

专论与综述

山苍籽油及主要成份抗菌机制研究进展

罗 曼¹ 蒋立科^{1*} 王志强² 奚 俊² 戴建勇²

(安徽农业大学生命科学学院 合肥 230036)¹ (双鹤神鹿药业集团 合肥 230041)²

摘要: 从山苍籽油药学作用的介绍, 综述对山苍籽油抗菌主要成份研究现状及对其作用机理研究的新思路和最新成果。

关键词: 山苍籽油 柠檬醛 抗菌机制

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 03-0074-04

山苍籽 (*Litsea cubeba*) 又称木姜子、山鸡椒, 属于樟科, 由其果实、根、叶提取的山苍籽油^[1]对黄曲霉、链孢霉、石膏样的芽孢菌、狗小牙孢菌等致病真菌, 金黄色葡萄球菌、绿脓假单胞菌、白色念珠菌等致病细菌有较强的杀抑作用, 是乔木类的中草药。在医药上, 可治胃病、关节炎和溃疡等症。该中草药广布于长江以南广大丘陵山地、资源极其丰富。因此, 对其主要部位作用的机理许多学者进行多方位研究。

1 山苍籽油及主要成分的药效

山苍籽油为多种成分的复合物, 其化学组成复杂^[2], 含有 26 种有机物, 主要成分有柠檬醛、芳樟醇、丁香酚、乙酸松叶酯、松烯、蒎烯、甲基正壬基酮、月桂烯、癸酰乙醛、香叶醇等, 其中柠檬醛依蒸馏方法、株龄和采摘时间不同占 65% ~ 92%。该精油属山苍籽植物次生代谢产物, 存在于其叶、花、果实之中, 尤以果实中含量高, 约为 4%。民间于每年 7 ~ 8 月份采摘果实。我国于 20 世纪 50 年代就将所采果实经蒸馏分离出山苍籽油作为香精油, 用作食品、香烟的调香剂。80 年代确认该精油的主要成份并出口西欧, 占我国香精油出口量的 75%。通过对大量山苍籽油与其单体柠檬醛抗菌作用的比较, 发现山苍籽油的抗菌组分主要是柠檬醛, 该醛能抑制 14 种细菌和 12 种真菌, 而类似该精油高效低毒的抗菌消炎中草药实属少见。因此, 深入研究柠檬醛的抗菌机理, 开发出针对性抗真菌药物对治疗我国南方 70% 人群患有真菌类感染的疾病有重大的意义。

21 世纪 30 年代就开始对中草药的清热解毒进行探讨, 发现诸多清热解毒、清热燥湿和清热泻火等药方、药效确有抗菌、抗病毒作用。但这些药方或药抗菌、抗病毒并不等于抗生素。传统抗菌、抗病毒实验方法有抗菌的体外实验法^[3]、抗菌的体内实验法^[4] (动物体内试验治疗法)。抗病毒的鸡胚法、整体动物法、组织培养法、反向被动血凝抑制试验法。尽管这些已被人们所认可的经典方法基础工作踏实, 有令人信服的依据, 且目前又无其他方法取代, 但体外实验只解决形态、特征鉴别问题, 体内实验也只解决毒性评价问题, 均难以在短时间内从深层次揭示药物的作用机理, 因而前期

* 国家档案局资助项目 (No. 903-保-027)

** 联系人

收稿日期: 2002-06-28, 修回日期: 2002-10-25

物力、精力及财力投入均大。而对该香精油的药效测定尚停留于抑菌圈的大小进行判断分析。面对我国加入“WTO”的双重挑战,及中草药在国内外巨大潜力,率先一步占领市场,需大力加强对中药的创新药物研究,除对传统中药进行“二次”开发外,尽快采用高新科学技术手段,对中药中具有新抗菌、抗病毒中草药作用机理及对细胞有效作用部位研究,提高中草药药效研究的科学性与可靠性。

