

文章编号: 1673 1689(2010)03-0476-05

6 种真菌发酵对马钱子降毒保效作用的初步研究

陈 龙, 施 铮, 曹 亮, 蒋亚平, 潘 扬*

(南京中医药大学 药学院, 江苏 南京 210029)

摘 要: 观察 6 种不同真菌发酵对马钱子毒性和镇痛、抗炎作用的影响。选择对马钱子药材适应性较强、菌丝生长旺盛的 6 种真菌菌种——裂褶菌、竹黄、单色云芝、鸡油菌、白僵菌和蝉花, 在适生条件下对马钱子进行固态发酵, 形成 6 种相应的马钱子发酵品——褶马菌质(SCSS)、竹马菌质(SBSS)、单马菌质(CUSS)、油马菌质(CCSS)、白马菌质(BBSS)和花马菌质(CGSS);以半数致死量(LD₅₀)为指标, 测定马钱子生品(RMSS)和炮制品(PSS)及 6 种不同发酵品经灌胃给药对小鼠的急性毒性;以双氯芬酸钠(DSE)和 RMSS 为阳性对照, 观察 6 种不同发酵品对腹腔注射醋酸所致小鼠扭体反应的抑制(镇痛)作用以及对外涂巴豆油所致鼠耳壳肿胀的减轻(抗炎)作用。结果表明, 马钱子通过 6 种真菌发酵后毒性降低, 与炮制品基本一致;且它保持了马钱子原有的镇痛和抗炎作用, 提示发酵可以为马钱子的降毒保效提供一条新途径。

关键词: 真菌发酵; 马钱子; 毒性; 镇痛; 抗炎

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Pilot Study on Effects of *Semen strychni* Fermented by Six Different Fungi on Toxicity, Analgesia and Anti-Inflammation

CHEN Long, SHI Zheng, CAO Liang, JIANG Yaping, PAN Yang*

(College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

Abstract: The toxicity, the analgesic and anti-inflammatory effect of *Semen strychni* integrative fermentation with six different fungi, including *Schizophyllum commune* Fr., *Shiitake* *bambusicola* P. Henn, *Coriolus unicolor* (L.: Fr.) Pat., *Cantharellus Cibarius* Fr., *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill and *Cordyceps gunnii* (Berk.) Berk were evaluated in this manuscript. When *Semen strychni* raw materials (RMSS) were solid-fermented with those fungi, the corresponding product were named as SCSS, SBSS, CUSS, CCSS, BBSS and CGSS, respectively. LD₅₀(i.g.) in mice were determined by the Bliss method to evaluate the acute toxicity of RMSS, processed *Semen strychni* (PSS) by traditional Chinese method and the six fermented products. The body writhing induced by i.p. 0.1% acetic acid and the ear edema induced by 2% croton oil were used to test the analgesic and anti-inflammatory effects of six fermented *Semen strychni* products with the positive controls of diclofenac sodium (DSE) and RMSS. The toxicities of SCSS, SBSS,

收稿日期: 2009-05-21

基金项目: 江苏省高校自然科学基金基础研究项目(06 KJB360083); 江苏省青蓝工程项目。

作者简介: 陈龙(1963-), 男, 江苏句容人, 理学博士, 副研究员, 主要从事生理学、药理学方面的研究。

* 通信作者: 潘扬(1964-), 男, 江苏扬州人, 理学博士, 研究员, 硕导, 主要从事中药化学与生物技术方面的研究。

Email: y.pan2006@163.com

CUSS, CCSS, BBSS and CGSS were lower than that of RMSS, and were similar to that of PSS. The analgesic and anti-inflammatory effects of the aboved six fermented products were similar to that of RMSS. In conclusion the six different fermented *Semen strychni* had the same advantageous effects as that of PSS and the acute toxicity of them could be decreased compare to that of RMSS.

Key words: fungus fermentation, *Semen strychni*, toxicity, analgesia, anti-inflammation

