

- 免疫调节作用[J]. 中国中药杂志, 1989, 14(2): 46-48.
- [4] 毛小娟, 王军志, 王凤蕴. 红芪多糖和黄芪多糖的免疫调节作用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1988, 8: 365-367.
- [5] 赵克胜, 丁丽轩, 孔海燕, 等. 黄芪多糖增强人外周血单个和细胞产生肿瘤坏死因子的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1993, 13(5): 263-264.
- [6] 耿长山. 黄芪多糖对去胸腺小鼠促进抗体产生机理的探讨[J]. 上海免疫学杂志, 1985, 5(2): 69-70.
- [7] 曲章义, 赵育莹, 刘惠雯, 等. 细胞因子[M]. 哈尔滨: 黑龙江科技出版社, 1998.

## 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

余惠旻<sup>2</sup>, 肖小河<sup>1</sup>, 刘塔斯<sup>2</sup>, 赵艳玲<sup>1</sup>, 袁海龙<sup>1</sup>, 谭安民<sup>3</sup>, 高晓山<sup>4</sup>

(1. 解放军 302 医院 药学部, 北京 100039; 2. 湖南中医学院药学院, 湖南 长沙 410007; 3. 北京医科大学 天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100083; 4. 中国中医研究院中药研究所, 北京 100700)

**摘要:** 目的 从生物物理化学的角度, 阐明中药四性(寒、热、温、凉)的客观真实性。方法 利用微量量热法, 测定了大肠杆菌在不同条件下的生长热谱曲线, 得到了相应的生物热动力学参数如生长速率常数( $K$ )、抑制率( $I$ )、半抑制率( $IC_{50}$ )、热焓( $\Delta H$ )。根据生物热动力学通用数值, 结合本草文献报道, 综合分析了参叶和参花药性的差异所在。结果 参叶和参花抑制细菌生长的热谱曲线, 其形状基本相同, 随着药物浓度的加大, 代谢过程的停滞期延长, 生长代谢峰后移; 其热力学参数热焓( $\Delta H$ )存在较稳定的差异——参叶降低了细菌生长代谢过程中热量的释放, 而参花增加了细菌生长代谢过程中热量的释放。结论 微量量热法可作为刻划中药药性的一个新的有效手段, 亦可作为中药活性筛选的新工具。

**关键词:** 中药四性; 微量量热法; 参叶; 参花; 热焓

中图分类号: R285.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)10-0910-04

### Biothermodynamic study on four therapeutic features of TCM

#### II Comparison of therapeutic features of *Folium ginseng* and *Flos ginseng* by microcalorimetry

YU Hui-min<sup>2</sup>, XIAO Xiao-he<sup>1</sup>, LIU Ta-si<sup>2</sup>, ZHAO Yan-ling<sup>1</sup>,  
YUAN Hai-long<sup>1</sup>, TAN An-min<sup>3</sup>, GAO Xiao-shan<sup>4</sup>

(1. Department of Pharmacy, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China; 2. College of Pharmacy, Hunan University of TCM, Changsha Hunan 410007; 3. National Research Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Beijing University of Medical Sciences, Beijing 100083, China; 4. Institute of Chinese Materia Medica, Chinese Academy of TCM, Beijing 100700, China)

**Abstract Object** To demonstrate the naked truth of four therapeutic features of TCM (cold, hot, warm and cool) from biophysical and biochemical point of view. **Methods** Growth thermogenesis curves of *Escherichia coli* were determined under different conditions by microcalorimetry to give biothermodynamic parameters, such as multiplication constant ( $k$ ), median inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ), and enthalpy ( $\Delta H$ ). Differences between folia ginseng and flos ginseng were comprehensively compared with reference to classical Chinese literatures on material medica. **Results** The bacteriostatic curve of both drugs were basically similar. With increasing concentration of decoctions of both drugs, the lag phase was delayed and the peaks shifted to the right. While the difference of  $\Delta H$  was stable, which decreases with the increasing concentration of *Folium ginseng*, but increases with increasing concentration of *Flos ginseng*. **Conclusion** Microcalorimetry is not only a new effective method to describe the therapeutic features of TCM, but also could be used as a tool for the screening of active TCM.

