

微量热法对小檗碱类生物碱抑菌作用的量效关系研究

代春美^{1,2,3}, 彭成³, 王伽伯², 肖小河^{2*}

(1. 辽宁医学院, 辽宁 锦州 121001; 2. 解放军第三〇二医院 全军中药研究所, 北京 100039;

3. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 610000)

摘要:目的 测定黄连中的3种生物碱小檗碱、药根碱、巴马汀对痢疾杆菌生长代谢的影响,从热力学角度研究小檗碱类生物碱抑菌作用的量效关系。方法 以微量热法测定小檗碱类生物碱作用于痢疾杆菌生长代谢的热谱曲线,并得出相应的热力学参数,如生长速率常数、产热功率、最大热功率出现时间、抑制率、传代时间等。根据热动力学模型,拟合了3种生物碱产热功率-质量浓度关系,并进行初步的量效关系分析。结果 小檗碱、药根碱、巴马汀对痢疾杆菌的生长代谢均有不同程度的抑制作用,在0.08~1.20 mg/mL内随着质量浓度的增加,最大热功率出现时间和传代时间延长,生长速率常数降低和最大产热功率降低,抑制率增加,且与药物质量浓度呈现一定的量效关系。结论 3种生物碱对痢疾杆菌的抑菌活性的强度顺序为小檗碱>巴马汀>药根碱,从热力学角度研究抑菌类中药的量效关系具有定量、灵敏、快速等优势。

关键词: 黄连; 小檗碱; 微量热法; 量效关系

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)07-1136-04

Dose effect relationship of berberine and analogues on antibacterial metabolism of *Bacillus shigae* by microcalorimetry

DAI Chumei^{1,2,3}, PENG Cheng³, WANG Jiabo², XIAO Xiaohe²

(1. Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, 302 Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100039, China; 3. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610000, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of berberine, jatrorrhizine, and palmatine in [WTBX] *Coptis chinensis* [WTBZ] on the metabolism of [WTBX] *Bacillus shigae* [WTBZ] and investigate the dose-effect relationship from the view of thermodynamics. **Methods** By microcalorimetry, the power-time curves of [WTBX] *B. shigae* [WTBZ] growth were obtained and the action on them by addition of berberine, jatrorrhizine, and palmatine at different concentrations [WTBX] in vitro [WTBZ] was studied. Meanwhile, the quantitative thermokinetic parameters, such as growth rate constant (k_1 , k_2), maximum heat output ([WTBX] P_1 , P_2), peak time (t_1 , t_2), inhibition ratio ([WTBX] I [WTBZ]), and generation time ([WTBX] t_c) obtained from these curves were analyzed and relationship of [WTBX] P - Q [WTBZ] was obtained. **Results** Results suggested that berberine, jatrorrhizine, and palmatine had different inhibited effects on [WTBX] *B. shigae* [WTBZ] growth in a dose-dependent manner. With the concentration increasing from 0.08 to 1.20 mg/mL, thermokinetic parameters, such as [WTBX] P_1 , P_2 , k_1 , [WTBZ] and [WTBX] k_2 [WTBZ] diminished, [WTBX] I [WTBZ] and [WTBX] t [WTBZ] c increased. On the contrary, the appearance time of [WTBX] t_1 and t_2 [WTBZ] prolonged. **Conclusion** Berberine and its analogues have obvious antimicrobial effect and the sequence of antimicrobial activity was berberin > palmatine > jatrorrhizine. Microcalorimetry is a useful tool to evaluate the dose-effect relationship of antimicrobial drug with its high sensitivity and significant quantitative information.

Key words: *Coptis chinensis* [WTBZ] Franch.; berberine; microcalorimetry; dose-effect relationship

阐明中药量效关系,科学地认识和把握中药剂量,从合理用药特别是剂量角度探索提高中医药疗效的新思路、新对策,是当前中医药研究的重大核心

课题。然而,中药量效关系是否客观存在?如何评价中药的量效关系,这些关键科学问题不容回避,同时又鲜有探究。

* 收稿日期: 2009-09-09

基金项目:“973”计划项目(2007CB512607);国家自然科学基金资助项目(30500665);辽宁省教育厅科研项目计划(L2010334)