马钱子(别名:番木鳖、大方八、苦实)系马钱科植物 *Strychnos nux-vomica* L. 的干燥成熟种子,其原植物野生于热带、亚热带地区的深山老林中,主产于印度、越南、缅甸、泰国和斯里兰卡等国,我国福建、台湾、广东、海南、广西和云南等地区亦有引种。作为药用,马钱子早在《本草纲目》中就有记载,味苦性温,有大毒,入肝脾经,功能通络止痛、消肿散结。临床上主要用于治疗各种难治性疾病,疗效卓著,为历代医家所推崇。随着近年来对马钱子抗炎、镇痛、抗肿瘤和抑制免疫等药理研究的日趋深入,其应用范围也不断扩展,已证实它是治疗风湿(类风湿)疾病、神经系统疾病等疑难杂症不可或缺的中药^[1]。马钱子含多种吲哚生物碱类化合物,其中以土的宁(strychnine)和马钱子碱(brucine)的含量为最高。由于高剂量的土的宁是已知的致命毒性物质,具有刺激中枢神经系统的效应,中毒时会发生典型的“土的宁惊厥”症状,最后导致呼吸肌强直,窒息而死,因此限制了它在临床上的应用。一般情况下,规定马钱子内服时必须用炮制品并配伍其他中药在复方中使用^[2]。我们在前文中已报道了利用真菌固体发酵可降低马钱子有毒成分的含量、改变其成分的构成^[3];并证实马钱子经朱红栓菌(*Trametes cinnabarina*)发酵后毒性明显降低并保持了其原有的镇痛和抗炎作用,从而推断发酵可能是马钱子降毒保效的一条新途径^[4]。作者对除朱红栓菌以外的6种马钱子真菌发酵品进行急性毒性、镇痛和抗炎作用的初步研究。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 动物与菌种 ICR小鼠由扬州大学比较医学中心提供;发酵用真菌菌种由作者所在实验室分离、鉴定、保藏,并传代复壮,分别为侧耳科真菌裂褶菌 *Schizophyllum commune* Fr.;肉座菌科真菌竹黄 *Shiraiabambusocola* P. Henn;多孔菌科真菌单色云芝 *Coriolus unicolor* (L.: Fr.) Pat.;多孔菌科真菌鸡油菌 *Cantharellus cibarius* Fr.;丛梗孢

科真菌白僵菌 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill;麦角科真菌蝉花 *Cordyceps gunnii* (Berk.) Berk.。

1.1.2 药物与试剂 马钱子药材(RMSS)和制马钱子(PSS):均由南京鹿江中药饮片厂提供,经潘扬研究员鉴定分别为马钱科植物马钱 *Strychnos nux-vomica* L. 的干燥成熟种子及其炮制(砂烫)品;马钱子发酵品:由作者所在实验室制备。取马钱子药材,干燥后粉碎(过10目筛),装入发酵专用瓶(500 mL),加适量水浸润至透,0.105 MPa蒸汽121℃灭菌,分别接种上述裂褶菌、竹黄、单色云芝、鸡油菌、白僵菌的蝉花等真菌菌种,在一定温度、湿度条件下发酵,待真菌菌丝体丰满、浓密、均匀地长满整个发酵容器(约30~45 d)时取出,在60℃下干燥4~5 h,即得6种马钱子真菌发酵品,分别被定名为褶马菌质(SCSS)、竹马菌质(SBSS)、单马菌质(CUSS)、油马菌质(CCSS)、白马菌质(BBSS)和花马菌质(CGSS)。双氯芬酸钠(diclofenac sodium enteric, DSE)缓释胶囊(英太奇):中国药科大学制药有限公司制造,规格为50 mg/粒,2粒/日。冰醋酸:南京化学试剂有限公司生产;巴豆油:杭州中香化学有限公司生产。

1.1.3 仪器与设备 MP12001电子天平,上海市恒平科学仪器有限公司制造;MELLTER-AE240电子天平:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司制造。

1.2 实验条件与试液配制

1.2.1 实验条件 给药前后,实验动物雌雄分笼,用全价颗粒饲料喂养(由江宁青龙山动物繁殖场提供);温度20~25℃。湿度40%~70%。

1.2.2 试液配制

1) 马钱子药液:取RMSS,在60℃下干燥4~5 h,先加工成粗粒,然后与相同质量的药用淀粉混合粉碎,过80目筛,加0.5%CMC-Na水溶液配成混悬液。使用前剧烈振摇1~2 min使均匀。

