

基于微量量热法的寒热中药对大肠杆菌生长热谱曲线的影响^{*}

高誉珊, 郑丰杰, 李 鑫, 许 红, 张淑静, 李宇航[△]

(北京中医药大学基础医学院, 北京 100029)

摘要: **目的** 观察典型寒热中药黄连、制附子对大肠杆菌生长代谢作用的影响,探讨微量量热法用于中药寒热差异及量化研究的可行性。**方法** 采用微量量热技术,测定大肠杆菌在不同浓度寒热中药水煎液干预下的生长热谱曲线,分析其热力学参数。**结果** 黄连、制附子均可影响大肠杆菌产热效应,其效应影响与药物浓度具有正相关关系;黄连组的热焓值明显低于对照组,制附子组的热焓值明显高于对照组。**结论** 微量量热技术是从生物体生命周期及能量代谢角度,观察中药寒热效应差异的客观化手段之一。

关键词: 微量量热法; 中药四气; 黄连; 附子; 大肠杆菌

中图分类号: R378.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2014)02-0010-04

寒热是中医的核心问题,无论是对阴阳理论的探讨、六经分证的研究,还是对中药作用的研究等,均直接或间接地涉及寒热客观化的评价问题^[1-2]。已有很多学者从阐明中药寒热药性差异的客观性、建立较为公认的中药寒热药性评价方法和指标、揭示中药寒热药性的生物学机制及可能的物质基础方面开展了大量的研究^[3-4]。本文从微量热力学角度对黄连、制附子典型寒热中药进行初步研究,观察其不同浓度水煎液对大肠杆菌生长热谱曲线的影响。

微量量热法是生物物理研究领域的新方法,主要用于研究生命体系的热力学过程和化学反应所产生热量变化的生物热效应,具有精确、微量、实时等特点,可连续检测并绘制细菌生长代谢热功率 P 随时间 t 的变化规律等特点。Barro、沈雪松、Yamage 等将微量热法运用到物理、细菌抗药性、细胞代谢研究等方面^[5-7]。在中药四性研究中,微量量热法也因其量化特征受到重视。近年来,王征等通过观察寒热中药对人胃癌细胞株 SGC-7901、人宫颈癌细胞株 HeLa 生长的影响,提出热性药具有促进细胞代谢生长、增殖的作用,而寒性药则大多表现为抑制作用^[8-9];余惠敏等对不同品种、不同部位、不同方法炮

制的人参^[10-11],鄢丹等对黄连及其不同炮制品^[12],周韶华对经典名方左金丸与反左金^[13]均进行了生物热动力学研究,实验结果与中药四性理论基本吻合。在此基础上,我们进行了如下实验研究。

1 仪器与材料

1.1 仪器

TAM Air 八通道微瓦级热导式等温量热仪(Thermometric AB, 瑞典),工作温度 10~80℃,控温精度 $2 \times 10^{-4} \text{℃}$,热功率最小检测极限 $0.15 \mu\text{W}$,24 h 内基线漂移不超过 $0.2 \mu\text{W}$,8 个通道同时进行测定。本研究的工作稳定设定为 37℃。

1.2 菌种

大肠杆菌菌株(E.coli ACTT 25922),由中国生物制品药品鉴定所提供。

1.3 中药水煎液

药材来源:制附子、黄连均购于北京同仁堂药店,经北京中医药大学中医药理论与关键技术中心鉴定均为正品。参文献[14]制备成中药水煎剂,具体方法是:取药材各 100g,用 6 倍水浸泡 30min,煎煮 1h,取药液,药渣再加 6 倍水,煮 30min,合并 2 次煎液,80℃水浴浓缩定容至 200mL,121℃高压蒸汽灭

^{*} 基金项目:教育部“211”工程三期建设项目;北京中医药大学创新团队项目(2011-CXTD-04)

