论 著 文章编号:0253-3626(2008)12-1516-04

国产水溶性蜂胶对感染根管内厌氧菌的体外抑菌实验

张红梅,林居红,蒋 琳
(重庆医科大学附属口腔医院预防科,重庆 400015)

【摘 要】目的:研究国产水溶性蜂胶对感染根管内两种常见优势厌氧菌,中间普氏菌、具核梭杆菌及其混合菌的体外抑菌活性。方法:采用琼脂稀释法测定蜂胶水溶液对中间普氏菌、具核梭杆菌及二者混合菌的最低杀菌浓度(Minimal bactericidal concentrations,MBC)。结果:蜂胶对中间普氏菌、具核梭杆菌及二者的混合菌的MBC分别为0.025%、0.025%、0.05%。结论:蜂胶对感染根管常见优势厌氧菌具有良好的抑菌活性,将其用于感染根管消毒具有一定的应用前景。

【关键词】蜂胶;中间普氏菌;具核梭杆菌;抑菌活性
【中国图书分类法分类号】R781.33 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-05-28

In vitro antibacterial activity of domestic-made water-soluble propolis against oral anaerobic bacteria from the infected root canal

ZHANG Hong-mei, et al
(*Department of Prevention, the Affiliated Stomatology Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate bacteriostasis effect of domestic-made water-soluble propolis on prevotella intermedia(Pi), fusobacterium nucleatum(Fn) and mixture bacteria of Pi and Fn in vitro. *Methods*: With agar dilution, minimal bactericidal concentrations(MBC) of propolis for Fn, Pi and mixture bacteria were determined. *Results*: MBC of propolis for Fn, Pi or mixture bacteria were 0.025%, 0.025%, 0.05% respectively. *Conclusion*: Propolis shows the favourable antibacterial activity against the main anaerobic bacterium in infectious root canal which it has a value of application for disinfecting root canal.

【Key Words】 Propolis; Prevotella intermedia(Pi); Fusobacterium nucleatum(Fn); Antibacterial activity

根管感染通常是厌氧菌占优势的多种细菌的混合感染。研究发现中间普氏菌(P.intermedia,Pi)和具核梭杆菌(F.nucleatum,Fn)是感染根管的优势菌[1]。而细菌之间的协同作用,能导致根尖周破坏的加重[2]。目前临床针对感染根管最常用的消毒方法是药物消毒。寻求一种消毒力强、副作用小的根管消毒药物一直是国内外学者所关注的研究课题。

蜂胶作为一种天然抗生素具有广泛的抗菌活性[3~5],对口腔致龋菌及牙周致病菌均有抑制作用[6~8]。但以前的研究多为蜂胶乙醇提取液,对蜂胶水提取液研究非常少;并且研究对象多为单一菌种的抑制作用,对细菌混合液抑制作用的研究很少。本研究通过观察国产水溶性蜂胶对Pi、Fn及二者混合菌的抑菌作用,测定最低杀菌浓度(Minimal bactericidal concentrations,MBC)值,为蜂胶在根管消毒领域的进一步研究提供理论依据。

作者介绍:张红梅(1974-),女,硕士,
研究方向:牙体牙髓疾病。
通讯作者:林居红,女,教授,E-mail:juhonglin@sina.com。
基金项目:重庆市中医药科研计划项目(07-2-50)。

1 材料和方法

1.1 实验菌株

具核梭杆菌(Fusobacterium nucleatum,Fn ATCC 25586),中间普氏菌(Prevotella intermdia,Pi ATCC 25611)由四川大学华西口腔医学院卫生部口腔生物医学工程重点实验室提供,冻干国际标准菌株。将Fn和Pi的干燥菌粉分别用心脑浸液(Brain-heart infusion,BHI)液体培养基溶解,采用分区划线的方法将两种细菌接种于BHI血琼脂培养基上,37℃厌氧环境(80%N_2,10%H_2,10%CO_2)培养48 h,显微镜下观察并鉴别分离,分别移取大小形态一致的菌落溶于BHI液体培养基中,再次接种在BHI血琼脂培养基上,37℃厌氧环境(80%N_2,10%H_2,10%CO_2)培养48 h后,用BHI+Hemin液体培养基配成

