

基于生物热力学的拳参对大肠埃希菌抑制作用

崔健^{1,2}, 赵奎君^{1*}

(1. 首都医科大学 附属北京友谊医院, 北京 100050; 2. 北京市大兴区人民医院, 北京 102600)

[摘要] 目的:测定不同产地、不同颜色拳参对大肠埃希菌生长代谢的影响,从生物热力学角度研究拳参对大肠埃希菌的抑制作用。方法:用微量热法测定18批拳参作用于大肠埃希菌生长代谢的热谱曲线,取得达峰时间(t_1, t_2),最大产热功率(P_{max1}, P_{max2}),生长速率常数(k_1, k_2),抑制率(I)4个主要参数。结果:河北、山东、安徽产拳参可延长大肠埃希菌第二指数生长期达峰时间(t_2),降低最大产热功率(P_{max2})及生长速率(k_2),湖北产拳参与其他产地样品趋势不同;各产地拳参对第一指数生长期的峰时间(t_1),降低最大产热功率(P_{max1})及生长速率(k_1)均无影响。不同产地拳参样品对大肠埃希菌抑制率不同(I),河北、山东、安徽产拳参抑制率在20%~50%,湖北拳参样品抑制率较低。同一批次不同颜色拳参样品抑制率有差异,9个批号样品中,7批棕红色饮片抑制率高于紫红色饮片。结论:不同产地棕红色及紫红色拳参对大肠埃希菌的生长代谢曲线均有不同程度的抑制作用,其差异原因有待进一步研究。

[关键词] 拳参;微量热法;抑菌活性;大肠埃希菌

[中图分类号] R284;R2-031;R282;R927.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)12-0057-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181232

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180327.1329.014.html>

[网络出版时间] 2018-03-27 14:44

Antibacterial Effect Evaluation of Bistortae Rhizoma Against *Escherichia coli* by Microcalorimetry

CUI Jian^{1,2}, ZHAO Kui-jun^{1*}

(1. Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China;
2. People's Hospital of Beijing Daxing District, Beijing 102600, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Bistortae Rhizoma from different production places and colors on growth metabolism of *Escherichia coli*, and investigate its inhibitory effect on *E. coli* from the standpoint of biological thermodynamics. **Method:** The thermal spectrum curve reflecting the growth and metabolism of *E. coli* affected by 18 batches of Bistortae Rhizoma was determined by using microcalorimetry. Then the quantitative thermokinetic parameters, such as peak time (t_1, t_2), maximum heat-output (P_{max1}, P_{max2}), growth rate constant (k_1, k_2), and inhibition rate (I) obtained from these curves were analyzed. **Result:** Bistortae Rhizoma from Hebei, Shandong and Anhui could prolong the peak time of *E. coli* in the second growth exponential period (t_2), and reduce the maximum thermal power (P_{max2}) and growth rate (k_2), different from the samples from Hubei. All samples from four production places had no influence on the parameters (t_1, P_{max1} , and k_1) in first growth exponential period. Bistortae Rhizoma from different production places showed different I values on *E. coli*, between 20% -50% for the samples from Hebei, Shandong and Anhui, while the I value was lower for the samples from Hubei. The Bistortae Rhizoma samples from the same batch but with different colors also showed difference in inhibitory rate. A total of 7 batches of brownish red Bistortae Rhizoma showed higher inhibition rate (I) than its

[收稿日期] 20180129(016)

[第一作者] 崔健,主管中药师,硕士,研从事临床中药学研究,E-mail:cuijian64@139.com

[通信作者] *赵奎君,主任药师,硕士生导师,从事临床中药学研究,E-mail:13910977822@139.com

prunosus ones in all 9 batches. **Conclusion:** The Bistortae Rhizoma from different places and colors have different degrees of inhibitory effect on the growth and metabolism of *E. coli*, and the factors leading to the difference still need further study.

