

枸杞多糖与黄芪多糖抑菌活性的研究*

李瑜¹ 周玉¹ 江冠民² 丁宇翔¹ 徐芳菲¹ 王强^{1△}

(1 益阳医学高等专科学校基础医学部 湖南 益阳 413000 2 南华大学第一附属医院检验科 湖南 衡阳 421001)

摘要 目的:研究黄芪多糖和枸杞多糖的抑菌活性并探讨不同 pH 值对其抑菌活性的影响。方法:采用滤纸片扩散法,分析不同浓度黄芪多糖和枸杞多糖在不同 pH 值下对几种常见细菌和霉菌(大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、黑曲霉、产黄青霉)的抑制效果。结果:对于细菌,枸杞多糖 8mg/mL 时出现抑菌圈,而黄芪多糖 0.02 mg/mL 时效果最佳;对于霉菌,随着枸杞多糖浓度的增大,抑菌圈的直径增大,而黄芪多糖 0.02 mg/mL 时效果最佳;当枸杞多糖和黄芪多糖在 pH6 的条件下,二者抑菌活性均最强。结论:枸杞多糖和黄芪多糖对细菌、霉菌都有一定的抑制效果,pH 值可影响枸杞多糖和黄芪多糖的抑菌效果。

关键词 枸杞多糖;黄芪多糖;抑菌作用;pH 值

中图分类号 R285.5 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)26-5061-03

Study on the Antibacterial Activity of Lycium Barbarum Polysaccharide and Astragalus Polysaccharide*

LI Yu¹, ZHOU Yu¹, JIANG Guan-min², DING Yu-xiang¹, XU Fang-fei¹, WANG Qiang^{1△}

(1 Department of Basic Medicine, Yiyang Medical College, Yiyang Hunan, 413000, China;

2 The First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang, Hunan, 421001)

ABSTRACT Objective: To explore the antibacterial activity of Lycium barbarum polysaccharide and Astragalus polysaccharide, and to determine whether the pH values affect this antibacterial activity. **Methods:** The inhibitory effects of Lycium barbarum polysaccharide and Astragalus polysaccharide on bacteria and mycete were determined by K-B method under different pH value. **Results:** As for bacteria, the inhibition of 8 mg/mL Lycium barbarum polysaccharide was the best, and the inhibition of 0.02 mg/mL Astragalus polysaccharide was the best. As for mycete, the inhibition of Lycium barbarum polysaccharide strengthened as its concentration increased, while the inhibition of Astragalus polysaccharide reached best at the concentration of 0.02 mg/mL. Both Lycium barbarum polysaccharide and Astragalus polysaccharide with pH 6 showed the best inhibitory effects. **Conclusion:** Lycium barbarum polysaccharide and Astragalus polysaccharide had inhibitory effects on bacteria and mycete to a certain extent and their antibacterial activity were influenced by pH.

Key words: Lycium barbarum polysaccharide; Astragalus polysaccharide; Antimicrobial activity; pH value

Chinese Library Classification(CLC): R285.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)26-5061-03

前言

多糖(polysaccharides)又称多聚糖,是由至少 10 个以上相同的单糖通过糖苷键结合成的聚合糖高分子碳水化合物,如淀粉、纤维素和糖原等。植物多糖来源非常广泛,可存在于植物的根、茎、叶、皮、种子、花和果实之中,分子量可达数万甚至数百万。植物多糖具有广泛生物活性,已有的研究证实,植物多糖具有抗病毒、抗细菌、抗寄生虫、抗肿瘤、抗辐射、抗衰老、降血糖、降血脂等诸多重要功效,且应用于人体时对机体毒副作用较小^[1-4]。枸杞为茄科植物宁夏枸杞(Lycium barbarum L.)的成熟果实,其中主要有效成分为枸杞多糖(Lycium barbarum polysaccharide, LBP),研究表明 LBP 具有多种生物活性^[5-7],不仅具有抗衰老、抗应激、抗肿瘤、保肝、降血糖等作用,还具有显著增强机体的免疫功能和免疫调节作用^[8-13]。黄芪多糖(Astragalus polysaccharide APS)为黄芪的主要有效成分,近年来许多学者

从不同角度对其进行了研究^[14-15],大量研究表明黄芪多糖具有增强机体免疫功能、抗病毒、抗氧化等多种药理功效^[16-17]。本文选择枸杞多糖和黄芪多糖作为研究对象,在体外观察二者对几种常见细菌和霉菌的抑制作用,并探讨不同 pH 值对枸杞多糖和黄芪多糖抑菌活性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

