

基于微量量热技术与化学计量学表征的角类动物药质量生物评价研究

鄢丹^①, 韩玉梅^{①②③}, 骆骄阳^{①②}, 张萍^①, 唐慧英^①, 彭成^②, 肖小河^{①*}

① 中国人民解放军第302医院全军中药研究所, 北京 100039;

② 成都中医药大学药学院, 成都 610075;

③ 重庆理工大学药学与生物工程学院, 重庆 400050

* 联系人, E-mail: yd277@126.com

2009-12-12 收稿, 2010-04-01 接受

国家自然科学基金(30625042, 30873385)、国家“重大新药创制”重大专项(2009ZX09502-003, 2009ZX09308-005)和中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地开放基金资助

摘要 着眼于捕获微生物生长代谢过程中能量变化规律, 采用微量量热技术研究名贵角类动物药(鹿茸、鹿角、羚羊角)对大肠杆菌生长代谢的干预作用, 以热谱曲线相似性和生物热动力学参数如第一生长速率常数(k_1), 第一阶段最大发热功率(P_1)、达峰时间(T_1)、发热量(Q_1), 第二阶段最大发热功率(P_2)、达峰时间(T_2)、发热量(Q_2)为评价指标, 借助化学计量学对生物热动力学特征参数信息进行辨识与抽提. 结果表明, 羚羊角与空白样品之间的相似性较鹿茸、鹿角低; 鹿茸、鹿角可增加微生物生长代谢过程能量(热量), 而羚羊角与之相反. 由此提示, 运用微量量热技术结合化学计量学, 以热谱曲线相似性表征生物活性谱(定性), 以生物热动力学特征参数表征生物效价值(定量), 可实现定性定量评价不同角类动物药的生物活性.

关键词

角类动物药
微量量热技术
化学计量学
大肠杆菌
生物活性谱
热动力学特征参数

鹿茸、鹿角和羚羊角作为名贵角类动物药收载于《中国药典》(一部), 其化学成分多为变性的角蛋白、磷脂、胆固醇和微量元素等, 药效成分雷同且难以区分, 而临床应用上有以补益作用为主的(鹿角与鹿茸), 以解热作用为主的(羚羊角)差异^[1]. 因此, 沿用植物药以测定化学成分含量为主的质量控制方法难以评价其品质^[2]. 动物药同生物制品一样, 主要来自动物的全体、器官、组织、生理或病理产物、排泄物等, 经传统加工和现代生物技术制成, 二者来源相似, 具有同源性; 加之, 动物药所含化学成分同生物制品类似, 一般由蛋白质、多肽等多类化合物组成. 因此, 借鉴生物制品质量控制方法, 从生物活性测定角度(含生物效价值和生物活性谱), 建立角类动物药质量控制的方法将是解决其质量控制难题的可行之道^[3~7].

开展生物活性测定的核心工作是建立生物模型和测定方法. 肠道菌群大致可分为有益菌、有害菌和利害均备菌, 三者互相制约、互相协调, 共同维持肠道的微生态平衡, 从而维护机体的健康. 大肠杆菌是肠道菌群中的利害均备菌, 同许多肠道菌相互拮抗、组成正常菌群; 当出现肠道菌群失衡、定位转移等, 则表现出有害的一面^[8,9]. 因此, 鹿茸、鹿角补益作用的发挥与其参与机体肠道内环境调节、维持体内菌群平衡、干预肠道细菌代谢作用有关^[8,10,11]; 此外, 大肠杆菌还常作为解热药和抗菌药生物测定的生物模型^[12~14]. 结合鹿茸、鹿角和羚羊角的药理作用, 选择大肠杆菌作为其生物测定的生物模型. 微量量热技术作为一种可量化、简便的测定反应热变化的方法而较广泛地应用于物理、化学和生命科学等领域^[13~18].

英文版见: Yan D, Han Y M, Luo J Y, et al. The action of medicinal animal horns on *Escherichia coli* growth investigated by microcalorimetry and chemometric analysis. Chinese Sci Bull, 2010, 55: 2945—2950, doi: 10.1007/s11434-010-3348-4

该方法主要是通过获得动态的生物热力学参数和热谱曲线($P-t$)特征信息,以表达微生物、细胞、组织和器官等生物体在生长代谢过程中或药物干预作用下的微量热变化规律,具有实时在线、灵敏、高通量和指纹性等技术优势^[19-21].

