

• 专论与综述 •

微生物在中药现代化中的应用

杨红亚, 王兴红*, 彭 谦

(云南大学云南省微生物研究所 教育部微生物资源开放研究重点实验室, 云南 昆明 650091)

摘 要: 中药行业是我国最有发展前景的传统行业之一, 中药现代化是其发展的必然要求。在中药研究中应用现代化科学技术成果, 特别是应用生命科学的新技术、新理论是中药现代化研究的重要内容, 是促进中药发展的最重要手段之一。对中药微生物的深入研究, 是认识微生物相关中药的形成机制、开发珍贵中药的替代资源、对中药进行二次开发、寻找新的中药资源, 甚至是研究一些中药药理的重要途径。同时, 微生物学在为中药现代化作贡献的过程中, 也为微生物学的发展找到其独特的发展空间, 形成具有中国特色的中药微生物学研究体系。概述微生物与中药的多方面关系并提出了一些看法。可以预见, 充分利用微生物学的研究成果必将为中药发展带来新的局面。

关键词: 微生物; 中药现代化; 应用

中图分类号: R282

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)11-1728-04

Application of microbes in modernization of Chinese materia medica

YANG Hong-ya, WANG Xing-hong, PENG Qian

(Key Laboratory for Microbial Resources of Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Key words: microbes; modernization of Chinese materia medica; application

中药行业是我国具有比较优势的少数几个产业之一, 在自然科学领域, 我国最有实力、最有优势、最有后劲的就是中医药。中医药虽然历史悠久, 但是由于学术指导思想与现代科学有较大差距, 中药的发展跟不上时代的要求。在中药研究中应用现代科学技术成果, 特别是应用生命科学的新技术、新理论是中药现代化研究的重要内容, 是促进中药发展的最重要手段之一。

微生物学是生命科学中发展较快的学科之一, 在生命科学中地位越来越重要, 成为各门学科都离不开的重要工具。在中药现代化进程中, 微生物显示出了越来越重要的作用, 充分利用现代微生物学成果可以更好地促进中药的现代化, 也为微生物学的发展开辟了新领域。

1 微生物学理论促进了微生物相关中药的发展

对传统微生物中药的生物学研究加深了传统微生物中药的应用和产品开发, 特别是多种中药微生物纯培养物代替原药材的研究尤其引人注目, 如灵芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst、猴头 *Hericium erinaceus* (Bull. ex Fr.) Pers. 等各种药用菌的栽培, 对保护环境、保护资源、满足人民群众用药需求起到了十分巨大的作用。以金水宝为代表的从冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berkeley) Sacc. 中分离的真菌纯培养物代替冬虫夏草的研究取得了巨大的经济和

社会效益, 掀起了以蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai, sp. nov.、蝙蝠蛾多毛孢 *Hirsutella hepiali* Chen et Shen sp. nov.、蛹虫草 *Cordyceps militaris* (L.) Link 等虫生真菌的研究热潮。对一些微生物和植物相互作用形成的中药也有了更深入的认识, 如龙血竭的形成与真菌有密切的关系, 是龙血树抵抗微生物侵染而产生的一种植物抗毒素; 僵蚕中的一些有效成分是微生物、蚕、桑叶相互作用形成的^[1]。对天麻 *Gastrodia elata* Bl.、茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 等中药的生物学研究促进了这些中药品种植栽培技术的发展。

微生物相关中药形成方式, 可以分为以下几种情况: 1) 以腐生生活方式形成的大型药用真菌, 如灵芝、猴头、木耳 *Auricularia auricula* (L. ex Hook.) Underw.、香菇 *Lentinus edodes* (Berk.) Pegler 等。这些真菌基本上都可以实现人工栽培。2) 天然微生物发酵植物性中药材料形成, 如神曲、红曲等, 主要是酵母和丝状真菌。3) 植物和微生物共生形成的中药, 如天麻是蜜环菌 *Armillaria mellea* (Vahl ex Fr.) Quel. 和天麻植物的共生体, 天麻植物依靠蜜环菌提供营养; 猪苓 *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fr. 也是由于蜜环菌侵入猪苓菌核形成的共生体, 由蜜环菌提供营养。4) 寄生真菌侵染活体昆虫形成的虫菌复合体, 其实质是昆虫的致病菌。如冬虫夏草、僵蚕、蛹虫草等。5) 微生物侵染植物后, 植物抵抗微生

