

灵芝菌生物转化对何首乌特异质肝毒性的影响

段淇轩¹, 林艳^{1, 2*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南长沙 410208

2. 湘产大宗药材品质评价湖南省重点实验室, 湖南长沙 410208

摘要: 目的 建立灵芝菌与何首乌双向发酵的最佳发酵体系, 并探讨灵芝菌生物转化对何首乌特异质肝毒性的影响。方法 70%乙醇回流提取生何首乌粉末制备何首乌醇提物(PMEE, 二苯乙烯苷质量分数为7.85%); HPLC法检测二苯乙烯苷转化率, 考察底物浓度、发酵温度、转速、瓶装量、接种量、发酵时间6个因素对灵芝菌与PMEE双向发酵体系的影响, 并制备不同二苯乙烯苷转化率的发酵物。采用脂多糖(LPS)制备SD大鼠特异质肝毒性模型, 考察PMEE高、低剂量(以生首乌计2.16、1.08 g·kg⁻¹, 分别为4、2倍临床等效剂量)及灵芝菌转化后PMEE发酵物(二苯乙烯苷的转化率分别为0、50%、75%、100%, 以生首乌计2.16 g·kg⁻¹)的特异质肝毒性, ELISA法检测血清丙氨酸氨基转氨酶(ALT)、天冬氨酸氨基转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)的释放量, HE染色法观察肝脏病理学改变。结果 灵芝菌转化PMEE的最佳发酵条件为发酵温度28℃、摇床转速180 r·min⁻¹、菌种接种量2.5%、培养基瓶装量25%、底物质量浓度19.11 mg·mL⁻¹, 转化时间88~104 h, 二苯乙烯苷转化率与转化时间呈一定的线性关系, 线性方程为 $Y=20.657X-12.959$, $R^2=0.988$ 。与对照组比较, 模型组的ALT、AST、LDH无显著性差异, 提示LPS特异质肝毒性模型造模成功; 与模型组比较, PMEE灵芝菌转化后二苯乙烯苷转化率为75%、100%组ALT、AST、LDH的释放量无显著差异, 其他给药组ALT、AST、LDH释放量均显著升高($P<0.01$), 且ALT、AST、LDH的释放量随二苯乙烯苷含量的减少而减少。与对照组相比, 模型组有少量炎症因子增加, 但无显著性病理学改变, 未见肝损伤现象; PMEE高剂量组出现肝细胞广泛性坏死, 胞核消失, 有许多大小不一的脂滴空泡, 偶有灶性炎症; PMEE低剂量组可见多数汇管区有大量库普弗细胞浸润, 多数肝细胞水肿, 有少量肝细胞胞质内可见小泡性或细颗粒状脂质空泡; PMEE灵芝菌转化组随着二苯乙烯苷含量降低, 肝脏损伤程度也减轻, 二苯乙烯苷转化率为100%组基本上未见肝细胞损伤。

结论 灵芝菌生物转化能降低何首乌特异质肝毒性, 减毒作用与减少何首乌中二苯乙烯苷含量相关。

关键词: 何首乌; 灵芝菌; 特异质肝毒性; 二苯乙烯苷; 生物转化减毒

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)04-0781-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.04.011

Effects of biotransformation of *Ganoderma lucidum* on idiosyncratic hepatotoxicity of *Polygonum multiflorum*DUAN Qixuan¹, LIN Yan^{1, 2}

1. School of Pharmaceutical Science, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Key Laboratory for Quality Evaluation of Bulk Herbs of Hunan Province, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To establish of a fermentation system for *Polygonum multiflorum* Thunb. by *Ganoderma lucidum*, and effects of biotransformation of *G. lucidum* on idiosyncratic hepatotoxicity of *P. multiflorum* was investigated. **Methods** The ethanol extract of *P. multiflorum* (PMEE, mass fraction of stilbene glycoside 7.85%) was prepare by 70% ethanol reflux extraction of raw *P. multiflorum* powder. HPLC method was used to detect the stilbene glycoside conversion rate, and the effects of six factors, including substrate concentration, fermentation temperature, rotational speed, bottled volume, inoculation amount, and fermentation time, on the bidirectional fermentation system of *G. lucidum* and PMEE, and to prepare fermentation products with different stilbene glycoside conversion rates. Using lipopolysaccharide (LPS) to prepare a specific hepatotoxicity model in SD rats, the specific hepatotoxicity of high and low doses of PMEE (calculated as 2.16, 1.08 g·kg⁻¹, respectively, 4 and 2 times the clinical equivalent