收稿日期:2014-03-24

作者简介:高誉珊(1986-),女,北京市人,实验师,在读硕士研究生。主要研究方向:中药药性研究。

[△]通信作者:李宇航,E-mail:liyuhang@bucm.edu.cn

菌 30min,放入冰箱冷藏,备用。

1.4 LB 液体培养基

参文献[15]取胰蛋白胨 10g、酵母提取物 5g、NaCl 10g 加入 950 mL 去离子水中,摇动容器直至溶质溶解,用 5mol/L NaOH 调 pH 至 7.0,用去离子水定容至 1L,在 15Pa 高压下蒸汽灭菌 20min。冷却分装后置冰箱中备用。

2 实验方法

2.1 实验方法

本实验参文献[16]采用安瓿法。实验分为对照组和药物组,对照组加入 4950 μ L 的 LB 培养基,50 μ L 蒸馏水,并接种浓度为 1×10^9 cfu/mL 的大肠杆菌菌液作为反应基液,使反应体系达到 5mL。药物组同样加入加入 4950 μ L 的 LB 培养基,50 μ L 不同浓度的中药水煎液,使药物在安瓿内的最终生药浓度达到 0.5,1,1.5,2,2.5,5,7.5 (mg/mL),并接种浓度为 1×10^9 cfu/mL 的大肠杆菌菌液作为反应基液,使反应体系达到 5mL。密封,迅速放入微量量热仪中。参比瓶加入 5mL 培养基,不接种菌种。跟踪记录细菌生长的 P-t 曲线,当曲线重新返回基线时,实验结束。

2.2 热力学参数

参文献[8],采用生长速率常数 K、抑制率(I)、抑制率为 50%时药物的浓度(IC_{50})、热焓(ΔH)、达峰时间(T_p)评价药物对细菌生长热谱的影响。其中生长速率常数(K)能够表达细菌在特定条件下生长代谢速率的快慢。生长抑制率(I)为细菌受抑制时的生长速率常数与正常生长速率常数之差和正常生长速率常数的比值。以生长抑制率(I)对浓度 c 作图得到 I%-C 关系式,求得抑制率为 50%时药物的浓度(IC_{50})。 IC_{50} 可用来衡量细菌对药物的敏感性, IC_{50} 越小,表明细菌对药物越敏感,药物的抑制作用越大。热焓(ΔH)是 TAM Air 八通道微瓦级热导式等温量热仪直接记录的是热流量随时间变化的曲线,该曲线与基线所构成的峰面积与热焓(ΔH)成正比,热焓实际上代表了细菌总的代谢热。达峰时间(T_p)即为细菌在生长过程中达到最大发热功率所需要的时间。

3 结果

3.1 大肠杆菌正常产热曲线

如图 1 所示。37 $^{\circ}$ C 大肠杆菌的 P-t 曲线可以划分为 4 个阶段^[7],即生长期(A-B)、停滞期(B-C)、稳

定期(C-D)、和衰亡期(D-E),呈现出 2 个指数生长期特征。前一个峰为细菌利用新鲜培养基及其内溶解氧迅速生长的结果,生长速率较快,可称为第一指数生长期。随着细菌的快速生长,培养基中的溶解氧迅速消耗,细菌的生长出现暂时停滞,在这期间,细菌通过调整自身生理活动重新适应环境,经过一段调整期后,细菌重新开始稳步增长,即第二指数生长期,其生长速率相对要比第一指数期的生长速率要低得多,但由于细菌数量大,产热功率高,是细菌细胞的主要放热阶段。在细菌细胞的衰亡期,培养基物质被消耗殆尽,热功率曲线重新回到基线。在大肠杆菌的生长过程中,生长期的营养物和氧较充分,细菌以指数生长,发热功率最能体现细菌的生长状态,也最能反应微生物基本的生长模式和特征^[18]。测定 8 个通道安瓿瓶内大肠杆菌正常生长代谢热谱曲线,算得 8 个通道大肠杆菌正常生长速率常数 K (见表 1),可得 $K=(3.092 \pm 0.004) \times 10^{-4}$ /s,相关系数 R 均大于 0.995,说明结果有良好的重现性和相关性。

表 1 8 通道安瓿瓶大肠杆菌正常生长速率常数

通道	K/s ⁻¹ ($\times 10^{-4}$)	R
1	3.086	0.9951
2	3.097	0.9987
3	3.095	0.9961
4	3.086	0.9984
5	3.092	0.9968
6	3.095	0.9984
7	3.093	0.9956
8	3.092	0.9952

