

芽孢杆菌发酵炮制中药红花增强溶血栓药效研究

吴 泊 邵幼姿 薛莉丽 潘雯斓

(江苏大学附属宜兴市人民医院药学部, 宜兴, 214200)

摘要 目的:探讨芽孢杆菌发酵炮制中药红花增强溶血栓药效。方法:采用系统数值化和数值系统调控技术对发酵炮制条件进行合理适量优化,用角叉菜胶法对小鼠尾部进行了血栓实验,检测了大鼠纤溶和凝血指标。结果:在相同剂量下(1 000 U/mL)A 红发组(红花与 C2-13 共发酵组)比其余各组有明显缩短血栓长度($P < 0.05$),凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)以及活化的部分凝血活酶时间(APTT)被延长,明显缩短优球蛋白溶解时间(ELT)的作用($P < 0.05$)。结论:红花通过 C2-13 菌种发酵炮制后可有效提升纤溶活性、抗凝作用,增大溶血栓的药效。

关键词 芽孢杆菌;发酵炮制;中药红花;增强;溶血栓;抗凝;纤溶活性;药效

Study on the Efficacy of Bacillus Fermented Chinese Medicine Flos Carthami in Enhancing Thrombolytic Effect

Wu Bo, Shao Youzi, Xue Lili, Pan Wenlan

(Department of Pharmacy, Yixing People's Hospital, Jiangsu University, Yixing 214200, China)

Abstract Objective: To explore the efficacy of bacillus fermentation processing Chinese medicine Flos Carthami in enhancing thrombolytic effect. **Methods:** Numerical system and system of numerical control technology were used for reasonable proper optimization of fermentation processing conditions. The carageen glue method was carried out on mice tail thrombosis experiment to test the fibrinolytic and blood coagulation index of rats. **Results:** Under the same dose (1 000 U/mL), A red hair group (Flos Carthami and C2-13 fermentation group) significantly shorten thrombus length than the rest of the groups ($P < 0.05$). The effective extension of thrombin time (TT), prothrombin time (PT) and activated clotting time (APTT) live enzymes were delayed, and significantly shorten euglobulin dissolution time (ELT) effect ($P < 0.05$). **Conclusion:** Flos Carthami by C2-13 strains fermentation processing after anticoagulant effect, can effectively improve fibrinolytic activity, and increase the efficacy of dissolving thrombus.

Key Words Bacillus; Fermentation processing; Chinese medicine Flos Carthami; Enhanced; Dissolve thrombus; Efficacy

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.07.049

微生物所自有的酶系会影响物质转化,但必须是在条件温和的情况下,生成全新的物质。中药炮制时需在中药中使用微生物发酵,有利于药物药效的发挥;利用微生物发酵可将药物进行转变,成为更容易被人体吸收的小分子;中药的有效成分可借助微生物代谢生成全新的药物,其药效发挥更佳。微生物发酵的次生代谢产物和药物成分可以发生协同作用,这样可以增强药效。红花 *Carthamus tinctorius* L. 属于菊科植物红花中的干燥花,其功效主要是祛瘀止痛、活血通络。红花是一种活血通络、去瘀止痛的良药,属于菊科植物红花的干燥花^[2]。最近几年被广泛用于血行不同,淤血阻滞,另外,红花对降血脂、抗血栓也十分有疗效。本文炮制中药红花采用的微生物是一株高纤溶酶活性的地衣芽孢杆菌,对共发酵条件进行研究,同时进行发酵产物药效实验,

明确其的药效作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物 红花,产地四川简阳,经过鉴定被归为菊科植物红花 *Carthamus Tinctorius* 的干燥花。

1.1.2 动物 实验所需 60 只 SD 大鼠均由相关中药研究所实验动物中心提供,体重为 240 g 左右,差值在 20 g 以内,雌雄各 30 只。动物饲养条件:饲养环境温度为 18 ~ 29 °C,日温差 ≤ 3 °C,相对湿度达 40% ~ 70%,新鲜空气换气次数 10 次/h,气流速度 ≤ 0.18 m/s,压差 25 Pa,洁净度 1 万级,氨浓度 15 mg/m³,噪声 ≤ 60 dB,照度 150 ~ 300 Lux。饲料应无菌、高营养,每次投放 3 ~ 4 d 的饲料,添加熟鸡蛋和灭菌葵花籽。)

