

低压静电场对大肠杆菌生长过程的影响

代群威, 董发勤, 邓建军

■背景资料

如何保护人体正常菌群的微生态平衡并进一步利用其来达到治疗部分细菌性疾病成为研究的热点. 相关报道大部分注重于医用抗生素等药物对正常菌群平衡的影响, 而忽视了人类日常生活环境对其带来的影响. 电场对微生物生长影响也主要集中在利用高压、高频电磁场杀菌的研究上, 而未见有关低压静电场对微生物生长的影响研究, 本文就是基于以上两个方面进行试验研究的.

代群威, 董发勤, 西南科技大学环境与资源学院 四川省绵阳市 621010

邓建军, 绵阳市第四人民医院检验科微生物室 四川省绵阳市 621000

代群威, 男, 1978-11-20, 河南省漯河市人, 汉族, 2005年西南科技大学硕士, 讲师, 主要从事环境协调材料及环境医学研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 40072020

通讯作者: 董发勤, 621010, 四川省绵阳市, 西南科技大学环境与资源学院. fqdong@swust.edu.cn

电话: 0816-6089120 传真: 0816-6089124

收稿日期: 2006-01-10 接受日期: 2006-02-08

Effect of low-voltage static electric field on growth of *Esoherichia coli*

Qun-Wei Dai, Fa-Qin Dong, Jian-Jun Deng

Qun-Wei Dai, Fa-Qin Dong, College of Environment and Resources, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, Sichuan Province, China

Jian-Jun Deng, Department of Microbiological Laboratory, the Forth People's Hospital of Mianyang, Mianyang 621000, Sichuan Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 40072020

Correspondence to: Dr. Fa-Qin Dong, College of Environment and Resources, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, Sichuan Province, China. fqdong@swust.edu.cn

Received: 2006-01-10 Accepted: 2006-02-08

Abstract

AIM: To study the influence of static electric field with different intensities on the growth of *Esoherichia coli*.

METHODS: The static electric field of 3 and 24 volt were used upon the big tubes ($\Phi = 30$ mm) in which *E. coli* were cultured. The optical density and bacterial colony numbers were measured during the growth process of *E. coli*. Meanwhile, the morphology of *E. coli* under the action of 24-volt static electric field was observed by scanning electron microscopy (SEM) comparatively analyzed with the control group.

RESULTS: The growth of *E. coli* obviously restrained during the prophase of culturing under the experiment conditions. Stable growth period of *E. coli* was advanced 2 and 4 hours under the

action of static electric fields of 3 and 24 volt, respectively. *E. coli* appeared the second logarithm growth period 6-8 h after the first stable period started. That was the growth remediation of bacteria. And in the experimental conditions, the intensity of static electric field was in inverse relation with the restoring speed of *E. coli*. In addition, the morphological distortion of *E. coli* was found under the SEM.

CONCLUSION: The external low-voltage static electric field has inhibitory effect on the growth of *E. coli*.

Key Words: Static electric field; *Esoherichia coli*; Restraint; Growth remediation

Dai QW, Dong FQ, Deng JJ. Effect of low-voltage static electric field on growth of *Esoherichia coli*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(7):682-686

摘要

目的: 研究不同强度低压静电场对大肠杆菌 (*E. coli*) 生长过程的影响.

方法: 将3 V和24 V两种不同强度低压静电场施加于培养大肠杆菌的大试管($\Phi = 30$ mm), 测量大肠杆菌生长过程中的吸光度 A_{540nm} 及菌落数, 并对24 V静电场作用下8 h的大肠杆菌进行扫描电镜(SEM)观察, 对比其与对照管的菌体形态变化特征.

结果: 大肠杆菌的生长在培养前期受到了明显的抑制. 3 V和24 V静电场作用下大肠杆菌进入稳定生长期的时间分别提前了2 h和4 h, 当第1个稳定生长期持续6-8 h后出现第2次生长, 即出现“生长修复”. 且在试验条件下, 外加静电场越强, 修复速度就越慢. 扫描电镜分析发现了试验条件下大肠杆菌菌体形态出现了一定的变异, 进一步说明了外加低压静电场对大肠杆菌生长存在一定程度的影响作用.

结论: 外加低压静电场对大肠杆菌生长存在一定的抑制作用.

