

用大肠杆菌作为模型体系进行研究中药机理的例子*

曹 宏 威

(香港中文大学生物化学系, 香港)

大肠杆菌的呼吸系统和真核细胞基本上类似。此研究利用大肠杆菌 AW405, 一个半乳糖、木糖和阿拉伯糖的缺失型突变种作为简单的生物模型体系研究中国补药人参对细菌呼吸的影响。实验结果证明人参有刺激呼吸作用, 其加速量与人参的分量有正比关系。无论从饱和单糖实验结果观察抑或从细菌遗传性质考虑, 人参抽提液的作用纯粹起于它能补给养份, 而增长呼吸的解释不能被接受。尤其是在腺三磷酸酶抑制剂存在下, 人参仍能使这简单模型体系显示刺激呼吸的现象, 指出它的特性实际很类似氧化磷酸化的解偶联剂。

中国医药是人类知识的宝库。科学家善于发掘, 善于整理这个知识宝库, 不仅有助于防治疾病, 保证人类健康; 而且对科学研究: 化学体与生物体(包括生物大分子)间互相作用的规律, 也提供非常广博而有效的化学探试分子。

五加科植物人参, 为我国民间通用的补药, 其功能包括大补元气, 益血生津, 宁神益智。近年国内外学者对人参的研究颇为活跃。它的化学成分, 经柴田承二等多年研究, 发现为含有多种人参苷的混合物^[1,2]。用人参抽提液喂食白鼠, 可增加动物的水上挣扎生存时间^[3]。在生化作用上, 人参抽提液使神经生长因子添加威力^[4]; 使鼠肝葡萄糖代谢量升值^[5], 在蛋白和核糖核酸合成过程中俱表现出明显的增长作用^[6,7]。基于这些分散的现象, 可以概括认识到人参抽提液对生命过程有肯定而有效的刺激作用。这个普遍而广泛的刺激效应极有可能和生物体的每个单元(如细胞)的一个广谱的生理现象(如能量传递或膜透性改变)有关。要进行这类机理的探索, 需要一个既简单而又为科学界明确瞭解的模型体系作为起点着手研究。

大肠杆菌由于易培养, 繁殖时间短, 而且有关它的生化和遗传知识较丰富, 成为生物模型体系中一个广泛地被用作研究的对象。在国外, 用微生物作机制性的研究也不少: 利用微生物的朴素趋化性, 研究原始感觉的传递机制^[8,9]; 利用多头绒泡菌不同种类间的融合性研究移植的组织相容性原理^[10]; 利用药物对细菌的诱导突变检验该药物的致癌强度^[11,12]等等, 分别从不同角度观察探索, 增加人类对生命机理的认识。

从细胞个体的观点出发, 大肠杆菌有完整的电子传递体系, 其结构被认为与真核细胞的体系相似^[13], 所以用大肠杆菌作为一个生物模型体系, 去研究对生物氧化有影响的药物药理, 颇值一试。这篇文章, 是我室应用大肠杆菌作为研究人参对呼吸影响的一些初步机理的研究。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

AW405 (大肠杆菌 K12, 为半乳糖、木糖、阿

本文于 1980 年 8 月 25 日收到。

* 本校中药研究组支持经费, 袁莎菲参与工作。谨此致谢。

拉伯糖的缺失型), 遗传性质包括 (国际标记法: gal⁻, gal⁻², thr, leu, his⁻⁴, thi, lac, xyl, ara, str^{-r}, tonA^{-r}, tsr^{-r})^[14]。

(二) 培养基及试液

培养菌种所有器皿俱先经高压高温消毒。胰化豚肉汁含 1% 美国 Difco 公司 Bacto-胰化豚肉晶。呼吸量测试液含 10⁻²M 磷酸钾缓冲液, 10⁻⁴M 乙底酸, pH 调至 7.0。此试液原用于细菌趋化性研究^[15], 它对细菌趋化性能 (一个较易受破坏的生理现象) 无害, 故选用; 加进乙底酸, 以保证任何存在的微量双价金属离子, 不会对呼吸测试造成抑制作用。

(三) 试剂

糖类购自美国 Ohio 州 ICN 药厂, 二环己基碳二亚胺 (DCCD) 购自美国 Sigma 公司; 其它化学药品皆为试剂级。

两种不同来源人参的抽提液俱有使用。其一为天津中央制药厂出品的“松树牌”人参精液; 另一为香港市面上出售的南朝鲜产品 (商品名为韩国高丽人参精), 研究以后者 (因无附加化学品) 为主, 但两者作用基本一致。取 100 毫克人参粉, 于 100 毫升蒸馏水中煮 3 小时, 沉淀物先后用离心机及微孔滤膜分离, 药液可置 4℃ 冷藏保存, 通常使用期不超过 1 个月。浓度表示法以原人参粉重量换算: 100 毫克/毫升即该抽提液取自每毫升含 100 毫克人参粉, 经正常抽提处理并分离所得的药液。