1.1.3 菌种 本实验室将地衣芽孢杆菌 C2-13 分

离后,由中国科学院某生物研究所环境研究实验室鉴定、传代保存。

1.1.4 试剂 凝血酶(中国药品生物制品鉴定所,批号:31022822);冻干人纤维蛋白原(中国药品生物制品鉴定所,批号:210950031);角叉菜胶(sigma公司,批号:8001-79-4);蚓激酶肠溶胶囊(北京百奥药业有限公司,批号:20320902);凝血酶时间,凝血活酶时间,凝血酶原时间,纤维蛋白原试剂盒(太阳诊断系列产品);其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 发酵操作流程 红花发酵采用的是生长曲线法,将红花全花置于 40℃ 高温干燥后粉碎,然后采用 200 目筛进行过滤,以进一步研究在 C2-13 在生长过程中受到红花的影响程度,对各个培养时间段 OD 值通过 30 nm 测量,以此 OD 值来绘制其生长曲线。C2-13 菌株数值系统调控技术、发酵培养基发酵条件调控、优化采用系统数值。

1.2.2 纤溶酶活检测 纤溶酶活的检测主要是采用 Mullertze 和 Astrop 的方法制定标准化的纤维蛋白平板,并将样品用微量注射器注射于平板上,恒温保持 37℃,持续 9 h,之后采用游标卡尺对溶斑的垂直直径进行测量,将溶斑垂直直径与尿激酶标准曲线做比较,得出酶活单位。

1.2.3 药效实验

1.2.3.1 正常大鼠凝血及纤溶指标的影响 动物分组给药:每组 10 只大鼠,5 只雌鼠,5 只雄鼠,每天按量给每组用药,每天为大鼠灌胃 0.01 mL/g,并持续 10 d。指标观察以及检测方法:凝血酶时间(TT)、血酶原时间(PT)、活化的部分凝血活酶时间(APTT)的测定用 ACL200 全自动血凝仪及其配套产品(美国 Coulter 公司,型号:ACL200);优球蛋白溶解时间(ELT)测定按药理实验方法学;纤维蛋白原(FIB)的测定用采用 Clauss 凝固法。

1.2.3.2 小鼠尾部血栓检测 将所有小鼠随机分配,分为 6 组,雌鼠、雄鼠各 5 只,每组公 10 只小鼠,分别为 A 对照(磷酸缓冲液 0.02 mol/L),B 红混(将白发浓缩 2 倍与 25 g/L 红浸等体积混合),C 红发(C2-13 与红花一起发酵加清液 1 000 U/mL),D 红浸(红花水提液 25 g/L),E 蚓激酶(配置成 1 000 U/mL),F 白发(C2-13 发酵加清液 1 000 U/mL),每天为小鼠分别灌胃 0.01 mL/g。持续 3 d 后,为小鼠做尾部血栓造型,采用的方法为角叉菜胶法。用药 2 d,之后对血栓出现情况进行观察,并测量长度。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件,计数

资料用百分数(%)表示,采用 χ^2 检验;计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 发酵炮制的优化 将培养基采用数值系统调控技术和系统数值化进行优化和调控。使用系统数值化和数值系统调控技术调控、优化了培养基。X1-X8 为碳源含量(%),X9-X22 为氮源含量(%),分别是糖蜜、葡萄糖、大豆蛋白陈、玉米蛋白粉等;X23-X29 为无机盐含量(%),分别是 $MgCl_2$ 、 $ZnSO_4$ 等,X30-X34 为发酵条件,X30 表示 pH,X31 表示装量(%),X32 表示温度(℃),X33 表示接种量(%),X34 表示发酵时间(h),Y 表示发酵液的酶活(U/mL)。有 5 项试验是采用系统因素量的优化配置进行的,原系统因素由原来的 34 个缩减了 21 个剩 13 个,试验结果见表 1 共发酵前。红花含量 0~30(g/L)成为其中的一个因素,也就是说将优化后的地衣芽孢杆菌 C2-13 和培养基中加入到 X35 中一起发酵,以此达到最大优化程度提高发酵条件,结果见表 1 共发酵后。

