

基于四膜虫生物热活性的大黄炮制减毒研究

李会芳¹, 马永刚², 肖小河^{2*}, 刘 义³

1. 山西中医学院, 山西 太原 030024

2. 解放军第302医院全军中药研究所, 北京 100039

3. 武汉大学化学与分子科学学院, 湖北 武汉 430072

摘要: **目的** 探讨大黄不同炮制品对四膜虫毒性的差异。**方法** 采用微量量热仪考察大黄不同炮制品对四膜虫生物热活性参数的影响。**结果** 大黄不同炮制品对四膜虫生长有不同程度的抑制作用, 其作用强度顺序为生大黄>酒大黄>熟大黄>大黄炭; 对四膜虫生长的抑制毒性表现为: 随着抑制率的增大, 传代时间(t_G)延长, 最大热功率($P_{\max}$)逐渐降低, 达最大热功率时间($t_{\max}$)逐渐延后; 四膜虫整个生长过程的产热量不同程度地减少, 以生大黄减少的最为明显。**结论** 大黄经炮制后, 有明显的减毒作用, 四膜虫生物热活性研究可用于中药毒性的早期筛选。

关键词: 大黄; 炮制减毒; 四膜虫; 微量量热法; 生物热活性

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)01-0103-03

Toxicity-attenuating effect of processed rhubarb products based on bio-heat activity in *Tetrahymena thermophila* BF5

LI Hui-fang¹, MA Yong-gang², XIAO Xiao-he², LIU Yi³

1. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China

2. China Military Institute of Chinese Materia Medica, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China

3. College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China

Abstract: **Objective** To explore the toxicity difference of various processed rhubarb products on *Tetrahymena thermophila* BF5. **Methods** The effects of various processed-rhubarb products on parameter of bio-heat activity in *T. thermophila* BF5 were investigated by a TAM air isothermal microcalorimeter. **Results** Various processed rhubarb products had different inhibition on the growth of *T. thermophila* BF5 in different degrees. The order of intensity was crude rhubarb > alcohol-processed rhubarb > steamed rhubarb > carbonized rhubarb. The inhibition on the growth of *T. thermophila* BF5 was with the phenomenon of t_G being increased, $P_{\max}$ being lowered down, and $t_{\max}$ being delayed. The heat production during the growth of *T. thermophila* BF5s was reduced in varying degrees, and the reducing of crude rhubarb was the most obvious. **Conclusion** It could be concluded that the processed rhubarb could attenuate the toxicity significantly. The study on the bio-heat activity of *T. thermophila* BF5 is suitable for the early screening on toxicity of Chinese materia medica.

Key words: rhubarb; toxicity-attenuating effect of process; *Tetrahymena thermophila* BF5; microcalorimetric method; bio-heat activity

四膜虫是一种淡水中常见的单细胞真核原生动物, 已知有10余种, 目前研究中常用的是梨形四膜虫和嗜热四膜虫。四膜虫不仅具有真核细胞典型的亚细胞结构, 同时具备完整生命体所有的诸如纤毛、口器、黏液泡等细胞器, 因此使得以四膜虫为模型生物实验在短时间内在细胞层次和生命独立个体层次两方面同时展开。四膜虫代谢功能非常类似于哺乳动物的肾和肝脏, 其对许多环境中有毒物质的

应答比其他高等生物更为敏感、直接, 具有专属、灵敏、实时在线、重现性良好等技术优势, 大量研究已证明四膜虫是对药物、有机物和无机物、水污染物进行毒理学评价较理想的模型^[1-3], 然而其在中药毒理学研究中的应用鲜见报道。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, 生物体生长代谢过程中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

收稿日期: 2011-06-21

基金项目: 国家科技部“十一五”科技支撑计划(2006BAI08B03)

作者简介: 李会芳(1980—), 女, 博士, 讲师, 从事中药药理及毒理学研究。Tel: 13453453836 E-mail: 13453453836@163.com

*通讯作者 肖小河 E-mail: pharmacy302@126.com

量热法进行检测^[4-5]。本实验选用嗜热四膜虫作为评价大黄不同炮制品安全性的生物热动力学作用的模型,比较大黄不同炮制品对四膜虫毒性的差异。

1 材料与方法

1.1 药材

大黄购自甘肃礼县药材公司,经解放军第 302 医院全军中药研究所肖小河研究员鉴定为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥根及根茎,酒大黄、熟大黄、大黄炭由同一批生大黄炮制而得,方法参照《中国药典》2005 年版及《北京市中药材炮制规范》,由北京冠城堂药材饮片有限公司协助完成。

为尽可能暴露大黄的潜在毒性,采用醇提与水提相结合的方法制备生大黄及其炮制品的总提物,用于毒性比较研究。提取方法:将大黄粉碎成粗粉,加 6 倍量 95%乙醇加热回流 3 次,每次 1 h,合并滤液,浓缩得醇提液,滤渣挥去乙醇,加 10 倍量水,加热提取 1 h,滤液与醇提液合并,减压干燥得总提物。将不同炮制品总提物溶于 0.5% NaOH,配制成质量浓度为 1 g/mL 的药液,用微孔滤膜(0.22 μm)滤过除菌后作为大黄四膜虫生物热动力学供试样品。