收稿日期: 2004-10-09

基金项目: 云南省教育厅自然科学重点基金资助项目(032160B)

作者简介: 杨红亚(1982—), 女, 河南邓州人, 现为云南大学微生物研究所 2002 级研究生, 研究方向为微生物药物学。

Tel: (0871) 6231218 E-mail: yhy6018@163.com

* 通讯作者 王兴红 E-mail: wxihong@sina.com.cn

物的侵染而形成的植物抗毒素,如龙血竭、沉香等。

微生物相关中药活性成分的研究为这些中药的质量标准化起到了重要的作用,也加深了对这些中药药理作用的认识。药理学研究促进了传统微生物中药在治疗现代社会的高发病如癌症、心脑血管疾病、病毒性疾病中的应用。多数微生物中药都具有滋补保健的效果,如灵芝、冬虫夏草成为保健食品开发的热点。大多数药用真菌都含有真菌多糖,真菌多糖能增强免疫力、没有直接的细胞毒作用,成为抗癌、抗病毒产品开发热点。

2 微生物在中药二次开发中的作用

我国现有中药虽有上万种,但随着药物筛选技术的进步,特别是高通量筛选技术的出现,从有限资源中发现新的有价值的结构已越来越难,如何充分利用现有资源,充分扩展其资源价值已成为当务之急。用微生物转化的方法处理中药的化学成分,对充分发挥我国中草药的资源优势,开发具有自主知识产权的新药具有十分重要的意义。

已有一些学者开始注意到开展中药微生物转化研究的巨大价值并付诸实践,取得了较好的研究成果。王兴红等^[2]认为可以借助不同真菌产生的丰富酶系来炮制中药,达到产生新的药用成分、提高有效成分含量、降低不良反应的目的,并应用这一理论开展了薏苡仁的微生物转化研究,结果表明:经转化后的薏苡仁不仅原有抗癌组分的量提高,还出现了新的抗癌组分。余伯阳^[3]提出将天然药物的生物转化研究与组合化学理论相结合,提出“中药生物组合化学”的概念,并建议将其用于复杂天然药物的筛选和研制,开发具有中国特色的、新的高效活性先导化合物,并利用微生物对延胡索中镇痛成分延胡索乙素进行了转化,有2个菌株的转化物活性高于底物,经进一步分离,最终得到了2个转化产物,活性明显高于延胡索乙素。庄毅^[4]建议以不同的中药材料为固体基质,通过接种不同的真菌获得不同的“药性菌质”,通过对“药性菌质”用药理模型筛选后可以获得不同的中药产品,达到对中药增效、扩用、减毒的作用,并在这一思路指导下进行了槐耳菌发酵中药,获得的发酵菌质药用效果比常规培养的槐耳菌质明显增强,临床疗效乙型肝炎e抗原转阴率由33%提高到50%。吴炳新等^[5]也提出了类似的观点,认为中药经微生物发酵后可以达到有利于有效组分的提取、吸收和增加新的活性成分的效果,并认为是中药现代化的重要手段,并在这一思路指导下开发了辅助抗癌药三株赋新康,证实未经发酵的中药抑瘤率为31%,经双歧杆菌等肠道菌发酵后其抑瘤率达60%以上。但以中药增效、减毒为目的的中药生物转化研究无论在深度、广度方面都还有很大的不足。

