

# 不同发酵天数对“栓钱菌质”急性毒性及抗炎、镇痛作用的影响

彭薇, 孙钰, 潘扬\*, 张弦, 蒋亚平

(南京中医药大学药学院, 江苏南京 210029)

**摘要:** 通过急性毒性试验、小鼠扭体试验和耳廓肿胀试验, 比较 7 个不同发酵天数(0、7、20、41、48、62、69 d)的“栓钱菌质”的急性毒性及抗炎、镇痛作用, 研究了不同发酵天数对其毒性效应和抗炎、镇痛作用的影响。实验结果表明, 不同发酵天数“栓钱菌质”毒性下降率(%)大小如下: 0 d $\approx$ 7 d<20 d $\approx$ 41 d<48 d<62 d<69 d。扭体反应次数大小如下: 69 d $\approx$ 62 d>48 d>41 d $\approx$ 20 d>0 d>7 d; 与空白对照相比, 0、7、20、41、48 d 者与马钱子生品一样, 均明显减少醋酸致小鼠扭体反应次数( $P<0.05$ ), 表明发酵 48 d 内基本保留了生品原有的镇痛作用; 而 62 d 和 69 d 者则此活性消失, 且与阳性对照(吲哚美辛)相比有极显著性差异( $P<0.01$ )。耳廓肿胀下降率(%)大小如下: 7 d $\approx$ 20 d>41 d>48 d>0 d>>62 d>69 d; 与空白对照相比, 0、7 d、20、41、48 d 者与生品相同, 皆可显著抑制致炎后小鼠的耳廓肿胀率( $P<0.05$  或 0.01), 表明发酵 48 d 内抗炎作用没有明显变化。综合分析不同发酵天数“栓钱菌质”毒性和药效的结果, 确定其发酵终点应选择在第 41~48 d 较适宜。

**关键词:** “栓钱菌质”; 发酵时间; 马钱子; 急性毒性; 镇痛; 抗炎

中图分类号: TQ 461; R 283.1 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2013)05—0541—05

## Effects of Different Fermentation Days on Acute Toxicity and Analgesic, Anti-Inflammatory Activity of Shuanqian Junzhi

PENG Wei, SUN Yu, PAN Yang\*, ZHANG Xian, JIANG Ya-ping

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

**Abstract:** To observe the effects of different fermentation days of Shuanqian Junzhi (SQJZ, a *Strychnos nux-vomica* product fermented by *Trametes cinnabarina*) on acute toxicity and analgesic, anti-inflammatory activity, seven samples of different fermentation days (0 d, 7 d, 20 d, 41 d, 48 d, 62 d and 69 d) were applied. The acute toxicity and anti-inflammatory, analgesic activities of SQJZ of different fermentation days were evaluated in animal models. Listed as followed was the acute toxicity of different SQJZ in a descending order: 0 d $\approx$ 7 d<20 d $\approx$ 41 d<48 d<62 d<69 d. The sustaining twisting reaction times was: 69 d $\approx$ 62 d>48 d>41 d $\approx$ 20 d>0 d>7 d. According to the

收稿日期: 2013-03-05

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目(yssk-2010); 南京中医药大学中药学优势学科开放课题(2011ZYX5-001)。

\* 通信作者: 潘扬(1964—), 男, 江苏扬州人, 理学博士, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事中药化学与生物技术研究。

E-mail: y.pan2006@163.com

control group, the twisting times caused by acetic acid of the crude, 0 d, 7 d, 20 d, 41 d, 48 d of SQJZ noticeably decreased ( $P < 0.05$ ) just like the crude *Strychnos nux-vomica*, which indicated the analgesic action of the crude did not change significantly within 48 day-fermentation period. However, 62 d and 69 d of SQJZ had no significant analgesic effect and there was a significant difference ( $P < 0.01$ ) in comparison with the positive drug indometacin, which showed a complete loss of the anti-inflammatory effect after 62 day-fermentation. The swelling percent decrease of external ear was: 7 d  $\approx$  20 d  $>$  41 d  $>$  48 d  $>$  0 d  $>>$  62 d  $>$  69 d. With the control group, 0 d, 7 d, 20 d, 41 d and 48 d of SQJZ were able to reduce the swelling of murine external ear caused by croton oil ( $P < 0.05$  or 0.01), the same as the crude, indicating that their anti-inflammatory effect did not declined through 48 day-fermentation. Therefore, the feasible period of fermentation of SQJZ is about 41-48 days.