收稿日期: 2022-11-23

基金项目: 湖南省卫生健康委科研计划项目(D202313058583); 湖南省大学生创新创业训练计划项目(湘教通【2022】174号; 2924); 湖南中医药大学校级大学生创新创业训练计划项目(X202010541027); 湖南中医药大学校级科研基金项目(2020XJJ020)

*通信作者: 林艳, 博士, 高级实验师, 研究方向为中药毒性物质基础及毒理研究。E-mail: linyan198210@163.com

dose) and PMEE fermented products after transformation by *G. lucidum* (the conversion rates of stilbene glycosides are 0%, 50%, 75%, and 100%, respectively, 2.16 g·kg⁻¹ based on raw *P. multiflorum*) was investigated. The release of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and lactate dehydrogenase (LDH) were detected by ELISA, and the pathological changes of the liver were observed by HE staining. **Results** The optimal fermentation conditions for the transformation of PMEE by *G. lucidum* were fermentation temperature of 28 °C, rotating speed of the shaking table of 180 r·min⁻¹, inoculum inoculation amount of 2.5%, bottled amount of culture medium of 25%, and substrate mass concentration of 19.11 mg·mL⁻¹. There was a linear relationship between the conversion rate of stilbene glycoside and the conversion time within 88 to 104 hours, and the linear equation was $Y = 20.657 X - 12.959$, with a square of correlation coefficient $R^2 = 0.988$. Compared with control group, there was no significant difference in ALT, AST, and LDH in the model group, indicating that the LPS specific hepatotoxicity model was successfully established. Compared with the model group, there was no significant difference in the release of ALT, AST, and LDH of PMEE fermented products after transformation by *G. lucidum* groups (the conversion rates of stilbene glycosides are 0%, 50%, 75%, and 100%), while the release of ALT, AST, and LDH in other treatment groups were significantly increased ($P < 0.01$), and the release of ALT, AST, and LDH decreased with the decrease of stilbene glycoside content. Compared with the control group, there was a small increase in inflammatory factors in the model group, but no significant pathological changes were observed, and no liver injury was observed. In the high dose group of PMEE, extensive necrosis of hepatocytes, disappearance of nuclei, many lipid droplet vacuoles of varying sizes, and occasional focal inflammation were observed. In the low dose group of PMEE, there were a large number of Kupffer cells infiltrating most portal areas, most liver cells were edema, and a small amount of vesicular or granular lipid vacuoles were visible in the cytoplasm of liver cells. With the decrease of the content of stilbene glycoside in the PMEE *G. lucidum* transformation group, the degree of liver damage was also reduced. The group with a stilbene glycoside conversion rate of 100% basically had no liver cell damage. **Conclusion** Biotransformation of *G. lucidum* can reduce heterologous hepatotoxicity of *P. multiflorum*. The toxicity reduction effect is related to reducing the content of stilbene glycosides in *P. multiflorum*.

Key words: *Polygonum multiflorum* Thunb.; *Ganoderma lucidum*; idiosyncratic hepatotoxicity; tetrahydroxystilbene glucoside; biotransformation detoxification

何首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根,生首乌能解毒消痈、润肠通便、截疟;制首乌能补肝肾、益精血、乌须发、化浊降脂。临床研究发现何首乌肝毒性存在显著个体差异,发病率相对较低,但往往在临床治疗剂量,服用较短时间即可发生肝损伤,故而考虑何首乌肝损伤可能是特异质肝损伤。目前,研究者采用内毒素(LPS)免疫敏化动物模型证明何首乌肝毒性为特异质肝毒性^[1-2]。

生物发酵可以利用微生物本身酶体系对中药化学成分进行转化,产生新化学成分或者减少原有化学成分,起到减毒或增效作用。有报道枯草杆菌与何首乌共发酵,能降低何首乌中结合型蒽醌水平^[3]。米根霉能将何首乌中大黄素转化为大黄素吡喃葡萄糖苷,可缓解泻下作用^[4]。

本课题前期研究发现何首乌醇提物(ethanol extract from *P. multiflorum*, PMEE)具有特异质肝毒性,二苯乙烯苷为特异质肝毒性的主要化学成分,并呈现一定的剂量相关性^[5]。灵芝菌能定量转化二苯乙烯苷单体,转化产物为对羟基苯甲醛和2,3,5-三羟基苯甲醛,且体外实验发现二苯乙烯苷转化后毒性减弱^[6]。但是,笔者未见灵芝菌转化PMEE体