1.5×10^8 CFU/ml菌悬液，备用。

1.2 蜂胶实验应用液的制备

将水溶性固体蜂胶（河南长葛市晟源蜂业有限公司提供，纯度达98%，黄酮类化合物总含量≥140 g/kg，含铅量<1 mg/kg）置冰箱冻存24 h，使成为不具粘性的固体。用电子天平精密称取蜂胶固体11.8 g，溶解于75 ml蒸馏水，调整pH值（6.8～7.0），98℃的水浴加热后制备成浓度为15.4%的蜂胶水溶液。待溶液冷却后，用滤纸过滤，将滤渣及滤纸上未溶解的蜂胶在40℃的恒温箱中烘干（过夜）。称取滤渣重量并计算蜂胶溶液浓度。加蒸馏水调整蜂胶水溶液浓度至1%，置于冰箱内保存备用。

取1%蜂胶1 ml，加入BHI+Hemin液体培养基9 ml制成0.1%的蜂胶应用液。用BHI+Hemin液体培养基按对倍稀释法将0.1%的蜂胶应用液稀释成0.1%、0.05%、0.025%、0.012 5%、0.006 25%等5个浓度备用。

1.3 药物平板的制备

实验组（蜂胶组）：取已配制好的5个不同浓度的蜂胶实验药液，在无菌条件下按低浓度到高浓度，依次加入已融化并冷却至48℃～50℃的BHI血琼脂中，待混合后倾注于直径为90 mm平板中。每个平板含1个药物浓度，其药液量为2 ml、琼脂培养基量为18 ml。

药物对照组（氢氧化钙组）：用BHI+Hemin液体培养基按对倍稀释法将氢氧化钙稀释成5 mg/ml、2.5 mg/ml、1.25 mg/ml、0.625 mg/ml、0.313 mg/ml等5个浓度备用。

阳性对照组：将BHI血琼脂倾注于直径为90 mm平板中，制作成一个不加药物的BHI血琼脂平板，约20 ml、4 mm厚，晾干表面水分，备用。

阴性对照组：含有药物，但不含有菌液的BHI+Hemin液体培养基倾注于直径为90 mm平板中，约20 ml、4 mm厚，晾干表面水分，备用。

1.4 体外抑菌实验

本实验采用琼脂稀释法。用记号笔将含药物琼脂平板和阳性对照琼脂平板的底部划分成12个记号区。然后用点种仪取实验菌液（10^8 CFU/ml），分别接种于不同浓度的药物琼脂平板表面的记号区内。其中，1～4记号区内接种6 μl的Fn菌液，5～8记号区内接种6 μl的Pi菌液，取3 μl的Fn菌液和3 μl的Pi菌液接种于9～12记号区的同一点上（形成混合菌液）。点种完毕后的琼脂平板放置于37℃厌氧环境中（80% N_2，10% H_2，10% CO_2）培养48 h。以肉眼直接观察细菌生长情况，无细菌生长的最低药物浓度为最低杀菌浓度。抑菌实验重复6次。

2 结 果

阳性对照组均有细菌生长，阴性对照组均无细菌生长。蜂胶水溶液抑菌实验结果见表1，氢氧化钙抑菌实验结果见表2。

3 讨 论

本实验采用琼脂稀释法测定蜂胶对Fn、Pi及其二者混合菌的最低杀菌浓度，此方法是美国国立临床实验室标准化委员会规定的最常用的体外药敏试验方法。它使用一定浓度的琼脂培养基，在同一平板上可同时测定10～20种细菌对药物的敏感性[2]。大量研究表明，牙龈卟啉单胞菌（Porphyromonsa gingivals，Pg）、Fn和Pi等厌氧菌是牙髓、根尖周疾病的优势病原菌 。单一厌氧菌的致病力是有限的，而细菌