**Keywords:** Shuanqian Junzhi, fermentation time, *Strychnos nux-vomica*, acute toxicity, analgesic, anti-inflammatory

中药马钱子为马钱科植物马钱 *Strychnos nux-vomica* L. 的干燥成熟种子, 2010 版《中国药典》记载其性温, 味苦, 具通络止痛、散结消肿之效<sup>[1]</sup>, 是中医临床常用的活血化瘀药。现代研究表明, 马钱子具有较好的镇痛、抗炎、抗肿瘤等药理活性<sup>[2-3]</sup>, 其主要有效成分是生物碱类, 包括土的宁、马钱子碱、土的宁氮氧化物和马钱子碱氮氧化物等。由于马钱子“其毒甚烈”(《医学衷中参西录》), 故临床内服须用其炮制品。“双向发酵”是作者所在实验室创立的一种使药用真菌与药材组合进行固体发酵以生产药物的现代生物技术<sup>[4]</sup>, 它为毒性中药“降毒存效”开辟了一条新途径<sup>[5]</sup>。前期作者运用该项技术对马钱子进行发酵减毒研究, 已证实其经朱红栓菌 *Trametes cinnabarina* 发酵后形成的发酵品(简称为“栓钱菌质”)中多种原有的生物碱成分发生了质和量的变化, 毒性较大的土的宁和马钱子碱含量呈现下降趋势<sup>[6]</sup>; 而毒性相对较小的土的宁氮氧化物和马钱子碱氮氧化物有不同程度的增加<sup>[7]</sup>。药理实验也表明: 与马钱子生品相比, “栓钱菌质”毒性有所降低且保持了其原来的镇痛、抗炎作用<sup>[8]</sup>, 这就说明马钱子发酵减毒与目前公认的炮制机理<sup>[9]</sup>基本相同。

一般认为, 为了获得最佳发酵产品, 当“栓钱菌质”的发酵终点达到时, 必须终止发酵过程; 如果发酵时间(天数)过长或过短, 其降低毒性和提高(保持)药效的效应必将相应变差。本实验比较不同发酵天数“栓钱菌质”急性毒性及抗炎、镇痛作用的差别, 旨在为其发酵终点的确定提供科学依据。

## 1 材料

### 1.1 药材与药品

马钱子药材(生品), 购自南京市药业股份公司, 经潘扬教授鉴定为马钱科植物 *Strychnos nux-vomica* L. 的干燥成熟种子; 吡啶美辛片, 购自上海信谊九福药业有限公司。

### 1.2 仪器与试剂

AE240 电子分析天平, 瑞士 METTLER TOLEDO 公司产品; 高压蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂产品; 超净工作台, 江苏无锡空气净化设备厂产品; 微型高速万能粉碎机, 河北省黄骅市齐家务科学仪器厂产品; 巴豆油, 杭州中香化学试剂有限公司提供; 羧甲基纤维素钠, 国药集团试剂有限公司提供; 水为纯净水, 其余试剂均为分析纯。

### 1.3 动物与菌种

ICR 小鼠, 由扬州大学比较医学中心提供; 朱红栓菌 *Trametes Cinnabarina* (Jacq.: Fr.) Fr., 由南京中医药大学药用菌与中药生物技术研究所在分离、鉴定、保藏并复壮。

### 1.4 “栓钱菌质”制备

按双向固体发酵的制备工艺进行操作<sup>[10-11]</sup>。将马钱子粉碎成粗粒(过 10 目筛) 5 g, 加适量水稍润湿, pH 自然, 填入粗试管( $\varphi$  32 mm  $\times$  200 mm), 混合均匀, 扎口, 121  $^{\circ}$ C 高压灭菌 50 min, 冷却; 从菌种斜面上切取绿豆粒大小的菌丝体(带培养基)一块, 移入发酵基质的表面(使二者需有接触), 扎口, 置

于培养箱中 27 ℃ 恒温培养。每天严密观察红栓菌在马钱子(基质)上的生长情况,分别在发酵至第 0、7、20、41、48、62、69 天时,掏取试管中的发酵物,60 ℃ 下干燥 4~6 h,即得“栓钱菌质”(简称为“SQJZ”),低温避光(4 ℃ 冰箱)保存。

### 1.5 试液配制

**1.5.1 药品混悬液的配制** 马钱子生品和不同时间段的发酵品,先粉碎成粗颗粒,然后加同质量的药用淀粉混合均匀,再粉碎过 80 目筛,加质量分数 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。