(四) 测定呼吸量

接种小量曾先适应于胰化豚肉汁生长的 AW405 菌种于鲜肉汁内, 置于 37℃ 旋转摇荡槽中生长至细菌对数生长期, 用离心机收取 (8,000g, 4℃ 及 10 分钟), 经呼吸量测试液两次离心冲洗, 细菌稀释至约每毫升 10⁹ 细菌, 置 4℃ 冰冻中待用。呼吸量用美国 Ohio 州 Yellow Spring 公司出品之 Clark 式呼吸测定计测量。校正准则以空气饱和蒸馏水等如每毫升含 5 微升氧气计算。

实验结果

人参抽提液有促进细菌呼吸作用 (图 1)。在测试范围内, 细菌呼吸大致上与药液浓度成正比。最低有效阈约在 10⁻¹ 毫

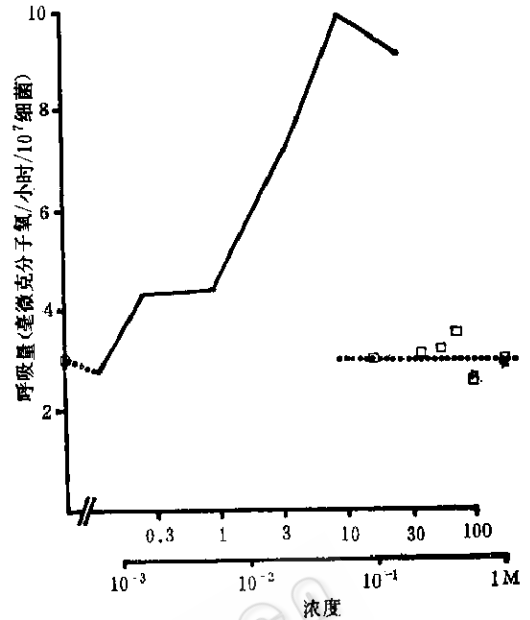


图 1 人参及单糖对大肠杆菌呼吸的影响

横轴有上下两线, 上线为人参抽提液浓度: 此浓度以每毫升蒸馏水所抽提的人参粉重量 (毫克) 作表示数值 (见材料和方法)。横轴下线以克分子浓度表示单糖的浓度。

假设人参粉纯粹含有己糖, 且全溶于水 (实际不是, 此处用作极端例子以否定人参的刺激作用由糖分子引起), 则其相对应的“糖”浓度可由横轴下线查出。

实线为人参对细菌呼吸的作用。□与★分别代表 D-葡萄糖及 L-鼠李糖; L-阿拉伯糖与 D-木糖的结果也相同, 没有列入。

克/毫升浓度间。在新生细菌, 营养饱和和情况下, 4 类单糖: L-阿拉伯糖、L-鼠李糖、D-葡萄糖及 D-木糖均无显著的刺激呼吸作用。

抽提液既为一混合物体, 而且人参苷可被化学作用或细菌所分解, 容易产生糖苷配基与单糖^[2, 16, 17]。释放出来的糖类, 能供细菌繁殖、呼吸, 作为生长碳源。为了证明人参的刺激呼吸作用并非源自碳源, 添加 4 类单糖作为对照, 结果证明呼吸增值不是因碳源所致。而且, 结合细菌的已知遗传特性, AW405 是木糖与阿拉伯糖的缺失突变种, 不能消化木糖与阿拉伯糖。可以确定人参中刺激呼吸的因素并非由于药液中含有糖养料的缘故。

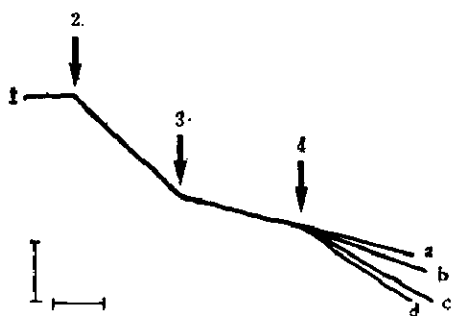


图2 人参抽提液的解偶联作用

图中分别表示大肠杆菌在不同化学药物处理的呼吸作用。直轴表示氧量 250 毫微克 ($10^{-9}g$) 分子; 横轴表示时间 10 分钟。(1)放进呼吸量测试液(加 $10^{-4}M$ 葡萄糖), 呼吸量为 0 (单位为 10^7 细菌每小时毫微克分子氧数量, 后从略); (2)放入细菌, 呼吸量为 33.5; (3)加入二环己基碳二亚胺 ($2.5 \times 10^{-4}M$), 3.06 及 (4) 注入人参, 使药液浓度分别为 (a) 1.2, (b) 3.6, (d) 12 和 (c) 35 毫克/毫升, 其相对应的呼吸量为 (a) 4.65, (b) 8.65, (d) 17.2 和 (c) 15.3。