枸杞多糖和黄芪多糖(瓶装干粉)购自浙江方格药业有限公司,DEAE 纤维素 52(DEAE-Cellulose 52)购自北京鼎国生物技术有限责任公司;大肠杆菌(Escherichia coli)、沙门氏菌(Salmonella typhimurium)、金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)以及黑曲霉(Aspergillus niger)、产黄青霉(Penicillium chrysogenum)均由益阳医专病原微生物实验室保存,其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

* 基金项目:湖南省高等学校科学研究资助项目(09C052)

作者简介:李瑜(1984-)女,研究方向:病原生物与免疫学,E-mail:yulee163@163.com

△通讯作者:王强(1968-)男,研究方向:药物合成与新药开发,E-mail:717204786@qq.com

(收稿日期:2012-04-06 接受日期:2012-04-30)

UV-8000 紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司), MB-6659 pH 值测定仪(青岛明博环保科技有限公司), 震荡培养箱(上海博翎仪器设备有限公司), 隔水式恒温培养箱(上海博翎仪器设备有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 枸杞多糖和黄芪多糖的制备 将枸杞多糖和黄芪多糖干粉溶解于灭菌 PBS 缓冲液中, 配成 1 mg/mL 的母液, 经 0.22 μ m 过滤器过滤除菌, 贮于 4℃ 备用。临用前稀释成浓度分别为 0.01 mg/mL、0.02 mg/mL、0.2 mg/mL、2 mg/mL、8 mg/mL 的多糖应用液。

1.3.2 培养基的配制 参照文献根据培养物需要分别配制牛肉膏蛋白胨琼脂培养基和马铃薯葡萄糖琼脂培养基。

1.3.3 供试菌液配置 分别将大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、黑曲霉、产黄青霉接种于琼脂斜面, 细菌于 37℃ 培养 24 h, 真菌于 28℃ 培养 24 h。培养物以无菌生理盐水冲洗, 配成菌悬液待用(约 10^7 个/mL)。

1.3.4 供试菌抑菌效力的测定 采用滤纸片扩散法。将滤纸制成直径 6 mm 的滤纸圆片若干张, 干热 160℃ 灭菌 2h, 将灭菌后的滤纸片分别浸入不同浓度的多糖应用液中, 充分吸收后备用。将配置好的培养基灭菌, 无菌制备培养平皿, 冷却后分别加入 0.5 mL 不同的供试菌, 涂布均匀。将前述经多糖应用液浸泡处理过的滤纸片夹取贴在相应的培养皿中, 每个平皿贴 2 片, 不同浓度的滤纸片之间应间隔一定距离, 同时以浸泡过无菌水的滤纸片作为阴性对照, 每种菌种设 3 个重复培养平皿。大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌在 37℃ 的恒温生化培养箱中连续培养 16~18h, 黑曲霉、产黄青霉在 28℃ 的恒温生化箱中培养 2~3d, 培养结束后测量每个滤纸片的抑菌圈直径, 并取平均值。

1.3.5 不同 pH 值下枸杞多糖和黄芪多糖抑菌活性的测定 取浓度为 8 mg/mL 的枸杞多糖溶液和 0.02 mg/L 的黄芪多糖溶液各 10 mL, 使用 0.1 mol/L HCL 和 0.1 mol/L NaOH 将上述多

糖溶液的 pH 值分别调整为 2.0、4.0、6.0、8.0 和 10.0, 再将灭菌的滤纸片放入, 充分吸收后重复 1.3.4 的操作, 测试不同 pH 值下的抑菌效力。

2 结果与分析

2.1 不同浓度枸杞多糖对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌以及黑曲霉、产黄青霉的抑制效果

通过滤纸片扩散法测定不同浓度 (0.01 mg/mL、0.02 mg/mL、0.2 mg/mL、2 mg/mL、8 mg/mL) 枸杞多糖溶液对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌以及黑曲霉、产黄青霉的抑制效果(表 1)。结果显示, 浓度为 8 mg/mL 的枸杞多糖对上述细菌和菌都有一定的抑制作用, 且对霉菌的抑制效果强于细菌。枸杞多糖对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的抑制效果无显著性差异 ($P>0.05$), 抑菌圈均为 8 mm 左右; 除了 0.01 mg/mL 这个浓度, 其他枸杞多糖浓度都出现了对黑曲霉和产黄青霉的抑菌圈, 且抑菌圈的直径随着枸杞多糖浓度的增加而增大。总体而言, 枸杞多糖对黑曲霉的抑菌圈直径大于产黄青霉, 提示枸杞多糖对霉菌的抑制效应具有选择性。