内减毒作用研究。为了进一步探讨灵芝菌与PMEE双向发酵的体内减毒作用,本研究通过检测二苯乙烯苷转化率建立灵芝菌与PMEE的最佳发酵体系,采用特异质肝毒性动物模型来考察PMEE及其灵芝菌发酵物的肝毒性,并探讨灵芝菌转化PMEE的减毒作用,以期为何首乌特异质肝毒性的物质基础和炮制减毒提供实验依据。

1 材料

1.1 菌种

灵芝菌,广东省微生物菌种保藏中心,编号为GIM5.250。

1.2 动物

SPF级SD雄性大鼠,6~8周龄,体质量(180±20)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(湘)2016-0002,大鼠实验规范遵循湖南中医药大学实验动物伦理委员会规定并获得批准实施(伦理批号LL2018120608)。大鼠饲养于湖南中医药大学SPF级实验动物中心,使用许可证号SYXK(湘)2013-0005。自由进食及饮水,实验室温度(22±2)°C,湿度60%~80%,人工光照约12 h/12 h明暗周期。

1.3 药物与主要试剂

生何首乌饮片购于长沙高桥大市场,经湖南中医药大学龚力民副教授鉴定为蓼科植物何首乌 *P. multiflorum* Thunb. 的干燥块根;马铃薯葡萄糖琼脂粉、马铃薯葡萄糖和琼脂粉均购于青岛海博生物技术有限公司;二苯乙烯苷(批号 N1103AS,质量分数大于 98%)购于大连美伦生物技术有限公司;LPS(规格 10 mg,批号 L-2880)购于 Sigma 公司;盐酸氯丙嗪购于上海禾丰制药有限公司(批号 20170613);丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)和乳酸脱氢酶(LDH)购于武汉华美生物工程有限公司(批号分别为 CSB-E10082h、CSB-E09603h、CSB-E11324r)。

1.4 主要仪器

CP114 电子分析天平(上海奥豪斯仪器有限公司);RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);LDZX-75KBS 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂);ZSD-1270 真菌培养箱(创博环球生物科技有限公司);LB-85A 双层恒温振荡培养箱(金坛市朗博仪器制造有限公司);Agilent 1260 高效液相色谱系统(PDA 检测器)(安捷伦科技有限公司);Varioskan Flash 酶标仪(Thermo Scientific 公司);DMLB2 双目显微镜(德国 LEICA 公司)。

2 方法与结果

2.1 灵芝菌转化 PMEE 最佳发酵体系建立

2.1.1 二苯乙烯苷对照品溶液的制备 取二苯乙烯苷对照品适量,精密称定,置 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,制得对照品储备液;取一定量对照品储备液用甲醇逐次稀释,得到二苯乙烯苷质量浓度分别为 0.046、0.092、0.184、0.368、0.736、1.472 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液,用于标准曲线。

2.1.2 PMEE 制备 取生何首乌粉末适量,精密称定,分别加入 8、6、6 倍量 70% 乙醇回流提取,提取 3 次,每次 2 h,合并提取液,减压浓缩,冷冻干燥,得 PMEE(采用标准曲线法计算二苯乙烯苷质量分数为 7.85%)。

2.1.3 发酵种子液制备 定量取斜面活化的灵芝菌种转移至装有 50 mL 液体培养基的锥形瓶中,28 °C、180 r·min⁻¹ 培养 3 d,即得。

2.1.4 发酵体系考察及供试品制备 为优化灵芝菌对 PMEE 的双向发酵体系,本研究分别对底物浓度、发酵温度、转速、瓶装量、接种量、发酵时间 6 个因素进行考察,每个因素不同水平样品平行做 3 份,并同时设置空白组,空白组不加菌液,其他条件与

实验组一致。考察 PMEE 底物终质量浓度 6.37、12.74、19.11、25.48、31.85 mg·mL⁻¹(换算成二苯乙烯苷的底物质量浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg·mL⁻¹) 时,发酵温度为 28 °C,转速为 180 r·min⁻¹,瓶装量为 25%,接种量 1.5%,发酵时间为 92 h;考察发酵温度 22、25、28、31、34 °C 时,PMEE 底物终质量浓度为 19.11 mg·mL⁻¹,转速 180 r·min⁻¹,瓶装量 25%,接种量 1.5%,发酵时间 90 h;考察转速 120、150、180、210、240 r·min⁻¹ 时,PMEE 底物终质量浓度为 19.11 mg·mL⁻¹,发酵温度为 28 °C,转速 180 r·min⁻¹,瓶装量 20%,接种量 1.5%,发酵时间 90 h;考察瓶装量 10%、15%、20%、25%、30% 时,PMEE 底物终质量浓度为 19.11 mg·mL⁻¹,发酵温度为 28 °C,转速 180 r·min⁻¹,接种量 1.5%,发酵时间 86 h;考察接种量 0.5%、1.0%、1.5%、2%、2.5%、3.0% 时,PMEE 底物终质量浓度为 19.11 mg·mL⁻¹,发酵温度为 28 °C,转速 180 r·min⁻¹,瓶装量 20%,发酵时间 86 h;考察发酵时间 0、12、24、36、72、80、84、88、92、96、100、104、108、112 h 时,PMEE 底物终质量浓度为 19.11 mg·mL⁻¹,发酵温度为 28 °C,转速 180 r·min⁻¹,瓶装量 20%,接种量 1.5%。