关键词: 静电场; 大肠杆菌; 抑制; 生长修复

代群威, 董发勤, 邓建军. 低压静电场对大肠杆菌生长过程的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(7):682-686
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/682.asp>

0 引言

正常情况下, 人体正常菌群(normal flora)在维持人体与外界平衡, 增加人体免疫力甚至治疗部分疾病等方面起着重要作用^[1-5]. 近年来, 人们在逐步认识人体正常菌群作用的同时, 有关外界环境(如: 过量服用抗生素及外界物理损伤等)对人体微生态平衡影响研究在国内外开始引起重视^[6-9].

电场对微生物影响研究主要集中在脉冲电场上, 包括利用脉冲电场低温杀菌^[10-14]及其在食品灭菌储藏中的应用研究, 弥补高温消毒的弊端^[15-17]; 脉冲电场与磁场, CO₂等其他物理条件协同作用杀菌能够进一步提高杀菌效果^[18-20]; 脉冲电场以及直流电场对微生物生长过程的影响研究及其杀菌机制研究等^[21-30]. 有关静电场对微生物影响研究较少, 且所选静电场主要为高压静电场^[31]. 然而低压静电场对微生物生长的影响, 特别是对人体正常菌群的微生态平衡影响方面研究目前少见报道. 我们对大肠杆菌在低压静电场(low-voltage static electric field)下生长情况进行了研究, 初步探讨了其对大肠杆菌生长的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌(ATCC25922)来自卫生部临床检验中心. 营养肉汤培养基: 牛肉膏5 g, 蛋白胨10 g, NaCl 5 g, 加蒸馏水1 000 mL, 调pH 7.2左右. 营养琼脂培养基: 牛肉膏5 g, 蛋白胨10 g, NaCl 5 g, 琼脂18 g, 加蒸馏水1 000 mL, 调pH 7.2左右. 葡萄糖溶液: 葡萄糖30 g, 加蒸馏水100 mL, 浓度为300 g/L. 以上全部经过高压蒸汽消毒, 备用. LEO S440型扫描电子显微镜; 国产721型分光光度计; 国产DG-410型电热恒温培养箱; 低压静电场3 V, 24 V.

1.2 方法 接种一环*E.coli*菌种于10 mL液体培养基中, 置于36℃培养箱中, 24 h后取出, 作为原菌液备用; 取5 mL的葡萄糖溶液加入到250 mL液体培养基中, 混匀后分装到直径为30 mm的大试管中各30 mL; 在大试管中插入电极并用棉塞塞紧(图1). 在每支试管中加入50 μL的原菌液, 将低压静电场作用管(以下简称试验管)分别接通试验所需电源, 同时做无外加静电场的对照管. 将整个装置置于36℃恒温培养箱中, 每隔

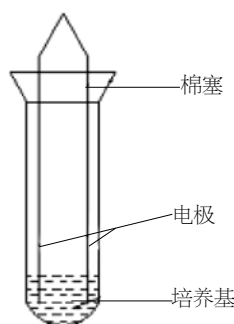


图1 低压静电场作用试验装置.

一定时间各取2 mL菌液(摇匀)测吸光度 A 值, 并用倾注法测菌落数. 测定时以无菌蒸馏水做空白对照, 选用540 nm波长, 用光程为0.5 cm的比色杯, 并将测试结果绘制曲线.

统计学处理 数据用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 采用SPSS 10.0统计软件处理. 试验组与对照组间比较采用 t 检验.

2 结果

2.1 大肠杆菌生长过程 24 V试验管大肠杆菌从6 h处开始细菌悬液的吸光度 A 值基本出现稳定, 证明开始进入“稳定生长期”, 相对正常情况下提前了4 h, 3 V试验管则相对提前了2 h; 另外对照管相对试验管在该时期的 A 值较大, 表现为生长曲线相对较“高”. 试验管整个生长曲线有2个“台阶”, 即2个稳定生长期, 第2台阶开始于24 h处. 可能由于大肠杆菌在实验静电场作用下经过多代生长繁殖, 对外界环境干扰产生了耐受性, 逐渐适应了电流对其生长的抑制作用, 在第1个稳定生长期持续6-8 h后出现第2次生长, 即其生长出现了“反弹现象”, 或者说是“生长修复”. 从菌落数对数曲线可以看出, 与对照相比, 试验管曲线较低且中间出现了波动, 24 V静电场作用下大肠杆菌衰亡期延迟, 电压越大, 修复速度就越慢(表1, 图2).