2) 制马钱子药液:取PSS,同马钱子药液制备。

3) 6种发酵品药液:取SCSS、SBSS、CUSS、CCSS、BBSS和CGSS,分别同马钱子药液制备。

4) 0.5% 醋酸溶液:精密量取冰醋酸 0.5 mL,加蒸馏水使溶散成 100 mL,即得。

5) 2% 巴豆油溶液:精密量取巴豆油 2 mL,加乙醚 73 mL 和无水乙醇 20 mL 使溶散,加蒸馏水至 100 mL 即得,密闭低温保存。

1.3 对醋酸腹腔刺激致小鼠扭体反应的影响

取体重 20~24 g 雄性小鼠 90 只^[5],按体重随机分为 9 组:1) 空白组(0.5% CMG-Na 水溶液 20 mL/kg);2) DSE 组(20 mg/kg);3) SSRM 组(按生药计 40 mg/kg);4) SCSS 组(按生药计 40 mg/kg);5) SBSS 组(按生药计 40 mg/kg);6) CUSS 组(按生药计 40 mg/kg);7) CCSS 组(按生药计 40 mg/kg);8) BBSS 组(按生药计 40 mg/kg);9) CGSS 组(按生药计 40 mg/kg),各组给药体积按 20 mL/kg 一次性灌胃。给药 0.5 h 后,用 0.5% 醋酸溶液腹腔注射给药,每鼠 0.2 mL,致痛后立即观察小鼠的扭体反应(腹部内凹,躯干与后腿伸张,臀部高起等),记录 15 min 内各小鼠发生扭体次数,并计算扭体抑制率。

抑制率=(空白组平均扭体次数-给药组平均扭体次数)/空白组平均扭体次数×100%。

单因素方差分析进行组间均数的比较。

1.4 对巴豆油外涂致小鼠耳壳肿胀的影响

取体重 24~28 g 雄性小鼠 50 只,按体重随机分为 9 组^[6]:1) 空白组(0.5% CMG-Na 水溶液 20 mL/kg);2) DSE 组(20 mg/kg);3) SSRM 组(按生药计 40 mg/kg);4) SCSS 组(按生药计 40 mg/kg);5) SBSS 组(按生药计 40 mg/kg);6) CUSS 组(按生药计 40 mg/kg);7) CCSS 组(按生药计 40 mg/kg);8) BBSS 组(按生药计 40 mg/kg);⑨ CGSS 组(按生药计 40 mg/kg),各组给药体积按 20 mL/kg 每日灌胃 1 次,连续给药 4 d。末次给药 0.5 h 后,用 2% 巴豆油溶液涂于小鼠右耳前后两面,每鼠 0.05 mL。致炎后 4 h,将小鼠颈椎脱臼致死,自耳廓剪下左、右两耳,用锋利的打孔器(直径 9 mm)分别在两耳的同一部位打下圆耳片,电子天平称重(精确至 0.1 mg),记录每鼠左、右耳片的质量(mg),比较其耳廓肿胀度。

肿胀度=右耳片质量-左耳片质量

肿胀抑制率=(空白组平均肿胀度-给药组平均肿胀度)/空白组平均肿胀度×100%。

单因素方差分析进行组间均数的比较。

以上镇痛和抗炎的实验数据均以 $\bar{X} \pm s$ 表示,统计软件采用 SPSS 13.0 for Windows,组间比较按单因素方差 LSD 法进行分析。

1.5 急性毒性试验

8 个受试品各取体重 18~22 g 小鼠 50 只,随机分为 5 组,每组 10 只,雌雄各半,以每种受试品预试验结果选择适当的剂间比:1) SSRM 为 1:0.8;2) PSS 为 1:0.85;3) SCSS 为 1:0.85;4) SBSS 为 1:0.85;5) CUSS 为 1:0.85;6) CCSS 为 1:0.85;7) BBSS 为 1:0.85;8) CGSS 为 1:0.8。实验前各组小鼠禁食(不禁水),12 h 后,在 20~24 ℃ 的情况下,以每 10 g 用 0.2 mL 的容量灌胃,给予不同浓度的药物,观察并记录给药后 7 d 内动物精神活动、饮食、饮水、毛色、二便及死亡等情况,死亡动物及时进行尸检,Bliss 法(LD₅₀ CALC 2.0 版软件)统计半数致死量(LD₅₀);并计算 2~8 组受试品相对于马钱子生品的 LD₅₀ 上升率(%)

$LD_{50} = (发酵品或炮制品 LD_{50} - 生品 LD_{50}) / 生品 LD_{50} \times 100\%$ 。

2 结果与讨论

2.1 镇痛作用方面

与空白对照相比,双氯芬酸钠止痛作用最强($P < 0.01$);马钱子生品、褶马菌质、竹马菌质、单马菌质、油马菌质、白马菌质和花马菌质均有较好的止痛作用,可明显减少小鼠由于腹腔注射醋酸引起的扭体次数($P < 0.05$);但与马钱子生品相比,这 6 种发酵品对腹腔注射醋酸引起的疼痛反应的抑制作用均未见显著性差异,表明马钱子生品经发酵后止痛作用并未增强,见表 1。

表 1 马钱子发酵品对醋酸致小鼠扭体反应的影响

Tab.1 Effect of *Semen strychni* fermentation products on the body writhing induced by acetic acid