取不同发酵样品 1 500 r·min⁻¹ 离心 10 min,取 1 mL 发酵液上清液,加入 1 mL 的甲醇沉淀蛋白质等杂质,0.22 μm 微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。

2.1.5 高效液相检测条件 色谱柱: Epic-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相: 甲醇(A)-水溶液(B),梯度洗脱(0~12 min, 10%~40% A; 12~20 min, 40%~60% A; 20~27 min, 60%~90% A; 27~30 min, 90%~100% A; 30~40 min, 100% A);体积流量 1 mL·min⁻¹;检测波长 264 nm;柱温 30 °C;进样量 10 μL。

2.1.6 方法学考察

(1) 精密度试验 取同 1 份供试品溶液,在“2.1.5”项色谱条件下连续进样 6 次,以第 1 次进样所得指纹图谱作为对照图谱,计算相似度,其相似度均大于 0.98,表明该方法精密度良好。

(2) 稳定性试验 取同 1 份供试品溶液,在“2.1.5”项色谱条件下,分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样测定,以 0 h 所得指纹图谱为对照,各指纹图谱相似度结果均大于 0.97,表明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

(3) 重复性试验 取 PMEE 底物质量浓度 19.11 mg·mL⁻¹(二苯乙烯苷质量浓度 1.5 mg·mL⁻¹)、发酵温度 28 °C、转速 180 r·min⁻¹、瓶装量 30%、接种量

2.5%、发酵时间 96 h 的样品,按“2.1.4”项方法重复制备供试品溶液 6 份,进行指纹图谱测定,其指纹图谱相似度均大于 0.99,表明本方法重复性良好。

(4) 专属性考察 二苯乙烯苷对照品、PMEE、灵芝菌转化 PMEE 色谱图见图 1。

(5) 二苯乙烯苷线性关系考察 取一定量的二苯乙烯苷对照品溶液,在“2.1.5”项色谱条件下,记录相应的峰面积,以峰面积为纵坐标,对照品质量浓度为横坐标,绘制标准曲线并进行回归计算。二苯乙烯苷的回归方程为 $Y=4\ 900.3 X+7.8761$, $r=0.999$,在 $0.046\sim 1.472\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 线性关系良好。

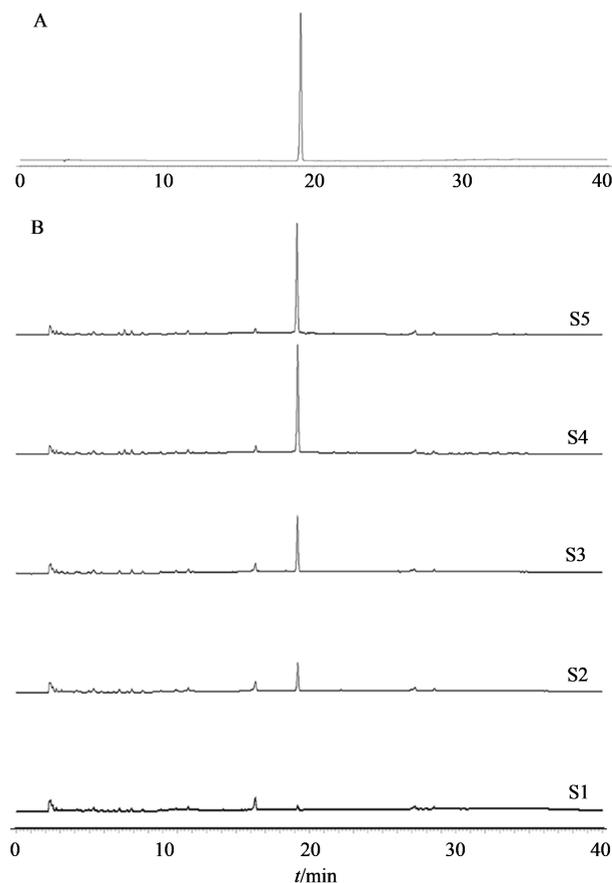
(6) 二苯乙烯苷回收率试验 PDA 液体培养基中加入适量二苯乙烯苷,使二苯乙烯苷的质量浓度为 $1.5\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,按“2.1.4”项方法制备供试品,在“2.1.5”项色谱条件下测得二苯乙烯苷的峰面积,根据标准曲线的回归方程计算出二苯乙烯苷的量,平行测定 3 份,测得平均回收率为 98.5%,RSD 为 0.76%。