**Key words** four therapeutic features of TCM; microcalorimetry; *Folium ginseng*, *Flos ginseng*, enthalpy ( $\Delta H$ )

收稿日期: 2001-04-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970911)

作者简介: 余惠旻 (1972-), 男, 新疆省乌鲁木齐市人, 1994年毕业于新疆医学院中药专业; 1999年 至今于湖南中医学院及解放军 302 医院攻读硕士学位。

中药四性即寒、热、温、凉四种功能之气,是中医药最重要的基本理论之一,是中医赖以处方遣药的主要依据。中药的四性一直是中医药理论研究的难点,至今尚未有成熟的经验可循。我们认为,寒、热、温、凉是中药药性功能的高度概括,在某种程度上亦是物质热物理、热化学、热生物属性的重要反映。微量量热法是生物物理化学研究领域近年来发展起来的新技术,主要用来研究生命体系的热力学过程以及化学反应的微量热量变化的生物热力学效应。根据生命体生长、繁殖,伴随代谢有热量释放,释放热量随生长期的变化关系就是热谱图。由热谱图可监测生命体的生长情况和能量代谢,且此热谱图具有良好的重现性和明显的特征性。微量量热法为我们研究中药四性提供了新的方法和思路<sup>[1]</sup>。目前国内外将此方法用于生物组织细胞的代谢及热化学反应的报道较多<sup>[2,3]</sup>,但用微量量热法进行中药四性的研究,在国内外还属首次。

人参 *Panax ginseng* C. A. Mey 是一名贵中药,研究证明,人参皂苷为人参的主要有效成分之一,它具有人参根的主要生理活性,人参的茎、叶、花、果均含有与人参根类似的皂苷成分,且含量高于根,已作为人参皂苷提取的主要原料,而且逐渐被用于中医药临床,祖国传统医学认为:药物治疗,藉药物性气的偏,调治人身之气的偏盛偏衰,使复归于平和<sup>[4]</sup>,因此探讨和确定人参地上部分的药性,对于更好地指导临床用药,提高人参原植物的生物利用度,扩大人参药用资源,开发新的人参制品等,具有现实的意义。

为了凸现中药四性的生物热化学特性,避免因中药来源、功效、化学成分、药理作用的“背景”差异,我们选取功效、化学成分、药理作用相近甚至相同的参叶 (*Folium Ginseng*) 和参花 (*Flos Ginseng*) 作为研究对象,用 LBK2277 微量量热计测定了 37℃ 条件下大肠杆菌 *E. coli* (ACTT 25922) 标准及加药条件下的热谱图,通过对参叶、参花影响大肠杆菌 *E. coli* 代谢产热的分析,初步阐述了中药四性的热生物学实质。

## 1 材料

1.1 仪器:瑞典生产的 LBK2277 热活性检测仪 (Thermal Activity Monitor),其热稳定性好。工作温度 10℃~80℃,控温精度  $\pm 2 \times 10^{-4}$ ℃,热功率最小检测极限 0.15 μW。该仪器的主要检测原理是:样品产生的热量,经过热点检测器流到散热片再传给水浴,在热检测器产生的温差以相应的电压信

号输出,它正比于热功率输出,并由自动记录仪描绘在记录纸上。

1.2 菌种:大肠杆菌 (*E. coli* ACTT 25922),由解放军 302 医院检验科提供。

1.3 中药水煎液:参叶、参花均购自吉林国营参场。取药材各 50 g,用 6 倍水浸泡 15~30 min,取药液,药渣再加 6 倍水,煮 30 min,合并两次煎液,抽滤并浓缩定容至 100 mL,灌封,121℃ 高压蒸气灭菌 30 min 处理,放入冰箱冷藏。

1.4 培养基:牛肉膏汤液体培养基。成分:蛋白胨 2 g,氯化钠 1 g,牛肉浸膏 1 g,蒸馏水 200 mL,用氢氧化钠平衡溶液调 pH 至 7.4~7.6,121℃ 高压蒸气灭菌 30 min 备用。

1.5 实验方法:本实验采用安瓿法。对照组:在 3 mL 玻璃安瓿中加入浓度为  $10^8$  cells/mL 的 *E. coli* 菌液作为测试瓶,参比瓶中加入 1 mL 无菌培养基。实验组:在 3 mL 安瓿中加入 *E. coli* 菌液和中药水煎液共 1 mL 作为测试瓶,使细菌终浓度为  $10^8$  cells/mL,中药水煎液分别为:参叶 (g/mL) 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20; 参花 (g/mL) 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20。参比瓶中加入 1 mL 无菌培养基,加盖密封好以后,先由安瓿升降把将安瓿放在预热位置停放一段时间,以使安瓿温度稳定,在安瓿温度与水浴温度达平衡后,再把样品放进测量杯里进行检测,参比物也和样品一样,同时进行,同样处理。