本研究着眼于捕获微生物生长代谢过程中能量变化信息,采用微量量热技术研究不同角类动物药对大肠杆菌生长代谢的干预作用,以热谱曲线相似性和生物热力学参数如第一生长速率常数(k_1),第一阶段的最大发热功率(P_1)、达峰时间(T_1)、发热量(Q_1)和第二阶段的最大发热功率(P_2)、达峰时间(T_2)、发热量(Q_2)为评价指标,借助化学计量学对其生物活性特征参数信息进行挖掘,以灵敏专属地表征角类动物药干预大肠杆菌生长代谢过程的热量变化规律,从而为评价角类动物药生物活性提供参考.

1 实验

(i) 仪器. TAM Air 八通道毫瓦级热导式等温量热仪(Thermometric AB, 瑞典), YXQ LS-B 全自动立式电热蒸汽灭菌器(上海降拓食品设备有限公司), BS201S 型电子天平(北京 Sartorius 有限公司).

(ii) 材料. 大肠杆菌(CCTCC AB91112)由中国药品生物制品检定所中国典型培养物收藏中心提供. 蛋白胨培养基(蛋白胨 10 g、酵母膏 5 g、氯化钠 5 g 溶于 1 L 蒸馏水中,调节 pH 为 7.0~7.2 后分装, 121℃ 高压蒸汽灭菌 30 min, 4℃ 冰箱中放置备用). 人工胃液: 取 10% 盐酸溶液 16.4 mL, 加水约 800 mL 及胃蛋白酶 10 g, 搅匀后加水定容至 1000 mL. 鹿茸(产地吉林)、鹿角(产地吉林)和羚羊角(产地新疆)由北京同仁堂科技发展股份有限公司提供.

(iii) 样品制备. 角类动物药富含角蛋白、多肽等成分,临床常以粉末入药,因此采用人工胃液模拟制备供试品溶液. 称取鹿茸、鹿角和羚羊角 3 种药材粗粉各 2 g, 置于 20 mL 量瓶,加入人工胃液 15 mL 后超声处理 5 min, 放冷,再加入人工胃液稀释至 20 mL, 置于台式振荡器(37℃)中振荡 1 h, 静置 5 min 后,取上层清液作为供试品溶液.

(iv) 实验方法. 在恒温 37℃ 条件下,采用微量量热计之安瓿法测定. 先将大肠杆菌接种到蛋白胨培养基中形成悬浮液(细胞浓度 2×10^6 细胞/mL), 分别与新配制的 3 种角类动物药的供试液混合后,加入安瓿瓶中,并置于量热计的测定通道中. 在大约 30

min 后待安瓿瓶达到 37℃ 时,以 PicoLog TC-80 工作站实时记录热谱曲线,直到曲线回到基线时停止.

(v) 化学计量学方法. 相似性评价:参考中药高效液相色谱指纹谱相似性评价方法^[19],采用向量余弦法对不同浓度角类动物药干预作用下的大肠杆菌生长代谢热谱曲线与大肠杆菌自身的热谱曲线进行相似性评价^[20]. 主成分分析:对角类动物药干预作用下大肠杆菌热谱曲线中多个生物热力学参数进行主成分分析(Unscrambler 9.8),以在不影响信息真实性的前提下,捕获主要特征参数,达到降维目的,有助于快速寻找影响事物的主要因素^[21,22].

2 结果

2.1 热谱曲线

图 1 为在恒温 37℃ 条件下,大肠杆菌在未加药时(即空白样品)生长代谢的热谱曲线. 在密闭的安瓿瓶中营养物和氧的供给是有限的,结合微生物生长代谢的一般规律,可将大肠杆菌的热谱曲线分为两个阶段(1, 2)和 5 个期:停滞期(A-B)、第一生长期(B-C)、稳定期(C-D)、第二生长期(D-E)和衰亡期(E-F)^[15,23,24].

同样地,将含不同浓度的 3 种角类动物药的细胞悬浮液置于安瓿瓶中,在上述条件下测定、记录,分别得到不同给药条件下的热谱曲线,如图 2 所示. 从图可直观看出,由于角类动物药样品的干预作用,使得大肠杆菌生长代谢的各热动力学参数呈现规律性变化.