**1.5.2 体积分数 0.5% 醋酸溶液的配制** 精密量取冰醋酸 0.5 mL,加蒸馏水使溶散成 100 mL,即得,密闭保存。

**1.5.3 体积分数 2% 巴豆油溶液的配制** 精密量取巴豆油 2 mL,加乙醚 73 mL、无水乙醇 20 mL 使溶散,加蒸馏水至 100 mL,即得,低温密闭保存。

## 2 实验方法

### 2.1 急性毒性实验

将不同发酵天数“栓钱菌质”的 7 个样品分别进行实验。每个样品取 18~22 g 小鼠,雌雄各半,随机分组,每组 10 只,以预试验结果选择适当的组数(5~6 组)和剂距。实验前小鼠禁食(不禁水)12 h 后,以 0.2 mL/10 g 的剂量灌胃给予不同浓度的药物,观察并记录给药后 7 d 内小鼠的精神、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,采用 LD50 CALC(Ver. 2.0)软件(Bliss 法)计算半数致死量(LD<sub>50</sub>)和 95% 可信限;并按下式计算不同发酵天数“栓钱菌质”相对于马钱子生品的毒性下降率(%)。

毒性下降率=

$$\frac{(\text{发酵品的 LD}_{50} - \text{生品的 LD}_{50})(\text{mg/kg})}{\text{生品的 LD}_{50}(\text{mg/kg})} \times 100\%$$

### 2.2 镇痛作用

醋酸腹腔注射致小鼠扭体试验<sup>[12]</sup>:取体质量 20~24 g 雄性小鼠 100 只,按体质量随机分为 10 组,每组 10 只:①模型空白对照组(质量分数 0.5% CMC-Na 水溶液 20 mL/kg);②阳性对照组(吲哚美辛 20 mg/kg);③生马钱子药材组(按生药计 20 mg/kg);④—⑩分别为发酵 0、7、20、41、48、62、69 d 的“栓钱菌质”(按发酵品计 20 mg/kg),各组给药体积按

20 mL/kg 一次性灌胃。给药后 0.5 h,各组小鼠腹腔注射体积分数 0.5% 醋酸溶液 0.2 mL/只,观察并记录注射醋酸 15 min 内各小鼠发生扭体反应(腹部内凹、躯干与后腿伸张、臀部高起)的次数。

### 2.3 抗炎作用

对巴豆油所致鼠耳肿胀的影响<sup>[12]</sup>:取体质量 20~24 g 雄性小鼠 100 只,按体质量随机分为 10 组,每组 10 只:①模型空白对照组(质量分数 0.5% CMC-Na 水溶液 20 mL/kg);②阳性对照组(吲哚美辛 20 mg/kg);③生马钱子药材组(按生药计 20 mg/kg);④—⑩分别为发酵 0、7、20、41、48、62、69 d 的“栓钱菌质”(按发酵品计 20 mg/kg),各组每日灌胃 1 次,给药体积按 20 mL/kg,连续给药 4 d。末次给药 0.5 h 后,用体积分数 2% 巴豆油溶液 0.05 mL 涂于小鼠右耳两侧,左耳不涂作为正常对照。致炎后 4 h,将小鼠颈椎脱臼致死,自耳廓剪下左、右两耳,用打孔器(直径 9 mm)分别在两耳的同一部位打一圆耳片,电子天平称质量(精确至 0.1 mg),记录每鼠左右耳片的质量(mg),计算其耳廓肿胀度(即每鼠右耳片质量减去左耳片质量)(mg),并按下式得出耳廓肿胀下降率(%)。

耳廓肿胀下降率=

$$\frac{(\text{对照组的耳廓肿胀度} - \text{发酵品的耳廓肿胀度})(\text{mg})}{\text{生发酵品的耳廓肿胀度}(\text{mg})} \times 100\%$$

耳廓肿胀度以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 17.0 软件,各组间比较采用单因素方差分析。

### 2.4 统计学方法

以上镇痛、抗炎结果采用 SPSS 17.0 统计软件处理,耳廓肿胀度(mg)和扭体次数计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),方差齐者采用 LSD 法,方差不齐采用 Tamhane's T2 法, $P < 0.05$  者为差异有显著意义。