3 微生物在药理学研究中的作用

微生物是评价抗真菌、细菌、病毒药物的天然模型,包括对体外单纯微生物培养物的作用,如测定抑菌圈、最小抑菌浓度等;体内模型是用特定的微生物感染动物的某一部位或全身,形成感染,然后测定药物体内作用的效果^[6]。

微生物还可以作为抗癌药物的模型来筛选具有抗癌作用的中药。尽管人们认为癌细胞体外培养作为抗肿瘤药物的

筛选模型要比微生物模型筛选出来的命中率更大,但微生物生长与动物细胞代谢有不少共同点,微生物学方法简便,适合大量天然产物的初筛。如噬菌体法、细菌变种法和抗代谢法、Ames试验都是抗癌药物可以使用的筛选方法。用具有和人相同代谢途径的特定微生物菌株,可以代替动物模型进行特定用途的药物筛选;抗代谢物在无机氮源培养基中有抗菌作用,在有机氮源培养基中无抗菌作用,利用这个特点可以作为抗代谢药物的筛选^[6]。

由于一些微生物具有和动物和人类似的代谢途径,能产生相同或类似的代谢产物,这样,就可以利用这些微生物对中药的一些有效成分进行药理和毒理研究,特别是在难合成药物和辅助确定代谢途径方面有重要作用,在药物开发的早期阶段提供药物代谢的可能途径。微生物转化研究在菌体和抗生素研究中已应用了很长一段时间,特别是单氧化酶催化的氧化反应,导致了动物代谢的微生物模型的建立^[7]。微生物作为药物代谢模型有一系列的好处:培养简单、成本低;很容易筛选到大量能代谢某种药物的菌株;微生物代谢速率快,药物浓度可以比在细胞或组织模型中高,代谢产物一般在20~200 mg/L,比较容易检测、分离和结构鉴定,并可和动物代谢产物直接进行对比研究;新的代谢产物也可以用于新的活性;可以预测最可能形成的代谢产物;很容易放大制备用于药理和毒理研究的样品;微生物还可以用于需要多步才能合成的反应;在手性和对映体专一性物质研究时很有用;减少了对实验动物的需求,大幅度降低了代谢研究的成本,也避免了一些伦理问题;还克服了由单一的化学合成提供化合物限制。由于很容易进行前药的活性代谢产物的鉴定,所以可以早期预计活性或毒性代谢产物;甚至当新的代谢产物出现时,也有可能从实验动物中推测出可能的代谢途径^[8]。雅致小克银汉霉 *Cunninghamella elegans* Lendner. 和刺孢小克银汉霉 *C. echinulata* (Thaxter) Thaxter^[9]和球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.^[10]是常用的哺乳动物药物代谢研究的辅助工具,如小克银汉霉对青蒿素的转化研究。

通过微生物对中药的生物转化研究也是认识中药作用机制的重要手段。中药以口服为主,它们必然在消化道中与肠道菌接触,肠道菌的代谢对中药的作用不容忽视,有些中药可能通过人体的消化酶或肠道菌的代谢后才起作用。如消化道对天然药物中的糖苷吸收较差,首先必须经肠道菌水解为相应的苷元才能被吸收,柴胡皂苷在大鼠体内经肠道菌转化成代谢产物后才能被吸收并发挥其药理作用;淫羊藿苷的肠菌代谢产物对白细胞介素-6的产生的促进作用比原药更强;口服人参皂苷的抑瘤效应源于人参皂苷被肠菌转化的代谢物20(S)-原人参萜二醇-20-O-β-D-吡喃葡萄糖(M1)能抑制肿瘤新生血管的形成,抑制黑色素瘤B16-F10细胞的生长和转移,诱导Lewis肺癌细胞凋亡^[11~13]。目前,已研究了肠内细菌对苦杏仁苷类、香豆素类、黄酮类、萜类以及萜类化合物的代谢作用,并鉴定了其代谢产物。