2.2 红花剂量对 C2-13 生长的影响结果 在 0%~5% 的不同含量条件下,红花对 C2-13 的生长也会产生不同的影响,或促进或抑制,当培养基中的红花含量为 0~30 g/L,可促进地衣芽孢杆菌的生长,当红花含量超出 30 g/L,则会抑制其生长,所以在研究过程中对红花的使用比例要合理。值得关注的是当红花含量在 20~30 g/L,在促进 C2-13 生长的同时还延长了其生长期,对微生物作用于红花有效成分纤维酶的产生和发酵炮制提供有利条件。

表 1 系统因素量的优化配置试验设计及结果(g/L)		
组别	共发酵前	共发酵后
X6	3	3
X11	2	2
X14	2	2
X20	1.7	1.7
X23	0.2	0.2
X24	1.3	1.3
X28	0.19	0.19
X29	0	0
X30	11	11
X31	42	42
X32	1/16	1/16
X33	4	4
X34	49	49
X35	0	26
Y	665	743

表 2 大鼠尾部血栓和大鼠凝血,纤溶指标情况

组别	血栓长度(%)	APTT(S)	PT(S)	TT(S)	ELT(min)	FIG(g/L)
对照	49.27±8.74	24.88±12.67	18.35±15.58	42.85±15.37	205±18	3.32±0.29
红浸	39.28±11.36	2.52±20.68	21.19±18.35	48.76±18.35	185±12	3.23±0.36
蚓激	36.53±7.26	35.95±17.53	23.52±17.35	55.82±14.62	122±13	3.29±0.25
白发	32.87±9.74	44.63±19.65	28.66±16.25	63.95±15.67	117±5	3.28±0.42
红混	28.75±6.48	46.39±12.35	28.86±16.66	67.48±12.25	98±12	3.22±0.32
红发	22.43±5.49	58.45±5.12	39.65±8.25	79.78±17.62	77±10	3.15±0.27

C2-13 菌株发酵液的酶活性在未添加红花的情况下仅为 665 U/mL,而红花与 C2-13 菌株混合发酵之后提高了药效的活性,如表 2。这个结果提示 C2-13 菌株的次代谢产物和红花中的有效成分可相互作用,提高纤维蛋白的溶解效果。

2.3 小鼠尾部血栓抑制 为小鼠经下皮注射后,小鼠尾部会出现暗红色血栓,而且暗红色血栓会逐渐扩大到一定范围,经过一定时间之后,暗红色转变为紫色,紫色变为黑色,和正常尾分界非常明显,结果见表 2。在一样的水平下,F 组明显可以抑制小鼠尾部血栓的发生率,而且效果也很好。

2.4 大鼠凝血及纤溶指标结果

2.4.1 凝血效果比对 对凝血酶时间、凝血活酶时间、凝血酶原时间进行测定,反映机体内外源性凝血的途径。如下表中,B,C,D,E,F 组和 A 组作比较,发现在同等药剂量下,F 组凝血酶时间、凝血活酶时间、凝血酶原时间有效延长,且差异明显,说明 A 红花组对内外源性凝血系统有抑制作用,且效果超出其他组。

2.4.2 纤溶系统影响比较 溶栓药物评定中对药物溶栓效果通过优球蛋白溶解时间、纤维蛋白原反应,如表 2,A 组与其他组进行比较发现,在同样药剂量情况下,F 组可有效缩短小鼠血液中优球蛋白溶解时间,与其他组差异有统计学意义。血浆纤维蛋白原的含量虽然比以前低,但是变化并不明显,这就表明药剂量并不影响机体的凝血机制,而且其不良反应也小。

3 讨论

使用微生物技术发酵炮制中药就是将生物进行转化。将微生物生长分泌的胞外酶混入培养基中,作用于培养基中的微生物与中药发生化学反应,也就是说微生物对中药的发酵炮制有很好的效果。微生物发酵炮制中药的机理就是利用微生物的转化能力。现代发酵工程证明,微生物具有很多能力,例如氧化、酯化、还原化^[5]。所以说,利用微生物发酵炮制中药其实就是利用酶催化中药中的有效成分,并

