

引用格式:何栾樱,林子淳,卢建东,等. 基于灵芝双向固体发酵雷公藤减毒持效的研究[J]. 北京化工大学学报(自然科学版), 2021, 48(4): 48–56.

HE LuanYing, LIN ZiChun, LU JianDong, et al. Detoxification and sustained effects of *Tripterygium wilfordii* based on *Ganoderma lucidum* bi-directional solid fermentation[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science), 2021, 48(4): 48–56.

基于灵芝双向固体发酵雷公藤减毒持效的研究

何栾樱^{1,2#} 林子淳^{1#} 卢建东² 熊国良^{2*} 王诗卉^{1*}

(1. 北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029; 2. 深圳市中医院, 深圳 518000)

摘要: 传统中药雷公藤具有抗炎和免疫抑制的作用,但因毒性强而极大地限制了其临床应用。以灵芝为药用真菌,采用双向固体发酵技术发酵雷公藤,并对发酵过程中得到的灵雷菌质进行抗炎活性和肝毒性评价。结果表明,接种量 10 mL/100 mL、发酵 30 天得到的灵雷菌质(N2-G30)在 3.75 μg/mL 的质量浓度下表现出减毒持效的作用,相比于雷公藤,可抑制脂多糖诱导的小鼠 RAW264.7 细胞释放促炎因子 TNF-α 和 IL-6,并且可减轻对人正常肝细胞 L02 增殖的抑制作用。通过液相色谱-质谱联用(LC-MS)分析雷公藤发酵前后主要成分的含量变化,结果显示,与发酵前相比,发酵后雷公藤甲素、雷公藤红素、雷酚内酯的含量增加,雷公藤内酯甲的含量减少,这些成分的含量变化与 N2-G30 的减毒持效作用有关。

关键词: 雷公藤; 灵芝; 双向固体发酵; 抗炎作用; 肝毒性

中图分类号: R392.12 **DOI:** 10.13543/j.bhxbzr.2021.04.006

引言

雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook F)系卫矛科植物,主要产自浙江、江苏等地。雷公藤作为一种传统中药材,始记于《神农本草经》^[1],其性凉味辛,归肝、肾经,具有免疫调节和抗炎作用^[2],是临床上首选的中药免疫抑制剂。然而雷公藤的治疗剂量接近中毒剂量^[1],极大地限制了在临床上的广泛应用。因此,雷公藤的减毒持效研究成为近年关注的焦点。雷公藤的主要化学成分为生物碱类、萜类,其中,生物碱类主要成分有雷公藤春碱、雷公藤晋碱、雷公藤次碱、雷公藤定碱;二萜类主要成分有雷公藤甲素、

雷酚内酯;三萜类主要成分有雷公藤红素、雷公藤内酯甲。它们既是雷公藤的主要药效成分,同时也是减毒持效的主要监测对象。

双向固体发酵技术(bidirectional solid fermentation)是以药用真菌发酵药性基质的一种技术^[3],产物药性菌质常表现出高于真菌和药性基质相加的药效^[2-4],该技术具有增效、解毒、扩大药用范围等显著优势。灵芝(*Ganoderma lucidum* Karst)是多孔菌科真菌,同时也是药理活性优良的药材。在双向固体发酵中,灵芝作为发酵菌种已经得到许多应用,例如可以明显增强草乌的抗炎镇痛作用^[5],有助于附片的解毒增效^[6],对于中药的毒性和药效有很好的改善作用。作为发酵中药的常用菌种,灵芝也是发酵雷公藤的良好选择,其产物命名为灵雷菌质。庄毅等^[7]建立了灵芝双向固体发酵雷公藤的工艺,发现发酵 30 天得到的灵雷菌质相比于雷公藤生药表现出了减毒持效的作用。侯志帆等^[8]检测了雷公藤发酵前后的成分变化,结果表明双向固体发酵可以降低雷公藤中有毒化合物的含量。以上研究仅检测了小鼠给药后的死亡情况和淋巴细胞的增殖情况,并且仅进行了液相色谱检测,辨认出雷公藤甲素和邻苯二甲酸酯类成分含量的下降。而灵雷菌质对

收稿日期: 2021-03-08

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2019ZX09721001); 深圳科学技术项目(20180507183842516); 国家重点研发计划(2018YFA0903000); 国家自然科学基金(21606013)

#并列第一作者: 何栾樱,女,1997年生,硕士生;林子淳,女,1998年生,本科生

*通信联系人

王诗卉, E-mail: wangshihui@mail.buct.edu.cn

熊国良, E-mail: xionggl@163.com

于炎症因子释放的影响还未见报道,对于人正常肝细胞的体外毒性还未经检验,并且雷公藤的主要成分在双向固体发酵中的变化也没有监测。

研究表明,雷公藤的抗炎作用与机体细胞因子的调节有关,现有成药雷公藤多苷(tripterygium glycosides)主要通过影响 toll 样受体 4/核因子- κ B (TLR4/NF- κ B) 信号通路,拮抗和抑制炎症因子的释放,包括人肿瘤坏死因子 TNF- α ^[9]、人白细胞介素 IL-1 β 和 IL-6^[10-11] 等,从而发挥抗炎作用^[12-13]。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)可以识别并激活 TLR4,常用于启动炎症反应。巨噬细胞通常处于基态,活化后可向促炎的 M1 和免疫抑制的 M2 两种表型进行转化^[14]。巨噬细胞受 LPS 刺激后,活化成 M1 表型,分泌 TNF- α 、IL-6 等 M1 型标志物以及一氧化氮合酶 iNOS 等炎症因子,可以用作药物抗炎的研究模型^[15]。