## 2 实验结果

2.1 生长产热曲线:首先测定了 37℃ (310 K) 条件下大肠杆菌 *E. coli* 正常的热功率-时间曲线,接着又测定了在同样培养基中不同浓度不同中药作用下的 *E. coli* 生长的热功率-时间曲线 (图 1, 2)。

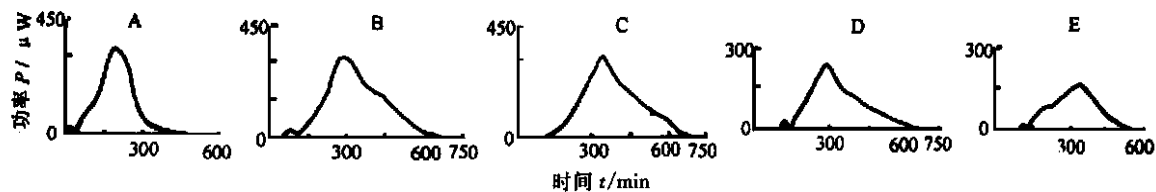
2.2 生长速率常数:细菌的生长、繁殖是与热效应紧密联系在一起,因此可以从热效应的大小来衡量细菌数量的多少,在指数生长期,细菌的数量按指数规律增加,其数学表达式为<sup>[5]</sup>:

$$n = n_0 e^{k(t-t_0)} \quad (1)$$

式中:  $n_0$  是  $t_0$  时细菌的数量;  $n$  是  $t$  时细菌的数量;  $k$  为细菌在指数生长的生长速率常数。其总发热量也应按指数规律增加,并将之归纳为:

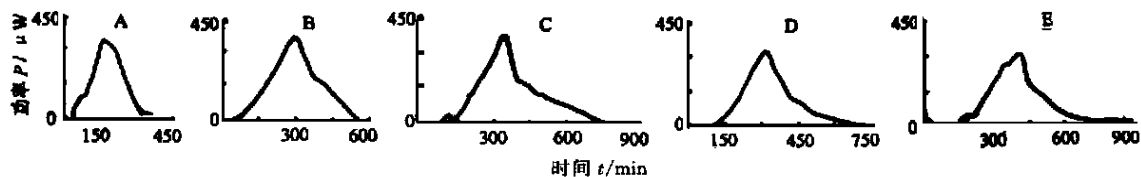
$$P_t = P_0 e^{k(t-t_0)} \quad \text{或} \quad \ln P_t = \ln P_0 + k(t-t_0) \quad (2)$$

其中:  $P_0$  是  $t_0$  时所测的热功率;  $P_t$  是  $t$  时所测的热功率;  $k$  是细菌在指数生长期的生长速率常数,它的大小实际上代表了细菌在指定条件下生长代谢速率的快慢。通过计算机拟合,使得  $\ln P_t$  线性方程,



A-0 g/mL B-0.05 g/mL C-0.100 g/mL D-0.150 g/mL E-0.200 g/mL

图 1 310K时大肠杆菌在不同浓度参叶抑制作用下生长的热功率-时间曲线



A-0 g/mL B-0.050 g/mL C-0.100 g/mL D-0.150 g/mL E-0.200 g/mL

图 2 310K时大肠杆菌在不同浓度参花抑制作用下生长的热功率-时间曲线

其斜率为生长速率常数  $k$ ,其数据见表 1

表 1 37℃ 大肠杆菌在不同中药抑制下的各种参数

| 中药 | 浓度<br>(g/mL) | $k$<br>( $\text{min}^{-1}$ ) | $\Delta H$<br>(J) | $I$<br>(%) | $\text{IC}_{50}$<br>(g/mL) | 相关系数<br>( $r$ ) |
|----|--------------|------------------------------|-------------------|------------|----------------------------|-----------------|
| 参叶 | 0            | 0.015                        | 4.392             |            |                            | 0.991           |
|    | 0.050        | 0.014                        | 4.046             | 9.21       |                            | 0.997           |
|    | 0.100        | 0.011                        | 3.733             | 26.97      |                            | 0.990           |
|    | 0.150        | 0.008                        | 3.004             | 44.08      | 0.046                      | 0.996           |
|    | 0.200        | 0.004                        | 2.805             | 73.68      |                            | 0.998           |
| 参花 | 0            | 0.015                        | 4.112             |            |                            | 0.991           |
|    | 0.050        | 0.015                        | 5.775             | 3.25       |                            | 0.994           |
|    | 0.100        | 0.012                        | 7.268             | 19.48      | 0.275                      | 0.994           |
|    | 0.150        | 0.011                        | 7.308             | 27.92      |                            | 0.993           |
|    | 0.200        | 0.009                        | 7.334             | 38.96      |                            | 0.996           |