将有效成分改性的生物转化过程。红花能抗凝血、降血栓的有效成分是其红花醌苷和红花黄色素,它的作用机理是将其溶解,将人体内纤溶酶原激活剂激活,将其激活为纤溶酶,从而起到溶解血栓的作用^[6]。红包中有很多糖苷类化合物,而糖苷类化合物主要是由葡萄糖和酚羟基缩合形成的。当糖苷水解酶时就会将这些葡萄糖水解掉,葡萄糖水解掉之后,酚羟基的数目就会增大,从而提高红花的抗氧化活性^[7]。另外,糖苷化合物水解之后产生的苷元比较容易吸收,生化转化率高,更能发挥出其的药理作用。发酵一方面能够促使微生物形成各种各样的此生代谢产物,这些代谢产物本身就是功效较好的药物^[8];另外一方面可以根据微生物中含有的酶定向地转化成为某种药物,使其的功效朝着预先的方向发展,例如已知某种生物中含有某种酶,而含有的这种酶可以将某种化合物结构改变,从而产生新的化合物^[9]。或者是把中药中的有效成分作为基础,经过微生物代谢产生新的化合物,微生物代谢产生新的化合物和中药中的成分可以形成新的化合物。微生物在中药环境中能够发生新的代谢反应,这是由于中药中的某些成分对微生物的代谢和生长有抑制或者是促进作用,以此来改变微生物的代谢途径,改变代谢途径后形成新的成分^[10]。微生物分解是将中药中的有毒物质分解掉,分解掉之后降低中药的不良反应,另外,微生物的分解作用也可以使中药中不容易消化吸收的大分子物质直接转化为小分子物质,转化成的小分子物质非常容易被肠道吸收掉^[11]。

利用小鼠尾部血栓实验对 C2-13 红花发酵液所含的药效成分进行测定;用纤维蛋白原和优球蛋白溶解时间作为纤溶作用的测定指标;测定凝血活酶时间和凝血酶时间等反映机体内凝血途径的情况^[12]。红花组的小鼠尾部血栓长度明显比其他组的小鼠尾部血栓长度短,降低了 FIG 的含量,缩短了 ELT 的时间,延长了 PT、TT 的数值,这就说明红花与 C2-13 共发酵炮制后对机体内的内外源性凝血体

系有很好的抑制作用,纤溶酶得到提高,有效发挥红花醪液的溶栓、抗栓作用^[13]。

通过分析红花中的有效成分可得,发酵炮制后溶栓作用和 C2-13 产生的糖普水解酶有关系。红花中很多糖普类化合物都是由酚羟基和葡萄糖缩合而成。例如 6-羟基山萘酚-3-O-葡萄糖苷,6-羟基山萘酚-7-O-葡萄糖苷,新红花苷,槲皮苷等^[14]。糖苷键上的葡萄糖被糖苷水解酶水解之后生成的苷元相比未水解的苷元吸收效果更好,同时提高了生物利用率,红花中的有效成分可更好地发挥药理作用。

前期准备工作将 C2-13 和红花共发酵物质的成分采用 HPLC 做了测定,结果发现红花中消失了一个保留时间为 7.624 分的吸收峰,新出现了 2 个保留时间 12.45 分的吸收峰。发酵后血栓能力的提高可能对其造成了影响,最根本的是与 C2-13 的发酵炮制有关系^[15]。深入研究需采用磁共振成像等先进设备。

微生物的分解转化能力极强,能够产生次生代谢产物,利用微生物发酵技术来炮制中药,微生物技术改变药物物理性比物理化学炮制手段提高药性更强,而且还可以降低药物的不良反应,扩大了适应证^[16]。但微生物技术在药物炮制中的潜能并没有彻底发挥出来,所以说深入研究微生物在中药炮制中的物质基础对中药现代化和新的活性产物有着非常重要的意义。

微生物发酵就是利用微生物代谢过程来产生酶,产生的酶能够催化底物,目前的微生物整体细胞能够为反应催化剂的生物催化技术和生物转化提供较好的基础,其专一性强,条件简单,是生物转化技术中发展最为迅猛的分支之一,尤其是提取分离技术的改进,分离技术的改进使微生物发酵技术的应用不在局限于小分子的转化和药物酿造,而是广泛用于天然化合物的生物合成、生物催化物的合成、光学活性化合物的拆分、新药物的开发、药物前体化合物的转化等各种领域^[17]。到目前为止,微生物技术已经应用于 50 多种反应,其中有水解、酯化、水合、酰化、脱水、氨化、芳构化、异构化等有机化学反应,