对各类香精油主要抗菌成份,有过许多研究报道,其中虽涉及柠檬醛较多,但有关抗菌机理的研究却甚少。推测“溶解脂类或表面活性作用”也许是香精油抗菌机理之一。Knoblook.K等研究了40种菇类对初生能量的代谢、丁烯二酸脱氢酶(SDH)活性、呼吸过程的电子传递以及氧化磷酸化过程的影响作用,发现在 5×10^{-3} mol/L浓度下,所有供试菇类都能抑制上述反应。这表明香精油可影响菌类的呼吸作用及细胞膜功能。Martin Bard等研究表明香叶醇可提高 K^+ 向细胞外渗透并增加真菌细胞膜的流动性,还可降低细胞膜脂质层的相变温度而影响膜脂的流动性,有些香精油如柠檬醛可通过其 α 、 β 不饱和键与某些酶结合^[5],进而导致微生物的代谢紊乱,其它有关香精油的抗菌机理还知之甚少。Gulari^[6]报道Balakhoskii和Meisei曾提出柠檬醛具有一定的抗菌功能,并认为它在医药工业中有一定价值。柠檬草香精油的抗菌功能与其柠檬醛浓度密切相关。Okayaki和Oshima认为柠檬醛可抑制真菌生长。Lord和Husa在对天然香精油的抗菌性进行研究时,发现柠檬醛样品稀释2,000~5,000倍时仍具有明显抗真菌功能。Kellner和Kober在把柠檬醛作为厕所清洁剂时,发现该醛对奈氏球菌(*Neisseria*)、类链球菌(*Streptococcus faecalis*)、金黄色葡萄球菌(*Saureus*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megatherium*)和白色青霉(*Oidium albicas*)的生长有明显的抑制作用。1957年,Mose和Lukas对包括柠檬醛在内的多个香精油样品的抗菌功能进行了比较和广泛的研究,发现在所用34种细菌材料中,柠檬醛对其中14种有效。Zibitsker发现柠檬醛对7个念珠菌属的真菌有杀伤作用,致死剂量为原液 $10^1 \sim 10^7$ 倍。Sterent等将柠檬醛经高压液相色谱分离成为反式及顺式两组分,之后分别测试其组份的抗细菌、真菌及酵母菌的能力,发现混合的柠檬醛有杀菌功能,但如果单独使用,无论是反式还是顺式都失去了抗菌功能,表明顺式、反式柠檬醛之间存在一定的相互作用。对香精油自身的抗菌特性有了较深认识,而未触及香精油作用所诱发的生物学效应。

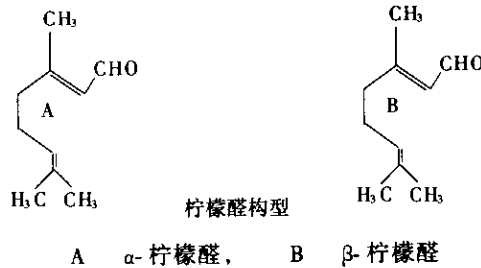
2 山苍籽油的作用机理

20世纪90年代前,对山苍籽抗菌作用研究上,除李开泉、唐陶等人^[7-9]进一步确认山苍籽油抗真菌作用的主要成份是柠檬醛,吴正山、蒋立科、周淑香等人就山苍籽油的抗菌及其毒性评价作了研究外,近年来,周坚、李沛涛^[10]采用同位素标记追踪,对山苍籽油作了抗金黄色葡萄球菌和绿脓假单胞杆菌机理的研究,夏忠荣、杨军祥、李沛涛^[11]等采用与周坚、李沛涛相同方法^[7]作了山苍籽油抗白色念珠球菌机制的研究,尽管透视镜分析说明了山苍籽油部分作用机理,如细胞壁疏松、膜密度降低、细胞内容物减少、干扰蛋白质和细胞壁的合成等,但有关柠檬醛如何进入菌丝体细胞及孢子、在此过程中细胞器及质膜又发生什么动静态变化过程,均无直接证据,况且山苍籽油含有近30种有机化合物,具有抗菌作用有5种,是单一成份的作用,还是多种成份的复合作用,尚未阐明,特别是毒化后菌丝体停止生长,孢子失去萌发力,菌核体中止合成黄曲霉毒素 B_1 的分子机制尚未阐明。尽管1997年和1999年分别有二篇关于

香精油抗黄曲霉机理的报道^[12-13]，但后者只是引用了前者的报道，除了有关生理指标分析与静态电镜观察外，尚无药物进入细胞、药物与靶分子结合而降低分子生物活性等方面机制的报道。