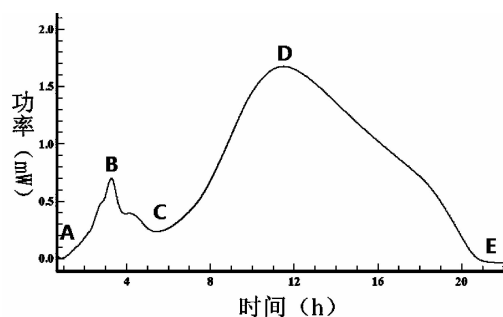


图 1 37 $^{\circ}$ C 大肠杆菌正常的热功率-时间曲线

3.2 各药物不同浓度对大肠杆菌生长产热曲线的影响

如表图 2 所示:图为大肠杆菌在黄连、制附子

表 2 37℃时大肠杆菌在黄连、制附子不同浓度作用下生长的热力学参数

组别	生药浓度 /(C/mg·mL ⁻¹)	达峰时间 /(Tp/h)	生长速率常数 /(k/s ⁻¹)	热焓 /(ΔH/J)	抑制率 /%	半抑制浓度 (IC ₅₀ /mg·mL ⁻¹)	相关系数 /r
对照组	0	11.83	3.097×10 ⁻⁴	59.258	0		0.977
黄连	0.5	17.6	2.132×10 ⁻⁴	58.221	0.312	0.020	0.993
	1.0	21.76	1.572×10 ⁻⁴	57.525	0.493		0.997
	1.5	31.65	1.111×10 ⁻⁴	56.209	0.641		0.997
	0.5	11.41	1.635×10 ⁻⁴	61.638	0.472		0.984
制附子	1.0	11.11	1.321×10 ⁻⁴	62.179	0.573	0.041	0.992
	1.5	9.36	1.181×10 ⁻⁴	65.575	0.619		0.992

水煎液干扰下代谢产热曲线,其形状基本相同,但随着药物干扰,其生长期的斜率不同,生长代谢过程的停滞期不同,稳定期峰值不同。通过数据分析,可得到表 2 所示热力学参数。

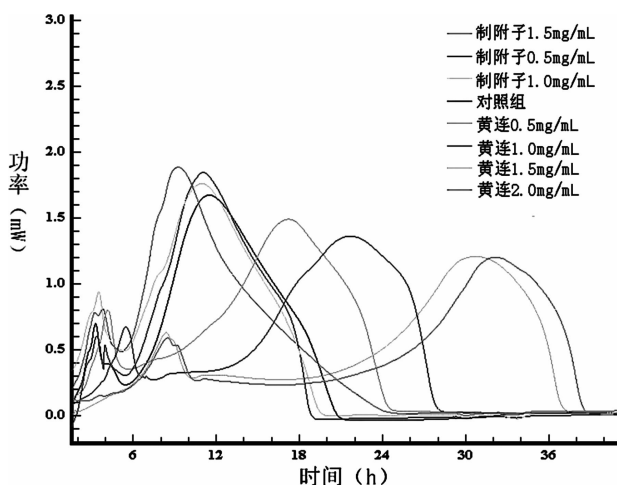


图 2 37℃时大肠杆菌在不同浓度下制附子黄连作用下生长的热功率-时间曲线

3.2.1 生长速率常数和半抑制浓度

从表 2 可以看出,随着药物浓度的增加,生长速率常数 K 呈下降趋势,抑制率呈上升趋势,提示药物浓度对细菌生长的影响成正相关。且不同药物在同一浓度时,对细菌的生长速率常数的影响不同。提示不同药物对细菌代谢的影响程度不同。对大肠杆菌的半抑制浓度制附子 0.041mg/mL>黄连 0.020mg/mL。