表1 不同浓度蜂胶水溶液的抑菌实验结果

菌名	蜂胶水溶液浓度（%）				
	0.1	0.05	0.025	0.012 5	0.006 25
中间普氏菌	-	-	-	+	+
具核梭杆菌	-	-	+	+	+
细菌混合液	-	-	+	+	+

注："-"表示无细菌生长，"+"表示有细菌生长

表2 不同浓度氢氧化钙溶液的抑菌实验结果

菌名	氢氧化钙溶液浓度（mg/ml）				
	5	2.5	1.25	0.625	0.313
中间普氏菌	-	-	+	+	+
具核梭杆菌	-	+	+	+	+
细菌混合液	-	+	+	+	+

注："-"表示无细菌生长，"+"表示有细菌生长

之间的协同作用是牙髓、根尖周疾病发生发展的重要因素之一。有研究显示感染根管内的优势菌如产黑色素厌氧杆菌、Fn等单独纯培养接种动物根管，往往不致病甚至不能存活，但混合接种却能导致根尖周破坏的加重[2]，因此，从微生态学的角度来看，细菌之间的协同作用对细菌在根管环境中的生存及致病十分重要。

国内外研究表明[9~11]，临床常用的根管消毒药物甲醛甲酚、樟脑酚等都有较强的细胞毒性，作为半抗原可引起机体免疫损害，并且甲醛甲酚有致癌的可能性。氢氧化钙是目前国内外得到公认的根管消毒药物，已广泛用于临床[12]。Law[10]对国外近年来多种根管消毒药物的研究报道进行系统评价，认为氢氧化钙仍然是目前最有效的根管消毒药物。本次实验结果显示氢氧化钙对Pi的MBC为2.5 mg/ml，对Fn的MBC为5 mg/ml，对混合菌的MBC为5 mg/ml，氢氧化钙对口腔厌氧菌有较好的杀菌效果，这与以往的研究结果相符；但同时Law也指出氢氧化钙并不能消除感染根管内的所有微生物，一些细菌（粪肠球菌、放线菌、葡萄球菌、链球菌）对较高的pH有一定的耐受性，尤其是粪肠球菌，当pH=11.5时，它仍能生存，而且牙本质中的羟磷灰石具有很强的缓冲性能，对于顽固性根尖周炎或根管治疗术失败后的患牙，氢氧化钙的消毒能力比较有限。因此，我们有必要寻求一种低毒、安全、有效的根管消毒药物。

蜂胶（Propolis）是一种历史悠久的民间用药。国内外的研究证明：蜂胶能抑制金黄色葡萄球菌、白色葡萄球菌、链球菌、产黑色素类杆菌等多种细菌[13,14]。此外，国内外的研究发现蜂胶能有效杀灭对氢氧化钙耐受的细菌[10,14]。H.Koo等[15]体外实验发现蜂胶不仅能对白色念珠菌、粪肠球菌、内氏放线菌、金黄色葡萄球菌、链球菌有很强的抑菌效果，并且能抑制细菌粘附和牙菌斑的形成。Oncag[16]等报道蜂胶在离体牙的根管内能有效杀灭粪肠球菌，建议将蜂胶用于根管消毒药物的替代药物。蜂胶还含有人体必需的氨基酸和微量元素，且无毒副作用[17,18]，在控制感染根管方面具有较高的药物开发价值。