[**Key words**] Bistortae Rhizoma; microcalorimetry; antibacterial; *Escherichia coli*

拳参载于《本草图经》，味苦涩，性凉，为蓼科植物拳参的干燥根茎，具有清热解毒、消肿散结、凉血消痈等功效，主治痈疽疮毒、癭瘤瘰疬、湿热泄痢、痔瘡出血、蛇虫咬伤^[1-2]。现代研究表明，拳参具有抗炎、镇痛及免疫增强等作用，多用于金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、大肠埃希菌等细菌，具有较好的抑菌效果^[3-4]。2015 年版《中国药典》一部中规定，拳参断面颜色为浅棕红色或棕红色（以下简称棕红色）^[5]，但临床应用中常见断面为浅紫红色至紫红色的拳参饮片（以下简称紫红色）。已有研究表明两种颜色拳参饮片中的化学成分含量有一定差异^[1]，但其抑菌性能是否有差异尚未有相关研究。微量热法（microcalorimetry）是一种基于生物热力学表达的生物活性检测方法，该方法可以精确检测并记录生物体生长代谢过程中所伴随的能量和产热的变化^[6]。当药物作用于细菌时，实时记录的生物热动力学热谱图可精确反应药物影响细菌体代谢过程中与热变化相关的各项参数，达到对该药物的抑菌强度进行定性和定量分析的目的，尤适于对抑菌类药物研究。本研究选取微量热模式菌大肠埃希菌为考察对象，采用微量热动力学方法，考察不同产地两种颜色共 18 个批次的拳参饮片对大肠埃希菌生长繁殖过程中各项指标的影响，对比两种颜色拳参饮片的抑菌效果，为紫红色拳参饮片的临床使用依据提供参考。

1 材料

2277 型 TAM III 多通道微量热仪（瑞典 Thermometric AB 公司）；YXQ LS-B 型全自动立式电热蒸气灭菌器（上海降拓仪器设备有限公司）；BS210S 型 1/1 万电子分析天平（北京 Sartorius 有限公司）。

大肠埃希菌菌株（*Escherichia coli*，解放军第三〇二医院临床医学检验中心提供，批号 ATCC 25922）自行传代于第四代，4℃ 冰箱保存备用。

实验用拳参饮片经首都医科大学附属北京友谊医院赵奎君主任药师鉴定，均为蓼科植物拳参 *Polygonum bistorta* 的干燥根茎，产地见表 1。

表 1 18 批拳参饮片样品产地及批号

Table 1 Habitats and lot numbers of Bistortae Rhizoma prepared slides from different batches

No.	产地	批号	颜色	No.	产地	批号	颜色
1	河北	13041403	紫红色	10	山东	1407004	棕红色
2	河北	13041403	棕红色	11	山东	311051	紫红色
3	河北	13071702	紫红色	12	山东	311051	棕红色
4	河北	13071702	棕红色	13	安徽	1407079	紫红色
5	河北	14061601	紫红色	14	安徽	1407079	棕红色
6	河北	14061601	棕红色	15	湖北	109813101	紫红色
7	山东	1401009	紫红色	16	湖北	109813101	棕红色
8	山东	1401009	棕红色	17	湖北	109814101	紫红色
9	山东	1407004	紫红色	18	湖北	109814101	棕红色

2 方法

2.1 培养基的制备 LB 培养基：取蛋白胨 10 g，酵母膏 5 g 和 NaCl 5 g，溶于 1 000 mL 蒸馏水中，调节 pH 为 7.0 后分装，121℃，0.1 MPa 高压蒸气灭菌 20 min，存放于 4℃ 冰箱中备用。