2.1.7 样品测定及转化率计算 分别测定各发酵样品及空白组样品中二苯乙烯苷的峰面积,计算转化率。

$$\text{转化率} = (\Delta A_{\text{样品}} - \Delta A_{\text{空白}}) / A_{\text{转化前样品}}$$

$\Delta A_{\text{样品}}$ 表示样品转化前后二苯乙烯苷峰面积变化量; $\Delta A_{\text{空白}}$ 表示空白组样品转化前后二苯乙烯苷峰面积变化量

从图 2 可以看出,灵芝菌转化 PMEE 的最佳发酵条件为:取适量 PMEE 使马铃薯葡萄糖液体培养基底物质量浓度为 $19.11\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,瓶装量为 25% 分装到摇瓶中,接种量 2.5% 接种灵芝菌发酵种子液,在温度 $28\ ^\circ\text{C}$ 、转速 $180\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 进行培养,在 $88\sim 104\ \text{h}$ 转化率呈一定的线性关系,线性方程为 $Y=20.657 X-12.959$



A-二苯乙烯苷对照品;B-PMEE(S5),二苯乙烯苷的转化率分别为 0(S4)、50%(S3)、75%(S2)、100%(S1)的灵芝菌转化后 PMEE A-tetrahydroxystilbene glucoside; B-PMEE(S5), conversion rates of stilbene glycosides were 0 (S4), 50% (S3), 75% (S2), and 100% (S1) of PMEE transformed by *G. lucidum*

图 1 PMEE 与灵芝双向发酵物 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC spectra of PMEE and fermentation samples

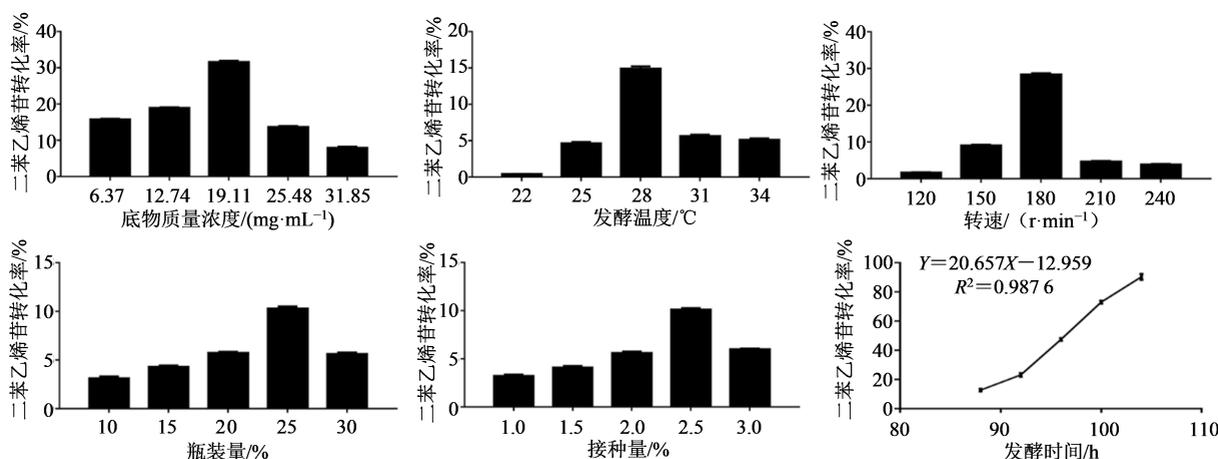


图 2 底物浓度、发酵温度、摇床转速、瓶装量、接种量和发酵时间对二苯乙烯苷转化率的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Effects of substrate concentration, fermentation temperature, rotation speed, bottle amount, inoculation ratio, fermentation duration on conversion efficiency ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

12.959, $R^2=0.988$, 104 h后二苯乙烯苷的转化率达到90%以上, 112 h PMEE中二苯乙烯苷能转化完全, 发酵液变得乌黑透亮, 有明显的菌香味。此结果表明在88~104 h内, 灵芝菌能定量转化PMEE中二苯乙烯苷。

