

• 药理与临床 •

## 雷公藤固态生物转化产物减毒增效作用的实验研究

马伟光<sup>1</sup>, 毕云<sup>2</sup>, 黄之镛<sup>1</sup>, 钱如贵<sup>3</sup>, 李婵娟<sup>3</sup>, 浦仕彪<sup>3</sup>(1. 云南中医学院 天然药物生物转化研究中心, 云南 昆明 650500; 2 昆明医学院, 云南 昆明 650032;  
3. 云南省药物研究所, 云南 昆明 650111)

**摘要:** 目的 观察与比较经曲霉菌种和根霉菌种转化后的雷公藤甲醇总提取物的药理活性和毒性反应, 为筛选具有保持或提高雷公藤活性、降低毒性的生物转化菌种提供实验依据。方法 采用急性和慢性炎症模型、免疫器官质量及细胞免疫试验考察转化产物的药理活性; 采用 ip 给药途径观察急性毒性反应。结果 曲霉菌种转化后甲醇总提取物 (TW1) 的抗炎、免疫抑制作用略有增强, 且毒性明显降低; 根霉菌种转化总提取物 (TW2) 毒性有所降低, 但抗炎、免疫抑制作用也略有下降。结论 曲霉菌种和根霉菌种转化后的甲醇总提取物在抗炎、免疫抑制作用和急性毒性方面发生了一定的变化, 减毒增效作用以曲霉菌种较为明显。

**关键词:** 雷公藤; 生物转化; 曲霉菌; 根霉菌

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)06-0927-04

## More activity and less toxicity of extracts from solid fermented medicinal plant

*Tripterygium wilfordii*MA Weiguang<sup>1</sup>, BI Yun<sup>2</sup>, HUANG Zhipu<sup>1</sup>, QIAN Rugui<sup>3</sup>, LI Chanyuan<sup>3</sup>, PU Shibiao<sup>3</sup>

(1. Research Center for Biotransformation of Medicinal Plants of Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 2. Kunming Medical College, Kunming 650032, China; 3. Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming 650111, China)

**Abstract: Objective** In order to reduce the toxicity and still maintain the bioactivity of the medicinal plant *Tripterygium wilfordii* (TW), the whole plant biotransformed method was employed. By observing the pharmacological activities and the toxicity of MeOH extracts from the root of *T. wilfordii* that were biotransformed by the fungi *Aspergillus* spp. and *Rhizopus* spp., the best biotransformed fungi strain has been selected based on the experimental data. **Methods** Applying the models of acute and chronic inflammation, the weight of immune organ and cell immunity were used to study the pharmacological activities, and ip injection to observe the acute toxicity. **Results** The anti-inflammation and immunosuppression have been increased slightly and the toxicity decreased significantly after being biotransformed by *Aspergillus* spp. (TW1), while the anti-inflammation, immunosuppression, and the toxicity have been declined after being biotransformed by *Rhizopus* spp. (TW2). **Conclusion** Although both selected fungi could change the pharmacological activities and toxicity of the *T. wilfordii*, *Aspergillus* spp. is better than *Rhizopus* spp.

**Key words:** *Tripterygium wilfordii* Hook. f.; biotransformation; *Aspergillus* spp.; *Rhizopus* spp.

雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 自古以来就是一种重要的有毒药用植物, 临床应用广泛, 药理活性多样<sup>[1]</sup>, 且雷公藤多苷片系我国已上市的常用抗风湿中成药之一<sup>[2]</sup>。但雷公藤用药后不良反应大, 且常用的减毒方法很难实现减毒增效的目的, 制约了其深度开发与应用。近年来, 随着生物工程技术的发展, 生物转化技术以其多学科交叉的特

点和优势, 在天然药物有效成分的结构修饰和创新药物的研究上发挥着越来越重要的作用<sup>[3]</sup>, 成为了目前国际天然产物研究的热点之一<sup>[4,5]</sup>。这一领域的迅速发展, 引发了利用微生物对天然药物进行整体固态生物转化的研究热潮<sup>[6]</sup>, 并迅速延伸到对天然有毒植物药进行减毒增(持)效的研究方向上来<sup>[7,8]</sup>。在前期研究的基础上<sup>[9]</sup>, 采用曲霉菌、根霉

①收稿日期: 2009-10-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30660223); 云南省财政厅资助项目; 云南省政府改善办学条件专项资金资助项目