2.2 药材提取液的制备 将各批次拳参饮片分别粉碎后过 4 号筛，放入 500 mL 回流瓶中，加入蒸馏水 100 mL，回流提取 1 h；倒出提取液后再次加入蒸馏水 60 mL，回流提取 0.5 h，合并提取液，抽滤后转移入蒸发皿中，水浴锅上 100℃ 挥发 12 h 后进行冷冻干燥，得到不同批次拳参提取物粉末。精密称取各批次提取物粉末，分别溶于 LB 培养基，配置成质量浓度为 10 g·L⁻¹ 的药材提取液，过 0.22 μm 除菌滤膜，密封后冷藏备用。

2.3 实验方法 采用安瓿法^[7]。无菌环境下，除溶剂空白组外，每个安瓿瓶精确加入接种量为 1 × 10⁵ 个/mL 的大肠埃希菌混悬液 9 mL，实验对照组加入 LB 培养 1 mL，其他实验组分别加入（10 g·L⁻¹）药材提取液 1 mL，溶剂空白组加入 LB 培养基 10 mL，混匀后加盖瓶塞，密封后放入微量热仪中。在 37℃ 下跟踪记录细菌生长代谢热谱曲线，当曲线回到基线后，结束实验。相同的条件下，重复实验 3 次，结果显示该方法具有良好重现性。

2.4 实验参数的计算 正常大肠埃希菌生长代谢过程可分为 4 个时期，第一指数生长期（a-b），静滞

期(b-c),第二指数生长期(c-d),衰亡期(d-e)。以时间为横坐标,功率为纵坐标作图,得到 $P-t$ 曲线,可反映出细菌生长代谢过程中的各项动力学参数,第一指数生长期最大产热功率 P_{max1} ,达峰时间 t_1 ,生长速率常数 k_1 及第二指数生长期最大产热功率 P_{max2} ,达峰时间 t_2 ,生长速率常数 k_2 。见图 1。

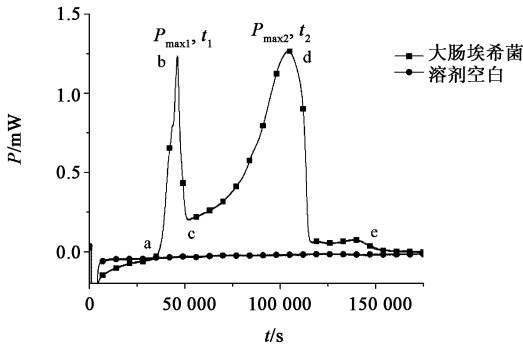


图 1 大肠埃希菌生长代谢热谱曲线

Fig.1 Thermogenic curves of *Escherichia coli* growth

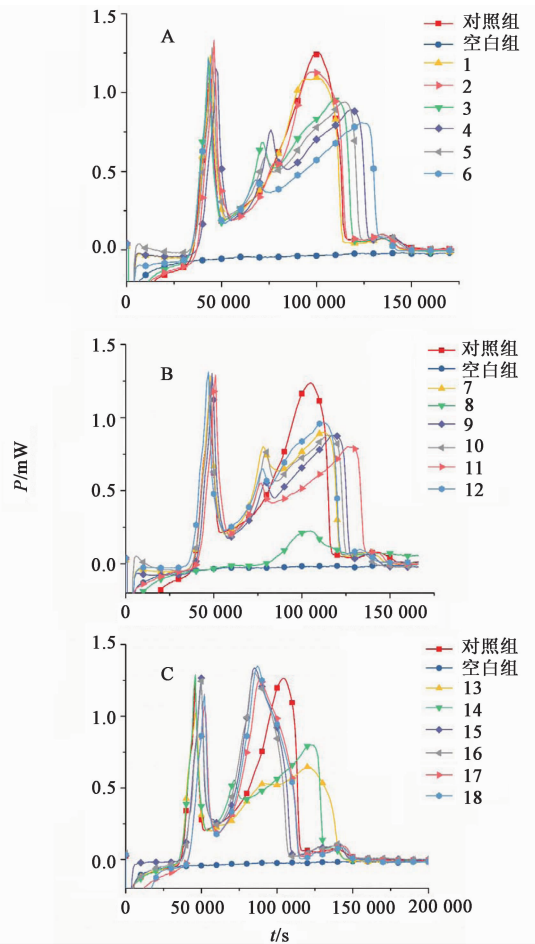
3 结果

3.1 大肠埃希菌生长代谢热谱曲线 在 37 °C 下,采用安瓿法测定并追踪记录了大肠埃希菌生长代谢热谱曲线及其在不同批次拳参提取物作用下的生长代谢热谱曲线,见图 2。