体外研究表明,雷公藤甲素可以通过启动肝细胞氧化应激而导致肝损伤。在人正常肝细胞 L02 中,雷公藤甲素(处理浓度 60 ~ 180 nmol/L,处理时间 12 ~ 48 h)表现出时间和剂量依赖的细胞毒性^[16],通过引发人正常肝细胞 L02 活性氧水平升高^[17]、线粒体膜电位去极化,从而诱导间质细胞凋亡。动物实验也显示,肝脏是雷公藤毒性损伤的易感靶器官之一^[18]。雷公藤肝毒性与功效密切相关,高剂量的雷公藤可使肝脏形成实质性损伤甚至坏死^[19]。

本文以灵芝为药用真菌,采用双向固体发酵技术发酵药性基质雷公藤,得到发酵 30 天和 40 天的产物灵雷菌质,比较它们对 LPS 诱导的 M1 型巨噬细胞释放炎症因子以及对人正常肝细胞增殖的影响,并使用液相色谱-质谱联用(LC-MS)方法分析了雷公藤在发酵前后的成分变化。

1 实验部分

1.1 实验材料和仪器

1.1.1 实验材料

雷公藤购自上海源叶生物科技有限公司,灵芝菌种购自中国微生物菌种保藏管理中心,小鼠 RAW264.7 细胞系购自江苏凯基生物技术股份有限公司,人正常肝细胞 L02 细胞系购自北纳创联生物科技有限公司,TNF- α 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒和 IL-6 ELISA 试剂盒购自默沙克生物技术有限公司,LPS 和 CCK-8 试剂盒购自北京索莱宝科

技有限公司,高糖 DMEM 培养基和 RPMI-1640 培养基购自北京沃卡威生物技术有限公司,雷公藤甲素、雷公藤红素、雷酚内酯标准品购自上海源叶生物科技有限公司;其他试剂均为分析纯,购自北京奥博星生物技术有限公司。

1.1.2 仪器

超净工作台(SW-CJ-1D 型,苏州净化设备有限公司),细胞培养箱(311 型,Thermo Fisher 公司),恒温恒湿培养箱(LHC-150 型,北京陆希科技有限公司),高压灭菌锅(BKQ-B50 II 型,山东博科生物产业有限公司),电子天平(BSA224S 型,Sartorius 公司),酶标仪(K3Plus 型,上海宝予德科学仪器有限公司),离心机(Heraeus Pico 17 型,Thermo Fisher 公司),恒温干燥箱(DGG-9070A 型,上海森信实验仪器有限公司),超高效液相色谱四级杆飞行时间串联质谱仪(XEVO-G2QTOF # YCA121 型,Waters 公司)。

1.2 双向固体发酵

在无菌条件下从灵芝母种斜面上切取 0.5 cm³ 菌块,转接到马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)斜面培养基上,置于 28 ℃、相对湿度 60% 的条件下培养 6 天进行活化^[20-21]。在无菌条件下从活化的灵芝斜面上切取 3 ~ 4 块 1 cm³ 菌块,接入装有 100 mL 液体种子培养基的 250 mL 锥形瓶中,置于 28 ℃ 且避光的条件下以 120 r/min 培养 6 天,挑选液体澄清、菌球大小均匀的液体种子作为发酵菌种。液体种子培养基配方:葡萄糖 20 g/L,酵母粉 5 g/L, KH₂PO₄ 1.5 g/L, MgSO₄ 0.75 g/L, CaCO₃ 2.5 g/L, VB₁ 0.1 g/L。

将雷公藤于 55 ℃ 干燥粉碎,过五号筛(筛孔尺寸为 0.177 mm)后用量筒量取粉末,以 100 mL/瓶的量加入到 250 mL 锥形瓶中,121 ℃ 灭菌 20 min 后均匀接种灵芝菌种,接种量分别为 7 mL/100 mL(命名为 N1 组)和 10 mL/100 mL(命名为 N2 组),每组设置 3 个平行对照。置于 27 ℃^[22]、相对湿度 60% 且避光的条件下培养,定期补充一定水分,每天观察灵芝的生长情况并拍照记录全瓶期、旺盛度等。在发酵的第 30 天和第 40 天,从 N1 组和 N2 组中收集灵雷菌质,于 55 ℃ 干燥粉碎,所得灵雷菌质粉末分别标记为 N1-G30(N1 组发酵 30 天)、N2-G30(N2 组发酵 30 天)、N1-G40(N1 组发酵 40 天)、N2-G40(N2 组发酵 40 天)。固态发酵培养基中仅含雷公藤中药基质。

精密称取灵雷菌质及雷公藤粉末 0.2 g,置于

2 mL 无菌管中进行提取,加入无水甲醇 1.5 mL,于 30 ℃、500 W 超声提取 1 h,冷却至室温,以 12 000 r/min 离心 10 min,分离得到上清液。随机取样 10 组,每组样本重复提取 3 次。混合每组上清液,经过 0.22 μm 微孔滤膜后,将一部分滤液直接用于成分检测,另一部分继续冻干,然后精密称取 0.1 mg 重新溶解于 1 mL 超纯水中,于 121 ℃ 灭菌 20 min,然后稀释成不同浓度用于细胞试药。

1.3 细胞培养

小鼠 RAW264.7 细胞置于 37 ℃、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,以含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和链霉素双抗的高糖 DMEM 培养基为完全培养基,传代周期为 2~3 天,选取对数生长期细胞进行试验。

人正常肝细胞 L02 置于 37 ℃、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,以含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基为完全培养基,传代周期为 2~3 天,选取对数生长期细胞进行试验。

1.4 ELISA 试验

通过 ELISA 试验检测灵雷菌质对小鼠 RAW264.7 细胞释放 TNF-α 和 IL-6 的影响。小鼠 RAW264.7 细胞以每孔 10 000 个/100 μL 接种于 96 孔板,LPS 处理的质量浓度为 1 μg/mL,雷公藤、灵雷菌质处理的质量浓度为 3.75 μg/mL。设置对照组(加入 LPS 但未加样品(雷公藤、灵雷菌质)),试验组(加入 LPS 和样品)。将各组置于 37 ℃、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 48 h,离心后仔细收集上清,使用 ELISA 试剂盒检测 TNF-α 和 IL-6 的相对含量。

