

九头狮子草对细菌超微形态结构的影响

覃容贵¹, 李淑芳¹, 罗忠圣²

(1 贵阳医学院, 贵州 贵阳 550004; 2 贵阳新天制药有限公司, 贵州 贵阳 550018)

摘要:目的: 研究九头狮子草对 β 溶血性链球菌、肺炎克雷伯菌的抗菌作用机理。方法: 用负染法和超薄切片法在电子显微镜下观察亚 MIC 各细菌超微形态结构。结果: 各细菌超微形态结构发生显著性改变, 形成典型的细胞壁缺陷菌(细菌 L-型)。结论: 九头狮子草具有抗菌作用, 其抗菌作用机理在于引起细菌细胞壁的缺损, 造成菌体肿胀、溶解而死亡。

关键词: 九头狮子草; 抗菌作用机理; 细菌细胞壁; 细菌超微形态结构

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2005)01-0046-03

The Effects of Herba Peristrophe on Ultramorphology of Bacteria

QIN Rong-gui¹, LI shufang¹, LUO Zhong-sheng²

(1 Guiyang medical college, Guiyang Guizhou 550004, China;

2 Guiyang Xintian pharmaceutical limited company, Guiyang Guizhou 550018, China)

Abstract Objective: To study antibacterial mechanism of Herba Peristrophe on β -Streptococcus hemolyticus and Klebsiella pneumonia. Methods: Electron microscope was used to observe the ultramorphology and ultramicroscopic structure of the bacteria. Results: Ultramorphologies of the bacteria were obviously changed and formed into typical morphologies of bacterial L-form. Conclusion: It indicated that antibacterial mechanism of Herba Peristrophe may destroy the cell wall of bacteria.

Key words: Herba Peristrophe; antibacterial mechanism; the cell wall of bacteria; the ultramorphology and ultramicroscopic structure of the bacteria

九头狮子草为爵床科植物九头狮子草 [*Peristrophe japonica* (Thunb.) Bremek.] 全草, 分布于江苏、浙江、福建、湖南、江西、贵州、四川等地, 在民间广为栽培。其性味辛、凉, 功用主治为祛风、清热、化痰、解毒, 用于治疗风热咳嗽、小儿惊风、喉痛、疔毒、乳痈。与其它药物配伍使用, 治疗肺热咳嗽、虚热咳嗽、小儿吐奶并泄青、男子尿结、咽喉肿痛、痔疮、蛇咬伤、黑疱疔、妇女白带、经漏^[1]。现代研究表明, 清热解毒类中药多具有抗菌作用。前期研究工作表明九头狮子草有较强的抗菌作用, 其作用可能与药物造成细菌细胞壁缺损有关^[2,3]。本研究主要从对细菌超微形态结构的影响方面进一步研究九头狮子草的抗菌作用机理, 为临床应用九头狮子草提供实验和理论依据。

1 实验材料

1.1 菌株 β 溶血性链球菌(ATCC0379)、肺炎克雷

伯菌, 由贵阳医学院微生物学教研室及检验系提供。

1.2 试药制备 九头狮子草采自贵州省贵阳市郊, 经贵阳医学院药学系龙庆德副教授鉴定, 用 70% 乙醇回流提取 4h, 减压浓缩, 挥干乙醇, 用蒸馏水配成 1 g/mL(含生药量) 的药液, 按需稀释。

1.3 培养基制备

1.3.1 营养肉汤的制备 称取营养肉汤粉(购自上海医学化验所试剂) 31g, 加蒸馏水 1000mL, 加热溶解, 备用。

1.3.2 LB 培养基的制备 按文献[4]方法称取酪蛋白胨(购自华美生物工程公司) 1g, 葡萄糖 1g, 氯化钠 1g, 酵母提取物(购自华美生物工程公司) 0.5g, 加蒸馏水 100mL, 加热溶解, 调 pH 至 7.6, 备用。

1.3.3 2 倍浓缩肉汤、2 倍浓缩 LB 培养基的制备: 以上各成分均倍量。

1.4 主要仪器 隔水式电热恒温培养箱(上海市跃进医疗器械一厂); 日立 H-600 电子显微镜。

2 实验方法

试管稀释法测定各细菌 MIC^[5] 后, 观察亚 MIC

各细菌形态的变化:

2.1 不同浓度含药培养基的制备 取 10 支试管, 编号, 每支试管加 2 倍浓缩肉汤 2mL, 吸取 2mL 九头狮子草提取液(1g/mL)加入第 1 支试管, 混匀后依次对倍稀释至第 7 支试管, 制成含药液体培养基, 使药物浓度依次分别为 0.5g/mL、0.25g/mL、0.125g/mL、0.0625g/mL、0.0312g/mL、0.0156g/mL、0.0078g/mL。10 支试管加棉塞后, 高压蒸汽灭菌 20min。

2.2 菌液的制备^[6] 0.5 麦氏比浊标准各菌液, 用营养肉汤或 LB 培养基作 1/10 稀释(含菌量约为 10^7 CFU/mL)。

2.3 接种 用微量移液器取 100 μ L 菌液依次由低浓度至高浓度分别加入 7 支含药培养基试管中(最终接种菌量约为 5×10^5 CFU/mL), 其余三支试管分别作有药无菌、有菌无药、西药阳性对照(以青霉素和庆大霉素作阳性对照)。

2.4 培养与检查 置温箱 37℃ 孵育过夜, 第 18、24、36h 用接种环分别取管底菌液涂片, 细胞壁染色, 镜检。细菌不生长的最低浓度即为九头狮子草对该菌的 MIC。每种敏感细菌为 1 组, 共做 2 组。 β 溶血性链球菌用 2 倍浓缩 LB 培养基培养, 肺炎克雷伯菌用 2 倍浓缩肉汤培养。

2.5 对细菌超微结构的影响 将孵育 24h 亚 MIC 试管菌液, 3000rpm 离心 10min 后, 取管底菌液。

2.5.1 负染法 用细毛细吸管取菌液滴到带 Formvar 膜的载网上, 静置 2min 后用洁净的滤纸吸去多余的液体使稍干, 然后用醋酸双氧铀染色, 吸去多余染液, 静置干燥后在电镜上观察。

2.5.2 超薄切片 菌液 3000rpm 离心 20min, 倾出上清液, 用牙签将细菌团挑入盛有 2% 预冷戊二醛液的小瓶中, 经戊二醛-锇酸双重固定、丙酮梯度脱水、Epon812 浸透包埋后, 制成超薄切片, 用醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色, 在电镜上观察细菌超微结构。

3 结果

3.1 孵育 18h, 含药试管细菌数量少于有菌无药管, 形态无明显变化。孵育 24h, 含药试管细菌数量明显少于有菌无药管, 形态发生显著改变, 典型 L-型细菌已形成。孵育 36h, 高浓度含药试管已几无细菌生长。

3.2 细菌超微形态的变化(负染法)

3.2.1 正常 β 溶血性链球菌呈球形、长椭球形, 形状规则, 细胞壁光滑, 菌体染色均匀(见图 1A)。据文献[2], 九头狮子草对 β 溶血性链球菌的 MIC 为 0.0625g/mL。在亚 MIC 0.0312g/mL 浓度下, 药后菌

体体积显著增大, 呈球形, 细胞壁厚薄不均, 可见明显缺陷。菌体染色明显浅于正常细菌, 示细胞质疏松; 菌体中央染色深于边缘部位, 边缘呈电子透明, 示菌体体积增大而肿胀(见图 1B)。

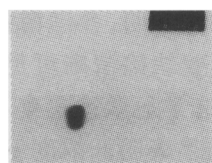


图 1A β 溶血性链球菌形态 ($\times 1.9$ 万)

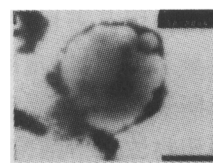


图 1B 药后 β 溶血性链球菌形态 ($\times 7200$)

3.2.2 正常肺炎克雷伯菌呈长椭球形, 中部一侧稍内凹, 细胞壁均匀光滑, 菌体染色均匀(见图 2A)。据文献[2], 九头狮子草对肺炎克雷伯菌的 MIC 为 0.5 g/mL。在亚 MIC 0.25g/mL 浓度下, 药后菌体体积显著增大, 呈球形, 细胞壁厚薄不均, 缺陷明显可见。有的部位细胞质外溢形成瘤状凸起, 菌体染色不均匀, 一侧略有电子透明感, 示菌体体积增大而肿胀(见图 2B)。

