

红曲霉菌对姜黄素的转化及产物自由基清除和抗脂质过氧化作用的研究

程东庆^{1,2}, 潘佩蕾², 周芳美², 沃兴德^{1,2} (1.北京中医药大学基础医学院, 北京 100029; 2.浙江中医药大学生命科学院, 杭州 310053)

摘要: 目的 研究红曲霉菌对姜黄素的微生物转化及转化总产物的自由基清除和抗脂质过氧化的作用, 并对转化产物进行了初步分析。方法 用本实验室保存的红曲霉菌对姜黄素进行微生物转化, 同时设立菌株对照和底物对照; 研究转化总产物对 DPPH 自由基的清除能力; 研究转化总产物对饲饵性高脂血症小鼠肝脏和血清 MDA、SOD、GSH-Px 等过氧化脂质的影响。用乙酸乙酯提取转化产物, 用 TLC、HPLC-DAD (Agilent Zorbax Extend C₁₈ 柱, 0.1% 乙酸和乙腈梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹) 对转化产物进行了初步分析。结果 姜黄素转化总产物在 10 000~400 mg·mL⁻¹ (相当于含姜黄素 100~4 mg·mL⁻¹) 内有很强的自由基清除能力, 总产物浓度在 100 mg·mL⁻¹ 还保留了 47.46% 的清除能力; 而底物对照物在 10 000、2 000 mg·mL⁻¹ 时有一定的清除能力, 但浓度在 400 mg·mL⁻¹ 时自由基清除能力已明显减弱, 100 mg·mL⁻¹ 以下已基本消失。转化总产物 500, 200, 100 mg·kg·d⁻¹ (相当于姜黄素 5, 2, 1 mg·kg·d⁻¹) 均能降低高脂血症小鼠肝脏和血清的过氧化脂质, 而菌株对照组 (500 mg·kg·d⁻¹) 和底物对照组 (500 mg·kg·d⁻¹, 相当于姜黄素 5 mg·kg·d⁻¹) 抗脂质过氧化作用不明显。研究超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶, 发现姜黄素转化产物对此二酶的作用不明显, 其抗氧化作用可能并非通过改变此二酶的活性。转化产物经 HPLC-DAD 分析, 发现可能存在 6 个转化产物, 其保留时间分别为 16.3, 22.1, 23.2, 28.0, 33.0, 36.1 min, 其光谱图与姜黄素存在明显差异。结论 姜黄素经红曲霉菌转化后形成了由 6 个代谢产物组成的新组合型天然姜黄素类似物群, 其自由基清除能力和抗脂质过氧化作用显著增强。

关键词: 姜黄素; 生物转化; 自由基清除; 抗脂质过氧化; 组合型天然化合物群

中图分类号: R963

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2009)07-0517-05

Effects of Curcumin Metabolites Transformed by *M.purpureus Went* in Radical Scavenging and Anti-oxidation in Hyperlipidemia Mices

CHENG Dongqing^{1,2}, PAN Peilei¹, ZHOU Fangmei¹, WO xingde^{1,2} (1.Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2.Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To study the radical scavenging and anti-oxidation properties of microbial transformed curcumin by *M.purpureus went*. **METHODS** A strain of *M.purpureus went* was used for microbial transformation. The DPPH radical scavenging ability of the transformed curcumin was studied, comparing to the ability of strain culture and substrate control. The anti-oxidation activity of the metabolites in hyperlipidemia mices was assessed by the change of MDA, SOD, GSH-Px in liver and serum. The metabolites of curcumin extracted were separated and assayed by TLC and HPLC-DAD (Agilent Zorbax Extend C₁₈ column, eluted by a gradient mixture of 0.1% acetic acid solution and acetonitrile with flow rate of 1.0 mL·min⁻¹). **RESULTS** The radical scavenging activity of curcumin was improved after being transformed. The transformed curcumin can reduce lipid peroxides in hyperlipidemia mices at dosage of 500, 200, 100 mg·kg·d⁻¹ (Corresponding to curcumin 5, 2, 1 mg·kg·d⁻¹) while strain culture control and substrate control seemed no effects. The transformed curcumin had no significant effect on the activity of the enzyme SOD and GSH-Px. Analysis of the metabolites showed that there were 6 metabolites, with retention times of 16.3, 22.1, 23.2, 28.0, 33.0, 36.1 min respectively. The spectra of these metabolites were all different but similar to that of curcumin. **CONCLUSION** Six metabolites of curcumin were transformed by *M.purpureus went* and became a new combinatorial natural curcumoids group. The radical scavenging and anti-oxidation properties were improved.