1.5 CCK-8 试验

通过 CCK-8 试验检测灵雷菌质对人正常肝细胞 L02 增殖的影响。人正常肝细胞 L02 以每孔 10 000 个/100 μL 接种于 96 孔板,雷公藤和灵雷菌质处理的质量浓度为 1.88、3.75、7.5 μg/mL。设置对照组(有细胞但未加样品(雷公藤、灵雷菌质)),试验组(有细胞且加入样品)。使用 CCK-8 试剂盒测定细胞吸光度值,按照式(1)计算细胞活力。

$$C = \frac{A_c - A_0}{A_b - A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中, C 为细胞活力, A_c 为试验组吸光度值, A_b 为对照组吸光度值, A_0 为背景吸光度值。

1.6 LC-MS 测试

通过 LC-MS 对比雷公藤和灵雷菌质的成分差

异^[23-24]。将样品适当稀释后进行检测。色谱运行条件:以水-乙腈为流动相进行梯度洗脱,流速 0.2 mL/min,柱温 45 ℃,进样量 5 μL。质谱运行条件:ESI+,扫描质量范围为质荷比 m/z 50~1500,毛细管电压 3 000 V,检测器电压 3 000 V,步长 5 spectra/s。运用 MassLynx V4.1 软件处理分析数据,采用 Elemental composition 计算 m/z 对应的分子式,推测相关成分。结果具有高分辨率,对于 m/z 956,分辨率 ≥ 20 000 半高全宽(FWHM),且不损失灵敏度;对于 m/z 152.0712,分辨率 ≥ 10 000 FWHM,且不损失灵敏度。分析时调用 4 位的 m/z 。

1.7 统计学分析

实验数据采用 Origin 统计软件(2018 版)进行分析,样本均数的比较采用完全随机设计的单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。重复数 $n = 3$,结果以平均值 \pm 标准差表示。

2 结果与讨论

2.1 雷公藤双向型固体发酵过程观察

雷公藤接种灵芝进行双向固体发酵,在发酵过程中密切观察 N1 组和 N2 组锥形瓶中灵芝的生长状况,并拍照记录,结果如图 1 所示。发酵第 8 天,N2 组开始出现灵芝菌丝;发酵第 14 天,N1 组开始出现灵芝菌丝;发酵第 17 天,N2 组中灵芝已基本长满全瓶;发酵第 22 天,N1 组中灵芝已长至半瓶,N2 组已完全长满全瓶;发酵第 25 天,N1 组中灵芝已基本长满全瓶;发酵第 30 天,N1 组中灵芝已完全长满全瓶,N2 组中部分灵芝成柱状生长;发酵第 40 天,N1 组中出现柱状灵芝,N2 组中柱状灵芝生长迅速。结果表明,在 7 mL/100 mL 和 10 mL/100 mL 的接种量下,30 天可以使灵芝对雷公藤进行充分发酵,并且接种量较多的灵芝生长更快。

2.2 灵雷菌质的抗炎评价

图 2 为不同样品对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 TNF-α 的影响。由图 2(a)可知,N1-G30 和 N2-G30 组的 TNF-α 相对含量均低于雷公藤组。N1-G30 组的 TNF-α 相对含量为 0.236,与雷公藤组相比降低了 22.37% ($P < 0.01$);N2-G30 组的 TNF-α 相对含量为 0.274,与雷公藤组相比降低了 9.87% ($P < 0.05$)。由图 2(b)可知,N1-G40 和 N2-G40 组的 TNF-α 相对含量与雷公藤组没有显著差异($P > 0.05$)。

图 3 为不同样品对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞

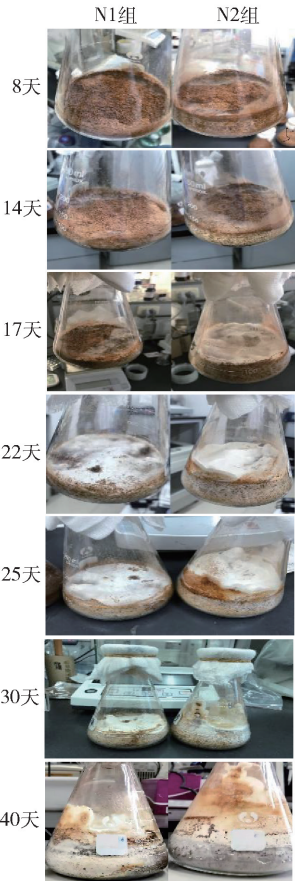
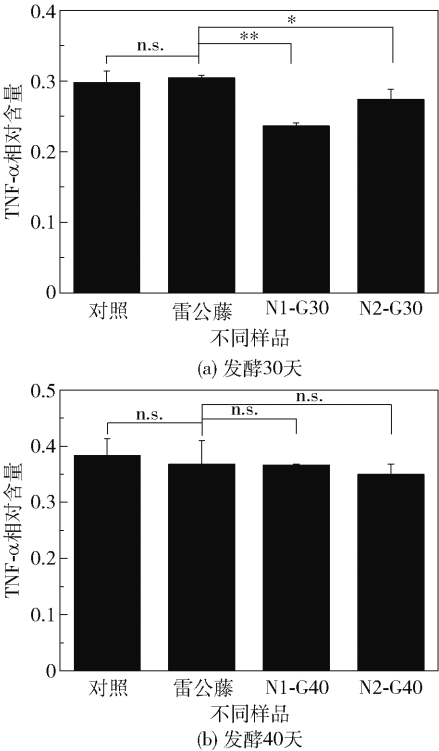