还有羟基化、脱氢、氢化、环氧化等各类氧化还原反应以及各类重要药物的合成转化领域^[18]。

参考文献

- [1] 陶建武,姚彩萍,王冀春,等. 绞股蓝在大鼠肝的抗脂质过氧化作用[J]. 中国临床药理学杂志,2001,10(3):160-162.
- [2] 黄夏琴,蒋惠娣,徐庆,等. 紫珠草抗脂质过氧化作用的实验研究[J]. 中草药,1998,29(4):246-249.
- [3] 金鸣,蔡亚欣,李金荣,等. 邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法检测 H_2O_2 - Fe^{2+} 产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理学进展,1996,23(5):553-555.
- [4] 张均田. 现代药理实验方法[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1998:21.
- [5] 何晨,金钊,冯志华,等. 芽孢杆菌发酵炮制中药红花增强溶血栓药效研究[J]. 中国中药杂志,2005,30(5):340-343.
- [6] 刘国勋,吴铁,陈志东,等. 小鼠体内血栓形成动物模型的建立及在抗血栓药物筛选中的应用[J]. 中国应用生理学杂志,1999,15(3):281-282.
- [7] Liu GX, Wu T, Chen ZD, et al. Establishment of animal model of thrombus formation in mice and its application in screening antithrombotic drugs[J]. Chinese Journal of Applied Physiology, 1999, 15(3): 281-282.
- [8] 邱凯,万昌秀,李天全,等. 应用系统全面反馈试验优化技术提高 RGD 短肽液相合成产率的初步研究[J]. 科技通报,2003,19(1):25-28.
- [9] 段智变,江汉湖,张书霞,等. 纳豆激酶粗制液对家兔溶血栓作用及其机制研究[J]. 营养学报,2003,25(1):46-51.
- [10] 徐叔云,陈修. 药理试验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1982:838.
- [11] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:518.
- [12] ASTRUP T, MULLERTZ S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. Arch Biochem Biophys, 1952, 40(2):346-351.
- [13] 段智变,江汉湖,张书霞,等. 纳豆激酶粗制液对家兔溶血栓作用及其机制研究[J]. 营养学报,2003,25(1):46-51.
- [14] 邱凯,万昌秀,李天全,等. 应用系统全面反馈试验优化技术提高 RGD 短肽液相合成产率的初步研究[J]. 科技通报,2003,19(1):25-28.
- [15] 张冬青,揭广川. 现代发酵技术在提高中药药用效能方面的作用[J]. 广东轻工职业技术学院学报,2005,4(1):34-37.
- [16] 李羿,刘忠荣,吴洽庆,等. 发酵中药——拓展中药新药研究开发的新空间[J]. 天然产物研究与开发,2004,16(2):179-181,184.
- [17] (2017-08-09 收稿 责任编辑:王明)
- [18] 定量标准商榷[J]. 中国药房,2005,16(22):1756-1757.
- [19] 吴冰. 数字化色谱指纹谱技术在六味地黄滴丸药材鉴定中的应用效果评价[J]. 医药前沿,2015,5(34):362-362.
- [20] 郭泉,胡容峰,高松,等. 六味地黄制剂的研究现状与中药制剂质量标准的构建[J]. 现代中药研究与实践,2014,28(4):78-81.
- [21] (2017-07-26 收稿 责任编辑:杨觉雄)
- [22] (上接第 1758 页)
- [23] 林静,乐卿清,谢荣伟. 高效液相色谱法测定六味地黄丸(浓缩丸)中马钱苷的含量[J]. 海峡药学,2010,22(6):91-92.
- [24] 姜建萍,曹音,李建芳. 六味地黄丸含量测定方法研究进展[J]. 中医药导报,2010,16(6):136-138.
- [25] 刘志辉. 2005 年版《中国药典》中六味地黄丸与六味地黄颗粒