2.2 生物热力学参数

因第二生长期(D-E)生长速率常数远低于第一生

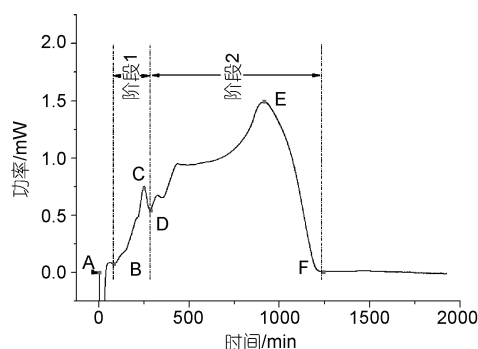


图 1 大肠杆菌生长代谢的热谱曲线
37℃, 蛋白胨培养基

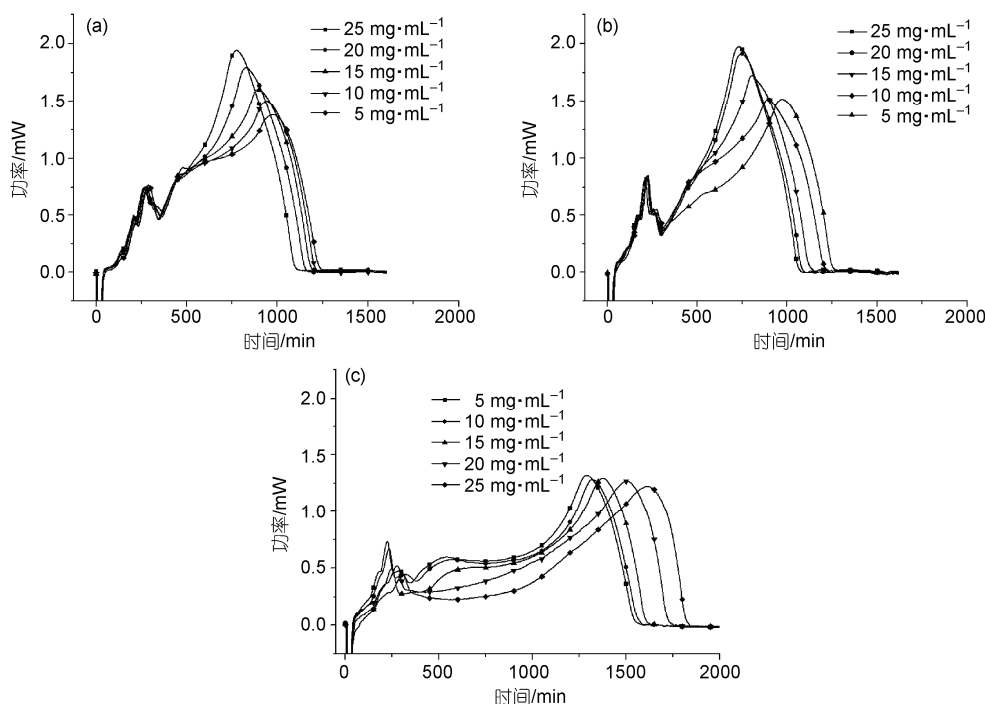


图2 不同浓度的鹿茸(a)、鹿角(b)和羚羊角(c)影响大肠杆菌生长代谢的热谱曲线
37℃, 蛋白胨培养基

长期(B-C), 可视为稳定期的一部分^[25], 特别是在(D-E)段时细菌增生情况复杂, 已不适宜用常规的指数生长模型进行拟合计算. 因此, 采用指数生长模型仅对大肠杆菌第一生长期(B-C)进行数学处理^[26].

$$P_t = P_0 \exp(kt) \quad \text{或} \quad \ln P_t = \ln P_0 + kt,$$

式中, P_0 为基线起点的产热功率, P_t 为时间 t 时的产热功率. 经对 P_t 取对数后与 t 进行直线回归处理, 计算得到空白样品的第一指数生长速率常数 k_1 为 $(0.0137 \pm 0.00031) \text{ min}^{-1}$, 相关系数均大于0.98, 标准偏差(SD)为0.003, 提示相关性与重复性良好, 如表1所示.