图 1 N1 组和 N2 组中灵芝的生长状况

Fig. 1 Growth status of *Ganoderma lucidum* in N1 and N2 groups

释放 IL-6 的影响。由图 3(a) 可知,仅 N2-G30 组的 IL-6 相对含量低于雷公藤组,N2-G30 组的 IL-6 相对含量为 0.220,与雷公藤组相比降低了 19.12% ($P<0.05$)。由图 3(b) 可知,N1-G40 和 N2-G40 组的 IL-6 相对含量均低于雷公藤组。N1-G40 组的 IL-6 相对含量为 0.567,与雷公藤组相比降低了 15.5% ($P<0.05$);N2-G40 组的 IL-6 相对含量为 0.451,与雷公藤相比降低了 32.79% ($P<0.01$)。

综合以上结果可知,在 3.75 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度下,对于 LPS 诱导的小鼠 RAW264.7 细胞释放 TNF- α 的抑制作用,N1-G30、N2-G30 组强于雷公藤组;对于 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 IL-6 的抑制作用,N2-G30、N1-G40、N2-G40 组强于雷公藤组。虽然各雷公藤组与对照组相比没有抑制炎症因子的释放,但是文献中已有雷公藤在体外抑制炎症因子的报道^[25],可能是因为醇提取的条件、试验的质量浓度无法表现出雷公藤的抗炎活性。灵雷菌质的醇提取物中,只有 N2-G30 对小鼠 RAW264.7 细胞释放 TNF- α 和 IL-6 同时有抑制作用,表现出的抗炎活性



* $P<0.05$, ** $P<0.01$, n. s. 表示 $P>0.05$,下同。

图 2 不同样品对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 TNF- α 的影响

Fig. 2 Effects of different samples on the content of TNF- α released from RAW264.7 cells induced by LPS

有较好的提升。因此,本文进一步探索 N2-G30 的醇提取物对人正常肝细胞 L02 增殖的影响。

2.3 灵雷菌质的肝毒性评价

图 4 为不同质量浓度下雷公藤和 N2-G30 对人正常肝细胞 L02 增殖的影响。由结果可知,在 1.88 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度下,N2-G30 组的细胞活力为 51.6%,与雷公藤组相比提高了 8.48% ($P<0.05$)。在 3.75 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度下,N2-G30 组的细胞活力为 43.76%,与雷公藤组相比提高了 14.04% ($P<0.05$)。在 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度下,N2-G30 组的细胞活力与雷公藤组没有显著差异 ($P>0.05$)。结果表明,与其他质量浓度相比,3.75 $\mu\text{g/mL}$ 的 N2-G30 表现出更好的减毒效果。

2.4 雷公藤发酵前后的成分变化

为了进一步探究雷公藤和 N2-G30 醇提取物的成分差异,选取雷公藤甲素、雷公藤红素、雷酚内酯标准品作为对照进行 LC-MS 测试,结果如图 5 所示。发酵前后的样品在不同保留时间 t_R 处的色谱峰出现了强度不一致的情况,表明灵芝双向固体发酵使雷公藤的成分产生了明显的变化。

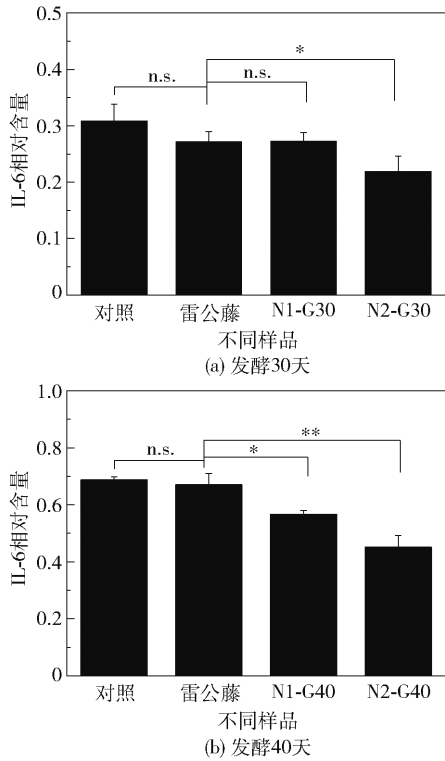


图3 不同样品对LPS诱导RAW264.7细胞释放IL-6的影响

Fig. 3 Effects of different samples on the content of IL-6 released from RAW264.7 cells induced by LPS

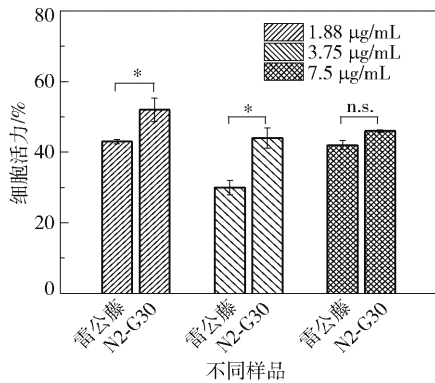


图4 不同质量浓度下不同样品对L02细胞增殖的影响

Fig. 4 Effect of different samples at different mass concentrations on the cell viability of L02 cells

2.4.1 雷公藤甲素

图6为雷公藤甲素的质谱峰,未提取到色谱峰进行面积积分。雷公藤发酵前后都检测到雷公藤甲素的存在,标准品、雷公藤发酵前、发酵后雷公藤甲素的准分子离子峰分别为 m/z 361.1655 $[M+H]^+$ 、 m/z 361.1646 $[M+H]^+$ 、 m/z 361.1647 $[M+H]^+$ 。雷公藤发酵后的峰强度由发酵前的18950增加到40804,表明雷公藤甲素的含量增加,这与雷公藤抗