2.2 灵芝菌转化后含不同二苯乙烯苷浓度PMEE发酵物的制备

PMEE与灵芝菌在最佳的发酵条件下双向发酵, HPLC法动态监测, 当二苯乙烯苷的转化率分别为0%、50%、75%、100%时(图1中S4、S3、S2、S1), 取出, 浓缩并冷冻干燥, 备用。

2.3 灵芝菌转化后含不同浓度二苯乙烯苷PMEE肝毒性研究

2.3.1 动物分组与给药 将SD雄性大鼠按照体质量随机分为9组, 即对照组, 模型(LPS, $2.8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组, 氯丙嗪(阳性药, $10.4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组, LPS($2.8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) + PMEE高、低剂量(以生首乌计 2.16 、 $1.08 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 分别为4.2倍临床等效剂量^[1])组, LPS($2.8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) + 灵芝菌转化后PMEE发酵物二苯乙烯苷转化率为0%、50%、75%、100%(S4、S3、S2、S1)组(以生首乌计 $2.16 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 每组8只。对照组及模型组连续15 d ig生理盐水, 其他组ig药物($5 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$), 模型组及LPS+药物组于每天给药后4 h注射LPS^[1], 连续15 d。

2.3.2 对大鼠血清ALT、AST、LDH的影响 末次给药后次日, 采用促凝采血管进行腹主动脉取血后处死, 血样静置1 h后, $3000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min取上清, 按ELISA试剂盒测定血清中ALT、AST、LDH的水平。

如图3所示, 与对照组比较, 模型组的ALT、AST、LDH无显著性差异, LPS造模后, 不会影响ALT、AST、LDH的释放量, 提示LPS特异质肝毒性模型造模成功。与模型组比较, PMEE灵芝菌转化后二苯乙烯苷转化率为75%、100%(S2、S1)组ALT、AST、LDH的释放量无显著差异。与模型组比较, 其他给药组ALT、AST、LDH释放量均显著升高($P<0.01$), 且ALT、AST、LDH的释放量随二苯乙烯苷含量的减少而减少, 提示灵芝菌生物转化何首乌能起到减毒作用。

2.3.3 对肝脏病理形态的影响 大鼠肝组织称质量后取组织 $1.5 \text{ cm}\times 1.0 \text{ cm}\times 0.5 \text{ cm}$, 于10%甲醛中固定。病理切片HE染色的制作由湖南中医药大学中西医结合学院心脏病理防治湖南省重点实验室完成。

如图4所示, 与对照组相比, 模型组有少量炎症因子增加, 但无显著性病理学改变, 未见肝损伤现象。PMEE高剂量组出现肝细胞广泛性坏死, 胞核消失, 有许多大小不一的脂滴空泡, 偶有灶性炎症。PMEE低剂量组可见多数汇管区有大量库普弗细胞浸润, 多数肝细胞水肿, 有少量肝细胞胞质内可见小泡性或细颗粒状脂质空泡。PMEE灵芝菌转化组随着二苯乙烯苷含量降低, 肝脏损伤程度也减轻, 二苯乙烯苷转化率为100%组基本上未见肝细胞损伤。肝脏组织病理切片结果表明何首乌特异质肝毒性与二苯乙烯苷的含量呈现一定剂量相关性, 灵芝菌转化能起到减毒作用。

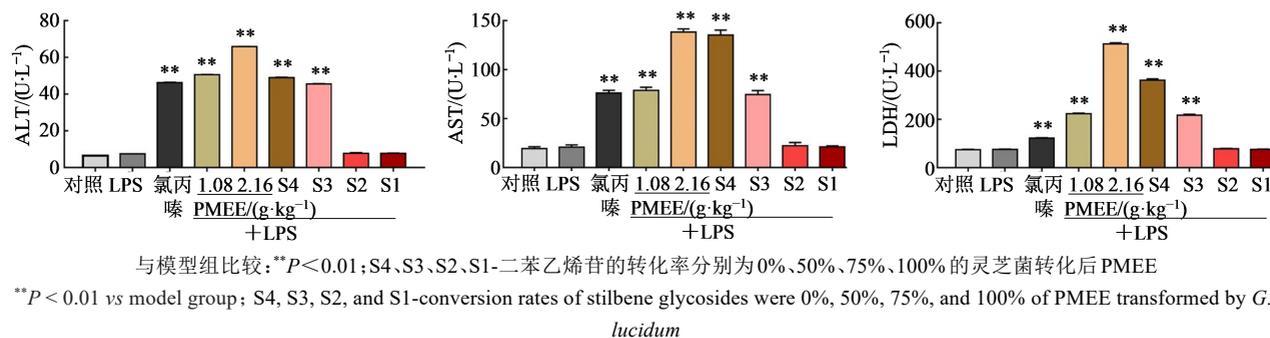


图3 不同药物组血清中ALT、AST、LDH水平变化($\bar{x}\pm s, n=8$)