1.2 四膜虫来源及处理

嗜热四膜虫 *Tetrahymena thermophila* BF5,由中国科学院水生生物研究所提供。四膜虫用培养基:15 g 蛋白胨、1 g 葡萄糖、5 g 酵母粉,溶于 1 000 mL 蒸馏水中,用 NaOH 调溶液 pH 7.2,121 °C 高压蒸汽灭菌 30 min,放置冰箱中备用。

1.3 主要仪器

TAM Air 微量热计(配有 Picolog 数据采集和分析软件),瑞典 Thermometric 公司;Mettler AE163 电子分析天平,瑞士梅特勒公司。

1.4 方法

1.4.1 四膜虫生物热活性测定 将四膜虫在专用培养基中培养至指数生长期,无菌操作下将处于指数生长期的四膜虫接种于 50 mL 专用培养基中,接种量为细胞 $2 \times 10^3/\text{mL}$ (1%),摇匀后向每个安瓿瓶(20 mL)中精密加入 5 mL 四膜虫培养基溶液,后加入灭菌蒸馏水 100 μL,加盖,密封放入恒温 28 °C 微量热仪中跟踪记录细胞的生长代谢过程热功率-时间曲线(图 1),当曲线重新返回基线时,实验结束。使用微量热仪同一通道重复 5 次。

根据图 1,可将四膜虫的生长过程分为 4 个部分:延迟期(A~B)、指数生长期(B~C)、稳定期(C~D)和衰亡期(D~E)^[6]。四膜虫在指数生

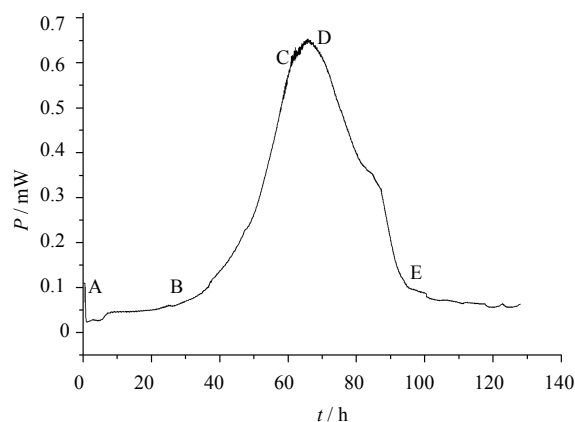


图 1 四膜虫的生长热谱曲线

Fig. 1 Thermal curve of *T. thermophila* BF5 growth

长期内的数量呈指数规律增长,其数学表达式为: $\ln N_t = \ln N_0 + kt$, $\ln P_t = \ln P_0 + kt$, $t_G = \ln 2/k$,式中 N_0 是 t_0 时的四膜虫数量, N_t 是 t 时的四膜虫数量, k 是四膜虫在指数生长期时的生长速率常数, P_0 为 t_0 时所测四膜虫的热功率, P_t 为 t 时所测四膜虫的热功率, t_G 为传代时间。对四膜虫热谱曲线的指数生长期取一系列的 $\ln P_t \sim t$ 数据进行线性拟合,从线性方程的斜率即可求出四膜虫生长的速率常数 k 值。 t_G 根据生长速率常数 k 计算而得。 k 和 t_G 可表示药物对四膜虫生长代谢过程中热功率的影响,从而提示药物在四膜虫生物热活性表达方面的差异。

1.4.2 大黄不同炮制品对四膜虫生长代谢的影响 将大黄不同炮制品样品溶液 100 μL 加入到 5 mL 四膜虫培养基溶液中作用于四膜虫,其余操作同“1.4.1”项,微量热仪记录热功率-时间曲线,计算热活性参数。

2 结果

2.1 四膜虫的生物热活性参数

四膜虫的生长速率较细菌慢得多,其全部的生长时间大约需要 100 h, 4~5 d。因此,四膜虫的 k 值非常小, $k = (0.069\ 24 \pm 0.002\ 83) \text{ h}^{-1}$ 。对照组的所有相关系数均大于 0.998 0,说明用微量热仪测定四膜虫的生长曲线具有良好的重现性。

2.2 大黄不同炮制品对四膜虫生长代谢的影响

根据大黄不同炮制品的四膜虫热谱曲线,计算相关热活性参数[传代时间(t_G)、最大热功率($P_{\max}$)、达最大热功率时间($t_{\max}$)]。四膜虫生长抑制率 = (对照组 k 值 - 大黄组 k 值) / 对照组 k 值。大黄不同炮制品对四膜虫代谢影响的热活性参数见表 1,对四膜虫代谢影响的热功率-时间曲线见图 2。

表 1 大黄不同炮制品对四膜虫代谢的热活性参数影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effects of various processed-rhubarb products on thermal activity parameters of metabolism in *T. thermophila* BF5 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

