

[文章编号 1000-1182(2004)01-0057-02

# 黄芩对牙髓卍淋单胞菌产丁酸影响的实验研究

李继遥, 汤亚玲, 谭红, 周学东, 张萍

(四川大学口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 通过研究黄芩对牙髓卍淋单胞菌生长代谢的影响, 探讨黄芩治疗牙髓根尖周病的作用机制。方法 采用试管两倍稀释法测定黄芩对牙髓卍淋单胞菌 (*P. e*) 的最小抑菌浓度 (MIC)。采用高效液相色谱仪测定低于 MIC 4 个浓度的黄芩对 *P. e* 产丁酸的影响。结果 黄芩对 *P. e* 的 MIC 为 100 mg/L。随着药物浓度升高, *P. e* 产丁酸量降低, 其值分别为 (3.527 ± 0.009) mg/L, (3.048 ± 0.005) mg/L, (2.490 ± 0.011) mg/L, (2.209 ± 0.016) mg/L。结论 黄芩对 *P. e* 生长、代谢有一定的抑制作用。

[关键词] 黄芩; 牙髓卍淋单胞菌; 丁酸; 高效液相色谱仪

[中图分类号] R780.2 [文献标识码] A

**The Effect of Radix Scutellariae on Butyrate of Porphyromonas endodontalis in vitro** LI Ji-yao, TANG Ya-ling, TAN Hong, ZHOU Xue-dong, ZHANG Ping. (Key Lab. of Oral Biomedical Engineering, Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of Radix Scutellariae on the growth, metabolism of *Porphyromonas endodontalis* (*P. e*), as a preparation for studying the mechanism of Radix Scutellariae in treating pulp and periapical diseases. **Methods** *P. e* was chosen as the experimental bacteria. Radix Scutellariae was extracted by means of reflux with 80% ethanol. The value of MIC of Radix Scutellariae was measured by minute amount serial dilution test, and the production of butyrate was measured by high liquid chromatograph (HPLC). **Results** Radix Scutellariae could inhibit the growth of *P. e*, of which the MIC was 100 mg/L. Following the increase in concentration of Radix Scutellariae, the amount of butyrate decreased to (3.527 ± 0.009) mg/L, (3.048 ± 0.005) mg/L, (2.490 ± 0.011) mg/L, (2.209 ± 0.016) mg/L, respectively ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Radix Scutellariae could inhibit the growth and metabolism of *P. e* and might be an effective agent in treating pulp and periapical diseases.

[Key words] Radix Scutellariae; *porphyromanus endodontics*; butyrate; high performance liquid chromatography

黄芩是传统中药,具有抗病原菌、抗变态反应、抗病毒、抗真菌、抗炎、抗氧化等作用<sup>1</sup>。牙髓卍淋单胞菌 (*Porphyromonas endodontalis*, *P. e*) 是感染根管的优势菌,在牙髓、根尖周围组织病的发生、发展中起着重要的作用。丁酸是 *P. e* 在液体培养基中主要的代谢酸,具有细胞毒性,是 *P. e* 的毒力因子之一<sup>2</sup>。本实验采用高效液相色谱仪 (high performance liquid chromatography, HPLC) 测定黄芩对 *P. e* 产生丁酸量的影响,以探讨黄芩对 *P. e* 的作用机制,为黄芩在治疗牙髓、根尖周围组织病中的应用提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验菌株、试剂与设备

*P. e* (ATCC 35406), 由首都医科大学微生物研究室提供。黄芩,原产地云南,其制备过程是将 100 g 原药粉碎后以 80% 乙醇 800 ml 回流提取 3 h, 过滤,

滤液减压浓缩至浸膏状,得 16.1 g。此过程在四川大学华西医学中心药学院天然药化教研室完成。高效液相色谱仪 (Perkin-Elmer 1022 型, 美国), 色谱柱 (YMC-Tack ODS-A150 × 4.6 mm I.D 型), 丁酸标准品 (Sigma 公司, 美国)。

### 1.2 实验菌株培养

复苏实验菌冻干菌株接种于 BHI 血琼脂平板上, 37 °C 厌氧 (80% N<sub>2</sub>、10% H<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>) 培养 48 h, 染色检查为纯培养物, 再接种于 BHI 琼脂平板上厌氧培养 48 h, 经形态学及生化试验鉴定为纯培养物后, 采用麦氏比浊法用磷酸盐缓冲液 (pH 7.2) 配成细菌混悬液 (10<sup>8</sup> CFU/L) 备用。