在限制性培养条件下, 微生物群体组成具有异质性特点, 属非线性、多变量的复杂动态过程. 可采用OriginLab软件对不同角类动物药作用下的热谱曲线进行处理, 以获取其更多的热动力参数信息(表2). 表2中纷繁复杂的数据难以直观准确地寻找其规律性,

也就难以快速评价不同角类动物药对大肠杆菌生长代谢过程的影响, 因此, 需要借助化学计量学对数据进行处理.

2.3 数据分析

(1) 热谱曲线相似性分析. 为客观表征不同药物作用于大肠杆菌后热谱曲线的整体差异, 采用余弦向量法对热谱曲线间的相似性进行分析. 以不加药的大肠杆菌空白样品生长代谢热谱曲线为参照, 不同浓度的鹿茸、鹿角和羚羊角样品分别与之进行比较, 得到相应的相似性评价数据, 并绘制示意图, 如图3所示.

从图3可直观看出, 3种不同动物药作用于大肠杆菌后的热谱曲线与空白相比, 在相似性方面, 明显分为两种趋势: 鹿茸和鹿角相似性变化趋势类似, 特别是在低浓度时(0~15 mg/mL), 基本一致, 仅在高浓度(15~25 mg/mL)时, 鹿茸与空白样品间的相似性较鹿角更小; 羚羊角则表现为另一类情况, 与空白样品间的相似性较鹿茸、鹿角明显更小, 提示羚羊角对大肠杆菌生长代谢的影响较鹿茸、鹿角更为显著; 另一方面, 从热谱曲线变化趋势来看, 以图2中的空白样

表1 大肠杆菌生长速率常数测定结果

实验编号	1	2	3	4	5	6	SD
$k_1 \times 10^{-3} / \text{min}^{-1}$	13.3	14.0	14.0	13.8	13.4	13.9	0.31
r^a	0.991	0.994	0.993	0.987	0.993	0.989	0.003

a) r 为相关系数

表 2 不同角类动物药影响大肠杆菌生长代谢过程的生物热力学参数($n = 6$)

样品	$C/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$k_1 \times 10^{-3}/\text{min}^{-1}$	P_1/mW	T_1/min	Q_1/J	P_2/mW	T_2/min	Q_2/J
空白	0	13.8±0.30	0.750±0.018	247.2±1.69	4.51±0.15	1.495±0.012	909.1±2.33	48.86±0.23
鹿茸	5	15.3±0.22	0.768±0.036	282.1±2.26	6.91±0.21	1.377±0.032	973.3±2.05	50.03±0.35
	10	16.6±0.32	0.742±0.016	281.8±1.32	6.29±0.25	1.496±0.024	939.0±2.15	53.02±0.17
	15	15.1±0.15	0.756±0.022	273.3±2.02	6.64±0.09	1.602±0.028	893.2±1.82	55.31±0.42
	20	16.4±0.24	0.757±0.034	271.1±0.92	6.44±0.28	1.793±0.018	825.2±1.39	57.10±0.36
	25	15.2±0.11	0.749±0.030	270.9±2.86	6.65±0.14	1.942±0.035	774.3±0.98	58.80±0.25
鹿角	5	16.0±0.09	0.854±0.027	226.4±1.67	6.22±0.18	1.512±0.032	958.9±1.27	50.18±0.27
	10	16.0±0.35	0.845±0.041	219.7±2.39	6.27±0.22	1.511±0.026	901.3±1.39	52.59±0.32
	15	16.1±0.26	0.835±0.038	223.9±1.63	6.32±0.13	1.715±0.011	802.0±2.30	53.98±0.19
	20	15.6±0.18	0.833±0.024	211.6±1.82	5.94±0.30	1.913±0.041	746.4±2.59	55.74±0.37
	25	16.2±0.41	0.827±0.033	209.3±0.89	6.07±0.27	1.986±0.027	732.3±1.63	57.97±0.32
羚羊角	5	12.1±0.33	0.733±0.028	224.1±1.69	6.95±0.23	1.317±0.022	1290.3±1.77	47.89±0.39
	10	11.0±0.37	0.668±0.036	234.6±2.41	7.14±0.32	1.282±0.032	1321.8±2.08	46.88±0.15
	15	10.2±0.29	0.495±0.019	248.7±2.09	6.58±0.12	1.292±0.030	1372.6±1.95	46.11±0.13
	20	9.10±0.16	0.519±0.031	279.3±1.97	6.85±0.20	1.268±0.021	1505.7±2.96	44.32±0.37
	25	8.22±0.21	0.444±0.025	306.9±2.42	7.06±0.29	1.222±0.038	1609.2±2.45	43.85±0.22