## 3 结果与分析

### 3.1 实验结果

**3.1.1 对急性毒性的影响** 各组小鼠灌服不同发酵天数药液后,均出现不同程度的兴奋症状,如活动明显增多、烦躁不安,甚至惊厥、抽搐而死亡,死亡时间一般在 30 min 内。低剂量小鼠中毒潜伏期较长,多在 3~5 h 后死亡,有的给药后小鼠反复抽搐而不死亡,后逐渐恢复正常,其活动、饮食及精神状态也与未给药小鼠基本相同。对中毒死亡小鼠进行解

剖后未发现病变组织。不同发酵天数“栓钱菌质”毒性下降率(%)大小如下:0 d≈7 d<20 d≈41 d<48 d<62 d<69 d。不同发酵天数“栓钱菌质”的LD<sub>50</sub>值和毒性下降率见表1。

表1 不同发酵天数“栓钱菌质”的急性毒性

Table 1 Effect of fermentation days in the acute toxicity of SQJZ

发酵天数/d	LD <sub>50</sub> /(mg/kg)	LD <sub>50</sub> 95%可信限/(mg/kg)	毒性下降率/%
0	100.6	87.7-115.5	-
7	94.5	75.9-117.7	-
20	121.3	102.5-143.5	20.6
41	129.4	90.8-184.3	28.6
48	178.1	114.1-278.2	77.0
62	264.3	228.7-305.3	162.7
69	307.2	253.0-373.0	205.4

**3.1.2 对镇痛作用的影响** 扭体反应次数大小如下:空白≥69 d≈62 d>48 d>41 d≈20 d>0 d>7 d>生品>吲哚美辛,且与空白对照相比,生品,发酵0、7、20、41、48 d者均明显减少醋酸致小鼠扭体反应次数(P<0.05),表明发酵48 d内镇痛作用没有明显下降;而62 d和69 d者则镇痛作用消失,与阳性对照(吲哚美辛)相比有极显著性差异(P<0.01)。扭体反应次数数据见表2。

**3.1.3 对抗炎作用的影响** 耳廓肿胀率(%)大小如下:空白≥69 d>62 d>20 d>7 d≈0 d>48 d>41 d>生品>吲哚美辛,且与空白对照相比,生品,发酵0、7、20、41、48 d者均可显著抑制致炎后小鼠的耳廓肿胀率(P<0.05或0.01),表明发酵48 d内抗炎作用没有明显变化。耳廓肿胀度(mg)及耳廓肿胀率(%)数据见表2。

### 3.2 结果与讨论

实验结果表明,不同发酵天数“栓钱菌质”毒性下降率(%)大小如下:发酵0 d≈7 d<20 d≈41 d<48 d<62 d<69 d。扭体反应次数大小如下:发酵69 d≈62 d>48 d>41 d≈20 d>0 d>7 d;与空白对照相比,发酵0、7、20、41、48 d者与马钱子生品一样,均明显减少醋酸致小鼠扭体反应次数(P<0.05),表明发酵48 d内基本保留了生品原有的镇痛作用;而62 d和69 d者则此活性消失,且与阳性对照(吲哚美辛)相比有极显著性差异(P<0.01)。耳廓肿胀下降

率(%)大小如下:发酵7 d≈20 d>41 d>48 d>0 d>>62 d>69 d,与空白对照相比,发酵0、7、20、41、48 d者与生品相同,皆可显著抑制致炎后小鼠的耳廓肿胀率(P<0.05或0.01),表明发酵48 d内抗炎作用没有明显变化。

表2 不同发酵天数“栓钱菌质”的镇痛和抗炎作用

Table 2 Effect of fermentation days on the analgesic and anti-inflammatory effects of SQJZ

组别	动物数/n	扭体反应次数(镇痛作用)	抗炎作用	
			耳廓肿胀度/mg	肿胀下降率%
空白	10	23.9±12.37	14.99±4.27	-
吲哚美辛	10	6.8±9.66**	7.47±5.23**	50.2
生品	10	9.9±9.50*	8.74±6.23*	41.7
SQJZ 0 d	10	12.9±7.39*	9.35±6.43*	37.6
SQJZ 7 d	10	11.6±11.01*	8.13±4.62**	45.8
SQJZ 20 d	10	13.5±8.34*	8.49±6.59*	43.4
SQJZ 41 d	10	13.9±7.62*	8.54±7.52*	43.0
SQJZ 48 d	10	14.7±5.06*	8.79±7.94*	41.4
SQJZ 62 d	10	19.5±11.52###	12.55±5.67	16.3
SQJZ 69 d	10	20.7±11.87###	13.11±7.47	12.5