### 1.3 最低抑菌浓度的测定

用移液器在 9 支试管中均加入 TPY 液体培养基 2 ml, 再加入不同浓度的黄芩 2 ml (以两倍稀释法依次稀释黄芩的浓度为 1 600 mg/L、800 mg/L、400 mg/L、200 mg/L、100 mg/L、50.0 mg/L、25.0 mg/L、12.5 mg/L), 最后 1 管不加黄芩作对照组, 然后每管加入菌悬液 100 μl, 对照组加入为 2.1 ml。震荡, 37 °C (80% N<sub>2</sub>、10% H<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>) 厌氧培养 48 h。将

[收稿日期 2002-07-04; 修回日期 2003-05-22

[作者简介] 李继遥 (1965-), 女, 四川人, 副教授, 硕士

[通讯作者] 谭红, Tel: 028-85501439

肉眼观察无细菌生长时的最低药物浓度视为其最低抑菌浓度(minimum inhibition concentration, MIC)值。

#### 1.4 黄芩对 *P. e* 产丁酸的影响

选取 MIC 值以下的 4 个浓度的黄芩配置 BHI 液体培养基 2 ml, 细菌混悬液 ( $10^8$  CFU/L) 100  $\mu$ l, 37 (80% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>) 厌氧培养 48 h, 纯化鉴定后静置备用。实验共分为 5 组: 阴性对照组; 黄芩浓度 62.5 mg/L 组; 黄芩浓度 125 mg/L 组; 黄芩浓度 250 mg/L 组; 黄芩浓度 500 mg/L 组。每组 6 个平行管。采用色谱条件: 检测波长 217 nm, 流速 2.0 ml/min, 流动相 18% 0.2 mol/L 磷酸盐甲醇溶液 (磷酸盐 甲醇 = 82 : 18) pH 2.8 的梯度洗脱程序; 柱温 22  $^{\circ}$ C, 采用 3 针法进样, 每次进样量 10  $\mu$ l。用标准品丁酸峰面积 ( $Y$ ) 对标准品丁酸的量 ( $X$ ) 进行回归处理, 建立直线回归方程, 并以此计算 *P. e* 丁酸量。

## 2 结果

### 2.1 标准丁酸样品色谱分析

黄芩对牙髓卟啉单胞菌 MIC 值为 100 mg/L。标准丁酸样品色谱分析见图 1。结果表明, 标准丁酸保留时间范围为 (5.8  $\pm$  0.3) min。线性方程为:

$Y = -0.0587 + 0.1682X, R = 0.9686$ , 线性范围为 1.50 ~ 13.00 mg/L。

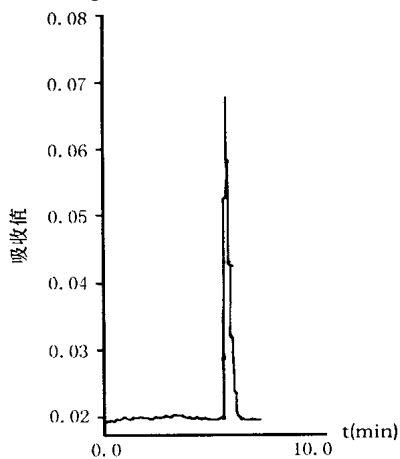


图 1 标准丁酸分离色谱图

Fig 1 The picture of standard butyrate by HPLC

### 2.2 不同浓度黄芩对 *P. e* 产丁酸的影响

不同浓度黄芩组丁酸峰值保留时间一致, 均在 (5.8  $\pm$  0.3) min 范围内, 其丁酸峰面积大小不同。不同浓度黄芩对 *P. e* 产丁酸的影响结果见表 1。从表 1 可见黄芩组 *P. e* 的丁酸含量显著低于阴性对照组 ( $P < 0.05$ )。各浓度黄芩组之间, 随着黄芩浓度的增加, *P. e* 的丁酸量逐渐减少, 且存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。这一结果说明黄芩对 *P. e* 产丁酸有抑制作用且同其浓度成正相关。

按此方法进行了 20 次实验, 结果表明平均回收

率为 92%, 相对标准差 (RSD) 为 1.8%, 重复性实验的变异系数小于 4%。

表 1 不同浓度黄芩对 *P. e* 产丁酸量的影响 ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

Tab 1 The Effect of Huang Qin on butyrate of *Porphyromonas endodontalis* ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