由于蜂胶是一种中药，按照药敏实验[2]对中草药实验应用液的规定，本实验按对倍稀释法将0.1%的蜂胶应用液稀释成0.1%、0.05%、0.025%、0.012 5%、0.006 25%等5个浓度，结果显示蜂胶对Pi的MBC为0.025%，对Fn的MBC为0.05%，对混合菌的MBC为0.05%，蜂胶能够抑制Fn、Pi及二者混合菌的生长。蜂胶不仅对单一厌氧菌表现出较强的抗菌活性，在细菌协同作用产生更强细菌毒力的情况下，也表现出较强的抗菌活性。国内外有很多关于蜂胶抗菌活性的报道，但关于口腔厌氧菌抑菌实验的报道较少，而且不同的报道所得出的结果也不一样。王银龙等[8]实验观察报道蜂胶对产黑色素类杆菌的最小抑菌浓度为0.313%；F.A.Santos等[14]研究了巴西热带高原草原蜂胶及其组分对口腔厌氧菌的作用，认为蜂胶的最小抑菌浓度范围为64 ~ 1 024 mg/L；结果不尽相同可能与蜂胶的组成成分存在地区差异性有关。尽管各产地的蜂胶在成分上有很大不同，但都具有抗微生物、抗氧化、抗炎症、抗癌等生物活性和药理作用，不受产地和季节的限制[19]。本次实验结果显示蜂胶具有较强的杀菌效果，可能是因为所选蜂胶的纯度达98%，黄酮类总含量≥140 g/kg（蜂胶抗菌的有效成分是黄酮类等化合物），并且水溶性蜂胶更易被机体吸收。以往研究的多为醇溶性蜂胶，所以与本次实验结果略有不同，但都提示了蜂胶具有很强的抗菌活性。

本实验所用蜂胶为水溶性固体蜂胶，目前蜂胶的提取方法有乙醇提取、水提取，超临界、膜技术、分子蒸馏等提取方法。长期以来，由于普通蜂胶脂溶性强、水溶性差，临床或实验多采用蜂胶乙醇提取法，制成品的气味浓、刺激性强。蜂胶水提液易于被机体吸收，不存在溶剂残留带来的副作用，也容易调味。在相同剂量的情况下，蜂胶水提液的抗炎和抗肿瘤效果与醇提液相比差异不大，甚至优于醇提液[19]。王晶等[20]采用连续培养致龋菌形成人工龋损的方法，比较蜂胶水溶液、蜂胶醇溶液和洗必泰3种溶液的防龋效果，结果发现蜂胶的防龋效果优于洗必泰，同时还指出蜂胶水提取物具有使用更方便、更安全等优点。吕泽田等[21]采用蜂胶水提取物进行抑制实验表明，蜂胶水提取物的抑菌作用几乎涵盖了霉素类、磺胺类的抑菌范围，证实了蜂胶的抑菌作用具有广谱性、安全性与经济性，尤其对金黄色葡萄球菌的抑制作用是其他抑菌类药物所不及的。本实验结果表明蜂胶水溶液对Fn和Pi均有良好的抑菌作用，与以往的研究结果相似[9]。

蜂胶的药用价值是它作为一种天然混合物表现出来的，其抗菌作用是所含各种成分综合作用的

结果。蜂胶萃取物含有二百多种物质，其抗菌的有效成分是黄酮类化合物、高良姜素、松属素、咖啡酸脂等[22]。蜂胶的抗菌、杀菌作用原理十分复杂，可能包括：黄酮类和苯乙烯类成分分解了细菌胞膜上的能量，从而限制细菌运动[23]；黄酮类化合物能抑制自由基的形成[24]；Marcucci等[25]研究发现蜂胶对不同细菌和霉菌不但具有直接抑制细菌和霉菌的作用，而且抑制细菌对细胞的粘附；Takaisikikuni等[26]认为蜂胶能破坏细菌细胞壁、细胞质、细胞膜的结构，产生溶菌作用，并能抑制细菌蛋白质的合成；由此可见蜂胶的抗菌机制十分复杂，其确切作用机制还有待进一步研究探讨。

我国是一个盛产蜂胶的大国，来源丰富，价格低廉。随着抗生素多重耐药性的发生日益突出，蜂胶由于具有抗菌，消炎及增强免疫力等药理学作用和较小的毒性作用，较其它化学制剂具有更高的研究开发潜力，在不久的将来可望成为根管消毒药物的替代品。

参 考 文 献

[1] 史俊南.牙髓生物学[M]. 西安：西安世界图书出版公司，2006.114-124.