作者简介: 马伟光 (1960—), 男, 云南昆明人, 博士, 教授, 从事天然药物生物转化、功能食品、民族医药的教学与研究工作。

Tel: (0871) 2879122 E-mail: weiguangma@163.com

菌为转化菌种,以大豆粉和麦麸为微生物营养辅料,对粉碎的雷公藤根茎进行整体固态生物转化研究,获得了两种不同的生物转化产物(TW1、TW2 分别为曲霉菌和根霉菌转化产物),并采用相同化学方法对两种转化产物和原药材(TW0)进行处理,得到药理研究的受试样品。为筛选既能保持或提高雷公藤的活性,又能降低其毒性的微生物菌种,本研究针对雷公藤已报道的主要药理活性,采用急性和慢性炎症模型、免疫功能试验、ip 给药途径的急性毒性试验,观察并比较雷公藤经不同菌种转化后甲醇总提取物的药理活性和急性毒性反应,为深入研究提供实验依据。

## 1 材料

1.1 实验动物:SPF 级 ICR 小鼠,4~6 周龄,雌雄各半,18~24 g;由昆明医学院实验动物中心提供,生产许可证:SCXK(滇)2005-0008;实验过程中饲养于 IVC 动物实验室。

1.2 实验药物:1 号样品为非转化雷公藤原药粉(TW0)的甲醇提取物,提取率为 7.0%,2、3 号样品分别为曲霉菌种(TW1)及根霉菌种(TW2)转化雷公藤的甲醇提取物,提取率分别为 8.0%、5.5%。醋酸泼尼松片,每片 5 mg,广东南国药业有限公司,批号 070301;2,4 二硝基氟苯(DNFB),分析纯,中国医药(集团)上海化学试剂公司;丙酮、冰醋酸、二甲苯,均为国产分析纯。伊文思蓝,Sigma 公司,北京夏斯生物科技有限公司分装。所有受试药物用纯水配制。

1.3 实验仪器:AL-204 电子分析天平,梅特勒托利多仪器(上海)有限公司;ELIX<sup>TM</sup>+ Mlu+ Qsynthesis 超纯水系统,美国;JJ2000 型电子天平,常熟双杰测试仪器厂;101 型电热鼓风干燥箱,北京仪器有限公司;722 分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;F5810-R 型台式高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司。

## 2 方法

### 2.1 抗炎作用比较

2.1.1 二甲苯致小鼠耳廓肿胀试验:取 18~20 g 小鼠 96 只,雌雄各半,按性别和体质量随机分为 8 组,见表 1。1~3 号样品均按 20、10 g/kg 的生药剂量折算成相应的提取物剂量,以比较同等生药剂量的作用差异。各组动物每日分别按剂量 ig 给药 1 次,对照组给予纯水,连续 7 d,容积均为 20 mL/kg。末次给药后 30 min,于每鼠右耳两面均匀涂抹二甲苯 50  $\mu$ L,左耳不涂为对照。1 h 后脱臼处死动

物,用直径 8 mm 打孔器将双耳同部位等面积切下,称质量,并计算耳肿胀度(左右耳片质量差值)。

2.1.2 小鼠腹腔毛细血管通透性试验:取 19~23 g 小鼠 88 只,雌雄兼用(每组雄性 6 只、雌性 5 只),分组与剂量见表 2,分组及给药方法同 2.1.1 项,连续给药 7 d。第 7 天禁食不禁水 12 h,称体质量后末次 ig 给药,30 min 后尾 iv 0.5% 伊文思蓝 0.1 mL/10 g,即刻 ip 0.6% 冰醋酸 0.1 mL/10 g;30 min 后按每只 5 mL ip 生理盐水,脱臼处死小鼠,轻揉腹部,剪开并收集洗出液;1 000 r/min 离心 5 min,取上清液于 590 nm 处测定吸光度(A)值。3 号样品高剂量组 iv 伊文思蓝失误 1 只。

2.1.3 小鼠棉球肉芽肿试验:取 20~24 g 雄性小鼠 96 只,按体质量随机分为 8 组,每组 12 只。各鼠于无菌条件下在左右后肢踝部皮下各植入(10.0 $\pm$ 1.0) mg 高压灭菌棉球 1 个,各组动物手术当日开始按剂量(表 3) ig 给药,每日 1 次,连续 8 d。第 9 天禁食不禁水 12 h 后称体质量,脱颈椎处死小鼠,将棉球连同周围结缔组织一起取出,剔除脂肪组织,于 60  $^{\circ}$ C 烘箱内干燥 24 h 后称质量,减去棉球质量即为肉芽肿质量,计算肉芽肿质量与体质量的比值。

### 2.2 对免疫功能的影响

2.2.1 小鼠免疫器官系数测定:取 18~20 g 小鼠 96 只,雌雄各半,分组及给药方法同 2.1.1 项,见表 4,连续给药 10 d。末次给药后 30 min,脱臼处死小鼠,剖取胸腺和脾脏,称质量,计算脏器系数。