KEY WORDS: curcumin; biotransformation; radical scavenging; anti-oxidation; combinatorial natural compounds

姜黄素为姜黄属植物的主要化学成分, 具有广泛生物学活性^[1-4]。笔者前期的研究发现姜黄醇提

物, 即姜黄素能使高脂膳食引起的兔主动脉粥样斑块减少, 斑块中的胆固醇和甘油三酯含量降低, 姜

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30873366)

作者简介: 程东庆, 女, 博士生, 副教授、硕士生导师

Tel: (0571)86613624

E-mail: b2006069@163.com

黄素也能使高脂膳食小鼠和大鼠血清和肝脏胆固醇、甘油三酯、LDL-TC 明显降低, HDL-TC 显著增高, 姜黄素除了具有降脂作用外, 还能对抗 LDL 的氧化修饰, 并且具有抗氧化、抗凝血和促纤溶等抗动脉粥样硬化作用。进一步的研究发现姜黄素可能是通过调节脂蛋白代谢、改变脂代谢相关酶的活性、促进 LDL 受体的表达、促进巨噬细胞吞噬等作用达到降血脂、抗动脉粥样硬化等作用。由于姜黄素具备降血脂和抗脂质过氧化作用, 因此是一个很好的调脂药物。笔者在 1998 年将其开发成“脂可平降脂通络软胶囊”, 于 2004 年获得新药证书, 2005 年上市后经临床多年实践证明姜黄素在调脂作用中确实具有良好的药理作用, 也取得了可观的社会和经济效益。

在姜黄素的开发过程中发现, 姜黄素属脂溶性化合物, 难溶于水, 易溶于乙醇和碱性溶液中, 姜黄素口服吸收率低、生物半衰期短、易降解, 稳定性差, 制约了姜黄素在临床中的广泛应用。因此, 国内外专家积极探索姜黄素的构效关系并尝试对姜黄素进行结构改造, 以期增加姜黄素的药效。

生物转化(Biotransformation)技术是应用植物细胞、微生物或酶等生物体系对天然活性化合物进行合成与结构修饰。生物转化反应主要有氧化、还原、酯化、水解、缩合、聚合、水合、环化、苷化等反应。相对于化学合成与修饰, 生物转化具有反应条件温和、污染小、成本低、副产物少等优点, 并具有很高的立体选择性、区域选择性和基团选择性, 能完成一些用化学方法难以进行的反应。

本试验利用红曲霉菌对姜黄素进行了微生物转化, 研究转化产物自由基清除和抗脂质过氧化作用, 为进一步筛选新型高效的姜黄素类调脂新药奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

红曲霉菌(*M.purpureus went*), 本实验室鉴定和保存。斜面培养基: 可溶性淀粉 3%、麦芽糖 3%、蛋白胨 2%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%、pH 5.0~5.5, 琼脂 2%。液体培养基: 葡萄糖 1%, 酵母膏 0.3%, 蛋白胨 0.5%, 麦芽膏 0.3%, pH 6.5 固体发酵培养基: 500 g 早籼米加 600 mL 沸水, 121 °C 高压灭菌。转化底物姜黄素: 化学纯。DPPH 溶液: 称取 6.4 mg DPPH(σ -alrich)溶解于 25 mL, 量瓶中定容, 摇匀, 作为储备液($6.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)保存于冰箱

中, 用时 10 倍稀释。昆明种小鼠: 由浙江中医药大学动物中心提供, 体重 18~22 g。动物生产合格证号 SCXK(沪)2002-0010, 动物设施合格证号 SYXK(浙)2003-0003, 动物实验合格证号(1996)第 22-00223 号。姜黄素标准品(中国药品生物制品检定所, 批号: 823-9401)。Agilent 1100 高效液相色谱仪: DAD 检测器、HPLC PUMP K-501、Agilent Zorbax Extend- C_{18} column (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)。

1.2 微生物转化方法

将保藏的菌株接种于斜面培养基上, 28~30 °C 恒温培养 4 d, 得到新鲜、成熟的培养物。取无菌的液体培养基加入到斜面培养物中制备孢子悬液。孢子悬液以 10%接种量转种至液体培养基, 28 °C 振荡培养 4 d。

1.3 姜黄素转化方法

将“1.2”项下菌液以 10%接种量接种到含 1%姜黄素的固体发酵培养基中, 30 °C 培养 24 h, 后转至 28 °C 培养 12 h, 再 30 °C 恒温培养 7 d。

1.4 菌体对照

将“1.2”项下菌液接种到不含姜黄素的固体培养基中, 培养方法同“1.3”, 排除菌株的发酵产物和培养基残留成分的干扰。

1.5 底物对照

固体培养基中加入 1%姜黄素, 不接种菌液, 培养方法同“1.3”, 考察转化过程中是否存在非微生物引起的药物分解产物。

1.6 转化产物的提取

将样品 60 °C 烘干至恒重, 过 40 目筛, 精密称取样品 4 g, 置索氏提取器中, 分别用 50 mL 乙酸乙酯 80~90 °C 回流 4 h。回流提取。提取液减压浓缩至干, 加氯仿溶解定容至 0.2 mL。