2.2 扫描电镜下大肠杆菌形态变化 对照样*E.coli*菌体形态均一(SEM×50 000). 24 V静电场作用下, 大肠杆菌出现畸形. 部分大肠杆菌菌体变宽, 中部出现凹陷, 整个菌体变“瘪”, 形态不规则, 呈“哑铃状”; 另有菌体变消长, 其长度为正常菌体的3-4倍. 实验外加低压静电场对大肠杆菌的生长具有明显的影响, 造成了其形态的变化(图3).

3 讨论

细菌固体成分的50%-80%是蛋白质, 细菌蛋白

■研发前沿

探讨利用高频、高压脉冲电场及静电场的杀菌效果, 目的是实现低温下杀菌, 为食品、医药等行业提供更有效的低温灭菌手段. 人体正常菌群的微生态平衡与人体健康之间的关系, 医用药物对人体正常菌群的微生态平衡的影响以及对其的防护等为当前研究热点.

■创新盘点

本文首次采用内置电极法模拟低压静电场, 人体安全电压(3 V和24 V)对人体正常菌株——大肠杆菌的生长过程影响进行了研究, 不同于其他有关的高频、高压电磁场与微生物相互作用的研究报道。

表 1 大肠杆菌在不同环境下生长情况比较 (mean \pm SD, $n = 3$)

取样时间 (h)	A_{540nm}			ΔA_{540nm}			菌落数 (10^9 CFU/L)		
	3 V	24 V	对照	3 V	24 V	对照	3 V	24 V	对照
0	0.095 \pm 0.001	0.095 \pm 0.001	0.095 \pm 0.001	0	0	0	5.0 \pm 1.0	5.0 \pm 1.0	5.0 \pm 1.0
4	0.226 \pm 0.002 ^b	0.257 \pm 0.003 ^b	0.220 \pm 0.001 ^b	0.131 \pm 0.001 ^b	0.162 \pm 0.002 ^b	0.125 \pm 0.001 ^b	1.2 $\times 10^2 \pm 6.0^b$	8.7 $\times 10^1 \pm 2.0^b$	8.0 $\times 10^1 \pm 5.0^b$
6	0.442 \pm 0.001 ^b	0.472 \pm 0.002 ^b	0.464 \pm 0.002 ^b	0.216 \pm 0.001 ^b	0.215 \pm 0.001 ^b	0.244 \pm 0.001 ^b	5.6 $\times 10^2 \pm 14.0^b$	4.0 $\times 10^2 \pm 8.0^b$	1.2 $\times 10^3 \pm 15.0^b$
8	0.475 \pm 0.003 ^b	0.480 \pm 0.002 ^b	0.568 \pm 0.001 ^b	0.033 \pm 0.002 ^b	0.008 \pm 0.001 ^b	0.104 \pm 0.001 ^b	3.0 $\times 10^3 \pm 11.0^b$	1.8 $\times 10^3 \pm 17.0^b$	5.0 $\times 10^3 \pm 10.0^b$
10	0.480 \pm 0.002 ^b	0.492 \pm 0.002 ^b	0.600 \pm 0.001 ^b	0.005 \pm 0.001 ^b	0.012 \pm 0.001 ^b	0.032 \pm 0.001 ^b	5.0 $\times 10^2 \pm 13.0^b$	1.0 $\times 10^3 \pm 15.0^b$	7.5 $\times 10^3 \pm 17.0^b$
12	0.510 \pm 0.001 ^a	0.505 \pm 0.003 ^b	0.602 \pm 0.002 ^b	0.030 \pm 0.001 ^b	0.013 \pm 0.001 ^b	0.002 \pm 0.001 ^b	3.8 $\times 10^3 \pm 23.0^b$	5.0 $\times 10^2 \pm 15.0^b$	1.0 $\times 10^4 \pm 35.0^b$
14	0.512 \pm 0.002 ^a	0.517 \pm 0.002 ^b	0.615 \pm 0.002 ^b	0.002 \pm 0.001 ^b	0.012 \pm 0.001 ^b	0.013 \pm 0.001 ^b	4.5 $\times 10^3 \pm 21.0^b$	2.0 $\times 10^3 \pm 14.0^b$	8.0 $\times 10^3 \pm 13.0^b$
24	0.587 \pm 0.002 ^a	0.580 \pm 0.002 ^b	0.622 \pm 0.001 ^b	0.075 \pm 0.001 ^b	0.063 \pm 0.001 ^b	0.007 \pm 0.001 ^b	1.3 $\times 10^3 \pm 15.0^b$	4.8 $\times 10^3 \pm 26.0^b$	1.5 $\times 10^3 \pm 19.0^b$
36	0.585 \pm 0.001 ^b	0.590 \pm 0.002 ^b	0.650 \pm 0.002 ^b	-0.002 \pm 0.001 ^b	0.010 \pm 0.001 ^b	0.028 \pm 0.001 ^b	2.0 $\times 10^2 \pm 8.0^b$	5.5 $\times 10^2 \pm 7.0^b$	2.5 $\times 10^2 \pm 14.0^b$