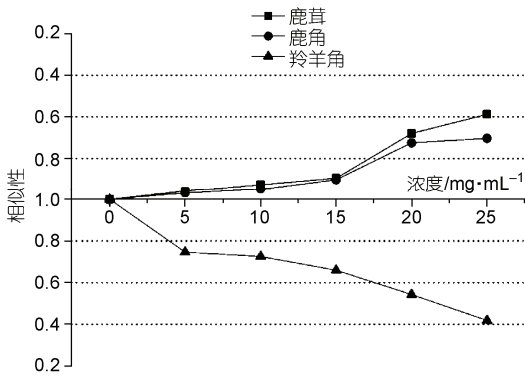


图 3 不同角类动物药影响大肠杆菌生长代谢的热谱曲线与空白样品相似性比较

品为分界线, 鹿茸、鹿角作用于大肠杆菌的生长代谢热谱曲线随着浓度的增加逐渐向 Y 轴靠近, 羚羊角则随着浓度的增加逐渐逼近 X 轴, 即二者呈现不同的变化趋势。

(2) 生物热动力特征参数的提取。上述试验所得到的多个生物热力学参数, 存在评价信息繁多($k_1, P_1, T_1, Q_1, P_2, T_2, Q_2$)、重叠、低质量信息的现象, 不利于直接发掘出规律性的信息。由于各参数信息间有一定相关性, 进而希望找到较少的几个彼此不相关的综合指标以尽可能多地反映原来众多变量的信息。为此, 借助化学计量学中的主成分分析方法, 寻找可用于评价不同样品生物热力学信息的综合指标, 挖掘蕴藏中的生物活性特征信息, 以揭示其内在规律。

采用主成分分析法分别对 3 种动物药作用于大肠杆菌生长代谢后的生物热力学参数 $k_1, P_1, T_1, Q_1, P_2, T_2, Q_2$ 进行计算。鹿茸: 特征值大于 1 的有 3 项, 可以在 96.9% 程度上代表其整体信息; 鹿角: 特征值大于 1 的有 2 项, 可以在 97.6% 程度上代表其整体信息; 二者均可通过 P_2, Q_2 代表其整体信息; 羚羊角特征值大于 1 的有 2 项, 可以在 97.2% 程度上代表其整体信息, 可通过 k_1, T_1 代表其整体信息。三者的得分示意图如图 4 所示。

通过表 2 中的 P_2, Q_2 (鹿茸、鹿角)和 k_1, T_1 (羚羊角)可清楚地反映出 3 种动物药作用于大肠杆菌生长代谢的规律, 如图 5 所示。可以看出, 鹿茸、鹿角随着其浓度值的增加, P_2 及 Q_2 总体出现随着浓度增加而逐渐增大的趋势, 只是在较低浓度时(0~10 mg/mL), 鹿角的 P_2 变化不明显, 鹿茸甚至还出现先下降后上升的异常特征变化; 羚羊角随着其浓度值的增加, k_1 逐渐降低, T_1 从 0 到 5 mg/mL 出现降低的情况, 从 5 mg/mL 后呈现随着其浓度值的增加, T_1 明显延长。进一步将 3 种动物药的浓度值分别与其对应生物热力学特征参数(由主成分分析得到)进行了线性回归分析处理, 结果显示其相关系数均大于 0.96, 提示通过主成分分析得到的生物热力学特征参数与浓度之间有良好的依赖性。