如图 2A 所示,与对照组相比,给药组 1,2 号样品大肠埃希菌在第二指数生长期的最大产热功率 P_{max2} 降低,3~6 号样品除 P_{max2} 降低外,达峰时间 t_2 推迟,但对第一指数生长期最大产热功率 P_{max1} 及达峰时间 t_1 均无显著作用,初步说明河北产各批次棕红色及紫红色拳参样品均能部分抑制大肠埃希菌的生长;其中同一批号的 1,2 号作用类似,但抑菌效果均弱于 3~6 号,3~6 号样品中细菌产热依次减少,说明抑菌作用依次增强;其中每批样品棕红色饮片抑菌效果略强于紫红色饮片。

如图 2B 所示,山东产各批次棕红色及紫红色拳参样品均能部分抑制大肠埃希菌的生长。与实验对照组相比,给药组 7~12 号样品大肠埃希菌 P_{max1} , t_1 不变, P_{max2} 显著降低, t_2 延后,其效果以 8 号最为明显。相同批号中,除 7,8 号外,另两批拳参样品中紫红色抑菌效果略强于棕红色饮片。

如图 2C 所示,安徽、湖北两产地拳参样品对大肠埃希菌产热的影响差异较大。安徽产 13,14 号样品中大肠埃希菌 P_{max2} , t_2 均显著降低;湖北产 15~18 号样品中, P_{max2} , t_2 有一定程度上升,原因尚不明确,两产地样品 P_{max1} , t_1 均不变;不同颜色饮片抑菌能力未见显著差异。



A. 1~6 号(河北);B. 7~12 号(山东);C. 13,14 号(安徽)及 15~18 号(湖北)

图 2 大肠埃希菌在不同批次拳参提取物样品作用下的生长代谢热谱曲线

Fig.2 Thermogenic curves of *Escherichia coli* growth affected by *Bistortae Rhizoma* from different batches

综合比较可发现,不同产地不同颜色样品对大肠埃希菌第一指数增长期的热力学参数 P_{max1} , k_1 , t_1 均无影响,说明拳参对大肠埃希菌主要作用于第二指数增长期。河北、山东、安徽三产地样品生物热力学图谱较相似,对大肠埃希菌具有相同的作用趋势;湖北产拳参样品与其他产地样品生物热力学参数影响差异较大。

3.2 大肠埃希菌生长速率常数 大肠埃希菌在生长过程中,根据其产热功率-时间 ($P-t$) 曲线出现 2 个生长期,此过程中产热功率 (P) 与时间 (t) 之间符合公式 $P_t = P_0 \exp(kt)$ 或 $\ln P_t = P_0 + kt$,其中 P_0 , P_t 分别是细菌在指数生长期的起始点和 t 时的产热功率^[7-10]。将生物热谱图上指数生长期的 P_t 对 t 进行线性拟合,可分别得出大肠埃希菌第一、第二指数生长期的生长速率常数 k_1 , k_2 。同时以 k 为依据,进行

抑制率 I 的计算 $I = (k_i - k_2) / k_i \times 100\%$, 式中 k_2 为对照组大肠埃希菌的生长速率常数, k_i 为药物作用下第二指数增长期大肠埃希菌生长速率常数。

如表 2 所示, 河北、山东、安徽三产地样品 (1 ~ 14 号) 对大肠埃希菌第一指数期生长期生长速率常数 k_1 的影响未见明显区别, 对 k_2 均有一定程度抑制