2.2.2 DNFB 致小鼠迟发性超敏反应试验:取 19~23 g 小鼠 108 只,雌雄各半,分组及给药方法同 2.1.1 项(另增设正常对照组),见表 5,连续给药 7 d。除对照组外,其余各组动物首次给药后 1 h 于腹部皮肤均匀涂抹 1% DNFB 混合液每只 50  $\mu$ L 致敏,并于第 2 天加强 1 次。末次给药后 30 min,各鼠右耳两面均匀涂抹 1% DNFB 混合液 10  $\mu$ L 进行攻击,左耳涂等量混合溶媒。激发后 24 h 脱颈椎处死动物,取耳片称质量,计算耳肿胀度。

2.3 急性毒性比较:取 18~20 g 小鼠 40 只,雌雄各半,按性别和体质量随机分为 4 组。1~3 号样品均按 20 g/kg 的生药剂量折算成相应的提取物剂量,以比较同等生药剂量的毒性强弱。各组动物分别按剂量 ip 给药 1 次,对照组给予纯水,容积均为 20 mL/kg,观察急性毒性反应和死亡情况。对观察期死亡的动物和观察结束后脱臼处死的动物进行解剖,检查各组织和脏器的体积、颜色、质地等有无异

常, 如有异常及时取材, 进行组织病理学检查。

2.4 统计学方法: 用 SPSS 11.0 统计软件进行数据统计, 计量资料用 *t* 检验, 计数资料采用方差分析, 方差不齐用秩和检验。

### 3 结果

#### 3.1 抗炎作用比较

3.1.1 对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响: 由表 1 可见, 以 20、10 g/kg 的相同生药剂量连续 ig 给药 7 d, TW0、TW1 及 TW2 的两剂量组, 均能明显抑制二甲苯致小鼠耳廓肿胀, 各样品组间比较无明显差异, 但 TW1 的抑制作用略强。

表 1 雷公藤各转化产物对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响 (*n* = 12)

Table 1 Effects of extracts from solid fermented medicinal plant *T. wilfordii* on ear edema in mice induced by *p*-xylene (*n* = 12)

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	耳肿胀度( $\bar{x} \pm s$ )/mg	抑制率/%
对照	-	23.68 ± 8.84	-
醋酸泼尼松	0.010	9.25 ± 4.25*	60.94
TW0	1.4	13.95 ± 7.64*	41.09
	0.7	15.48 ± 5.79*	34.63
TW1	1.6	11.78 ± 6.35**	50.25
	0.8	13.26 ± 6.37**	44.00
TW2	1.1	14.82 ± 7.87*	37.42
	0.55	15.38 ± 7.32*	35.06

与对照组比较: \* *P* < 0.05 \*\* *P* < 0.01

\* *P* < 0.05 \*\* *P* < 0.01 vs control group

3.1.2 对小鼠腹腔毛细血管通透性的影响: 由表 2 可见, 以 20、10 g/kg 的相同生药剂量连续 ig 给药 7 d, 所有给药组均能明显抑制醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性的增加, 各样品组间比较无显著差异, 但 TW1 的抑制作用略强。

3.1.3 对小鼠棉球肉芽肿的影响: 由表 3 可见, 以 20、10 g/kg 的相同生药剂量连续 ig 给药 8 d, TW0 和 TW1 均能明显抑制小鼠棉球肉芽肿的生成, TW2 仅有抑制趋势; 综合比较, TW1 对慢性炎症的抑制作用与原药相当, 二者均比 TW2 强。

Table 2 Effects of extracts from solid fermented medicinal plant *T. wilfordii* on peritoneal capillary permeability of mice

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	动物/只	毛细血管通透性( $\bar{x} \pm s$ , A 值)	抑制率/%
对照	-	11	0.682 ± 0.108	-
醋酸泼尼松	0.010	11	0.317 ± 0.196**	53.52
TW0	1.4	11	0.445 ± 0.296*	34.75
	0.7	11	0.437 ± 0.187**	35.92
TW1	1.6	11	0.312 ± 0.189**	54.25
	0.8	11	0.380 ± 0.166**	44.28
TW2	1.1	10	0.381 ± 0.132*	44.13
	0.55	11	0.496 ± 0.243*	27.27