3.2.2 热焓分析

制附子组的热焓值均高于其对照组,黄连组的热焓值均小于其对照组。提示制附子使大肠杆菌产热增加、代谢增强;而黄连则与其相反,且随着浓度增加,影响增大。

3.2.3 达峰时间

如图 3 所示:在相同浓度下不同药液作用于大肠杆菌所产生的生长代谢产热曲线,可以发现达峰时间制附子 9.36h<对照组 11.83h<黄连 31.65h。提示制附子使细菌达到最大发热功率所需要的时间较对照组短,黄连则相反。

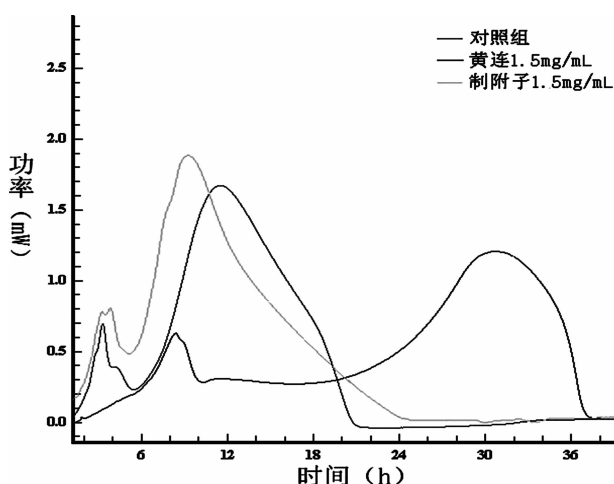


图 3 37℃时大肠杆菌在同浓度黄连、制附子作用下生长的热功率-时间曲线

制附子和黄连相比(见表 2),随着浓度增加,黄连作用于细菌后代谢达峰时间增大,由 17.6h 增加到 31.65h,峰形变得平缓,其整个代谢过程的时间增加。提示不同浓度药物对细菌生长速度的影响不同,高浓度药物作用较低浓度药物作用强。

4 讨论

中药四气是从药物作用于人体所获得的不同疗效总结出来的用药理论,反映了药物对人体阴阳盛衰、寒热变化的作用倾向,即凡是能减轻或消除热证的药物,一般属于寒性或凉性;凡是能减轻或消除寒证的药物一般属于热性或温性^[9,19]。以药物作

用于机体后所产生的热效应作为切入点研究发现:热药使机体体温上升、中枢兴奋、代谢增强;而寒药则与其相反^[20-21],从整体和宏观角度证实了中药寒热药性差异的客观存在,但检测结果容易受测温环境、测温技术和个体差异等因素影响,而以细菌或细胞作为受试对象开展中药寒热药性研究则可有效避免以上影响。

本研究发现:黄连、制附子均能不同程度地抑制大肠杆菌的生长,且随着药液浓度的增加,其抑菌作用逐渐增强。且将数据转换为半抑制浓度后,可将两组实验同时比较,黄连只需要较低的浓度就可对大肠杆菌产生较强抑菌作用,而制附子则需要更高的浓度。本研究还表明,这黄连、制附子对大肠杆菌生长代谢热输出均有明显影响,表现为制附子可增加代谢热的输出,黄连则降低代谢热的输出,这一研究结果与有关寒热药性研究的文献报道相吻合^[11-13],且随着药物浓度的增加,制附子促进的作用逐渐增强,黄连抑制的作用逐渐增强。 K 、 ΔH 、 IC_{50} 作为应用微量量热法研究中药寒热药性的主要参数,可有效反应寒热药物对大肠杆菌的生物热效应的影响。

需要注意的是,通过本实验方法取得的数据只能从微量量热学角度客观反映中药对大肠杆菌的影响,对于中药的寒热属性的判定来说具有一定局限性,还应进行多因素多角度的评价分析。本实验结果初步表明微量量热技术是从生物体生命周期及能量代谢角度,观察中药寒热效应差异的客观化手段之一,这对于进一步开展中药四性差异化和量化研究具有参考意义。

参考文献:

- [1] 白筱璐,李兴平,胡竟一,等. 熟附子、黄连对寒热体质大鼠正常体温的影响[J]. 中药药理与临床,2011,27(2):98-100.
- [2] 殷玉婷,李小婉,董杨,等. 中医药寒热本质的生物学基础研究进展[J]. 中西医结合学报,2012,12(10):1328-1335.
- [3] HB Yang, YL Zhao, BC Li, et al. Cold or hot nature attribute of zuojinwan and fanzuojinwan based on temperature tropism of mice[J]. Yao Xue Xue Bao, 2010, 45(6):791-796.
- [4] 代春美,肖小河,彭成,等. 中药四性研究概述[J]. 中成药, 2010, 3(3):480-482.
- [5] Barro s N, Feijo S, Simoni J A, et al. Microcalorimetric study of some Amazonian soils [J]. Thermochim Acta, 1999, 328(1):99-103.
- [6] Shen X S, Liu Y, Zhou C P, et al. Thermochemical studies on the quantity-antibacterial effect relationship of fluoroquinolones[J]. Acta Chem Sin, 2000, 58(11):1463-1466.
- [7] Yamage M, Evans C H. Suppression of mitogen-and antigen-induced lymphocyte proliferation by lanthanides[J]. Experientia, 1989, 45(11-12):1129-1131.
- [8] 余惠,肖小河,刘塔斯,等. 中药四性的生物热动力学研究 I. 生晒参和红参药性的微量量热学比较 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(5):393-396.
- [9] 高学敏. 中药学 (中医学高级丛书·上册)[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000:45-46.
- [10] 余惠敏,刘塔斯,肖小河,等. 中药四性的生物热动力学研究-人参与西洋参药性的微量量热学比较 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2001, 7(11):60.
- [11] 余惠敏,肖小河,刘塔斯,等. 中药四性的生物热动力学研究(II):参叶和参花药性的微量量热学比较[J]. 中草药, 2001, 32(10):910.
- [12] 鄢丹,肖小河,金城,等. 微量量热法研究黄连中小檗碱类生物碱对金黄色葡萄球菌生长代谢的影响[J]. 中国科学:B 辑, 2009, 38(6):487-491.
- [13] 周韶华,肖小河,赵艳玲,等. 中药四性的生物热动力学研究-左金丸与反左金寒热药性的微量量热学比较[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(12):1183.
- [14] 杨蓉,郑虎占. 中药煎煮法的现代研究概况[J]. 中国医药科学, 2012, 2(17):44-46.
- [15] Sambrook J, Russell D W, et al. 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学出版社, 2002.
- [16] 余惠,肖小河. 中药四性的生物热动力学研究(II)参叶和参花药性的微量量热学比较 [J]. 中草药, 2001, 32(10):910-913.
- [17] Li X, Liu Y, Wu J, et al. The action of the selenomorpholine compounds on Escherichia coli growth by microcalorimetry[J]. Therm Anal Calorim, 2002, 67:589-595.
- [18] Li X, Liu Y, Wu J, et al. The action of the selenomorpholine compounds on Escherichia coli growth by microcalorimetry[J]. Therm Anal Calorim, 2002, 67:589-595.
- [19] 王鹏,王振国. 中药四性理论形成发展源流述要[J]. 山东中医药大学学报, 2010, 34(1):5-7.
- [20] 朱明,李宇航,林亭秀,等. 关于中药寒热药性试验的红外成像观测 [J]. 中国体视学与图像分析, 2007, 12(1):53-55.
- [21] 尹妍,李宇航. 中药寒热属性的现代研究进展[J]. 世界中西医结合杂志, 2011, 6(3):254-256.

(编辑:杨阳)

(英文摘要见第 33 页)

疾病预防与控制至关重要。而对于脾胃已伤者,实者可醒脾消积,虚者健脾益气,以恢复脾胃运化功能。

血郁者,治以活血化瘀清热,可以血府逐瘀汤或桃红四物汤加减治疗。祝湛予教授发现很多糖尿病患者出现舌质紫暗、舌边瘀点或瘀斑、舌下静脉怒张、面部瘀斑等血瘀症状,根据病理解剖,有70%糖尿病患者死于心血管性病变的各种并发症。主张用活血化瘀法治疗糖尿病及相关并发症,其善用降糖活血方(木香、当归、益母草、赤芍、川芎、葛根、丹参、苍术、元参、生地、生黄芪),并证实活血化瘀法可以改善糖尿病患者的微循环障碍^[7]。