组别	动物数/只	扭体反应次数/次	扭体抑制率/%
空白	10	28.8±11.2	-
DSE	10	2.7±3.2 [*]	90.6
RMSS	10	17±13.5 [*]	41
SCSS	10	16.1±13.8 [*]	44.1
SBSS	10	16.4±12.7 [*]	43.1
CUSS	10	17.4±11.7 [*]	39.4
CCSS	10	16.9±12.6 [*]	41.3
BBSS	10	17.9±11.5 [*]	37.8
CGSS	10	16.9±13.4 [*]	41.3

注:与空白组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

2 2 抗炎作用方面

巴豆油可引起空白对照组小鼠被涂右耳明显肿胀,使两侧耳壳质量差增大。与空白对照相比,马钱子生品、褶马菌质、竹马菌质、单马菌质、油马菌质、白马菌质和花马菌质同双氯芬酸钠一样,对巴豆油致小鼠耳壳肿胀均有很好的抑制作用($P<0.05$),表现为降低小鼠耳壳肿胀度和提高抑制肿胀率;但与马钱子生品相比,这 6 种发酵品对巴豆油可引起小鼠被涂右耳肿胀反应的抑制作用均未见显著性差异,表明马钱子生品经发酵后抗炎作用未见增强,见表 2。

表 2 马钱子发酵品对巴豆油致小鼠耳壳肿胀的作用
Tab. 2 Effect of *Semen strychni* fermentation products on the ear edema induced by croton oil

组别	动物数/只	耳壳肿胀度/mg	肿胀抑制率/%
空白	10	18.6±7.7	—
DSE	10	11.1±5.3*	40.4
RMSS	10	12±5.8*	35.5
SCSS	10	12.5±4.3*	32.8
SBSS	10	11.3±6.8*	39.2
CUSS	10	10.7±8.4*	42.7
CCSS	10	12±6.3*	35.7
BBSS	10	11.2±7.4*	39.8
CGSS	10	11.2±7.5*	40.2

注:与空白组相比,* $P<0.05$ 。

2 3 急性毒性方面

小鼠灌胃马钱子品、制马钱子及其 6 种发酵品后,均很快出现兴奋症状,活动明显增多,烦躁不安,最后四肢出现强直性惊厥,很快死亡。死亡时间一般发生在 30 min 内,少数在 2 h 内。未死动物(绝大部分在 2 h 不死者都存活)逐渐恢复正常,以后的活动、食量及体重增长与未中毒动物相似。与马钱子生品(LD_{50} 为 85.2 mg/kg)相比,6 种发酵品的 LD_{50} 上升率约在 27.8%~50.6%,同马钱子的炮制品(上升率为 34.3%)基本一致,毒性均有明显下降,见表 3。

表 3 马钱子发酵品灌胃小鼠的 LD_{50}
Tab. 3 The LD_{50} of mice by *Semen strychni* fermentation products in gavage

组别	LD_{50} /(mg/kg)	95% 可信限/(mg/kg)	LD_{50} 上升率/%
RMSS	85.2	70.1~103.5	—
PSS	114.4	98.1~133.3	34.3

续表 3

组别	LD_{50} /(mg/kg)	95% 可信限/(mg/kg)	LD_{50} 上升率/%
SCSS	128.3	112.6~146.3	50.6
SBSS	112.4	96.9~130.3	31.9
CUSS	108.9	96.6~122.7	27.8
CCSS	116.5	104.6~129.8	36.7
BBSS	123.9	108.8~141	45.4
CGSS	111.5	93.1~133.7	30.9

3 结 语

中医药学对有毒中药的处理通常采用炮制或配伍等传统手法,真菌等微生物发酵用于中药的降毒保效的范例并不多见。然而,发酵工程作为 21 世纪最重要的生物技术产业之一(又称之为“三色农业”中的“白色农业”),目前正在成为现代中药研究的新热点^[7]。微生物具有特有酶系,这些酶物质强大的分解作用极有可能破坏天然产物中的有毒物质,从而降低其毒副作用。国内实验室将棉籽饼经微生物发酵脱去其中有毒的棉酚、棉酚紫、棉酚、青色素和棉绿素等,脱毒后的棉籽饼可作为富含蛋白质的牲畜饲料^[8]。真菌发酵的本质实际上就是对中药成分进行生物转化的过程,而生物转化是中药现代化研究的重要手段之一^[9]。因此用发酵法对马钱子进行去毒存效是具有一定的科学依据的。