4 微生物诱导组培中药材次生代谢产物的形成

用组织培养方法来生产中药的有效成分是解决中药资源紧张的重要手段,是中药现代化的重要内容之一。在组织培养中用发根农杆菌诱导组培物产生发状根(hairy root),由发状根形成次生代谢产物已成为利用中药组织培养物产生次生代谢产物的常用方法。到目前为止已建立了80多种植物的发状根无性系,其中不少是药用植物。Yoshikawa等^[14]的研究表明,人参的发状根在无外源激素的条件进行培养,人参皂苷(Rb,Rg)可达干质量的0.95%,而天然栽培根仅为0.4%,因此人参发状根完全有可能代替天然人参作药用。黄遵锡^[15]从短叶红豆杉诱导出发状根,选育出的5株无性系20 d后生物量增加9倍,紫杉醇的量是愈伤组织的1.3~8.0倍。

在植物与微生物的相互作用中,真菌能诱导植物中特定次生产物的积累,使植物产生对这些病原微生物的抗性。丹参是一种重要的药用植物,利用丹参毛状根和丹参转化细胞生产丹参酮等次生代谢物成为研究的热点。大丽轮枝菌*Verticillium dahliae* Kleb. 激发子V44和酵母提取物分别诱导丹参毛状根和丹参转化细胞后,过氧化物酶活力显著提高,且有利于次生代谢产物的积累^[16]。

5 药用植物内生真菌在中药栽培和中药新资源开发方面具有重要意义

内生菌(endophyte)主要指在其生活史的某一阶段存在于健康植物的组织中、不形成明显侵染的一类微生物。内生菌可以促进宿主的生长、发育,增强对不良环境的抵抗力,甚至会促进宿主植物某些代谢产物的形成。深入研究中药内生菌,对研究中药的活性成分和栽培可能具有重要作用。内生真菌与宿主植物某些活性成分的形成有密切关系,对于不同地方的相同物种来说,其内生真菌类群是不同的,这可能是形成中药道地性的原因之一。

开唇兰小菇、石斛小菇、兰小菇等3种小菇属内生真菌对兰科濒危药用植物铁皮石斛、金线莲的生长有促进作用。接种3种内生真菌后,铁皮石斛苗的生长量高于对照3~5倍,石斛小菇、兰小菇对铁皮石斛原球茎增殖也有明显促进作用;接种3种真菌的金线莲苗,侧芽及侧根数均显著高于对照^[17]。在植物试管苗培养基中分别加入20%真菌菌丝及10 mg/L 发酵液的醋酸乙酯提取物,结果发现3种菌的菌丝体及兰小菇的醋酸乙酯提取物能显著提高铁皮石斛原球茎的增殖率;石斛小菇的菌丝体对金线莲的生长和侧芽增殖有显著促进作用;开唇兰小菇和兰小菇的醋酸乙酯提取物分别对金线莲侧芽发生数及生长有显著促进作用,说明3种内生真菌对铁皮石斛、金线莲的促生长作用与菌丝内及分泌到菌丝外的代谢产物有关^[18]。

菌根是植物和真菌的共生体,是植物普遍存在的现象,菌根菌能促进菌根植物吸收矿质营养和水分,通过刺激或增加寄主植物产生次生代谢物,如抗生素、植保素、酚类化合物、苯丙烷类代谢酶系、木质素、过氧化物酶、水解酶等,提高寄主植物的抗病和抗逆能力。用VA菌根真菌*Glomus mosseae*接种韭菜进行试验,结果接种株比未接种株的株高、

鲜质量、干质量、叶绿素质量分数都增加,抗冻性增强^[19]。但在中药栽培研究中应用菌根技术尚未引起人们足够的重视,报道的文献比较少。

6 结语

据估计真菌约150万种,细菌约4万种,但成为中药大量用于医疗临床的仅有几十种,主要集中在大型真菌。如何开发新的微生物资源成为中药、以及利用微生物开发中药是一个十分重要的问题,特别是物种类群更为丰富的丝状真菌在中药中的应用更应引起重视。