2.2 不同浓度黄芪多糖对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌以及黑曲霉、产黄青霉的抑制效果

不同浓度 (0.01 mg/mL、0.02 mg/mL、0.2 mg/mL、2 mg/mL、8 mg/mL) 黄芪多糖溶液对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌以及黑曲霉、产黄青霉的抑制效果。其中, 浓度为 2 mg/mL、8 mg/mL 的黄芪多糖对细菌和霉菌的抑制效果不明显, 浓度为 0.01 mg/mL 的黄芪多糖对大肠杆菌的抑制效果不明显, 而其他浓度的黄芪多糖对各致病菌均有抑制作用。总体而言, 黄芪多糖对霉菌的抑制效果强于细菌, 特别是在 0.02 mg/mL 浓度时, 对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径大约为 7 mm, 对于黑曲霉、产黄青霉的抑菌圈直径大约为 11 mm, 均达到最佳抑制效果。此外, 黄芪多糖对黑曲霉的抑菌圈直径与产黄青霉抑菌圈直径差别无显著性 ($P>0.05$)。

表 1 滤纸片法测定枸杞多糖抑菌活性

Table 1 Determination of the inhibitory effects of Lycium barbarum polysaccharide with k-b method

LBP concentration (mg/mL)	Diameter of antibacterial circle					PBS
	Escherichia coli	Salmonella	Staphylococcus aureus	Penicillium chrysogenum	Aspergillus niger	
8	8.02± 0.17*	8.87± 0.23*	8.05± 0.38*	9.72± 0.23*	17.46± 0.71*	-
2	-	-	-	8.32± 0.62	11.72± 0.23	-
0.2	-	-	-	6.67± 0.52	7.15± 0.61	-
0.02	-	-	-	3.14± 0.62	4.08± 0.35	-
0.01	-	-	-	-	-	-

Note: "-" indicates no bacteriostatic circle; * indicates there is significant difference, compared with the same column, $P<0.05$.

2.3 不同 pH 值对枸杞多糖和黄芪多糖抑菌活性的影响

浓度为 10mg/mL 的枸杞多糖溶液和 0.02 mg/mL 的黄芪多糖溶液在 pH 值为 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 时的抑菌活性结果(图 1 和图 2)。

由图中可看出, 在 pH=6 的条件下枸杞多糖和黄芪多糖的抑菌活性均最强, 而在强酸性或强碱性条件下, 二者抑菌活性则相对减弱, 这可能是由于在强酸或强碱条件下, 枸杞多糖和黄芪多糖的结构发生了变化, 使其失去了抑菌活性。