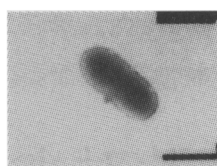


图 2A 肺炎克雷伯菌形态 ($\times 1.9$ 万)

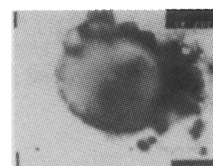


图 2B 药后肺炎克雷伯菌形态 ($\times 5800$)

3.3 肺炎克雷伯菌超微结构的变化(超薄切片)

正常肺炎克雷伯菌菌体呈短棒状, 细胞壁连续, 微波状弯曲, 细胞质呈电子致密并散布均匀空泡(见图 3A); 药后菌体体积显著增大, 呈椭球形或不规则形, 细胞壁缺陷清晰, 界限模糊, 呈不连续状态, 细胞质染色浅, 示细胞质疏松, 细胞结构松散(见图 3B、3C)。

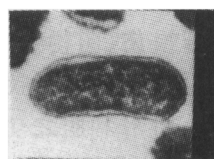


图 3A 肺炎克雷伯菌结构图 ($\times 5$ 万)

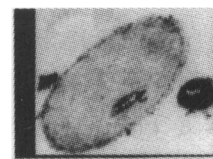


图 3B 药后肺炎克雷伯菌结构图 ($\times 3.5$ 万)

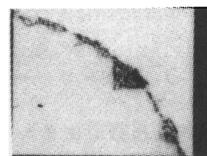


图 3C 药后肺炎克雷伯菌局部结构图 ($\times 5$ 万)

4 讨论

九头狮子草长期以来在贵州省布依族民间广为

应用,主要用于治疗小儿高热、小儿惊风(一种因儿童高热引起的惊厥,抽搐症状)等,因此民间又称其为惊药、尖惊药,尤以治疗临床原因不明,其它药物无效的高热效果特佳。九头狮子草的解热作用与其抗菌作用有密切关系。本实验结果表明,各细菌体积分显著增大,出现明显肿胀,细胞壁缺陷清晰可见。前期研究工作中,我们使用 BH-2 光学显微镜观察不同药物浓度下细菌形态的变化,结果表明低浓度下,部分细菌的形态已发生改变,随着药物浓度的增大,发生形变的细菌数量增加,形变程度加剧,直至细菌不能生长。药物浓度与其抑菌作用强度呈正相关。同时,随着培养时间的延长,药物对细菌的作用增强,从形态的微小变化到形成 L-型细菌,直至结构功能的损坏,不能继续生长。由此确证九头狮子草的抗菌作用机理在于它对细胞壁的作用。药物引起细菌细胞壁缺损,细胞外液在渗透压的作用下进入菌体,造成菌体肿胀、溶解死亡。九头狮子草通过抑制或杀灭作为发热激活物的病原微生物,从而抑制机体内生致热原的产生而解热^[7]。同时,九头狮子草

具有增强机体的免疫功能作用,提高机体对致病性细胞壁缺陷菌的抵抗能力而解热^[8]。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院编. 中药大辞典[M]. 上海: 新华书店上海发行所, 1986. 48-49.
- [2] 覃容贵, 李淑芳. 九头狮子草的抗菌作用研究[J]. 贵阳医学院学报, 2000, 25(2): 130-131.
- [3] 覃容贵, 李淑芳, 罗忠圣. 九头狮子草对细菌形态结构的影响[J]. 贵阳医学院学报, 2004, 29(1): 58-60.
- [4] 范秀容, 李广武, 沈萍. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社(第2版), 1990. 263.
- [5] 上海市第六人民医院检验组编. 快速检验诊断资料汇编[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1973. 213-214.
- [6] 李影林. 临床微生物学及检验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 85.
- [7] 李楚杰. 发热机制研究的新进展[J]. 中国病理生理学杂志, 1990, 6(5): 51-52.
- [8] 覃容贵, 李淑芳, 罗忠圣. 九头狮子草对小鼠免疫功能的影响[J]. 贵阳医学院学报, 2003, 28(5): 405-406.