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组。

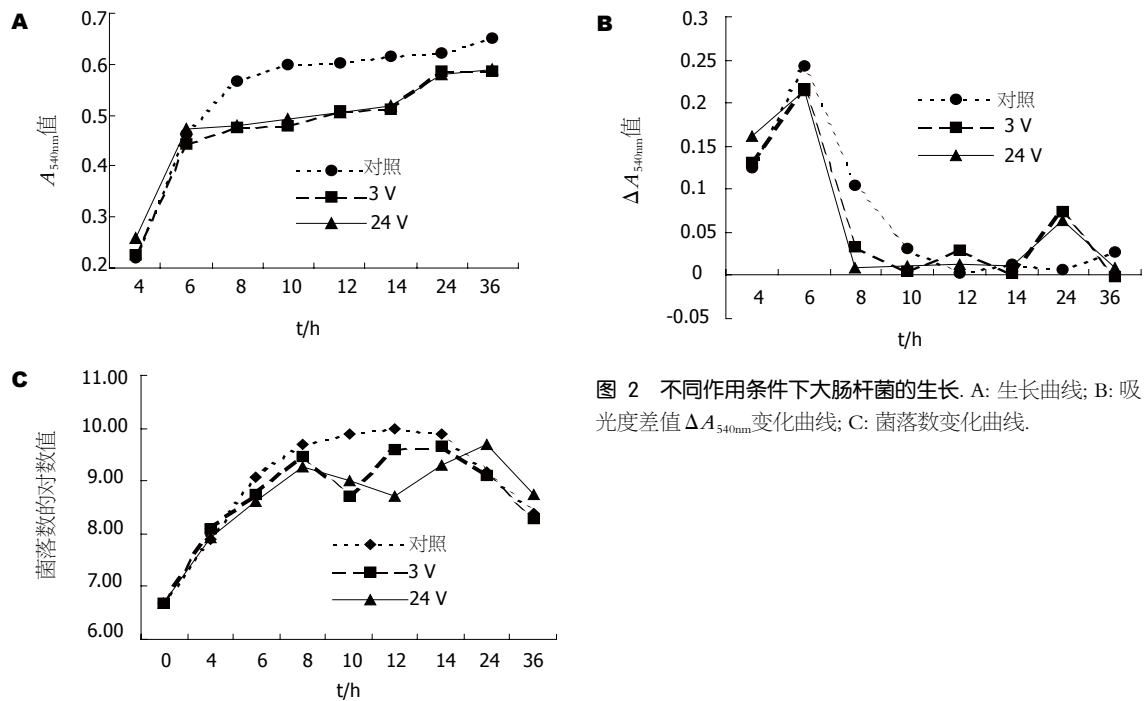


图 2 不同作用条件下大肠杆菌的生长。A: 生长曲线; B: 吸光度差值 ΔA_{540nm} 变化曲线; C: 菌落数变化曲线。



图 3 正常条件和24 V静电场作用下*E. coli*生长8 h的SEM照片 ($\times 50\ 000$)。A: 正常条件下; B, C: 24 V静电场作用下。

质和其他蛋白质一样, 由多种氨基酸组成, 是一种两性离子, 具有两性游离性质, 在溶液中可电离成带负电荷的羧基(COO^-)和带正电荷的氨基(NH_3^+), 氨基酸的电离与溶液的pH值有关。即当细菌所处的环境pH高于等电点时, 带正电。溶液

的pH 2-5之间时细菌处于等电点, 通常细菌所处的环境呈弱碱性(pH 7.2-7.6), 因此细菌带负电荷。在实验外加低压静电场的作用下, 电极周围形成静电场, 改变了菌体正常生长环境下的原有“电位差”, 从而打破了细胞内外的离子

浓度平衡状况, 也就影响到细菌的生长. 另外, 直流电场作用胶体除了使带电离子产生电泳外, 还会使悬浮粒子的均匀媒质(如水)产生电渗. 因为蛋白质中羧基电解会产生 H^+ , H^+ 被水分子包围, 形成水合离子并向阴极移动, 使阴极附近的水分增多, 阳极的水分减少. 含水量的变化将影响生物功能.