由表 1中数据可画出  $k$ - $C$  关系曲线(图 3,4)根据图 3,4拟合出  $k$ - $C$  关系式 令  $k$  为零,可求得细菌生长速率常数为零即生长代谢停止时所需的药物浓度称最小抑菌浓度。

### 2.3 抑制率和半抑制率<sup>[7]</sup>

定义:生长抑制率为:

$$I(\%) = (k_2 - k_1) / k_1$$

式中:  $k_1$ 为对照组的生长速率常数,  $k_2$ 为 *E. Coli* 受到抑制时的生长速率常数 以  $I$  (生长抑制

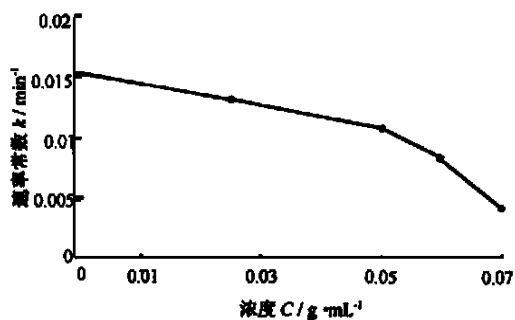


图 3 生长速率常数 ( $k$ )与参叶浓度 ( $C$ )的关系

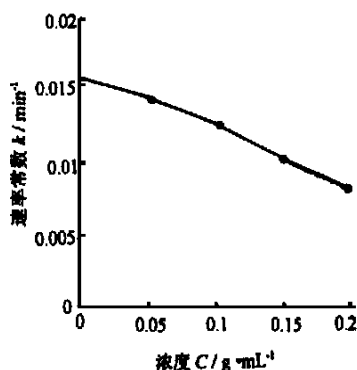


图 4 生长速率常数 ( $k$ )与参花浓度 ( $C$ )的关系

率)对浓度  $C$  作图得到  $I\%$ - $C$  关系(图 5)。根据图 5,求得  $\text{IC}_{50}$ (抑制率为 50% 时药物的浓度)(表 1)。 $\text{IC}_{50}$ 可用于衡量细菌对药物的敏感性,  $\text{IC}_{50}$ 越小,表明细菌对药物越敏感,药物的抑制作用越大。

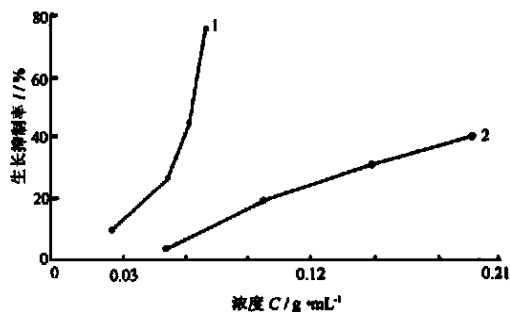


图 5 浓度 ( $C$ )与生长抑制率 ( $I$ )的关系

2.4 热焓:仪器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( $\Delta H$ )成正比(表 1)。因此,热焓实际上代表了细菌总的代谢热。

### 3 讨论

3.1 从图 1,2可以直观地看出,同一细菌在不同浓

度药物抑制下代谢过程的热谱图其形状基本相同,但随着加入药物浓度的增加,其生长代谢过程的停滞期延长,生长代谢峰向后移,且指数生长期的斜率不同。

3.2 从表 1 中的  $k$  值可以说明随着中药药液浓度的增加,细菌生长受抑制的作用越大,从而可以定性地刻划药液抗菌作用的程度;从图 3、4 可以得出参叶的最小抑菌浓度为 0.114 g/mL,参花为 0.500 g/mL,从而可以定量地刻划中药抑菌作用的大小;从表 1 中  $I$  值以及图 5 可以得出参叶的半抑制率为 0.046 g/mL,参花为 0.275 g/mL,半抑制率的大小反映了中药抑菌作用的差别。参叶和参花的  $k$  值,  $I\%$ ,  $IC_{50}$  的综合分析说明人参的不同药用部位参叶和参花,其药效存在着差异,参叶在浓度很低时就表现出很强的抑菌作用,而参花的抑菌作用相对较弱,药效的强弱从一个侧面反映了药性的差异。