双氯芬酸钠是第三代强效的非甾体消炎镇痛药物,广泛用于慢性风湿性关节炎、变形脊椎症、神经痛、感冒症候群、咽炎、痛经、手术以及拔牙后的镇痛、消炎等。作者将它用作马钱子发酵品主要药效学(镇痛和抗炎作用)研究的阳性对照药。与空白相比,马钱子生品及其 6 种发酵品均有较好的镇痛和抗炎作用($P<0.05$ 或 $P<0.01$),但这两者的镇痛和抗炎作用之间并未见显著性差异($P>0.05$),证明马钱子经发酵后保持了其原有的镇痛和抗炎作用;与马钱子生品相比,6 种药性发酵品的 LD_{50} 上升率约在 27.8%~50.6%,同马钱子的炮制品基本一致,提示发酵与炮制均可降低马钱子的毒性。由此可见,发酵可以为马钱子的降毒保效提供一条新途径。

参考文献(References):

- [1] 林昌松,陈纪藩,刘晓玲,等. 马钱子药理研究及临床应用概况[J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17 (2): 158- 160.
LIN Cang song, CHEN Ji fan, Liu Xiao ling, et al. General situation in pharmacological studies and clinical applications on [J]. **Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology**, 2006, 17 (2): 158- 160. (in Chinese)
- [2] 国家药典委员会. 马钱子: 中国药典 2005 年版第一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 34- 35.
- [3] 潘扬,张弦,蒋亚平,等. 双向发酵前后马钱子生物碱含量及其 HPLC 指纹谱的比较[J]. 南京中医药大学学报: 自然科学版, 2006, 22 (6): 362- 364.
PAN Yang, ZHANG Xian, JIANG Ya ping, et al. A comparison of content of alkaloid of *Semen strychni* and its HPLC fingerprint chromatography before and after bidirectional fermentation[J]. **Journal of Nanjing University of TCM: Natural Sciences Edition**, 2006, 22 (6): 362- 364. (in Chinese)
- [4] 刘亮镜,曹亮,蒋亚平,等. 马钱子经朱红栓菌发酵前后毒性及镇痛、抗炎作用的实验研究[J]. 南京中医药大学学报: 自然科学版, 2009, 25 (3): 205- 208.
LIU Liang jing, CAO Liang, JIANG Ya ping, et al. Toxicity and analgesic and antiinflammatory effects of nux vomica fermented by *Trametes cinnabarina*[J]. **Journal of Nanjing University of TCM: Natural Sciences Edition**, 2009, 25 (3): 205 - 208. (in Chinese)
- [5] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 201- 203.
- [6] 王兴红,李祺德,曹秋娥. 微生物发酵中药应成为中药研究的新内容[J]. 中草药, 2001, 32 (3): 267- 268.
WANG Xing hong, LI Qi de, CAO Qiu e. New field for study of TCM through fermentation by microbe[J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 2001, 32 (3): 267- 268. (in Chinese)
- [7] 黄玉德,施安辉. 微生物强化脱毒棉籽饼的研究与应用[J]. 饲料工业, 1995, 16 (3): 22- 23.
HUANG Yu de, SHI An hui. Research and application of the detoxicated cottonseed cake by microorganism[J]. **Feed Industry**, 1995, 16 (3): 22- 23. (in Chinese)
- [8] 刘学湘,陈建伟. 中药有效成分生物转化的研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27 (2): 14- 18.
LIU Xue xiang, CHEN Jian wei. Research progress of Chinese medicine effective component biotransformation[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008, 27 (2): 14- 18. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)

《食品与生物技术学报》征稿征订启事

《食品与生物技术学报》(双月刊)是教育部主管、江南大学主办的有关食品科学与工程、生物技术与发酵工程及其相关研究的专业性学术期刊,为 CSCD 核心期刊、全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国期刊方阵双效期刊,目前被美国化学文摘(CA)等国内外 10 余家著名检索系统收录。主要刊发食品科学与工程,食品营养学,粮食、油脂及植物蛋白工程,制糖工程,农产品及水产品加工与贮藏,动物营养与饲料工程,微生物发酵,生物制药工程,环境生物技术等专业最新科研成果(新理论、新方法、新技术)的学术论文,以及反映学科前沿研究动态的高质量综述文章等,供相关领域的高等院校、科研院所、企事业单位的教学、科研等专业技术人员、专业管理人员以及有关院校师生阅读,热忱欢迎广大读者订阅。

《食品与生物技术学报》,双月刊, A4(大 16K)开本, 160 页, 全年 6 期, 每册定价 15.00 元, 邮发代号: 28- 79, 全国各地邮局均可订阅。

《食品与生物技术学报》编辑部