3 柠檬醛抗菌机理

柠檬醛是小分子单萜类物质，具有顺反式两种结构。抗菌实验表明，两个组分作用于细胞的靶部位和靶分子相互协同。缺少任何一种构型均无活性。



Raner G M, Vax A D, Coon M J. 发现^[14]柠檬醛能有效抑制微粒体视黄醇脱氢酶 P450、同工酶 2B4 的活性，表明柠檬醛作为香料能有效地深入视觉细胞的质膜中，改变膜的通透性。罗曼，蒋立科，吴子健等^[15]在对山苍籽提取抗霉有效成分研究时，发现山苍籽油及果渣能抗黄曲霉在于强力破坏细胞壁、质膜结构和氧化还原系统而抑制黄曲霉等曲霉的生长，并使其孢子失去萌发能力；随着药物浓度的增加或致敏浓度 (MIC) 作用时间的延续，产毒黄曲霉在 360nm ~ 410nm 区域光吸收明显增加，反映细胞内某些大分子中能吸收紫外光的基团裸露，分子构象改变，活性丧失或部分失活；同时质膜刻蚀程度加深并出现钟孔，原生质渗出，对周围物质吸收利用率减少。在此基础上，通过生物物理和生物化学分析测定，发现质膜电位降低，电导率上升， $[Na^+, K^+]$ -ATPase 活性、质膜的选择性通透性、线粒体对氧利用速率、三羧酸循环中 MDH、SDH 活性显著下降，呼吸链上电子传递受到影响，而线粒体数目增加且形态不规则，表明该醛进入细胞后，破坏了高度有序的大分子拥挤环境，改变了生化反应的局域性，进一步证明该醛对细胞的破坏作用是多方面的。由于单个细胞的化学组成分析可用于评价外界刺激（如药物和毒素）对细胞化学组成的影响，获得其他方法所不能获得的宝贵信息，为药物设计有效地减少副作用提供重要的依据。大量正常细胞中单个细胞致病化学标记物的识别和表征使疾病的早期诊断成为可能。罗曼，蒋立科，黄耀雄，等人在对该醛作用于黄曲霉研究的基础上，将显微激光散射技术^[16,17]，显微多道分光光度系统、超分辨显微图象分析及单细胞凝胶电泳分析技术^[18]有机地组合成一个研究平台，通过计算机对所获图象进行存贮和分析，实现对经该醛损伤后黄曲霉细胞从结构到功能的实时在位动态地检测，获得所照射的单个活细胞内蛋白质等生物大分子的有关动态信息，进一步发现该醛对质膜、线粒体、细胞核形态产生的影响，与周坚等人所述（文献[11]）不同的是不仅从物理角度阐明柠檬醛通过改变膜的物理力学参数而损伤形态结构的过程，而且从完整的细胞、亚细胞和分子 3 个水平揭示该醛抗黄曲霉的机理，在于该醛损伤质膜而进入细胞后，改变黄曲霉的细胞内生物大分子拥挤环境并引发多种因素所致。其研究的特点归为把细胞静态结构与动态变化，细胞形

态变化的定性描述与生化指标变化的定量监测结合起来。

4 展望

天然抗菌剂来源广泛, 毒性小, 具有广谱性, 且药效长, 能在细胞内产生多方面生理效应, 这种错综复杂的物理化学变化随着科学技术的进步, 日趋明朗化, 并促使新的抗菌药物进入市场的周期大大缩短, 推动我国新抗菌药物和食品保鲜剂的开发。

参考文献

- [1] 江苏新医学院编. 中药大辞典(下册)第一版. 上海: 上海人民出版社, 1977. 1573.
- [2] 李若华. 广西化工, 1993, (3): 11~13.
- [3] 李义奎主编, 王钦茂副主编. 中药药理实验方法, 上海: 上海科学技术出版社, 1989. 286~297.
- [4] 朱蓓蕾. 动物毒理学. 上海: 上海科学技术出版社. 1989. 134~137.
- [5] 方德秋, 肖顺元. 天然产物研究与开发, 1994, 6(2) 95~77.
- [6] Gularti N K, Suri R K. Indian Perfumer, 1983, 26(2~4): 241~248.
- [7] 李开泉, 唐陶. 中国医院药学杂志, 1986, 6(11) 483~484.
- [8] 周勇, 陶君娣, 张家俊. 中西医结合杂志, 1984, 4(9): 558~559.
- [9] 涂新义, 刘菊英, 徐小清, 等. 中国医院药学杂志, 1987, 7(9): 418.
- [10] 吴正三, 蒋立科, 周淑香. 应用与环境生物学报, 1997, 9(2) 63~68.
- [11] 周坚, 李沛涛. 湖南医科大学学报, 1992, 17(4) 329~332.
- [12] Deoliveira A C A X, Ribeiropinto L F, Paumgarten F J R. In: Vitro inhibition of CYP2B1 Monooxygenase by Betamycene and other Monoterpenoid Compounds. Toxicology Letters 1997, 92: 39~46.
- [13] Loza-Tavera H. Chemicals Via Higher Plant Bioengineering, 1999, 464: 49~62.
- [14] Raner G M, Vaz A D, Coon M J. Mol Pharmacol, 1996, 49(3): 515~522.
- [15] 罗曼, 蒋立科, 吴子健. 微生物学报, 2001, 41(6): 723~729.
- [16] 罗曼, 蒋立科. 微生物学报, 2002, 42(2): 226~231.
- [17] 罗曼, 蒋立科, 邹国林. 武汉大学学报(理学版), 2002, 48(2): 217~222.
- [18] 罗曼, 黄耀熊, 蒋立科. 微生物学报, 2002, 42(2): 341~347.