由于大肠杆菌菌体本身带负电荷, 要顺着电场方向移动, 即向电极方向移动, 而由于电极的水分减少会使菌体水分部分渗出, 造成细菌细胞的“塌陷”变瘪. 从而给细菌带来一定的损伤甚至是破坏, 一定程度上抑制了细菌的生长, 这种抑制作用在细菌培养后期减弱, 出现了“生长修复”现象. 也可能是外加静电场影响细菌菌体内一些酶的生成或活力, 从而抑制了大肠杆菌的生长. 其中具体作用机制还有待进一步研究. 这对一些细菌性疾病的临床治疗以及探讨外部环境对人体内正常菌群平衡的影响方面都具有一定的参考价值, 同时也为微生物物理学方面的研究提供了一些理论依据.

4 参考文献

- Guarner F. The intestinal flora in inflammatory bowel disease: normal or abnormal? *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 414-418
- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5721-5732
- Karlsson H, Hessel C, Rudin A. Innate immune responses of human neonatal cells to bacteria from the normal gastrointestinal flora. *Infect Immun* 2002; 70: 6688-6696
- Reid G, Beuerman D, Heinemann C, Bruce AW. Probiotic *Lactobacillus* dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001; 32: 37-41
- Yoshimura T, Okamura H. Short term oral estriol treatment restores normal premenopausal vaginal flora to elderly women. *Maturitas* 2001; 39: 253-257
- Gemensky-Metzler AJ, Wilkie DA, Kowalski JJ, Schmall LM, Willis AM, Yamagata M. Changes in bacterial and fungal ocular flora of clinically normal horses following experimental application of topical antimicrobial or antimicrobial-corticosteroid ophthalmic preparations. *Am J Vet Res* 2005; 66: 800-811
- Seppala H, Al-Juhaish M, Jarvinen H, Laitinen R, Huovinen P. Effect of prophylactic antibiotics on antimicrobial resistance of viridans streptococci in the normal flora of cataract surgery patients. *J Cataract Refract Surg* 2004; 30: 307-315
- Acar JF. A comparison of side effects of levofloxacin to other agents concerning the ecological and microbiological effects on normal human flora. *Chemotherapy* 2001; 47: 15-23
- Erdogan H, Kemal M, Toker MI, Topalkara A, Bakici Z. Effect of frequent-replacement contact lenses on normal conjunctival flora. *CLAO J* 2002; 28: 94-95
- Garcia D, Gomez N, Manas P, Condon S, Raso J, Pagan R. Occurrence of sublethal injury after pulsed electric fields depending on the micro-organism, the treatment medium pH and the intensity of the treatment investigated. *J Appl Microbiol* 2005; 99: 94-104
- Aronsson K, Ronner U, Borch E. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to membrane permeabilization and subsequent leakage of intracellular compounds due to pulsed electric field processing. *Int J Food Microbiol* 2005; 99: 19-32
- Caubet R, Pedarros-Caubet F, Chu M, Freye E, de Belem Rodrigues M, Moreau JM, Ellison WJ. A radio frequency electric current enhances antibiotic efficacy against bacterial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4662-4664
- Rodrigo D, Barbosa-Canovas GV, Martinez A, Rodrigo M. Weibull distribution function based on an empirical mathematical model for inactivation of *Escherichia coli* by pulsed electric fields. *J Food Prot* 2003; 66: 1007-1012
- Evrendilek GA, Zhang QH. Effects of pH, temperature, and pre-pulsed electric field treatment on pulsed electric field and heat inactivation of *Escherichia coli* O157: H7. *J Food Prot* 2003; 66: 755-759
- Ayhan Z, Zhang QH, Min DB. Effects of pulsed electric field processing and storage on the quality and stability of single-strength orange juice. *J Food Prot* 2002; 65: 1623-1627
- Iu J, Mittal GS, Griffiths MW. Reduction in levels of *Escherichia coli* O157: H7 in apple cider by pulsed electric fields. *J Food Prot* 2001; 64: 964-969
- Evrendilek GA, Zhang QH, Richter ER. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and *Escherichia coli* 8739 in apple juice by pulsed electric fields. *J Food Prot* 1999; 62: 793-796
- Spilimbergo S, Dehghani F, Bertuccio A, Foster NR. Inactivation of bacteria and spores by pulse electric field and high pressure CO₂ at low temperature. *Biotechnol Bioeng* 2003; 82: 118-125
- Unal R, Kim JG, Yousef AE. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, and *Lactobacillus leichmannii* by combinations of ozone and pulsed electric field. *J Food Prot* 2001; 64: 777-782
- McCann J, Dietrich F, Rafferty C. The genotoxic potential of electric and magnetic fields: an update. *Mutat Res* 1998; 411: 45-86
- Liu Z, Chen W, Papadopoulos KD. Electrokinetic movement of *Escherichia coli* in capillaries. *Environ Microbiol* 1999; 1: 99-102
- Shiina S, Ohshima T, Sato M. Extracellular release of recombinant alpha-amylase from *Escherichia coli* using pulsed electric field. *Biotechnol Prog* 2004; 20: 1528-1533
- Ohshima T, Hama Y, Sato M. Releasing profiles of gene products from recombinant *Escherichia coli* in a high-voltage pulsed electric field. *Biochem Eng J* 2000; 5: 149-155
- Suleymanoglu E. Electorelease of *Escherichia coli* nucleoids. *Folia Microbiol (Praha)* 2002; 47: 365-370
- Zrimec A, Jerman I, Lahajnar G. Alternating electric fields stimulate ATP synthesis in *Escherichia coli*. *Cell Mol Biol Lett* 2002; 7: 172-174