Fig. 3 Changes of serum ALT, AST, and LDH levels in different drug groups ($\bar{x}\pm s, n=8$)

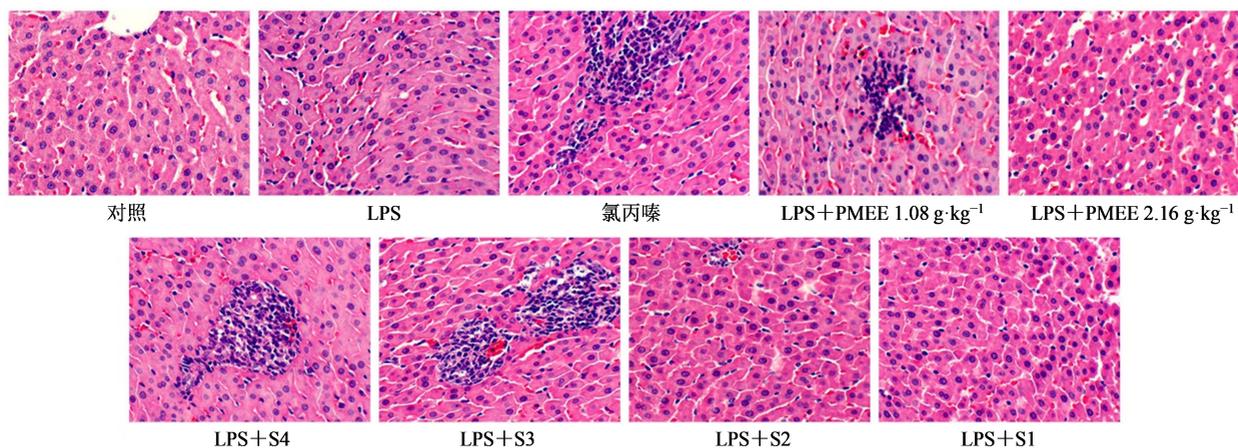
2.4 统计学处理

采用SPSS 22.0软件处理数据, 结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA); 当方差齐性时采用LSD检查, 方差不齐时采用Dunnett T3检验。

3 讨论

本研究对发酵条件进行了考察, 确定最优灵芝

菌转化PMEE的发酵体系为发酵温度 $28\text{ }^\circ\text{C}$, 摇床转速 $180 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 菌种接种量2.5%, 培养基瓶装量25%, 底物质量浓度 $19.11 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 转化时间88~104 h内, 二苯乙烯苷转化率与转化时间呈一定的线性关系, 提示灵芝菌可以定量转化PMEE中的二苯乙烯苷。采用特异质肝毒性动物模型来考察PMEE及其灵芝菌发酵物的肝毒性, 发现随着二苯乙烯苷



S4、S3、S2、S1-二苯乙烯苷的转化率分别为0%、50%、75%、100%的灵芝菌转化后PMEE
S4, S3, S2, and S1-conversion rates of stilbene glycosides were 0%, 50%, 75%, and 100% of PMEE transformed by *G. lucidum*

图4 各组大鼠肝脏损伤程度比较(HE染色, ×200)

Fig. 4 Comparison of severity of rat liver injury (HE staining, ×200)

含量的减少,其毒性也减少,说明灵芝菌转化PMEE、减少二苯乙烯苷含量后能起到减毒作用。

PMEE中二苯乙烯苷的转化时间长于二苯乙烯苷(质量分数99.5%)的转化时间,说明何首乌中其他化学成分能抑制灵芝菌生长。何首乌特异质肝毒性与何首乌中二苯乙烯苷含量具有一定相关性,灵芝菌能定量转化二苯乙烯苷,可为何首乌药效发挥、毒性规避提供实验依据。