临床之中,病情复杂,往往诸郁并见,如消渴后期,气郁日久,兼见湿郁、痰郁、热郁、食郁、血郁等,如消渴累及肾病,痰浊、瘀血、水湿诸邪并见,治疗上需从本出发,兼顾诸症。

4 结语

消渴发病逐年上升,越来越成为威胁人类身心健康的重要疾病,就中医而言,其气郁、湿郁、痰郁、热郁、食郁、血郁均可导致消渴,消渴又能产生湿、

痰、瘀、浊、毒等病理产物。师古法,结合现代临床实际情况,从郁论治消渴,辨证遣方施药,注意病人身心健康,以预防疾病,改善症状,防治并发症,提高病人生活质量,应当是值得进一步研究的。

参考文献:

- [1] 周仲瑛. 中医内科学[M]. 北京:中国中医药出版社,2003:427-433.
- [2] 张惠芬,迟家敏,王瑞萍. 实用糖尿病学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,2002:23,174-195,3,46-47.
- [3] 武国生,李彩平. 疏肝解郁治疗糖尿病的思路与方法[J]. 光明中医,2012,27(9):1867-2868.
- [4] 张晓燕. 早期糖尿病肾病的清热祛湿化瘀通络法治疗评价[J]. 中医临床研究,2013,5(2):65-66.
- [5] 尹建平. 王绪保辨治糖尿病周围神经病变经验介绍[J]. 中国中医药信息杂志,2013,20(2):92-93.
- [6] 严文有. 甘露饮临床应用举隅 [J]. 内蒙古中医药,2013(15):77-78.
- [7] 祝湛予. 降糖活血方治疗糖尿病 [J]. 北京中医,1989,1(4):3-4.

(编辑:徐建平)

Discussion on Treating Slake from Six Kinds of Stagnancy

WU Xi-xi, CHAI Ke-fu

(College of Basic Medical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: Diabetes is a common disease in clinical, the morbidity is rising in recent years Chinese traditional medicine treatment with unique diabetical thinking plays an important role in the treatment of diabetes. Because the social environmental lead to the rise of psychogenic diseases, stagnation syndrome often lead to kinds of diseases. Zhu Danxi divided stagnation syndrome into qi stagnancy, damp stagnancy, heat stagnancy, phlegm stagnancy, blood stagnancy, and food stagnancy. Analysis and discussion in this paper started from the role of Six Kinds of Stagnancy in diabetes, combined with ancient experts and modern traditional Chinese medicine practitioners, confirms that the treatment of slake based on stagnancy has specific effect in clinical. It may be beneficial for improving the clinical curative effect of diabetes in clinical.

KEY WORDS: slake; diabetes; six kinds of stagnancy; etiology and pathogenesis

(原文见第10页)

A Microcalorimetric Research on the Effect of Traditional Chinese Medicine on the Growth and Metabolism of E. coli

GAO Yu-shan, ZHENG Feng-jie, LI Xin, XU Hong, ZHANG Shu-jing, LI Yu-hang

(School of Preclinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the effect of berberis, aconite tuber, on the growth and metabolism of E. coli and to explore the feasibility of applying microcalorimetry to quantitative researches on the differences between coldness and heatiness of herbal medicine. **Methods** Microcalorimetric techniques were applied to evaluate thermal spectral profiling on the growth of E. coli at different concentrations of water decoction and analyze the thermodynamic parameters. **Results** This Chinese Medicines both significantly influenced the thermogenic effects of E. coli. A positive correlation is found between the concentration of the drug and thermogenic effects. compared with the control group, the enthalpy value of the berberis group was significantly reduced. Meanwhile the enthalpy value of the aconite tuber group was significantly higher than control group. The inhibiting effect to the E. coli showed a significant increase in aconite tuber group and a trend toward lower inhibiting effect in berberis group. **Conclusion** The microcalorimetric techniques can be applied in quantitative classification of Chinese herbal coldness and heatiness.

KEY WORDS: microcalorimetry; classified natures of Chinese herbs; berberis; aconite tuber; E. coli