[2] 周学东.口腔微生物学[M]. 成都：四川大学出版社，2002.251-257. 387-391.

[3] Stepanovic, Antic N, Dakic I, et al. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs [J]. Microbiology Res, 2003, 158(4): 353-357.

[4] Uzel A, Sorkun K, Oncag O, et al. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples[J]. Microbiol Res, 2005, 160(2): 189-195.

[5] Bankova V, Christov R, Kujumgiev A, et al. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis[J]. Z Naturfnmch, 1995, 50(3-4): 167-167.

[6] Gebara C E, Lima A, Marcia P A. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria[J]. Braz. J. Microbiol, 2002, 33(4): 365-369.

[7] 戴 淳，陈 晖，朱方远，等.蜂胶酊对根管各类细菌的作用及临床研究[J].口腔材料器械杂志，1996，5(3)：114-115.

[8] 王银龙，张敏丽，程文显，等.蜂胶对牙周致病菌的抑制作用[J]. 安徽中医学院学报，1996，15(4)：58-59.

[9] De Souza C A, Teles R P, Souto R, et al. Endodontic therapy associated with calcium hydroxide as an intracanal dressingmicrobiologic evaluation by the checkerboard DND-DNA hybridization technique[J]. J Endod, 2005, 31(2): 79-83.

[10] Law A, Messer H. An evidence-baced analysis of the antibacterial effectiveness of intracanal medicaments[J]. J Endod, 2004, 30(10): 689-694.

[11] Siquerira J F Jr, Lopes H P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide. A critical review[J]. Int Endod J, 1999, 32: 361-369.

[12] 张天宝，黄晓波，岳木生.蜂胶复方消毒剂杀菌效果与毒性的实验观察[J]. 中国消毒学杂志，2000，17：58-59.

[13] 刘海鹏，王钦茂.蜂胶治疗口腔疾病的药理作用和临床应用现状[J].中国临床药理学与治疗学，2002，7(3)：381-384.

[14] Santos F A, Bastos E M A, Uzeda M, et al. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2002, 80(2002): 1-7.

[15] Koo H, Gomes B P F A, Rosalena P L, et al. In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica montana against oral pathogens[J]. Archives of Oral Biology, 2000, 45: 141-148

[16] Oncag O, Cogulu D, Uzel A, et al. Efficacy of propolis as an intracanal medicament against Enterococcus faecalis[J]. GenDent, 2006, 54: 319-322.

[17] Martin M P, Pileggi R. A quantitative analysis of Propolis: a promising new storage media following avulsion[J]. Dent Traumatol, 2004, 20(2): 85-89.

[18] Sforcin J M, Orsi R O, Bankova V, Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2005, 98: 301-305.

[19] 胡福良，李英华，朱 威，等.不同方法提取的蜂胶液中总黄酮含量的测定及抗肿瘤与抗炎作用研究[J].中国食品学报，2005，5(3)：11-15.

[20] 马 斌，江 珉. 蜂胶在口腔内科中临床应用的研究进展[J]. 西南军医，2006，8(3)：72-73

[21] 吕泽田.蜂胶应用研究现状与发展趋势[J].蜜蜂杂志，2005，2：8-11.

[22] 徐叔云.临床药理学[M].合肥：安徽科学技术出版社，1992. 615-617.

[23] Popova M, Bankova V, Spassov S, et al. New bioactive chalcones in propolis from El Salvador[J]. Z Naturforsch, 2001, 56(7-8): 593-596.

[24] Burdock G A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis[J]. Food Chem Toxicol, 1998, 36: 341-363.

[25] Marcucci M C, Ferreres F, Garcia-Viguera, et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with Pharmacological activities[J]. J Ethnopharmacol, 2001, 74: 105-112.

[26] Takaisiki kuni N B, Schilcheer H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance[J]. Planta Med, 1994, 60: 222-227.

（责任编辑：关蕴良）