作者简介:代春美(1977—),女,辽宁锦州人,讲师,在读博士,主要研究方向为中药药理。

Tel: (0416) 4673175 E-mail: springdaidai@163.com

* 通讯作者 肖小河

微量热法^[1] (microcalorimetry) 是一种基于生物热力学表达的生物活性检测方法, 生物体生长代谢过程中所伴随的能量和产热的变化, 可以采用热动力学方法特别是微量热法进行检测, 尤其是对于抑菌类药物, 根据生物热力学参数和热谱图, 可实时、连续、在线、灵敏地检测药物影响生物体代谢过程中的热变化, 并可对其作用性质和强度进行定性和定量分析^[2-4]。

黄连性寒、味苦, 具有清热燥湿、泻火解毒、抗病原微生物的作用, 主要成分包括小檗碱、药根碱、巴马汀^[5]等。黄连有抑制痢疾杆菌作用, 其中小檗碱对痢疾杆菌有较强的抑制作用, 药根碱和巴马汀与小檗碱的结构相似, 药根碱和巴马汀是否也有类似作用, 三者抑制痢疾杆菌的作用强弱程度如何? 其量效关系如何? 本研究采用微量热法, 对 3 种生物碱对痢疾杆菌生长代谢过程的影响进行比较研究, 建立热谱图, 获得相应的热动力学参数, 对其抑菌活性进行客观量化评价, 并对 3 种生物碱抑制痢疾杆菌的量效关系进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 供试菌株: 痢疾杆菌 [*Bacillus shigae* CMCC (B) 51342], 由武汉大学中国典型培养物保藏中心提供。

1.2 样品: 盐酸小檗碱 (批号 0713-9906)、盐酸巴马汀 (批号 0732-9604)、盐酸药根碱 (批号 0733-200004) 对照品均购自中国药品生物制品检定所, 质量分数大于 98%。

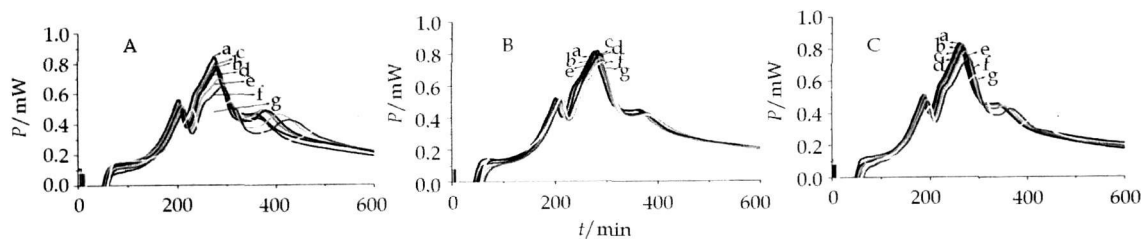
1.3 培养基: LB 培养基, 取 10 g 蛋白胨, 5 g 酵母膏, 5 g NaCl, 溶于 1 000 mL 二次蒸馏水中, 调 pH 7.2 后分装, 121 °C 高压蒸气灭菌 20 min, 4 °C 冰箱中放置备用。

1.4 实验仪器: 瑞典 Thermometric 公司产的 TAM Air 微量热仪, 有关仪器结构、原理及操作见参考文献内容^[6]。

1.5 实验方法: 采用安瓿法。每个安瓿瓶精确加入 5 mL 培养基, 接种痢疾杆菌, 接种量为 1×10^6 / mL, 按实验要求加入一定量小檗碱、药根碱、巴马汀药液, 加盖瓶塞, 密封放入微量热仪中^[7,8]。上述均为无菌操作。在 37 °C 下跟踪记录细菌生长代谢热谱曲线, 当曲线回到基线后, 实验结束。

2 结果

2.1 痢疾杆菌生长代谢热谱曲线: 在 37 °C, 安瓿法测定了痢疾杆菌生长代谢热谱曲线及其在小檗碱、药根碱、巴马汀作用下的生长代谢热谱曲线 (图 1)。在相同的条件下, 重复实验 3 次, 实验结果有良好的重现性。痢疾杆菌的生长繁殖过程可分为 4 个时期: 停滞期、第一指数生长期、第二指数生长期、衰亡期。3 种生物碱作用于痢疾杆菌的热谱曲线形状相似, 相对于对照组, 痢疾杆菌的停滞期均延长, 曲线的第一指数生长期和第二指数生长期出峰时间均后移, 峰形变得平缓, 其整个代谢过程的时间延长, 尤其是小檗碱和巴马汀上述特征明显。区别在于: 相对于对照组, 各样品的最高峰的峰高、出峰时间及上升段的斜率不同。