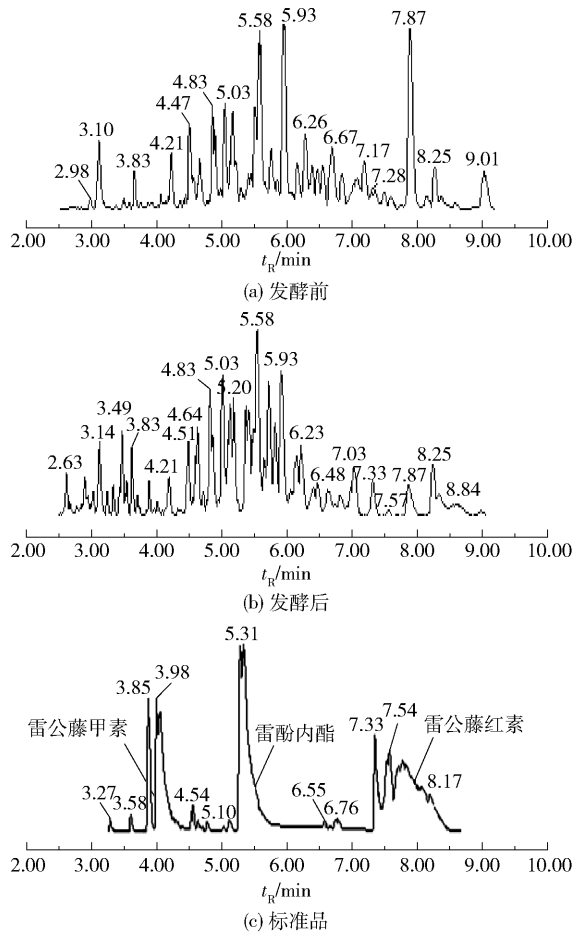


图5 雷公藤发酵前后的基峰离子色谱图

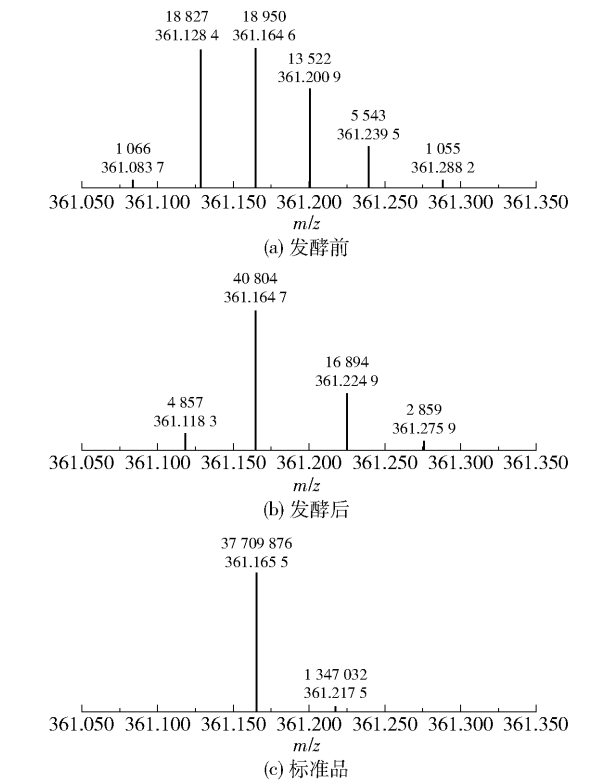
Fig. 5 Ion chromatograms of basic peaks before and after fermentation of *Tripterygium wilfordii*

2.4.2 雷公藤红素

图7和图8分别为雷公藤红素的质谱峰和色谱峰。雷公藤发酵前后都检测到雷公藤红素的存在,标准品、雷公藤发酵前、发酵后雷公藤红素的准分子离子峰分别为 m/z 451.2847 $[M+H]^+$ 、 m/z 451.2838 $[M+H]^+$ 、 m/z 451.2849 $[M+H]^+$ 。发酵后雷公藤红素的质谱峰强度由发酵前的120793增加到622700,色谱峰面积积分由发酵前的121增加到1023,均表明雷公藤红素的含量增加,这与雷公藤抗炎活性的维持有关。

2.4.3 雷酚内酯

图9为雷酚内酯的质谱峰,未提取到色谱峰进行面积积分。雷公藤发酵前后都检测到雷酚内酯的存在,标准品、雷公藤发酵前、发酵后雷酚内酯的准分子离子峰分别为 m/z 313.1803 $[M+H]^+$ 、 m/z 313.1803 $[M+H]^+$ 、 m/z 313.1798 $[M+H]^+$ 。发



