高,可以比较准确地反映 OD 值随蛋白质浓度的变化情况。再根据回归方程计算蛋白质浓度。

从图 3 可以看出,在金黄色葡萄球菌菌液中加入盐穗木正丁醇萃取物后,菌液中的蛋白质浓度显著增加,各试验组的蛋白浓度都显著高于空白对照组。当菌液中盐穗木正丁醇萃取物的浓度不低于 1 MIC 时,蛋白质的浓度在 0 h~5 h 内总体呈快速增长趋势,在 5 h~10 h 内总体呈平稳状态;当菌液中萃取物的浓度为 0.5 MIC 时,蛋白质的浓度在 0 h~3 h 内总体呈快速增长趋势,之后逐渐趋于平稳;而空白对照组的蛋白质浓度在这段时间内整体上变化不大。说明盐穗木正丁醇萃取物可以改变细胞膜的通透性,可使胞内的蛋白质通过细胞膜泄漏到细胞外。

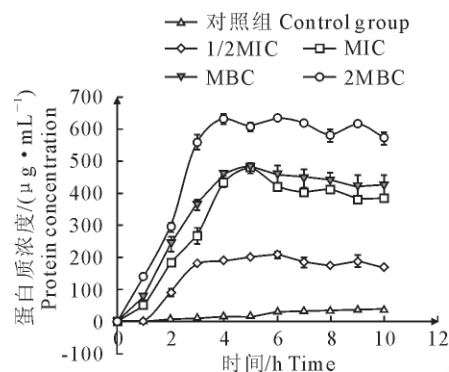


图 3 蛋白质含量的变化  
Fig. 3 Changes of protein contents

### 2.4 AKP 含量的变化

碱性磷酸酶(AKP)位于细胞膜和细胞壁之间,当细胞壁的完整性被破坏时,就会泄漏到细胞外。根据图 4 可以发现,2 MBC、1 MBC、1 MIC 组的 AKP 活性都显著高于对照组,特别是 2 MBC,只有 0.5MIC 组的 AKP 和对照组相差不大,略高于对照组。说明盐穗木正丁醇萃取物可以破坏金黄色葡萄球菌的细胞壁,导致 AKP 的外泄。

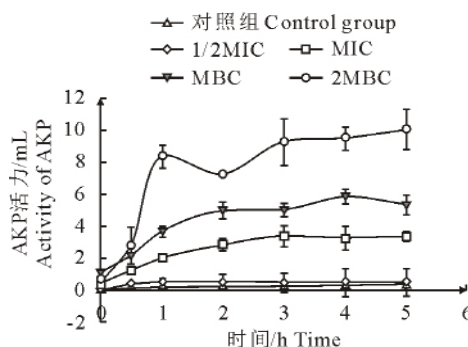


图 4 萃取物对金黄色葡萄球菌细胞壁的影响  
Fig. 4 Effect of extract on the cell wall of *Staphylococcus aureus*

### 3 讨论

细胞膜是细菌的保护屏障,当细胞膜的完整性遭到破坏时,会导致细胞膜的通透性增加,造成胞内容物的外泄。已有研究表明,药物的抑菌机制通过破坏细胞膜和细胞壁的完整性来抑制细菌的生长繁殖的。管敏等<sup>[10]</sup>在研究白毛夏枯草对金黄色葡萄球菌的抗菌机理时,发现细菌内的蛋白质分子和碱性磷酸酶外泄,并表明白毛夏枯草是通过破坏细胞壁和细胞膜的完整性发挥抑菌作用的。李婷等<sup>[11]</sup>研究表明姜厚朴水提取物对金黄色葡萄球菌的抑菌机制是增加细胞膜和细胞壁的通透性,降低相关能量代谢酶活性,以干扰其正常的代谢活动。本试验研

究结果与之相符,在金黄色葡萄球菌菌液中加入盐穗木正丁醇萃取物后,菌液的电导率、蛋白质和碱性磷酸酶的含量都会显著增加,它们的增加量都与萃取物的浓度呈正相关。说明盐穗木正丁醇萃取物是通过破坏金黄色葡萄球菌细胞膜和细胞壁的完整性来发挥抑菌作用的,至于是否还存在其他抑菌机制,比如蛋白和核酸的合成等,还有待于进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 苏 山,燕旭东,杨 健,等.深圳特区某医院院内感染 1567 例流行病学调查[J].海南医学,2014,25(1):131-134.
- [2] 王秋东,刘 琪,董志民,等.内蒙古部分地区致奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌和产色葡萄球菌的分子流行病学及耐药性研究[J].中国预防兽医学报,2017,39(4):257-261.
- [3] 席琳乔.新疆南疆常见草地植物图谱[M].新疆乌鲁木齐:新疆科学技术出版社,2013.
- [4] 贾琦珍.盐穗木总生物碱的提取及其抑菌活性的研究[D].新疆阿拉尔:塔里木大学,2010.
- [5] Hao L, Yan M, Zhao J L, et al. Flavonoids from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities[J]. Molecules, 2010, 15(11): 7933-7945.
- [6] Liu H, Wang K, Zhao J L, et al. Secondary metabolites from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities[J]. Rec Nat Products, 2012, 1(6): 57-61.
- [7] 毕振飞,宋明珠,刘宗瑛,等.天然植物抗菌液对金黄色葡萄球菌的抑菌作用及机理[J].生物学杂志,2015,32(6):50-54.
- [8] 李昌勤,赵 琳,薛志平,等.隐丹参酮抑菌作用机制研究[J].中国药学杂志,2012,47(21):1706-1710.
- [9] Yan F, Dang Q, Liu C, et al. 3,6-O-[N-(2-aminoethyl)-acetamide-yl]-chitosan exerts antibacterial activity by a membrane damage mechanism[J]. Carbohydr Polym, 2016, 149: 102-111.
- [10] 管 敏,张力文,徐致远,等.白毛夏枯草对金黄色葡萄球菌的作用规律及抗菌机理[J].中成药,2017,39(11):2393-2396.
- [11] 李 婷,杨舒然,陈 敏,等.姜厚朴水提物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌机理研究[J].现代食品科技,2016,32(2):84-92.

## Antibacterial Mechanisms of N-butanol Extract from *Halostachys caspica* on *Staphylococcus aureus*

WANG Shuo, TAO Da-yong, MEIHERIGULI · Abudurexiti, LIU Qiang, JIANG Xiu-mei

(College of Animal Science, Tarim University, Alar, Xinjiang, 843300, China)

**Abstract:** To study the bacteriostatic mechanism of N-butanol extract from *Halostachys caspica* on *Staphylococcus aureus* and promote the development of antimicrobials, the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of N-butanol extract from *Halostachys caspica* against *Staphylococcus aureus* were determined by double dilution method, and the changes of conductivity, extracellular protein and alkaline phosphatase (AKP) in culture medium were determined to study the effect of N-butanol extract on the cell membrane and cell wall of *Staphylococcus aureus*. The MIC of N-butanol extract from *Halostachys caspica* was 25 mg/mL, and the MBC was 50 mg/mL. The conductivity, protein and alkaline phosphatase contents of the medium increased significantly after adding N-butanol extract from *Halostachys caspica*. The N-butanol extract of *Halostachys caspica* had bacteriostatic effect destroying the integrity of the cell wall and cell membrane of *Staphylococcus aureus*.

**Key words:** *Halostachys caspica*; N-butanol extract; *Staphylococcus aureus*; cell membrane; cell wall