A-小檗碱 B-药根碱 C-巴马汀 a~g 0、0.08、0.16、0.24、0.40、0.60、1.20 mg·mL⁻¹

A-berberine B-jatrorrhizine C-palmatine a~g 0、0.08、0.16、0.24、0.40、0.60、1.20 mg·mL⁻¹

图 1 痢疾杆菌在小檗碱类生物碱作用下的热谱曲线

2.1 Power time curves of [*WTBX*]*B. shigae* [*WIHZ*] at 37 °C affected by different concentrations of berberine and its analogues

2.2 痢疾杆菌生长热动力学参数的测定: 在细菌的指数生长期中: $P_t = P_0 \exp(kt)$ 或 $\ln[WTBX] P_t = \ln[WTBX] P_0 + [WTBX] kt [WTBZ]$ ^[9,10], 其中 P_0 、 P_t 分别是细菌在指数生长期的起始点和 t 时的热功率。将热谱曲线上指数生长期的 $\ln[WTBX] P_t$ 对 t 进行线性拟合可得出痢疾杆菌第一指数生长期生长速率常数 ($[WTBX] k_1$)。可得 $[WTBX] k_1 = (0.02453 \pm 0.000008) \text{ min}^{-1}$ ($n = 6$), 相关系数 (r) 均大于 0.995 0, 可见其结果有非常好的重现性。

同时由 $t_g = \ln 2 / k_1$ 得出细菌传代时间 t_g ^[11,12]。痢疾杆菌及在不同浓度药物作用下的 t_g 、 k_1 、 k_2 、大热功率 P_1 、 P_2 , 出峰时间 t_1 、 t_2 列于表 1 中。细菌生长抑制率 (I) 定义为 $I = (k_0 - k_1) / k_0$ ^[11,12], 式中 k_0 为对照组痢疾杆菌的生长速率常数, k_1 为痢疾杆菌

同时由 $t_g = \ln 2 / k_1$ 得出细菌传代时间 t_g ^[11,12]。痢疾杆菌及在不同浓度药物作用下的 t_g 、 k_1 、 k_2 、大热功率 P_1 、 P_2 , 出峰时间 t_1 、 t_2 列于表 1 中。细菌生长抑制率 (I) 定义为 $I = (k_0 - k_1) / k_0$ ^[11,12], 式中 k_0 为对照组痢疾杆菌的生长速率常数, k_1 为痢疾杆菌

在不同药物作用下的生长速率常数,小檗碱类药物不同质量浓度对痢疾杆菌的 I 见表 1。

随着药物质量浓度的增加,细菌第二指数生长期的最大发热功率 P_2 相应减小。 P_2 可以作为表征药物

2.3 P_2 与药物质量浓度的量效关系: 由表 1 可见,

表 1 小檗碱类生物碱作用于痢疾杆菌的热力学参数

Table 1 Thermokinetic parameters for [WTHX] *B. shigae*[WTHZ] treated by berberine, jatrorrhizine, and palmatine at different concentrations

组 别	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	k_1 / min^{-1}	k_2 / min^{-1}	P_1 / mW	P_2 / mW	t_1 / min	t_2 / min	$I / \%$	t_G / min
对照	0	0.024 53	0.012 81	0.500 6	0.832 7	184	259	0	28 251 3
小檗碱	0.08	0.017 36	0.009 23	0.490 2	0.774 3	203	276	29 243 9	39 927 8
	0.16	0.014 99	0.008 04	0.532 4	0.798 7	205	277	38 903 6	46 240 6
	0.24	0.016 10	0.008 09	0.515 1	0.766 0	207	280	34 379 5	43 052 6
	0.40	0.016 64	0.005 83	0.516 5	0.702 0	210	285	32 178 5	41 655 4
	0.60	0.015 14	0.005 40	0.490 3	0.646 2	213	290	38 292 2	45 782 5
	1.20	0.012 83	0.001 56	0.495 7	0.555 8	229	313	47 707 4	54 025 5
药根碱	0.08	0.017 38	0.008 79	0.513 4	0.815 6	207	281	29 162 4	39 881 8
	0.16	0.017 33	0.009 49	0.486 5	0.786 3	208	283	29 366 2	39 996 9
	0.24	0.016 36	0.011 69	0.511 7	0.794 7	210	285	33 318 7	42 368 4
	0.40	0.018 02	0.009 80	0.491 6	0.771 9	210	287	26 553 9	38 465 4
	0.60	0.016 99	0.007 72	0.511 6	0.751 8	214	291	30 752 0	40 797 3
	1.20	0.015 29	0.007 60	0.521 9	0.746 1	213	290	37 680 9	45 333 3
巴马汀	0.08	0.017 40	0.009 72	0.511 2	0.828 5	186	262	29 080 9	38 836 0
	0.16	0.017 55	0.009 94	0.510 9	0.826 2	189	265	28 469 5	39 495 5
	0.24	0.019 91	0.008 62	0.487 9	0.802 4	190	267	18 850 6	34 814 0
	0.40	0.018 01	0.009 27	0.482 4	0.783 5	192	271	26 594 7	38 486 8
	0.60	0.017 31	0.008 37	0.469 0	0.741 8	195	277	29 447 7	40 043 1
	1.20	0.017 10	0.008 24	0.437 0	0.738 9	199	288	30 303 6	40 534 9