与对照组比较: \* *P* < 0.05 \*\* *P* < 0.01

\* *P* < 0.05 \*\* *P* < 0.01 vs control group

和 TW1 均能明显抑制小鼠棉球肉芽肿的生成, TW2 仅有抑制趋势; 综合比较, TW1 对慢性炎症的抑制作用与原药相当, 二者均比 TW2 强。

表 3 雷公藤各转化产物对小鼠棉球肉芽肿的影响

Table 3 Effects of extracts from solid fermented medicinal plant *T. wilfordii* on granuloma in mice induced by cotton pellets

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	动物/只	棉球肉芽肿干质量( $\bar{x} \pm s$ )/mg	(肉芽肿质量/体质量)( $\bar{x} \pm s$ )/(mg·10g <sup>-1</sup> )	抑制率/%
对照	-	12	77.83 ± 17.44	19.97 ± 5.57	-
醋酸泼尼松	0.010	12	50.96 ± 7.53**	11.00 ± 2.85**	44.92
TW0	1.4	12	58.29 ± 18.55*	13.99 ± 6.54*	29.94
	0.7	11	62.15 ± 12.12*	15.52 ± 4.47*	22.28
TW1	1.6	12	58.60 ± 15.55**	13.49 ± 5.64**	32.45
	0.8	12	62.44 ± 15.46*	14.53 ± 5.21*	27.24
TW2	1.1	12	66.08 ± 15.06	16.37 ± 5.97	18.03
	0.55	12	67.59 ± 17.32	16.30 ± 5.80	18.38

与对照组比较: \* *P* < 0.05 \*\* *P* < 0.01

\* *P* < 0.05 \*\* *P* < 0.01 vs control group

#### 3.2 免疫抑制作用比较

3.2.1 对小鼠免疫器官系数的影响: 由表 4 可见, 以 20、10 g/kg 的相同生药剂量连续 ig 给药 10 d, TW1 的两剂量和 TW2 的高剂量对小鼠胸腺有一定抑制趋势, TW2 对脾脏有一定增重趋势, TW0 对小鼠免疫器官质量无明显影响。

表 4 雷公藤各转化产物对小鼠免疫器官系数的影响 (*n* = 12)

Table 4 Effects of extracts from solid fermented medicinal plant *T. wilfordii* on coefficient of immune organs in mice (*n* = 12)

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	胸腺		脾脏	
		系数( $\bar{x} \pm s$ )/(mg·10g <sup>-1</sup> )	抑制率/%	系数( $\bar{x} \pm s$ )/(mg·10g <sup>-1</sup> )	抑制率/%
对照	-	35.18 ± 14.57	-	54.65 ± 11.11	-
醋酸泼尼松	0.010	6.78 ± 2.36**	80.73	29.61 ± 6.78**	45.82
TW0	1.4	34.69 ± 10.93	1.39	54.34 ± 9.84	0.57
	0.7	36.96 ± 11.35	-5.06	56.89 ± 9.68	-4.10
TW1	1.6	28.80 ± 10.95	18.14	49.03 ± 10.23	10.28
	0.8	30.87 ± 12.12	12.25	53.94 ± 13.16	1.30
TW2	1.1	28.42 ± 8.69	19.22	60.09 ± 21.70	-9.95
	0.55	35.68 ± 12.40	-1.42	60.52 ± 9.01	-10.74

与对照组比较: \*\* *P* < 0.01

\*\* *P* < 0.01 vs control group

3.2.2 对小鼠迟发性超敏反应的影响: 由表 5 可见, 以 20、10 g/kg 的相同生药剂量连续 ig 给药 7 d, TW0 及 TW1 均能明显抑制 DNFB 诱导的小鼠迟发性超敏反应, TW2 有抑制趋势; 综合比较, TW1 的抑制作用与原药相当, 二者均比 TW2 强。

3.3 急性毒性比较: ICR 小鼠以 20 mL/kg 的容积

单次 ip 给予 20 g/kg 生药剂量的 1、2、3 号样品, 连续观察 14 d, 每组 10 只动物的死亡情况分别为 10、2 及 6 只, 死亡时间均集中在给药后 48 h 内, 中毒症状为震颤和呼吸抑制。结果表明, 急性毒性 TW0 > TW2 > TW1。

表 5 雷公藤各转化产物对小鼠迟发性超敏反应的影响 (n=12)

Table 5 Effects of extracts from solid fermented medicinal plant *T. wilfordii* on delayed type hypersensitivity response in mice (n=12)

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	耳肿胀度( $\bar{x} \pm s$ )/mg	抑制率/%
对照	-	3.18 ± 2.66	-
模型	-	11.37 ± 5.14 <sup>△△</sup>	-
醋酸泼尼松	0.010	5.50 ± 4.21 <sup>* **</sup>	51.63
TW0	1.4	7.23 ± 3.59 <sup>*</sup>	36.41
	0.7	6.97 ± 3.17 <sup>*</sup>	38.70
TW1	1.6	6.88 ± 2.52 <sup>*</sup>	39.49
	0.8	6.43 ± 3.59 <sup>*</sup>	43.45
TW2	1.1	8.43 ± 5.17	25.86
	0.55	7.60 ± 4.70	33.16