■应用要点

本文对模拟低压静电场对大肠杆菌生长过程的影响进行了研究, 并证实外加低压静电场对大肠杆菌生长存在一定的抑制作用, 这对一些细菌性疾病的临床治疗以及维护人体正常菌群的微生态平衡有一定的价值.

■同行评价

课题设计新颖, 合理, 结果可信, 具有一定的科学意义. 对一些细菌性疾病的临床治疗以及探讨外部环境对人体内正常菌群平衡的影响方面具有一定的参考价值, 同时也为微生物物理学方面的研究提供了一些理论依据.

- 26 Vitzthum F, Geiger G, Bisswanger H, Elkin B, Brunner H, Bernhagen J. Amplifiable DNA from gram-negative and gram-positive bacteria by a low strength pulsed electric field method. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: E37
- 27 Oshima T, Sato M. Bacterial sterilization and intracellular protein release by a pulsed electric field. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2004; 90: 113-133
- 28 Aronsson K, Borch E, Stenlof B, Ronner U. Growth of pulsed electric field exposed *Escherichia coli* in relation to inactivation and environmental factors. *Int J Food Microbiol* 2004; 93: 1-10
- 29 Reyns KM, Diels AM, Michiels CW. Generation of bactericidal and mutagenic components by pulsed electric field treatment. *Int J Food Microbiol* 2004; 93: 165-173
- 30 Kermanshahi RK, Sailani MR. Effect of static electric field treatment on multiple antibiotic-resistant pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Immunol Infect* 2005; 38: 394-398
- 31 Umarov GR, Boichenko VS, Umarov MG. Effect of electrostatic field on bacteria *E. coli*. *Aviakosm Ekolog Med* 1999; 33: 61-62

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》

本刊讯 《世界华人消化杂志》为中国科技核心期刊、2003年百种中国杰出学术期刊、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国科技论文统计源期刊,《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》,荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》,俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录。

本刊主要报道食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合等胃肠病学和肝病学的进展及原创性等基础或临床研究的文章。

《世界华人消化杂志》2006年由北京报刊发行局发行,国际标准刊号ISSN 1009-3079,国内统一刊号CN 14-1260/R,邮发代号82-262,出版日期8, 18, 28日,月价72.00,年价864元。欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、各大图书馆订阅。联系地址: 100023 北京市2345信箱,世界胃肠病学杂志社。联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; 网址: www.wjgnet.com。

• 消息 •

专家门诊

本刊讯 《世界华人消化杂志》特设“专家门诊”固定专栏为广大消化病患者搭建一个信息平台,邀请本刊编委为专栏撰稿,每期1-3个专家门诊。写作格式如下:

胃溃疡诊断和治疗

个人简介(附3.5 cm × 5 cm照片一张)

通信作者(包括邮政编码、工作单位、部门、科室、机构全称、地址、所在省市、E-mail)

0 引言; 1 诊断; 2 治疗; 3 特色; 4 门诊时间