3.3 从图 1、2 中可见,在不同的药液浓度下,细菌代谢过程的热功率-时间曲线与基线构成的面积发生了变化,这种变化呈现出一定的规律性。在图 1 中,随着参叶浓度的增大,其热功率-时间曲线下的面积 ( $\Delta H$ ) 呈逐渐减小的趋势;在图 2 中,随着参花浓度的增大,其热功率-时间曲线下的面积 ( $\Delta H$ ) 呈逐渐增大的趋势 (表 1)。也就是说:参叶能降低细菌生长代谢的产热量,参花能增加细菌生长代谢的产

热量,  $\Delta H$  的大小体现了参叶和参花的药性差异,与传统文献中所记载的“……参叶大苦大寒,损气败血,……”,“补中带表,大能生胃津,去暑气,将虚火……”的提法基本相符<sup>[8]</sup>,可见细菌生长代谢的产热量 ( $\Delta H$ ) 可作为中药四性研究的一个重要指标。

3.4 中药四性的微量热法研究是我们在中医药传统理论的指导下,结合生物热力学的先进技术所做的有益的尝试,研究证明:该方法科学可行,突破了传统四性研究中思想和方法的局限性,是定性定量刻划中药四性的有效手段,还可作为中草药活性筛选的新工具。

参考文献:

- [1] 肖培根,肖小河. 21 世纪与中药现代化 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25(2): 67-70.
- [2] Tan A M, Xu B, Hang S Q, *et al.* Thermochemical study on the growth metabolism of human promyelocytic leukemia HL-60 cells inhibited by water-soluble metalloporphyrins [J]. *Thermochimica Acta*, 1999, 333: 99-102.
- [3] Wadso L. Microcalorimetric technique for characterization of living cellular systems. Will there be any important practical application? [J]. *Thermochimica Acta*, 1995, 269-270: 337-350.
- [4] 高晓山. 中药药性论 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1992.
- [5] Xie C L, Tang H, Song Z, *et al.* Microcalorimetric study of bacterial growth [J]. *Thermochimica Acta*, 1988, 123: 33-36.
- [6] 冯英,刘义,屈松生,等. D-氨基葡萄糖 Schiff 碱及金属配合物的抗菌活性 [J]. 物理化学学报, 1996, 12(8): 756-759.
- [7] 陈藏器. 本草纲目拾遗. 卷三. 参叶 [M]. 唐开元二十七年.

## 昆明山海棠诱导 HL-60 细胞凋亡的初步研究

敖琳,曹佳,孙华明,杨录军,刘胜学,周紫垣

(第三军医大学 分子毒理实验室,重庆 400038)

**摘要:**目的 探讨中药昆明山海棠 (THH) 诱导急性白血病细胞凋亡的规律及发生机制。方法 应用染料排除法、活细胞荧光染色、DNA 电泳、流式细胞仪、斑点杂交、原位杂交和荧光  $Ca^{2+}$  指示剂进行检测和观察。结果 HL-60 细胞在 THH 作用下出现典型的细胞凋亡特征,包括细胞形态改变、DNA 梯状带以及亚  $G_0$  峰,并且存在明显的量效和时效关系。进一步研究表明, Bcl-2 基因在凋亡过程中的表达持续下调,细胞内游离  $Ca^{2+}$  浓度未发生明显变化。结论 THH 有较强的诱导白血病 HL-60 细胞凋亡的能力,其作用机制与下调 Bcl-2 基因表达有关。

**关键词:** 昆明山海棠;细胞凋亡; HL-60 细胞

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2001)10-0913-04

## Preliminary studies on apoptosis of HL-60 cells induced by *Tripterygium hypoglaucum*

AO Lin, CAO Jia, SUN Hua-ming, YANG Lu-jun, LIU Sheng-xue, ZHO U Zi-huan

(Laboratory of Molecular Toxicology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Key words** *Tripterygium hypoglaucum* (Lévl.) Lévl. ex Hutch.; apoptosis; HL-60 cells

收稿日期: 2000-12-26

基金项目: 第三军医大学科研基金

作者简介: 敖琳 (1971-),女,重庆市人,讲师,硕士,主要从事分子毒理与遗传毒理研究。