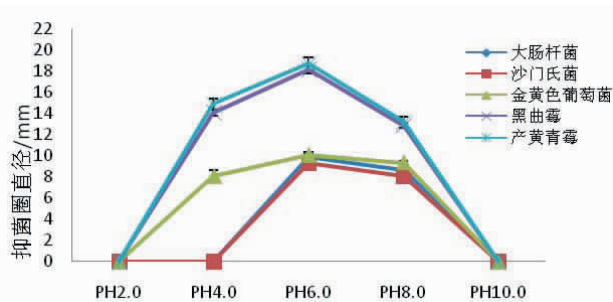


图1 不同 pH 值对 LBP 抑菌活性的影响

Fig.1 The influence of pH on the antibacterial activity of LBP

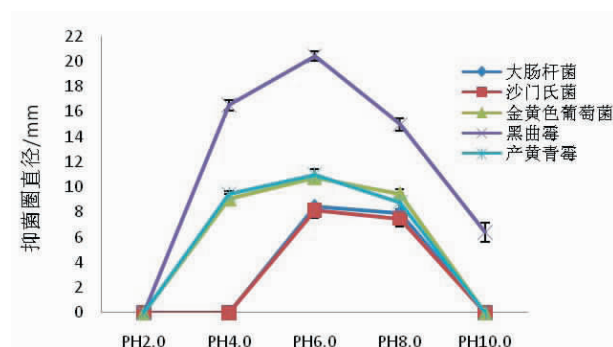


图2 不同 pH 值对 APS 抑菌活性的影响

Fig.2 The influence of pH on the antibacterial activity of APS

3 讨论

关于多糖的研究已有重大的进步,研究的广度和深度也在不断深入,已经发现多种多糖具有增强免疫的作用^[18],但是有关多糖体外抑菌作用的研究还相对较少。滤纸片扩散法全称为抗菌药物纸片琼脂扩散法敏感试验(简称改良 K-B 法),系 70 年代 WHO 在日内瓦召开的国际性会议上向全世界推荐的方法。临床使用枸杞多糖和黄芪多糖的历史相当久远,并且其效用也日益得到重视。本试验选用枸杞多糖和黄芪多糖对常见的几种细菌和霉菌进行体外抑菌作用效果的研究。结果表明,枸杞多糖和黄芪多糖在合适的浓度下对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌均有一定的抑制效果,对黑曲霉、产黄青霉的抑制作用强于细菌,枸杞多糖在合适浓度范围内对这三种细菌的抑制作用相当,对黄曲霉的抑制作用要强于产黄青霉,且随着枸杞多糖溶液浓度的增大,抑菌效果也逐渐增加,黄芪多糖在合适的浓度范围内对三种细菌的抑制作用相当,对两种霉菌的抑制作用也相当,黄芪多糖浓度为 0.02 mg/mL 时抑菌效果最佳。pH 值对于枸杞多糖和黄芪多糖的抑菌活性也有显著的影响,在中性条件和略偏酸性的条件下,二者的抑菌活性都很强,而在强酸或者强碱性的条件下,二者抑菌活性则相对减弱。

参考文献(References)

[1] Jin Di, Liang Ying, Sun Gong-bing, et al. Research Progresses on Extracting Techniques of Plant Polysaccharide [J]. Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2011, 23(5): 76-79

[2] Tao Y W, Tian G Y. Studies on the physicochemical properties, structure and antitumor activity of polysaccharide YhPS-1 from the root of Cordalis yanhushuo Wang [J]. Chinese Journal of Chemistry, 2006, 24 (2): 235-239

[3] Ge Y, Duan Y F, Fang G Z, et al. Study on biological activities of Physalis alkekengi var francheti polysaccharide [J]. J Sci Food Agric, 2009, 89(9): 1593-1598

[4] Nose, M. Activation of macrophages by crude polysaccharide fractions obtained from shoots of Glycyrrhiza glabra and hairy roots of Glycyrrhiza uralensis in vitro [J]. Biol Pharm Bull, 1998, 21(10): 1110-1112

[5] Chen Z, Lu J, Srinivasan N, et al. Polysaccharide-protein complex from Lycium barbarum L. is a novel stimulus of dendritic cell immunogenicity [J]. J Immunol, 2009, 182(6): 3503-3509

[6] Li Ying-jie, Qi Chun-hui, Zhang Yong-xiang. Advance in study of immunomodulation mechanism of Lycium barbarum polysaccharide [J]. Chinese New Drugs Journal, 2004, 13(10): 882-886

[7] Yu, M. S. Characterization of the effects of anti-aging medicine Fructus lycii on beta-amyloid peptide neurotoxicity [J]. Int J Mol Med, 2007, 20(2): 261-268

[8] Li, X.M., Y. L. Ma, and X. J. Liu. Effect of the Lycium barbarum polysaccharides on age-related oxidative stress in aged mice [J]. J Ethnopharmacol, 2007, 111: 504-511

[10] Gong, H. Therapeutic effects of Lycium barbarum polysaccharide (LBP) on irradiation or chemotherapy-induced myelosuppressive mice [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2005, 20(2): 55-62

[11] Chao, J.C. Hot water-extracted Lycium barbarum and Rehmannia glutinosa inhibit proliferation and induce apoptosis of hepatocellular carcinoma cells [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(28): 4478-4484

[12] Ha, K.T. Protective effect of Lycium chinense fruit on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity [J]. J Ethnopharmacol, 2005, 96 (3): 529-535

[13] Luo, Q. Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from Lycium barbarum [J]. Life Sci, 2004, 76(2): 137-149

[14] Wang H, Shen W Z, Ooi E V, et al. The antiviral activity of polysaccharides extracted from Lobophora Variegata [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2007, 29 (3): 271-275

[15] Yang Y F, Feng J Q, Xu H Y, et al. Influence of different extraction and purification methods on astragalus polysaccharides and pharmacological evaluation [J]. Chin Herb Med, 2010, 21(1): 54-61

[16] Ye Tao, Ye Xiang-li, He Jian-hua. Function and Mechanism of Action of Plant Polysaccharides [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2012, 1: 22-24

[17] Shen Li-hong, Wang Jian-sen, Li Ya, et al. Research and Application of Plant Polysaccharide [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(02): 349-352

[18] Yang Yue-hui, Jiang Qing-hua, Ding Ping-tian. Advances in studies on analytical methods of polysaccharides in plant [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2011, 42(6): 1239-1242