3 讨论与结论

本研究借助生物热力学参数 P_2, Q_2 表征鹿茸、鹿角作用于大肠杆菌的生长代谢热谱曲线, 表现出增

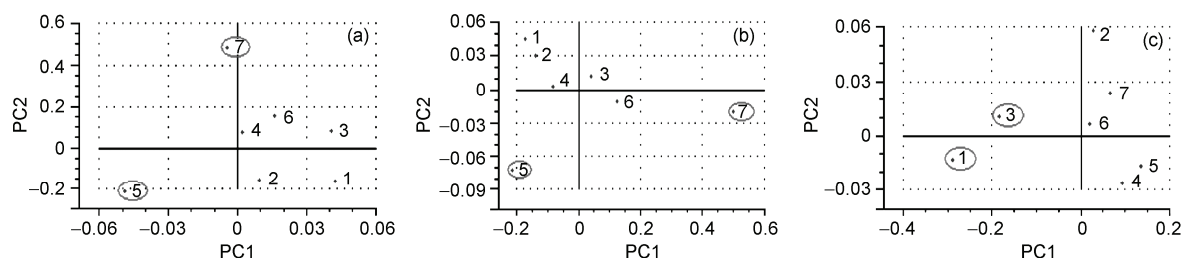


图4 鹿茸(a)、鹿角(b)和羚羊角(c)影响大肠杆菌生长代谢的生物热力学参数主成分分析得分示意图

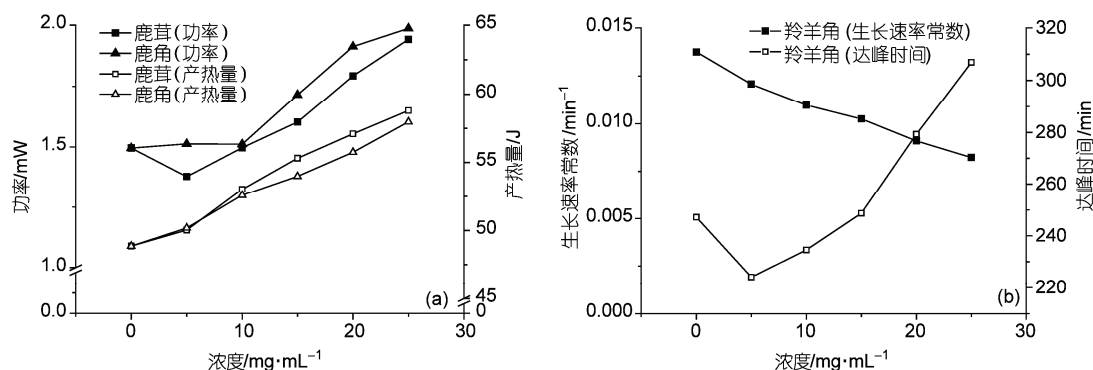


图5 鹿茸、鹿角(a)和羚羊角(b)影响大肠杆菌生长代谢的特征热力学参数与其浓度的关系

加微生物生长代谢过程能量(热量)的作用,这与传统中医药对鹿茸、鹿角功效所描述的“补肾阳、益精血”所蕴含的现代药理作用之兴奋(抗衰老、增强胃肠蠕动)而达到补益的生物活性密切相关。同样地,借助生物热力学特征参数 k_1 、 T_1 表征羚羊角作用于大肠杆菌的生长代谢热谱曲线全貌,提示羚羊角可抑制大肠杆菌的生长代谢过程,延长 T_1 ,延缓微生物的生长代谢过程,生物体系能量(热量)呈现下降趋势(表2),这与传统中医药对羚羊角功效所描述的“平肝息风、清肝明目、凉血解毒”所蕴含的现代药理作用之抑制(解热、镇静、抗惊厥)的生物活性密切相关。

从能量(热量)角度出发,发挥微量量热法可同时测定热谱曲线定性(相似性)和生物热力学特征参数定量(如 k_1 、 T_1 、 P_2 、 Q_2 等)的技术优势,实现了对药物作用于模式生物代谢全过程动态监测的目的,从而为定性定量全面反映药物发挥生物活性的动态过程提供了可能。在以后的研究中,如能结合DNA条码鉴定技术,从遗传信息方面展开对角类动物物种进行分子遗传鉴定,再加上本研究的生物活性辨识与评价方法,便可形成对角类动物药的“品(品种、基原)”与“质(质量、活性)”的综合监控模式,从而为其质量评价提供新的技术支持。