样 品	K/h^{-1}	t_G/h	生长抑制率/%	P_{max}/mW	t_{max}/h	总发热量/mJ
对照	0.071 75±0.001 76	9.66±0.18	—	0.653 6±0.011 9	65.93±2.29	29.42±3.77
生大黄	0.0354 5±0.000 62	19.55±0.34	50.59	0.317 4±0.013 1	100.61±2.26	19.60±1.08
酒大黄	0.038 60±0.000 68	17.96±0.32	46.20	0.419 9±0.023 2	84.71±5.47	22.00±2.86
熟大黄	0.048 57±0.001 13	14.27±0.29	32.31	0.482 7±0.031 1	83.23±3.93	23.67±3.64
大黄炭	0.056 48±0.000 90	12.27±0.41	21.28	0.576 1±0.018 9	76.93±5.81	26.14±2.35

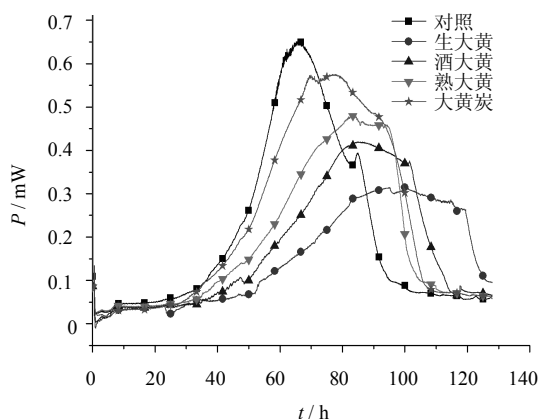


图 2 大黄不同炮制品对四膜虫代谢影响的热功率-时间曲线

Fig. 2 Thermal power-time curves of metabolism in *T. thermophila* BF5 affected by various processed rhubarb products

3 讨论

本课题组前期进行了大黄不同炮制品对小鼠的亚急性毒性实验,结果表明,ig 给予小鼠生大黄和酒大黄 53、76 g/kg,连续 14 d 后,小鼠出现轻微的肝脏、肾脏毒性反应,主要表现为肝功能和肾功能的损害,即丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、尿素氮、肌酐的升高,以及轻度肝组织和肾小管上皮细胞的轻度水变性;而给予熟大黄和大黄炭的小鼠未见肝脏和肾脏功能明显异常,表明这两种炮制大黄对小鼠肝、肾的毒性明显小于生大黄^[7],提示生大黄经炮制后,有一定的“减毒”作用,尤其以熟大黄和大黄炭的减毒效果最为显著。

本实验所用大黄不同炮制品的总提物不溶于水,考虑到大黄中蒽醌类成分具有一定的酸性且溶于碱性溶液中,因此将其溶于 0.5% NaOH 溶液中,经测定 pH 值为 7.2~7.8。另外由于加入的药液只有 100 μ L,对 5 mL 四膜虫培养基的酸碱环境影响极小,在预试验中即使直接加入 0.5% NaOH 溶液 100 μ L,也未观察到影响四膜虫生长活性的迹象,因此最终确定采用总提物溶于 0.5% NaOH 溶液作为供

试品溶液。另外由于高温灭菌会导致大黄中蒽醌类成分的变化,因此采用微孔滤膜的方法进行除菌。

在本实验的生物热力学研究中,四膜虫的生长速率常数、生长抑制率、 P_{max} 、 t_{max} 、总发热量等数据提示,同批次生大黄不同炮制品对四膜虫生长有不同程度的抑制作用,其作用强度顺序为生大黄>酒大黄>熟大黄>大黄炭。大黄对四膜虫的生长抑制毒性表现为:随着其抑制率的增大, t_G 延长, P_{max} 逐渐降低, t_{max} 逐渐延后。整个生长过程的产热量不同程度地减少,生大黄减少的最为显著。本实验结果与本课题组前期进行的大黄亚急性毒性实验的结论一致^[7],提示四膜虫生物热活性研究可用于中药毒性的早期筛选。

参考文献

- [1] Yan D, Jin C, Xiao X H, *et al.* Investigation of the effect of berberines alkaloids in *Coptis chinensis* Franch on *Bacillus shigae* growth by microcalorimetry [J]. *Sci Sin B*, 2007, 50(5): 638-642.
- [2] Zheng D, Liu Y, Zhang Y, *et al.* Microcalorimetric investigation of the toxic action of Cr (VI) on the metabolism of *Tetrahymena thermophila* BF5 during growth [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2006, 22(2): 121-127.
- [3] 张少锋, 鄢 丹, 唐慧英, 等. 基于微量量热技术的注射用增溶辅料生物安全性评价 [J]. 科学通报, 2010, 55(35): 3384-3390.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Wu Y W, Gao W Y, Xiao X H, *et al.* Calorimetric investigation of the effect of hydroxyanthraquinones in *Rheum officinale* Baill on *Staphylococcus aureus* growth [J]. *Thermochim Acta*, 2005, 429(2): 167-170.
- [7] 王伽伯, 马永刚, 张 萍, 等. 炮制对大黄化学成分和肝肾毒性的影响及其典型相关分析 [J]. 药学报, 2009, 44(8): 885-890.