每个峰的第一行数字表示峰强度,第二行数字表示质荷比,下同。
图 6 雷公藤甲素的质谱峰

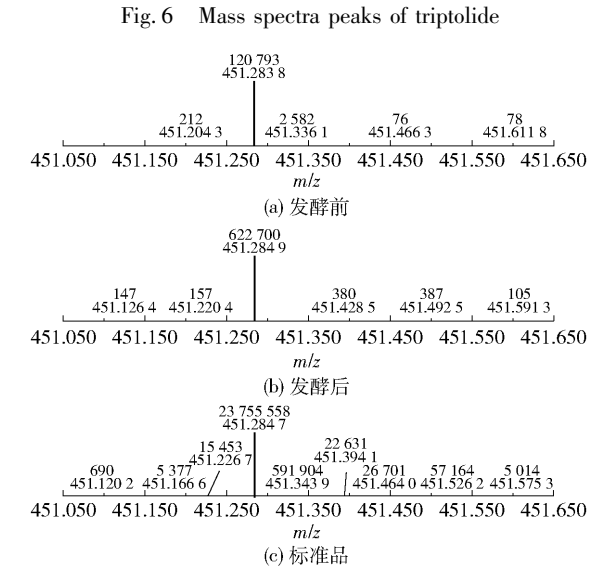
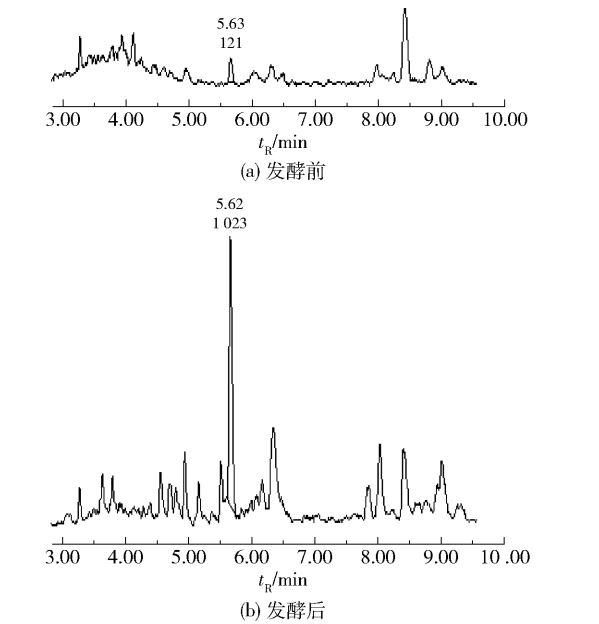


图 7 雷公藤红素的质谱峰
Fig. 7 Mass spectra peaks of celastrol

醇后的峰强度由发酵前的 21 816 增加到 158 216,表明雷酚内酯的含量增加,这与雷公藤抗炎活性的维持有关。

2.4.4 其他成分

通过 m/z 查找雷公藤春碱、雷公藤晋碱、雷公藤次碱、雷公藤定碱、雷公藤内酯甲的疑似峰,计算



每个峰的第一行数字表示保留时间,第二行数字表示面积积分。
图 8 雷公藤红素的色谱图
Fig. 8 Chromatograms of celastrol

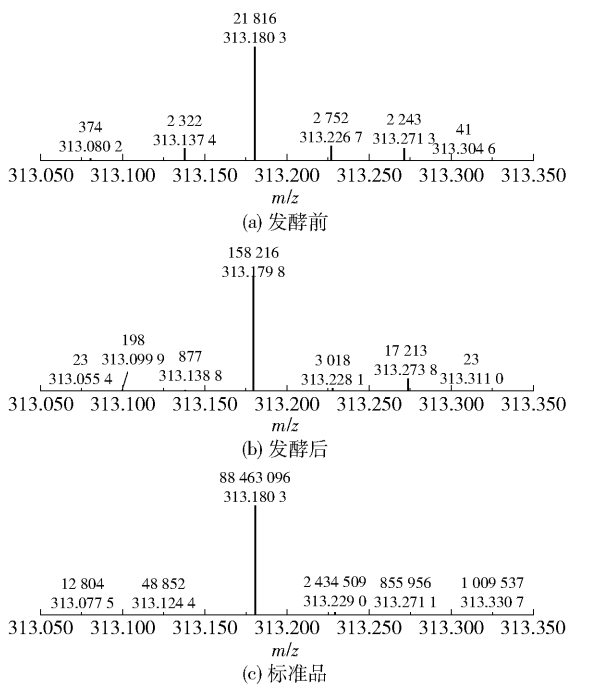


图 9 雷酚内酯的质谱峰
Fig. 9 Mass spectra peaks of triptophenolide

并推测其分子式,结果只得到雷公藤内酯甲,其 $[M + H]^+$ 对应的分子式为 $C_{30}H_{47}O_3$ 。图 10 为雷公藤内酯甲的质谱峰,未提取到色谱峰进行面积积分。发酵前、发酵后雷公藤内酯甲的准分子离子峰分别为 m/z 455.351 0 $[M + H]^+$ 、 m/z 455.350 0 $[M + H]^+$,并且都存在丢失中性 H_2O 分子的特征峰 m/z

437.3403 $[M + H - H_2O]^+$, 进一步丢失 $-CH_3$ 碎片形成 m/z 422.3279 $[M + H - H_2O - CH_3]^+$ 及 m/z 422.3487 $[M + H - H_2O - CH_3]^+$ 。发酵后的准分子离子峰的峰强度由发酵前的 184 028 降低至 123 972, 表明雷公藤内酯甲的含量减少^[26], 这与雷公藤的减毒作用直接相关。

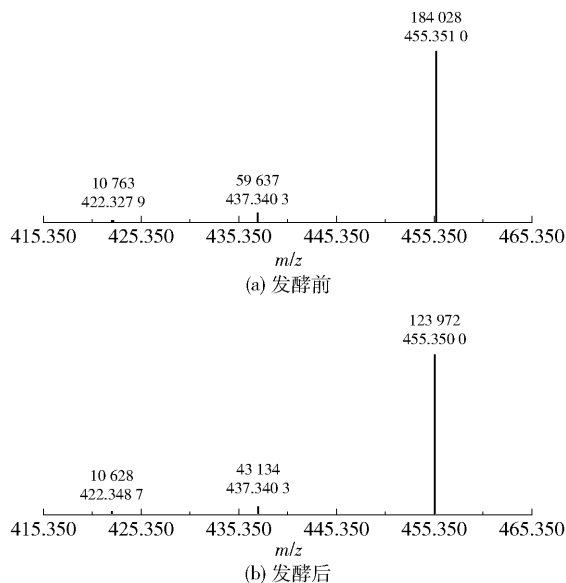


图 10 雷公藤内酯甲的质谱峰

Fig. 10 Mass spectra peaks of wilforlide A

3 结论

N2-G30 的质量浓度为 3.75 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对小鼠 RAW264.7 细胞在脂多糖诱导下释放两种促炎因子 TNF- α 和 IL-6 都有抑制作用, 并且对人正常肝细胞 L02 的增殖毒性较小。N2-G30 中, 雷公藤甲素、雷公藤红素、雷酚内酯含量的增加与雷公藤抗炎活性的维持有关, 而雷公藤内酯甲含量的减少与雷公藤的减毒作用直接相关。说明灵芝双向固体发酵(接种量 10 mL/100 mL, 发酵时间 30 天)能够通过成分的变化影响雷公藤的活性与毒性, 从而促进其减毒持效作用的产生。灵芝双向固体发酵技术在中药减毒持效上的应用是值得重视的, 今后应在协调好雷公藤“量-效-毒”关系的基础上, 不断改进双向发酵技术, 从而在根本上降低雷公藤的毒性, 真正实现安全有效地用药。