微生物不仅本身是中药的重要成员,也是中药现代化研究中必不可少的工具,充分利用微生物的不同特性对中药的现代化研究具有重要作用,如利用微生物转化对中药进行二次开发,进一步提高了中药开发价值,形成具有自主知识产权新药具有很好的发展前景。微生物相关中药的人工生产和寻找替代资源,也是保护环境和满足人民用药需求的可行途径。由于微生物的代谢类型十分丰富,对一些资源稀缺、活性成分比较清楚的中药也可以从微生物中寻找某些活性成分的替代资源。可以预见,充分利用微生物学的研究成果必将为中药发展带来新的局面。同时,微生物学在为中药现代化作贡献的过程中,也为微生物学的发展找到其独特的发展空间,可能形成具有中国特色的中药微生物学研究体系。

References:

- [1] Haruhisa K, Nahoko T, Yoshiteru O. Novel aromatics bearing 4-O-methylglucose unit isolated from the oriental crude drug *Bombyx batryticatus* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2004, 45: 367-370.
- [2] Wang X H, Li Q D, Cao Q E. New field for study of TCM through fermentation by microbe [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(3): 267-268.
- [3] Yu B Y. Biotransformation of natural bioactive compounds and the development of creative drugs [J]. *World Sci Technol Res Dev* (世界科技研究与发展), 2001, 21(5): 36-39.
- [4] Zhuang Y. New type solid fermentation engineer of pharmaceutical fungi [J]. *Edib Fungi China* (中国食用菌), 2002, 21(4): 3-6.
- [5] Wu B X, Niu J J, Sun X L, et al. Pharmaceutical technique of CMM by fermentation [J]. *Shandong J Tradit Chin Med* (山东中医杂志), 2001, 20(3): 179-180.
- [6] Zhang Z P. *Microbial Pharmacy* (微生物药理学) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003.
- [7] Mith R V, Rosazza J P. Microbial models of mammalian metabolism [J]. *J Pharm Sci*, 1975, 64: 1737-1758.
- [8] Srisilam K, Veeresham C. Biotransformation of drug by microbial cultures for predicting mammalian drug metabolism [J]. *Biotechnol Adv*, 2003, 21: 3-39.
- [9] Wong Y W J, Davis P J. Microbial models of mammalian metabolism: stereoselective metabolism of warfarin in the fungus *Cunninghamella elegans* [J]. *Pharm Res*, 1989, 6: 982-985.
- [10] Griffiths D A, Brown D E, Jezequel S G. Metabolism of xenobiotics by *Beauveria bassiana* [J]. *Xenobiotica*, 1993, 23: 1085-1100.
- [11] Weng X G. Product of ginsenoside's biotransformation can inhibit rat melanoma B16-F10 cell's growth and metastasis [J]. *Foreign Med Sci: Tradit Chin Med Drugs* (国外医学: 中医中药分册), 2002, 24(1): 41-42.
- [12] Shi Q. The inhibition of tumor-induced new vein's formation by intestinal flora metabolite of protopanaxadiol saponins [J]. *Foreign Med Sci: Tradit Chin Med Drugs* (国外医学: 中医中药分册), 2002, 24(1): 42-43.

- [13] Wang D. Apoptosis of Lewis lung cancer cells were induced to by intestinal flora metabolite of protopanaxadiol saponins [J]. *Foreign Med Sci; Tradit Chin Med Drugs* (国外医学: 中医中药分册), 2002, 24(1): 43-44.
- [14] Yoshikawa T, Furuya T. Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes* [J]. *Plant Cell Rep*, 1987, 6(6): 449.
- [15] Huang Z X, Mu Y L, Zhou Y M, et al. Transformation of *Taxus brevifolia* Nutt. by *Agrobacterium rhizogenes* and production of taxol in hairy root [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 1997, 19(3): 292-296.
- [16] Huang B Q, Liu M X. Effects of fungal elicitors on peroxidase activities in hairy root cultures and transformed cells of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Hubei Agric Coll* (湖北农学院学报), 2001, 21(3): 235-237.
- [17] Gao W W, Guo S X. Effect of three endophytic fungi on growth of *Dendrobium candidum* and *Anoetochilus roxburghii* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(6): 543-545.
- [18] Gao W W, Guo S X. Effects of endophytic fungal hyphae and their metabolites on the growth of *Dendrobium candidum* and *Anoetochilus roxburghii* [J]. *Acta Acad Med Sin* (中国医学科学院学报), 2001, 23(6): 556-559.
- [19] Zhao S J, Li S L. Study on the physiological properties of vesicular-arbuscular mycorrhiza enhanced yield of Chinese chives [J]. *Soil Fertil* (土壤肥料), 1993, 4: 38-40.