抑菌活性的特征参数之一。以 P_2 对药物质量浓度 (ρ) 进行线性拟合, 其斜率绝对值越大, 抑菌作用就越强。 P_2 与 ρ 的关系为小檗碱: $P_2 = 0.813\ 85 - 2.303\ 21 \times 10^{-4} \rho$, $r = -0.972\ 73$; 药根碱: $P_2 = 0.804\ 92 - 5.866\ 01 \times 10^{-5} \rho$, $r = -0.890\ 69$; 巴马汀: $P_2 = 0.833\ 2 - 1.177\ 25 \times 10^{-4} \rho$, $r = -0.976\ 06$; (质量浓度范围为 0.08~ 1.20 mg/mL)。从 P_2 与 ρ 的量效关系图 (图 2) 中, 可以看出小檗碱的抑菌作用最强, 巴马汀、药根碱依次递减。

痢疾杆菌均有一定的抑制作用, 其抑菌活性可借助于热力学参数进行定量。生长速率常数 (k) 值可作为表征细菌生长代谢过程的特征常数之一, 因此在其他条件相同而加入不同抑制性药物时, k 值的改变可作为评价药物抑菌作用大小的参数。本研究中, 小檗碱、药根碱、巴马汀随着质量浓度的增加, k_1 、 k_2 总体趋势减小, 尤其是 k_2 减小的趋势更为明显, 但未显现明显线性关系; 随着药物质量浓度的增加, 细菌生长抑制率增加, 以小檗碱的抑制率增加最为显著, 药根碱、巴马汀随着药物质量浓度的改变, 抑菌强度增加的程度相对较弱。同时, 随着药物质量浓度的增加, t_G 也相应增加, 尤其是小檗碱随着药物质量浓度的增加, t_G 明显延长, 提示小檗碱对痢疾杆菌的抑菌作用比较显著。在热力学参数中, 第二指数生长期最大热功率 P_2 与药物质量浓度呈线性关系, 对于定量评价小檗碱类生物碱抑菌作用具有重要意义。

对于抑菌类中药的量效关系研究, 以往的传统方法如管碟法和比浊法^[13] 虽能反应药物抑菌作用的强弱, 但不能获得实时在线的数据, 且灵敏性相对于微量热法要低。而以热力学理论为指导的中药生物活性测定, 反映了中药的整体效应, 其中生长速率常数、最大发热功率及出峰时间具有明显的特征性,

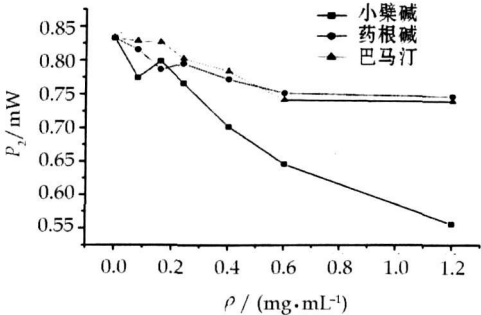


图 2 P_2 与 ρ 的量效关系图

g.2 Dose effect relationship of [WTHX] P_1 [WTHZ]₂ and ρ

3 讨论

本研究利用热力学方法及其热力学参数, 从细胞水平上对小檗碱类生物碱的抑菌作用进行了定量研究与分析。本研究中黄连 3 种小檗碱类成分对

符合中医药的整体观,并具有高效、灵敏、实时、在线等特点,且能获得定性定量的数据,对中药量效关系及药效物质基础研究提供了新的技术平台,具有一定的应用前景。

参考文献:

- [1] 周传佩,刘义,沈雪松,等.热分析技术在药物研究中的应用[J].分析科学学报,2001,17(5):430
- [2] 代春美,肖小河,王迪,等.微量热法对不同生长年份黄连品质的评价[J].中草药,2006,37(2):205-209
- [3] 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
- [4] 孔维军,赵艳玲,山丽梅,等.微量热法研究黄连与吴茱萸分煎后配伍时的药性差异[J].中草药,2009,40(12):1893-1897
- [5] 万德光,彭成.四川道地中药材志[M].成都:四川出版集团,2005
- [6] 孔维军,赵艳玲,山丽梅,等.左金丸及类方 HPLC 指纹图谱与生物热活性指纹的“谱-效”关系研究[J].化学学报,2008,66(32):2533-2538
- [7] 余惠旻,肖小河,刘塔斯,等.中药四性的生物热动力学研究——生晒参和红参药性的微量热学比较[J].中国中药杂志,2002,27(5):393
- [8] 鄢丹,肖小河,金城,等.微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,2008,38(6):487-491
- [9] Kong W J, Wang J B, Jin C, et al. Effect of emodin on [WTBX] *Candida albicans* [WTBZ] growth investigated by microcalorimetry combined with chemometric analysis [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 83: 1183
- [10] Fan D L, Xiao X H, Ma X J. Calorimetric study of the effect of protoberberine alkaloids in *Coptis chinensis* Franch. on [WTBX] *Staphylococcus aureus* [WTBZ] growth [J]. *Thermochimica Acta*, 2008, 480: 49-52
- [11] Zheng D, Liu Y, Zhang Y, et al. Microcalorimetric investigation of the toxic action of Cr (VI) on the metabolism of [WTBX] *Tetrahymena thermophila* [WTBZ] BF5 during growth [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2006, 22: 121
- [12] 沈雪松,刘义.氟喹诺酮类药物对大肠杆菌抑制作用的量效关系的热化学研究[J].化学学报,2000,58(11):1463-1466
- [13] 马建凤,刘华钢,朱丹.中药体外抑菌研究的方法学进展[J].药物评价研究,2010,33(1):39-42

黄芩中黄酮类成分活性作用的虚拟评价

商倩^{1,2},刘巍²,徐为人^{2*},刘鹏²,刘冰妮²,韩英梅²,汤立达²

(1 天津医科大学基础医学院,天津 300070; 2 天津药物研究院 天津市新药设计与发现重点实验室,天津 300193)

摘要:目的 利用理论对接方法研究黄芩中黄酮类化合物的潜在作用机制。方法 选取黄芩中 8 个黄酮类化合物(包括苷元及其苷),收集现有靶标的晶体结构,利用 Schrödinger 软件进行计算,以分级标准评价选择性。结果 文献报道黄芩黄酮类化合物药理作用共 26 种,其中与苷元及其苷类化合物对接结果相符的个数分别为 9 个和 25 个。表明苷元及其苷类化合物的靶标选择性与虚拟评价有差异,苷类化合物的结果与文献更接近。结论 说明虚拟评价技术对于中药复杂作用系统的研究具有较大的实用性,苷元与苷类化合物体内作用效果相似,而体内代谢是药物虚拟评价过程中非常重要的影响因素。

关键词:黄芩;黄酮类化合物;虚拟评价

中图分类号:R285.51 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2010)07-1139-04

Virtual evaluation on activities of flavonoids from *Scutellaria baicalensis*

SHANG Qian^{1,2}, LIU Wei², XU Wei-ren², LIU Peng², LIU Bing-ni², HAN Ying-mei², TANG Li-da²

(1. Basic Medical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

Abstract: Objective To explore the investigation method of complicated Chinese materia medica (CMM), the potential action mechanisms of flavonoids from *Scutellaria baicalensis* were studied by docking calculation. **Methods** In total, eight flavonoids (aglycones and their glycosides) from [WTBX] *S. baicalensis* [WTBZ] were selected as ligand. The crystalline structures of targets related to common diseases were used as the receptors for calculation. The calculations were conducted with Schrödinger software package. The grading standard of selectivity was developed according to G-score between ligands and re-

* 收稿日期:2010-03-10

基金项目:科技部支撑项目(2007BA141B01);天津市应用基础与前沿技术项目(07TCZDJC05300)

作者简介:商倩(1983—),女,天津人,硕士研究生,研究方向为新药设计与筛选。E-mail: dtsmalau@hotmail.com

* 通讯作者 徐为人 Tel: (022) 23003529 E-mail: xwrtj@yahoo.com.cn