参考文献:

[1] 申琳, 运乃茹. 浅述雷公藤研究进展[J]. 医学信息, 2015, 28(36): 393-394.
SHEN L, YUN N R. Research progress of *Tripterygium*

wilfordii[J]. Medical Information, 2015, 28(36): 393-394. (in Chinese)

- [2] 农程, 王欣之, 江振洲, 等. 雷公藤对免疫系统作用及机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(16): 3374-3383.
NONG C, WANG X Z, JIANG Z Z, et al. Progress of effect and mechanisms of *Tripterygium wilfordii* on immune system[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2019, 44(16): 3374-3383. (in Chinese)
- [3] 庄毅. 药用真菌新型(双向型)固体发酵工程[J]. 中国食用菌, 2002, 21(4): 3-6.
ZHUANG Y. New type (two-way pattern) solid fermentation engineering in medicinal mushrooms [J]. Edible Fungi of China, 2002, 21(4): 3-6. (in Chinese)
- [4] 杨丽娜. 雷公藤制剂的指纹图谱与抗炎细胞药效学研究[D]. 福州: 福建中医药大学, 2014.
YANG L N. Fingerprint and anti-inflammatory cellular pharmacodynamics of *Tripterygium wilfordii* preparation [D]. Fuzhou: Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 2014. (in Chinese)
- [5] 王身艳, 余黎, 刘学湘, 等. 灵芝双向固体发酵草乌后菌质抗炎镇痛作用研究[J]. 中国医药生物技术, 2012, 7(5): 352-356.
WANG S Y, YU L, LIU X X, et al. Studies on anti-inflammatory and analgesic effects of fungal fermentative products of *Aconitum kusnezoffii* by *Ganoderma lucidum* bi-directional solid fermentation [J]. Chinese Medicinal Biotechnology, 2012, 7(5): 352-356. (in Chinese)
- [6] 江南, 魏巍, 许晓燕, 等. 双向固体发酵技术对附片解毒增效的初步研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(11): 2677-2679.
JIANG N, WEI W, XU X Y, et al. Preliminary study on detoxification and synergism of *Radix Aconiti Lateralis* Preparata by bidirectional solid fermentation [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2015, 26(11): 2677-2679. (in Chinese)
- [7] 庄毅, 谢小梅. 药用真菌新型(双向性)固体发酵工程对雷公藤解毒持效的初步研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(16): 2083-2087.
ZHUANG Y, XIE X M. Primary studies of toxicity-reducing and efficacy-maintaining action of fungal fermentative products in *Tripterygium wilfordii* by a novel bi-directional solid state fungal fermentation [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2009, 34(16): 2083-2087. (in Chinese)
- [8] 侯志帆, 梁永红, 何礼标, 等. 灵芝双向固体发酵雷公藤后菌质化学成分变化初步研究[J]. 中草药,