药物浓度(mg/L)	丁酸量(mg/L)	P 值
500.0	2.209 $\pm$ 0.016	< 0.05
250.0	2.490 $\pm$ 0.011	< 0.05
125.0	3.048 $\pm$ 0.005	< 0.05
62.5	3.527 $\pm$ 0.009	< 0.05
0.0	9.747 $\pm$ 0.006	< 0.05

## 3 讨论

黄芩具有安全、无毒副作用, 使用方便, 可以配置成多种剂型等优点。它集消炎、杀菌、清热解毒、安抚于一体, 既可用于治疗又可用于保健, 防治兼顾, 价廉, 同时又取材方便<sup>1</sup>。按古方黄芩在保髓治疗、瘘管型根尖周炎治疗、根管治疗中均取得较好的治疗效果<sup>3,4</sup>, 但作用机制不详。因此, 本实验希望为黄芩在感染根管治疗中进一步的推广应用提供理论基础。

2001 年, 张萍等<sup>5</sup> 采用反相梯度高效液相色谱技术对同时分离的 7 种短链脂肪酸 (甲酸、丁酸、乙酸等) 所需的检测波长、流动相及梯度洗脱程序等条件进行研究, 为本课题采用高效液相色谱技术测定丁酸的量提供了实验分析条件。本课题的检测波长为 217 nm, 流速为 2.0 ml/min, 流动相为 18% 0.2 mol/L 的磷酸盐甲醇溶液 (磷酸盐 甲醇 = 82 : 18), pH 2.8 的梯度洗脱程序, 柱温 22  $^{\circ}$ C。本实验按此条件进行了多次重复实验, 其回收率和重复性均较好。在此条件下得出了丁酸的较理想的分离色谱图。色谱图表明丁酸出峰时间较恒定, 范围为 (5.8  $\pm$  0.3) min; 同本实验采用的 BHI 培养基固有峰之间间隔大于 1 min, 满足进行定量分析时对分离度的要求。本实验黄芩浓度选择低于 MIC, 使得各组 *P. e* 细菌量一致, 从而排除由于 *P. e* 数量的减少而降低丁酸总产量的可能性。实验结果表明, 随着黄芩浓度的增加, *P. e* 产生丁酸的量逐渐减少, 其原因可能是因为黄芩直接降低了 *P. e* 产生丁酸的能力或与丁酸发生化学作用降解了 *P. e* 已产生的丁酸, 有待于进一步研究。

学者们对丁酸的研究首先是从牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *P. g*) 和不解糖卟啉单胞菌 (*Porphyromonas asaccharolyticus*, *P. a*) 开始的。1982 年, Touw 等<sup>6</sup> 研究表明 *P. g* 和 *P. a* 的上清液对培养的上皮细胞具有毒性, 并且认为此毒性作用是由于

(下转第 61 页)

周手术后 1~4 周细胞的增殖活性,结果发现术后 1~2 周细胞增殖活性最高。Herr 等<sup>4</sup> 应用 BrdU 标记的免疫组化技术研究犬牙周手术后牙周膜成纤维细胞的增殖活性,结果术后 1~2 周,缺损区底部有大量的 BrdU 标记细胞,术后 3~4 周有较多的新生结缔组织和牙槽骨形成。本研究探讨了犬牙周术后 1、2、3、4 周牙周成纤维细胞样细胞的增殖活性,结果表明不论是否应用 bFGF 或屏障膜,术后 2 周细胞增殖活性最高,术后 2 周是牙周再生过程中的关键期。

许多体外研究证实了多肽生长因子对牙周膜细胞生长和分化的影响。张韶君等<sup>5</sup> 报道,bFGF 能促进牙周膜细胞的增殖和 DNA 合成及其对根面的附着。葛少华等<sup>6</sup> 报道,bFGF 在促进牙周膜细胞增殖和 DNA 合成的同时能抑制碱性磷酸酶活性和矿化结节的形成。Takayama 等<sup>7</sup> 观察到 bFGF 对牙周膜成纤维细胞的促分裂作用随培养时间的延长而逐渐降低。本实验观察了 bFGF 在动物体内局部应用对牙周成纤维细胞样细胞的影响,结果发现 bFGF 的局部应用可以明显促进早期(术后 1~2 周)伤区细胞增殖,与 GIR 联合应用效果更好。本实验还观察到,术后 3 周牙周创区的细胞增殖活性明显下降,此期牙骨质和牙槽骨开始活跃形成。这表明牙周再生中的细胞生长和分化过程在这一时期已基本完成。基于 GIR 技术凭借屏障膜保护缺损区,防止牙龈结合上皮根向迁移和牙龈结缔组织细胞长入的原理,作者认为屏障膜放置 3 周即可起到 GIR 技术的作用。作者在以前的组织学实验研究也证明了这一点<sup>8</sup>。