与对照组比较: <sup>△△</sup> P < 0.01

与模型组比较: <sup>\*</sup> P < 0.05 <sup>\*\*</sup> P < 0.01

<sup>△△</sup> P < 0.01 vs control group

<sup>\*</sup> P < 0.05 <sup>\*\*</sup> P < 0.01 vs model group

#### 4 讨论

天然药物的功效是其内含物质群整体协同作用的结果, 此物质群的整体情况, 包括所含化学成分的种类、各成分的量及组成比例的差异, 都会对功效产生影响<sup>[10]</sup>。不同的化学成分在生理活性方面既可能相互协同、互补增效, 又可能相互制约, 平衡作用, 在作用范围上也往往具有多靶点的特征。整体固态生物转化是在传统中药炮制中固态发酵法的基础上, 结合现代生物工程技术, 利用微生物或其代谢酶为活性基质, 对其中复杂的有机物质进行分解或转化, 以产生新的活性物质或改变固有成分之间的平衡, 从而导致药效作用和毒性发生相应的改变。

本研究发现曲霉菌种转化产物的抗炎、免疫作用比原药略有增强, 而根霉菌种转化产物的作用则有所降低, 但两菌种转化产物的急性毒性均低于原药, 以曲霉菌减毒效果较为明显。研究结果表明, 雷公藤在曲霉菌、根霉菌参与下的生物转化, 可能导致其活性/毒性物质基础的变化, 从而产生一定的脱毒持效(或增效)作用。该研究是固态整体生物转化法首次用于天然有毒植物药脱毒研究的成功范例, 对其他有毒天然植物药的减毒持(增)效研究提供了一种切实可行的方法与思路, 其应用范围还可延伸至其他单一的天然药物或复方天然药物中, 发酵工程在创新药物、功能食品和美容护肤品的研究与开发中必将展现其无穷的魅力。

#### 参考文献:

- [1] 马伟光, 张滔, 张超. 有毒药物雷公藤的研究及展望 [J]. 中华中医药杂志, 2006, 21(2): 117-119
- [2] 冯先礼, 岑国栋. 雷公藤多苷对小鼠细胞免疫功能的影响 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(5): 289-291
- [3] 崔玉娜, 张怡轩, 赵余庆. 利用生物转化法制备稀有人参皂苷的研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 676-680
- [4] 王旭, 徐威, 游松. 微生物转化在药学中的应用 [J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(7): 477-482
- [5] 余伯阳. 天然活性成分的生物转化与创新药物开发 [J]. 世界科技研究与发展, 1999, 21(5): 36-39
- [6] 阮晓东, 张惠文, 蔡颖惠, 等. 微生物在中药生物转化中的应用 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 149-152
- [7] 马伟光, 张超. 生物转化的核心技术——天然药物发酵的研究进展 [J]. 云南中医学院学报, 2004, 27(3): 55-57
- [8] 谢小梅, 贺婧, 罗闯丹, 等. 灵芝双向发酵雷公藤的解毒持效作用 [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1925-1929
- [9] 马伟光, 毕云, 黄之错, 等. 雷公藤固态生物转化产物的初步药理研究 [J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(3): 373-376
- [10] 肖小河, 金城, 肖培根. 中药生产质量控制和评价模式的创新与发展 [A]. 中国科协第 131 次青年科学家论坛 [C]. 昆明: 云南中医学院, 2006

## 欢迎订阅《中草药》杂志 1996—2009 年增刊

为了扩大学术交流, 提高新药研究水平, 经国家新闻出版主管部门批准, 我部从 1996 年起, 每年出版增刊一册。

1996~2009 年增刊 包括中药创新药物开发的思路和方法、中药现代化研究、中药知识产权保护、中药专利的申请及中药走向国际等热点内容。

以上各卷增刊选题广泛, 内容新颖、学术水平高、科学性强, 欢迎广大读者订阅。以上增刊为我部自办发行, 邮局订阅《中草药》不含增刊, 但能提供订阅凭证者, 购买增刊 7 折优惠, 款到寄刊。

地址: 天津市南开区鞍山西道 308 号(300193)

网址: www. 中草药杂志社. 中国; www. tipress. com

电话: (022) 27474913 23006821

传真: (022) 23006821

E-mail: zcy@tipress. com