作用。湖北产拳参样品对 k_1 无影响, 但对 k_2 有促进作用, 且使二次达峰时间 t_2 缩短。但相同产地不同颜色样品间未见明显区别。不同产地拳参样品对大肠埃希菌抑制率不同 (I), 河北、山东、安徽产拳参抑制率在 20% ~ 50%, 河北产拳参对大肠埃希菌具有较强抑制率, 抑制效果优于山东、安徽、湖北产样品。

表 2 不同批次拳参提取物作用于大肠埃希菌的热动力学参数 ($T = 37\text{ }^\circ\text{C}$, $n = 3$)

Table 2 Thermokinetic parameters of escherichia coli growth affected by Bistortae Rhizoma in different batches ($T = 37\text{ }^\circ\text{C}$, $n = 3$)

样品编号	t_1/s	$P_{\max 1}/\text{mW}$	$k_1/10^{-5}$	t_2/s	$P_{\max 2}/\text{mW}$	$k_2/10^{-5}$	$I/\%$
1	42 613	1. 236 1	8. 750 0	99 705	1. 146 6	5. 666 7	36. 87
2	43 987	1. 322 2	8. 500 0	100 236	1. 153 1	5. 750 0	35. 95
3	41 239	1. 231 5	8. 416 7	116 976	0. 940 1	5. 000 0	44. 30
4	45 689	1. 199 8	8. 416 7	120 489	0. 870 7	4. 916 7	45. 23
5	43 019	1. 284 0	8. 500 0	118 281	0. 891 6	4. 833 3	46. 16
6	43 501	1. 231 0	8. 666 7	124 892	0. 827 7	5. 083 3	43. 37
7	47 891	1. 284 8	8. 416 7	112 955	0. 886 1	6. 750 0	24. 81
8	0	0	0. 000 0	103 876	0. 223 5	7. 166 7	20. 17
9	49 285	1. 321 1	8. 583 3	118 801	0. 884 0	7. 000 0	22. 02
10	48 194	1. 248 8	8. 333 3	115 902	0. 876 8	6. 416 7	28. 52
11	50 625	1. 282 4	8. 416 7	130 811	0. 799 2	6. 500 0	27. 59
12	46 627	1. 358 4	8. 416 7	112 813	0. 972 1	7. 250 0	19. 24
13	45 879	1. 021 6	8. 666 7	121 984	0. 648 0	5. 750 0	35. 95
14	45 023	1. 289 4	8. 833 3	122 889	0. 797 3	6. 916 7	22. 95
15	49 753	1. 264 5	8. 916 7	85 094	1. 337 8	9. 333 3	-3. 97
16	49 696	1. 264 1	8. 666 7	84 776	1. 334 2	9. 250 0	-3. 04
17	51 953	1. 064 5	8. 250 0	88 994	1. 250 8	9. 000 0	-0. 26
18	51 712	1. 152 0	8. 583 3	87 006	1. 349 7	9. 333 3	-3. 97

4 讨论

微量热法能在细胞水平较为客观地反映生物生长代谢的整体能量变化和热效应。生物的生长过程中均伴随着能量转移和热量变化, 通过采集生物生长各个时期的热量释放量, 可形成独特的生物热力学图谱, 获得丰富的热力学参数^[9]。在药物影响下, 细菌生长过程中的能量变化被改变, 通过仪器可采集得到新的热力学图谱。与原有图谱的比对分析后, 研究者可得到药物对生物体生长代谢过程中热力表征的作用。与传统化学成分含量测定相比, 微量热法直接作用于细胞, 在生物层面更加直观地反映药效; 与药理研究相比微量热法具有实时、高效、经济、普适性好的特点, 是一种介于化学成分指征与临床药效之间的方法。已有相关报道表明该方法在黄连^[10]、板蓝根^[11]、人工麝香^[12]、黄芩^[13]的研究中