参考文献

- 1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部). 北京: 化学工业出版社, 2005. 225—228
- 2 鄢丹, 肖小河, 金城, 等. 中药质量控制模式与方法的挑战和发展. 中草药, 2006, 37: 806—809
- 3 张贵君, 李晓波, 李仁伟, 等. 常用中药生物鉴定. 北京: 化学工业出版社, 2006. 180—182
- 4 陈军霞, 龚冬梅, 蔡本志, 等. 地龙冻干粉针对家兔血液流变学的作用. 中国药理学通报, 2009, 25: 418—419
- 5 唐松山, 滕达, 王晓华, 等. 一个新的尖吻蝮蛇类凝血酶对血液活性的研究. 徐州医学院学报, 2005, 25: 308—312
- 6 Yan D, Li G, Xiao X H, et al. Direct determination of fourteen underivatized amino acids from *Whitmania pigra* by using liquid chromatography evaporative light scattering detection. J Chromatogr A, 2007, 1138: 301—305
- 7 Kim K S, Choi Y H, Kim K H, et al. Protective and anti-arthritis effects of deer antler aqua-acupuncture (DAA), inhibiting dihydroorotate

- dehydrogenase, on phosphate ions-mediated chondrocyte apoptosis and rat collagen-induced arthritis. *Int Immunopharmacol*, 2004, 4: 963—973
- 8 郭兴华. 益生菌基础与应用. 北京: 北京科学技术出版社, 2002. 7—10
- 9 Yan D, Wei L, Xiao X H, et al. Microcalorimetric investigation of effect of berberine alkaloids from *Coptis chinensis* Franch on intestinal diagnostic flora growth. *Chinese Sci Bull*, 2009, 54: 369—373
- 10 周丹蕾, 鄢丹, 李宝才, 等. 微量量热法研究天然虫草和人工虫草对大肠杆菌生长代谢的影响. *药学报*. 2009, 44: 640—644
- 11 Lee J, Lee E, Kim D, et al. Studies on absorption, distribution and metabolism of ginseng in humans after oral administration. *J Ethnopharmacol*, 2009, 122: 143—148
- 12 Ministry of Health, Labour & Welfare. Japanese Pharmacopeia, 14th ed. Tokyo: Ministry of Health, Labour & Welfare, 2001. 54—59
- 13 USP 30-NF25. The United States Pharmacopoeia-The National Formulary. Rockville M D. The United States Pharmacopoeial Convention, Inc., 2007. 103
- 14 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部). 北京: 化学工业出版社, 2005
- 15 Yan D, Jin C, Xiao X H, et al. Antimicrobial properties of berberines alkaloids in *Coptis chinensis* Franch by microcalorimetry. *J Biochem Biophys Methods*, 2008, 70: 845—849
- 16 Yan D, Xiao X H, Jin C, et al. Microcalorimetric investigation of the effect of berberines alkaloids from *Coptis chinensis* Franch on *Staphylococcus aureus* growth. *Sci China Ser B-Chem*, 2008, 51: 640—645
- 17 Katarzyna L, Bartłomiej P, Jerzy D. Microcalorimetry as a possible tool for phenanthrene toxicity evaluation to eukaryotic cells. *Thermochim Acta*, 2004, 411: 181—186
- 18 Liu G S, Liu Y, Chen X D, et al. Study on interaction between T4 phage and *Escherichia coli* B by microcalorimetric method. *J Virol Methods*, 2003, 112: 137—143
- 19 Chen Y, Zhu S B, Xie M Y, et al. Quality control and original discrimination of *Ganoderma lucidum* based on high performance liquid chromatographic fingerprints and combined chemometrics methods. *Anal Chim Acta*, 2008, 623: 146—156
- 20 谢培山. 中药色谱指纹图谱. 北京: 人民卫生出版社, 2005. 32
- 21 Bevilacqua C J, Damberg R G, Fergusson A J, et al. Varietal discrimination of Australian wines by means of midinfrared spectroscopy and multivariate analysis. *Anal Chim Acta*, 2008, 621: 19—23
- 22 Ho C B, Wu D D. Online banking performance evaluation using data envelopment analysis and principal component analysis. *Comput Oper Res*, 2009, 36: 1835—1842
- 23 Kong W J, Wang J B, Jin C, et al. Effect of emodin on *Candida albicans* growth investigated by microcalorimetry combined with chemometric analysis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 83: 1183
- 24 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. *Thermochim Acta*, 2005, 429: 167
- 25 Wu Y W, Ouyang J, Xiao X H, et al. Antimicrobial properties and toxicity of anthraquinones by microcalorimetric bioassay. *Chin J Chem*, 2006, 24: 45—50
- 26 Li X, Liu Y, Wu J, et al. Microcalorimetric study of *Staphylococcus aureus* growth affected by selenium compounds. *Thermochim Acta*, 2002, 387: 57—61