注:与空白对照相比,\*P<0.01,\*\*P<0.01;与阳性对照相比,###P<0.01。

表面上看,发酵62 d和69 d者急性毒性下降率虽然分别达162.7%和205.4%,毒性相比马钱子生品下降幅度较大,但实质上二者的镇痛和抗炎作用已丧失,故仍以48 d或41 d者(毒性下降率各为77%和28.6%)为佳。另外,比较分析发酵41 d和48 d“栓钱菌质”的镇痛和抗炎作用,除了这二者的两种作用与马钱子生品保持基本一致外,41 d者镇痛作用稍强;而48 d者抗炎作用略胜。

## 4 结语

综上所述,“栓钱菌质”制备所需发酵天数要控制在一个合理的范围内,发酵时间过短不能达到降低毒性的目的,而发酵时间过长则会影响到马钱子原有的临床作用效果,因此最后确定其发酵终点应选择在第41~48 d较适宜。至于其中有毒成分和有效成分质和量的变化,还有待于进一步深入研究。

## 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [2] Yin W,Wang T S,Yin F Z,et al. Analgesic and anti-inflammatory properties of brucine and brucine N-oxide extracted from seeds of *Strychnos nux-vomica*[J]. **J Ethnopharmacol**,2003,88(2):205-214.
- [3] Deng X K,Yin W,Li W D,et al. The anti-tumou effects of alkaloids from the seeds of *Strychnos nux-vomica* on HepG2 cells and its possible mechanism[J]. **J Ethnopharmacol**,2006,106(2):179-186.
- [4] 庄毅,潘扬,张李阳,等. 药用真菌“双向发酵”的起源、发展及其优势与潜力[J]. 中国食用菌,2007,26(2):3-6.  
ZHUANG Yi,PAN Yang,XIE Xiao-mei,et al. The origin,development and its advantage and potential of 'the bi-directional solid fermentation' for medicinal fungi[J]. **Edible Fungi of China**,2007,26(2):3-6.(in Chinese)
- [5] 涂霞,潘扬. 双向发酵——毒性中药炮制减毒的新途径[J]. 菌物研究,2010,8(1):52-56.  
TU Xia,PAN Yang. The Bi-Directional fermentation technology:a new approach to attenuating the toxicity of toxicity of toxic Chinese materia medica[J]. **Journal of Fungal Research**,2010,8(1):52-56. (in Chinese)
- [6] 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 指纹图谱的比较[J]. 南京中医药大学学报:自然科学版,2006,22(6):362-36.  
PAN Yang,ZHANG Xian,JIANG Ya-ping,et al. The comparison of contents of alkaloids and the HPLC fingerprints of *Strychnos nux-vomica* between after and before bi-directional solid fermentation[J]. **Journal of Nanjing TCM University:Natural Science Edition**,2006,22(6):362-365.(in Chinese)
- [7] Yang G M,Pan Y,Liu L J,et al. Simultaneous determination of strychnine,brucine,strychnine N-oxide and brucine N-oxide in crude and fermented nux vomica by capillary zone electrophoresis with ephedrine hydrochloride as an internal standard[J]. **Chromatographia**,2011,73(11-12):1223-1228.
- [8] 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):203-208.  
LIU Liang-jing,CAO Liang,JIANG Ya-ping,et al. Experimental study on the toxicity and analgesic,anti-inflammatory activity of *Strychnos nux-vomica* after and before fermentation by *Trametes cinnabarina* [J]. **Journal of Nanjing TCM University:Natural Science Edition**,2009,25(3):203-208. (in Chinese)
- [9] Cai B C,Hattori M,Namba T. Processing of nux vomica . Composition of the seeds of *Strychnos nux-vomica* in alkaloids on traditional drug processing[J]. **Chem Pharm Bull**,1990,38(5):1295-1298.
- [10] 徐锦堂. 中国药用真菌学[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1997.
- [11] 庄毅. 真菌药用“固体发酵”上游工程建设基本研究方法[J]. 中国食用菌,2009,28(4):8-9,14.  
ZHUANG Yi. The Basic methodology for fungi used in drug 'Solid-state Fermentation'[J]. **Edible of Fungi of China**,2009,28(4):8-9,14. (in Chinese)
- [12] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 第2版. 北京:人民卫生出版社,1991.