细菌呼吸为二环己基碳二亚胺减弱(图2)。二环己基碳二亚胺在大肠杆菌之作用机制有如寡霉素^[18], 与腺苷三磷酸酶复合体之亚基结合, 阻抑磷酸化作用的正常进行^[19]。而大肠杆菌的电子传递体系与真核细胞基本上相似^[13], 磷酸化作用与电子传递体系偶联。一旦磷酸化受阻, 电子传递便减缓。加进人参液可使二环己基碳二亚胺的阻抑作用逆转, 产生最佳反阻抑的抗衡作用的药液浓度为 10 毫克/毫升, 浓度过高反而使抗衡降低。从已知的生物化学特性, 人参抽提液有类似解偶联性质的药性因子存在。

讨 论

利用现有对大肠杆菌的已知生化和遗传知识, 有助于建立和明瞭人参抽提液对增加细胞呼吸的初步机制。在鼠肝的线粒体呼吸实验中以琥珀酸为底物亦有产生同等的刺激作用^[20]。人参增强呼吸的效应, 在被二环己基碳二亚胺的腺苷三磷酸酶作用下仍有效。由于阻抑剂对大肠杆菌呼吸

链的牵制作用主要关键在于磷酸化和电子传递偶联着。所以人参在阻抑剂仍使呼吸增加的一个合理的解释是它产生解偶联作用。在人参促进呼吸的初步生化探讨上, 简单的细菌体系帮助提供了上述有用的资料。至于这个解偶联的机制怎样? 它是不是人参作为大补药的一个必需因素呢? 抑或任何低毒性的解偶联剂俱有一定程度的“滋补”性呢? 皆有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Shibata, S. et al.: *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 14: 595, 1966.
- [2] Nagai, M. et al.: *ibid*, 19: 2349, 1971.
- [3] Saito, H. et al.: *Japan J. Pharmacol.*, 23: 43, 1973.
- [4] Saito, H. et al.: *Japan J. Pharmacol.*, 27: 445, 1977.
- [5] Kang, S. S.: *Korean Ginseng Studies Chemistry Pharmacology*, Vol. 1, Il Hwa Co., Seoul, Korea, 1977, P. 544.
- [6] Oura, H. et al.: *J. Biochem.*, 77: 1057, 1975.
- [7] Oura, H. et al.: *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 19: 453, 1971.
- [8] Adler, J.: *Science (U. S. A.)*, 153: 708, 1966.
- [9] Tso, W. -W. (曹宏威) and J. Adler: *J. Bacteriol.*, 118: 560, 1974.
- [10] Clark, J. and O. R. Collins: *Amer. J. Bot.*, 63: 783, 1976.
- [11] Ames, B. N., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (U. S. A.), 70: 2281, 1973.
- [12] Green, M. H. L. and W. J. Muriel: *Mutat. Res.*, 38: 3, 1976.
- [13] Harold F. M.: *Bacteriol. Rev.*, 36: 172, 1972.
- [14] Hazelbauer, G. L., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.)*, 64: 1300, 1969.
- [15] Adler, J. and B. Templeton: *J. Gen Microbiol.*, 46, 175, 1967.
- [16] Tanaka, O., *Korean J. Ginseng Sci.*, 2: 9, 1977.
- [17] Yosioka, I., et al.: *Tetrahed. Lett.*, 50, 6303, 1966.
- [18] Racker, E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 10: 435, 1963.
- [19] Slater, E. C.: "Methods in Enzymology", (ed by R. W. Estabrook and M. E. Pullman) Acad. Press, N. Y., 1967, p. 48.
- [20] 曹宏威, 待发表。

AN EXAMPLE TO ILLUSTRATE THE USE OF *ESCHERICHIA COLI* AS A MODEL SYSTEM TO STUDY THE MODE OF ACTION OF A CHINESE HERB

Cao Hongwei (Tao Wung-wai)

(Department of Biochemistry, The Chinese University of Hong Kong Shatin, N. T., Hong Kong)

Escherichia coli, possessing a complete set of electron transport system, respire in a similar fashion as that observed in eukaryotes. In this study, *E. coli* AW 405, a gal^- , xyl^- and ara^- mutant was used as a simple biological model system to study the effect of *ginseng*, a Chinese herbal tonic, on the bacterial respiration. It was shown that the presence of *ginseng* enhances the rate of respiration and that this stimulatory effect is *ginseng* concentration-dependent. Neither the

evidence obtained from the studies of the bacterial respiration in saturated solutions of monosaccharides that are common cleavage products from ginsenosides nor from the consideration of the genetics of AW 405 lend support to the possibility that *ginseng* acts like a nutrient. On the other hand, the stimulatory effect observed on this model system after its ATPase inhibition by DCCD, suggests that *ginseng* may in fact uncouples oxidative phosphorylation.