- 2012, 43(2): 234–237.
- HOU Z F, LIANG Y H, HE L B, et al. Chemical constituents changes in *Tripterygium wilfordii* after ganoderma bidirectional solid fermentation[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2012, 43(2): 234–237. (in Chinese)
- [9] 张皖东, 吕诚, 赵宏艳, 等. 雷公藤甲素配伍甘草酸对 CIA 大鼠血清 TNF- α , IL-10 的影响[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(5): 414–417.
- ZHANG W D, LV C, ZHAO H Y, et al. Effect of combination glycyrrhizin and triptolide on TNF- α and IL-10 in serum of collagen induced arthritis rats[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2007, 32(5): 414–417. (in Chinese)
- [10] GABAY C. Interleukin-6 and chronic inflammation[J]. Arthritis Research & Therapy, 2006, 8(Suppl 2): S3.
- [11] RAMADORI P, AHMAD G, RAMADORI G. Cellular and molecular mechanisms regulating the hepatic erythropoietin expression during acute-phase response: a role for IL-6[J]. Laboratory Investigation, 2010, 90(9): 1306–1324.
- [12] QIN D P, ZHOU Y J, ZHANG S Z, et al. Anti-inflammation of *Tripterygium wilfordii* polycoride on macrophages and its regulation to inflammation via TLR4/NF- κ B[J]. Chinese Herbal Medicines, 2015, 7(2): 155–161.
- [13] LUO D, ZUO Z Y, ZHAO H Y, et al. Immunoregulatory effects of *Tripterygium wilfordii* Hook F and its extracts in clinical practice[J]. Frontiers of Medicine, 2019, 13(5): 556–563.
- [14] 王青竹, 石婧, 刘琴, 等. 小檗碱促进巨噬细胞系 RAW264.7 由 M1 促炎表型向 M2 抗炎表型极化[J]. 基础医学与临床, 2019, 39(5): 646–651.
- WANG Q Z, SHI J, LIU Q, et al. Berberine promotes M1 proinflammatory phenotype to M2 anti-inflammatory phenotype polarization in macrophage cell line RAW264.7[J]. Basic & Clinical Medicine, 2019, 39(5): 646–651. (in Chinese)
- [15] LEE H H, SHIN J S, LEE W S, et al. Biflorin, isolated from the flower buds of *Syzygium aromaticum* L., suppresses LPS-induced inflammatory mediators via STAT1 inactivation in macrophages and protects mice from endotoxin shock[J]. Journal of Natural Products, 2016, 79(4): 711–720.
- [16] XI C, PENG S J, WU Z P, et al. Toxicity of triptolide and the molecular mechanisms involved[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 90: 531–541.
- [17] LV H W, JIANG L P, ZHU M D, et al. The genus *Tripterygium*: a phytochemistry and pharmacological review[J]. Fitoterapia, 2019, 137: 104190.
- [18] 高丽, 白赟, 柴智, 等. 雷公藤毒性反应研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(4): 107–110.
- GAO L, BAI Y, CHAI Z, et al. Research progress on toxicity of *Tripterygium wilfordii*[J]. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 2012, 19(4): 107–110. (in Chinese)
- [19] 赵庆华, 李晓宇, 冯群, 等. 基于剂量的雷公藤抗小鼠免疫性炎症“效-毒”关联性评价[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(6): 1139–1143.
- ZHAO Q H, LI X Y, FENG Q, et al. Evaluation on dosage-based efficacy-toxicity correlation of *Tripterygium wilfordii* against immune inflammation in mice[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2015, 40(6): 1139–1143. (in Chinese)
- [20] 苏明声, 谢小梅, 罗闵丹, 等. 雷公藤解毒持效双向发酵工艺的建立[J]. 菌物学报, 2010, 29(2): 294–299.
- SU M S, XIE X M, LUO H D, et al. Optimization of bidirectional solid fermentation for toxicity-reducing and efficacy-maintaining action of fungal fermentative products of *Tripterygium wilfordii*[J]. Mycosystema, 2010, 29(2): 294–299. (in Chinese)
- [21] 庄毅, 池玉梅, 陈慎宝, 等. 药用真菌新型固体发酵工程与槐苋菌质的研制[J]. 中国药理学杂志, 2004, 39(3): 175–178.
- ZHUANG Y, CHI Y M, CHEN S B, et al. Preparation of medicinal fungal new type bi-directional solid fermentation engineering and Huai Qi fungal substance[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2004, 39(3): 175–178. (in Chinese)
- [22] 庄毅. 药用真菌双向性固体发酵工程技术在雷公藤解毒持效中的应用: CN 1911262A[P]. 2007-02-14.
- ZHUANG Y. Application of bidirectional solid fermentation engineering technology of medicinal fungi in detoxification and persistence of *Tripterygium wilfordii*: CN 1911262A[P]. 2007-02-14. (in Chinese)
- [23] 冯群, 栾永福, 孙蓉. 基于功效和物质基础的雷公藤毒性研究进展[J]. 中国药物警戒, 2013, 10(2): 88–92.
- FENG Q, LUAN Y F, SUN R. Research development on toxicity of *Tripterygium wilfordii* related to efficacy and chemical material basis[J]. Chinese Journal of Pharmacovigilance, 2013, 10(2): 88–92. (in Chinese)
- [24] 胡峻, 刘超, 郭兰萍, 等. 超高效液相色谱串联质谱

- 同时测定雷公藤药材中 5 个有效成分[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(8): 1469–1473.
- HU J, LIU C, GUO L P, et al. Determination of five effective components in medicinal material of *Tripterygium* by UPLC–ESI–MS/MS [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2016, 41(8): 1469–1473. (in Chinese)
- [25] 周俊, 徐艳, 臧银善. 雷公藤的抗炎免疫作用研究进展[J]. 医学综述, 2019, 25(24): 4855–4859.
- ZHOU J, XU Y, ZANG Y S. Research progress in anti-inflammatory and anti-immune effects of *Tripterygium wilfordii* [J]. Medical Recapitulate, 2019, 25(24): 4855–4859. (in Chinese)
- [26] 于东防, 朱海涛, 陈麒. 雷公藤中三萜内酯 A 分子结构的研究[J]. 中草药, 1992, 23(4): 171–174, 222.
- YU D F, ZHU H T, CHEN Q. Study on the molecular structure of triptotriterpenoidal lactone A in common threewingnut (*Tripterygium wilfordii*) [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 1992, 23(4): 171–174, 222. (in Chinese)

Detoxification and sustained effects of *Tripterygium wilfordii* based on *Ganoderma lucidum* bi-directional solid fermentation

HE LuanYing^{1,2#} LIN ZiChun^{1#} LU JianDong² XIONG GuoLiang^{2*}
WANG ShiHui^{1*}

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029;

2. Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen 518000, China)

Abstract: The traditional Chinese medicine *Tripterygium wilfordii* has anti-inflammatory and immunosuppressive effects, but its clinical application is greatly limited due to its strong toxicity. *Ganoderma lucidum* was used as a medicinal fungus to ferment *Tripterygium wilfordii* by bi-directional solid fermentation. The anti-inflammatory activity and hepatotoxicity of the fungal fermentation product were evaluated. The results showed that the product (N2-G30) obtained at an inoculation amount of 10 mL/100 mL and after 30 days of fermentation at a mass concentration of 3.75 µg/mL afforded a detoxification and sustained effect. Compared with *Tripterygium wilfordii*, the product can inhibit the release of pro-inflammatory cytokines TNF-α and IL-6 from RAW264.7 cells induced by lipopolysaccharide and reduce the inhibition of the proliferation of human normal liver cells L02. The main components of *Tripterygium wilfordii* before and after fermentation were analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). The results showed that the contents of triptolide, celastrol and triptophenolide increased and the contents of wilforlide A decreased after fermentation. The changes in the concentrations of these components are reflected in the detoxification and sustained effect of N2-G30.

Key words: *Tripterygium wilfordii*; *Ganoderma lucidum*; bi-directional solid fermentation; anti-inflammatory effect; hepatotoxicity

(责任编辑: 于少云)