生或制何首乌均为可用于保健食品的中药,一直以来被大众认为是黑发、抗衰老的滋补佳品,市场使用极为广泛。含何首乌系列保健品有何首乌口服液、何首乌粉、乌发养颜茶、首乌胶囊等,其肝毒性在国内外常有报道^[7]。何首乌炮制后二苯乙烯苷的含量降低,体内外实验发现何首乌炮制后其肝毒性减弱,表明何首乌肝毒性与二苯乙烯苷的含量存在一定关系^[8]。体外筛选实验发现顺、反式二苯乙烯苷是何首乌特异质肝毒性成分的主要化学成分,且反式二苯乙烯苷所致炎症反应,能进一步诱导顺式二苯乙烯苷特异质肝毒性^[9]。顺式二苯乙烯苷抑制过氧化酶活化增生受体 γ (PPAR- γ)通路,促进LPS介导的免疫炎症损伤,导致特异质肝毒性^[10]。通过粗糙集理论构建谱毒关系研究何首乌肝毒性物质基础,结果表明何首乌的肝毒性与二苯乙烯苷有关^[11]。本研究结果进一步证明二苯乙烯苷含量与何首乌特异质肝毒性存在一定的关系,灵芝菌转化PMEE中二苯乙烯苷能起到减毒作用,可为何首乌特异质肝毒性物质基础和临床安全利用提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李春雨, 李晓菲, 涂灿, 等. 基于内毒素模型的何首乌特异质肝损伤评价 [J]. 药学学报, 2015, 50(1): 28-33.
Li C Y, Li X F, Tu C, et al. The idiosyncratic hepatotoxicity of *Polygonum multiflorum* based on endotoxin model [J]. Acta Pharm Sin, 2015, 50(1): 28-33.
- [2] 薛琪, 翟文泽, 任晶, 等. 基于内毒素特异质模型的何首乌毒性与炮制工艺研究 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(2): 162-165, 280.
Xue Q, Zhai W Z, Ren J, et al. Investigation of *Polygonum multiflorum Radix* processing approaches using a lipopolysaccharide model of hepatotoxicity [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2020, 38(2): 162-165, 280.
- [3] 范琼, 赵敏, 金明坤, 等. 枯草杆菌发酵对何首乌抗氧化成分及肝癌细胞抗增殖作用的影响 [J]. 南方农业学报, 2020, 51(8): 1932-1938.
Fan Q, Zhao M, Jin M, et al. Effects of *Polygonum multiflorum* Thunb fermented by *Bacillus subtilis* on main antioxidant ingredient contents and antiproliferation effects on hepatoblastoma cells [J]. J South Agric, 2020, 51(8): 1932-1938.
- [4] 杜晨晖, 海青山, 闫艳, 等. 微生物发酵炮制何首乌机理的初步研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(2): 212-215.
Du C H, Hai Q S, Yan Y, et al. Preliminary study on the processing mechanism of *Polygonum multiflorum* Thunb. by microbial fermentation [J]. Nat Prod Res Dev, 2012, 24(2): 212-215.
- [5] Lin Y, Xiao R, Xia B H, et al. Investigation of the idiosyncratic hepatotoxicity of *Polygonum multiflorum*

- Thunb. through metabolomics using GC-MS [J]. BMC Complement Med, 21, 120: 2021.
- [6] Lin Y, Peng X, Xia B H, et al. Investigation of toxicity attenuation mechanism of tetrahydroxy stilbene glucoside in *Polygonum multiflorum* Thunb. by *Ganoderma lucidum* [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 280: 114421.
- [7] 黄嘉敏, 赵霞, 孙宜康, 等. 何首乌致药物性肝损伤的病理学特点 [J]. 肝脏, 2022, 27(1): 20-22, 37.
- Huang J M, Zhao X, Sun Y K, et al. Study on clinicopathological characteristics of *Polygonum multiflorum*-induced liver injury [J]. Chin Hepatol, 2022, 27(1): 20-22, 37.
- [8] Li R L, Gao F, Yan S T, et al. Effects of different processed products of *Polygonum multiflorum* on the liver [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 5235271.
- [9] He L Z, Yin P, Meng Y K, et al. Immunological synergistic mechanisms of trans-/ cis-stilbene glycosides in Heshouwu-related idiosyncratic liver injury [J]. Sci Bull, 2017, 62(11): 748-751.
- [10] Meng Y K, Li C Y, Li R Y, et al. Cis-stilbene glucoside in *Polygonum multiflorum* induces immunological idiosyncratic hepatotoxicity in LPS-treated rats by suppressing PPAR- γ [J]. Acta Pharmacol Sin, 2017, 38 (10): 1340-1352.
- [11] 林艳, 肖榕, 尹林子, 等. 基于粗糙集理论构建"谱毒"关系研究何首乌特异质肝毒性物质基础 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(3): 509-517.
- Lin Y, Xiao R, Yin L Z, et al. Developing spectrum-toxicity relationship with rough set theory for hepatotoxicity material basis of *Polygonum multiflorum* [J]. China J Chin Mater Med, 2019, 44(3): 509-517.

【责任编辑 兰新新】