也有应用。

本研究以临床用药过程中对常用饮片的表征观察为切入点, 利用生物热力学方法检测不同产地、不同颜色拳参对大肠埃希菌的抑制作用, 并通过热力学图谱, 计算得到生长速率常数、最大产热功率等一系列反映大肠埃希菌生长变化的动力学参数, 从细胞水平上对拳参的抑菌作用进行了定量研究和分析。课题组前期已对不同颜色拳参饮片进行指纹图谱比对及主要成分的聚类分析^[2, 14], 结果显示不同颜色拳参饮片中主要成分基本一致, 但不同成分间含量有较大差异^[2]。本研究中, 河北、山东、安徽产拳参样品中大肠埃希菌第二指数生长期最大产热功率明显降低, 达峰时间延后, 显示出对大肠埃希菌具有一定抑制作用, 但不同产地、不同批次之间具有一定差异; 湖北产拳参对大肠埃希菌的作用于其他产

地不同,其机制有待进一步研究。同一产地同一批号棕红与紫红色样品对大肠埃希菌作用相近,初步反映紫红色拳参饮片对大肠埃希菌亦有较好抑制作用。

综上所述,棕红色与紫红色拳参饮片均有一定抑菌作用,其抑菌效果未见显著性差异,为临床中药饮片的合理使用提供支持。

[参考文献]

[1] 董捷鸣,崔健,赵小梅,等. 2种颜色拳参饮片 HPLC-MS 指纹图谱比较研究[J]. 药物分析杂志,2017,37(8):1503-1508.

[2] 吴璐璐,许剑锋,赵勇. 拳参乙醇提取物和水提取物体外抗菌和抗氧化活性[J]. 江苏农业科学,2013,41(5):246-249.

[3] 张齐雄,曹蓓. 中药拳参生物活性研究进展[J]. 亚太传统医药,2012,8(7):195-196.

[4] 刘春棋,王小丽,曾靖. 拳参提取物抑菌活性的初步研究[J]. 赣南医学院学报,2006(4):489-490.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:288-289.

[6] 代春美,彭成,王伽伯,等. 微量热法对小檗碱类生物碱抑菌作用的量效关系研究[J]. 中草药,2010,41(7):1136-1139.

[7] KONG W J, WANG J B, JIN C, et al. Effect of emodin on *Candida albicans* growth investigated by

microcalorimetry combined with chemometric analysis [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 83 (6): 1183-1190.

[8] ZHAO Y L, WANG J B, ZHANG P, et al. Microcalorimetric study of the opposing effects of ginsenosides Rg₁ and Rb₁ on the growth of mice splenic lymphocytes [J]. J Therm Anal Calorim, 2011, 104(1): 357-363.

[9] 唐慧英,鄢丹,张清哲,等. 微量热法研究鹿茸4个活性部位对肠道特征菌群生长代谢的影响[J]. 物理化学学报,2010,26(5):1442-1447.

[10] 代春美,王伽伯,孔维军,等. 微量热法研究黄连及其主要组分配伍的抑菌作用[J]. 化学学报,2010,68(10):936-940.

[11] 赵艳玲,王伽伯,肖小河. 微量热法研究板蓝根的生物热力学特征[J]. 中草药,2007,38(2):193-196.

[12] 罗云,金城,周健,等. 基于微量热法和化学计量学的人工麝香抗金黄色葡萄球菌作用研究[J]. 中国药学杂志,2011,46(17):1312-1316.

[13] 曾燕,郭兰萍,王继永,等. 基于微量热法不同来源黄芩抑菌活性对比研究[J]. 中国现代中药,2017,19(9):1262-1269.

[14] 张萍,朱尘琪,晁冲,等. HPLC法测定2种不同颜色拳参饮片中绿原酸及没食子酸含量[J]. 药物分析杂志,2014,34(7):1305-1309.

[责任编辑 顾雪竹]