近红外光谱在中药质量控制中的应用

史春香¹, 杨悦武², 郭治昕², 祝国光¹, 元英进¹

(1. 天津大学化工学院 制药工程系, 天津 300072; 2. 天津天士力集团, 天津 300402)

摘要:介绍了现代近红外光谱的测量原理、与传统分析技术相比近红外分析技术的优势、模型建立常用的化学计量学方法, 讨论了近红外光谱法在药物分析领域和药物生产中的应用, 如判别药材产地、测定药材主要成分量、假药识别、在线检测等。近红外光谱分析技术具有操作简便、快速、非破坏、无污染等优势, 随着近红外技术及相关理论的发展, 将对中药的现代化起着非常重要的推动作用。

关键词:近红外光谱; 建模; 化学计量学; 中药质量控制

中图分类号:R28

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)11-1731-03

Application of near-infrared spectroscopy in quality control of Chinese materia medica

SHI Chun-xiang¹, YANG Yue-wu², GUO Zhi-xin², ZHU Guo-guang¹, YUAN Ying-jin¹

(1. Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Tianjin Tasly Group Co., Ltd., Tianjin 300402, China)

Key words: near-infrared (NIR) spectroscopy; modeling; chemometrics; quality control of Chinese materia medica

近红外光(near-infrared, NIR)是介于可见光(VIS)和中红外光(MIR 或 IR)之间的电磁波, 美国材料检测协会(ASTM)将近红外光谱区定义为波长 780~2 526 nm 的光谱区(波数为 12 820~3 959 cm⁻¹), 习惯上又将近红外区划分为近红外短波(780~1 100 nm)和近红外长波(1 100~2 526 nm)两个区域^[1]。

近红外光谱主要是由于分子振动的非谐性使分子振动从基态向高能级跃迁时产生的。近红外光谱记录的是分子中单个化学键的基频振动的倍频和合频信息, 它常常受含氢基团 x-H(x=C, N, O)的倍频和合频的重叠主导, 所以在近红外光谱范围内, 测量的主要是含氢基团 x-H 振动的倍频和合频吸收。获得近红外光谱主要应用两种技术: 透射光谱技术和反射光谱技术。从近红外光谱中提取有用信息属于弱信息和多元信息, 需要充分利用现有的光机技术、电子技

术和计算机技术进行处理。

与传统化学分析方法相比, 近红外光谱分析有如下鲜明的技术特点^[2]: 分析速度快; 多种成分同时分析; 无污染分析, 样品不需特别的预处理, 不使用有毒、有害试剂; 无损分析; 实时分析和远距离测定; 操作简单, 分析成本低。然而该项技术是一种间接的分析技术, 它必须依赖常规的化学分析方法测定出特定背景范围内多个标准样品成分的化学值, 通过数学模型计算待测样品的成分量。近红外光谱已在各个领域发挥了重要作用, 本文主要就其在现代中药质量控制中具有的潜力进行分析。

1 近红外光谱模型的建立

与其他常规分析技术不同, 现代近红外光谱是一种间接分析技术, 它通过校正模型的建立实现对未知样本的定性或定量分析。其分析方法的建立主要由以下几个步骤构成: (1)