伤口愈合是一个很复杂的过程,包括了炎症、肉芽组织形成,新生血管形成以及基质成分的重建。对

于牙周愈合来讲,既包括软组织再生又包括硬组织重建。从本实验可以看到,牙周愈合过程是来源于根方牙周膜或牙槽骨内的细胞不断增殖并向冠方移行分化的结果。牙周组织再生困难的可能原因是缺乏足够的活性细胞,残余的牙周膜及骨组织自身固有修复能力较弱。bFGF 可促进伤区细胞的增殖,并表现出作用于间质细胞的多种生物活性,表明 bFGF 的应用将有益于牙周组织再生。

#### [参考文献]

- 1] Murakami S, Takayama S, Ikezawa K, et al. Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor J. J Periodont Res, 1999, 34(7):425-430.
- 2] Miki Y, Shimabukuro Y, Kitamura M, et al. The effect of application of bFGF on regeneration of the periodontal tissues J. J Dent Res, 1994, 73(2):354.
- 3] Ighaut J, Aukhil I, Simpon DM, et al. Progenitor cell kinetics during guided tissue regeneration in experimental periodontal wounds J. J Periodont Res, 1988, 23(2):107-117.
- 4] Herr Y, Matsuura M, Wen LL, et al. The origin of fibroblasts and their role in the early stages of horizontal furcation defect healing in the beagle dog J. J Periodontol, 1995, 66(3):716-730.
- 5] 张韶君,梁益慧,杨丕山.碱性成纤维细胞生长因子对人牙周膜细胞生长的影响J.上海口腔医学,2001,10(2):135-137.
- 6] 葛少华,杨丕山.碱性成纤维细胞生长因子对牙周细胞生物学活性的影响J.上海口腔医学,2001,10(1):24-26.
- 7] Takayama S, Murakami S, Miki Y, et al. Effects of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells J. J Periodont Res, 1997, 32(8):667-675.
- 8] 宋爱梅,杨丕山,孙钦峰,等.屏障膜放置时间与牙周再生量关系的动物实验研究J.牙体牙髓牙周病学杂志,2001,11(1):17-19.

(本文编辑 王 晴)

(上接第 58 页)

*P. g* 和 *P. a* 的代谢产物丁酸盐造成。1985 年, Grenier 等<sup>7</sup> 开始研究 *P. e*, 指出 *P. e* 产生的丁酸同样对培养的上皮细胞具有毒性。1992 年, Van Winkelhoff 等<sup>2</sup> 认为 *P. e* 产生的丁酸可以抑制各种培养的人上皮细胞生长, 具有较强的毒性, 并将 *P. e* 产生的丁酸作为 *P. e* 的毒力因子之一。结合本实验结果根据黄芩可以减少 *P. e* 产生的丁酸量从而推测其可以减少 *P. e* 在牙髓、根尖周围组织病中的致病性。

*P. e* 的代谢产物是复杂的, 包括正丁酸、乙酸、丙酸、异丁酸、异戊酸。本实验仅对黄芩对丁酸的影响进行分析, 其他代谢产物有待于进一步的研究。

#### [参考文献]

- 1] 高学敏主编. 中药学 M. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 345.

- 2] Van Winkelhoff. *Porphyromonas endodontalis*: Its role in endodontal infections J. J Endod, 1992, 18(9):431-434.
- 3] 缪 莉, 袁祥林. 中西医结合治疗慢性根尖周炎 242 例 J. 实用中西医结合杂志, 1997, 10(5):433.
- 4] 管永煜, 庞荣博. 中药三黄酊糊剂在空管药物疗法中的应用 J. 牙体牙髓牙周病学杂志, 1998, 8(1):28.
- 5] 张 萍, 叶利民, 肖晓蓉, 等. 短链脂肪酸的梯度高效液相色谱法分析研究 J. 华西口腔医学杂志, 2001, 19(5):294-295.
- 6] Touw JJ, van Steenberghe TJ, De Graaff J. Butyrate: A cytotoxin for Vero cells produced by *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides asaccharolyticus* J. Antonie Van Leeuwenhoek, 1982, 48(4):315-322.
- 7] Grenier D, Mayrand D. Cytotoxic effects of culture supernatants of oral bacteria and various organic acids on Vero cells J. Can J Microbiol, 1985, 31(3):322-324.

(本文编辑 王 晴)