1.7 转化产物自由基清除能力

取 2 mL 样品加入到 2 mL DPPH 稀释液中, 室温静置 30 min 后, 以 2 mL 样品溶液与 2 mL 50% 的乙醇溶液为参比, 517 nm 测吸光度值, 分别记为 A_i 、 A_0 。同时测定 2 mL DPPH 溶液与 2 mL 50% 的乙醇溶液的吸光度(A_j)。

样品对 DPPH 自由基清除率(SA)% = $[1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$

1.8 转化产物对高脂血症小鼠脂质过氧化的影响

昆明种小鼠(体重 20~22 g), ♀ ♂ 各半, 适应性饲养后随机分成 7 组: 正常组、高脂血症模型组、高剂量(500 mg \cdot kg \cdot d $^{-1}$)转化产物治疗组、中剂量(200

mg·kg·d⁻¹)转化产物治疗组、低剂量(100 mg·kg·d⁻¹)转化产物治疗组、底物对照(500 mg·kg·d⁻¹)和菌体对照(500 mg·kg·d⁻¹)治疗组。均以 0.5%的羧甲基纤维素钠水溶液配成悬液。

正常对照组喂饲基础饲料,其余动物喂饲高脂饲料(79%基础饲料、1%胆固醇、10%蛋黄粉和 10%猪油,0.5%去氧胆酸钠),每鼠每天平均 6 g,连续 15 d。在继续喂饲高脂饲料的同时给不同治疗,正常组、模型组等体积生理盐水灌胃。每天 1 次,给药 10 d。

禁食约 12 h,摘眼球取血,分离血清;断颈处死取肝,肉眼观察肝脏病变,在相同部位取肝脏精确称取 0.1 g 在冰水中制成 20%的匀浆,4 ℃,4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,提取上清液;血清及肝脏匀浆上清液的脂质过氧化物(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)。

1.9 转化产物的薄层色谱分析

以姜黄素为对照,转化产物的提取物点于硅胶 G 薄层板,于展开剂(氯仿:甲醇:甲酸=96:2:0.1)中展开,挥干溶剂,可见光及紫外下观察,记录斑点位置,计算 Rf 值,分析姜黄素转化前后组分变化,判断发生转化与否。

1.10 转化产物的 HPLC 分析

以姜黄素为对照,提取物进行 HPLC 分析,色谱柱: Agilent Zorbax Extend C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm),以 0.1%乙酸-水和乙腈在 30 ℃下进行梯度洗脱,分析姜黄素转化前后 HPLC 指纹图谱的差异,初步判断可能出现的转化产物。

1.11 统计学处理

用 DPS 9.5 软件进行处理。

2 结果

2.1 姜黄素微生物转化产物自由基清除能力

表 2 姜黄素微生物转化产物对食饵性高脂血症小鼠肝脏过氧化脂质的影响

Tab 2 The antioxidation activity of transformed curcumin in hyperlipidemia mices liver

	剂量/mg·kg·d ⁻¹	相当于姜黄素含量/mg·kg·d ⁻¹	MDA/nmol·g ⁻¹	SOD/U·g ⁻¹	GSH-Px/μg·g ⁻¹
正常组	-	-	16.45±1.88	40.41±4.83	42.62±3.78
高脂血症组	-	-	24.79±2.54	40.11±3.79	33.55±2.92
高剂量	500	5	13.66±1.69	32.46±4.01	25.00±5.51
中剂量	200	2	15.92±1.96	31.43±3.76	22.30±4.41
低剂量	100	1	15.66±1.35	32.09±3.95	22.63±7.08
菌体对照	500	0	18.30±1.95	32.87±3.54	21.79±5.84
底物对照	500	5	19.23±2.67	40.37±4.09	34.66±3.74

研究发现,菌体对照物基本没有 DPPH 自由基的清除能力,底物对照物在 10 000, 2 000 mg·mL⁻¹ 时有一定的清除能力,但 400 mg·mL⁻¹ 浓度时自由基清除能力已明显减弱,100 mg·mL⁻¹ 以下已基本消失;姜黄素转化总产物在 10 000~400 mg·mL⁻¹ (相当于含姜黄素 100~4 mg·mL⁻¹) 浓度范围内有很强的自由基清除能力,100 mg·mL⁻¹ 还保留了 47.46% 的清除能力。说明姜黄素经红曲霉菌转化后,DPPH 自由基的清除能力显著增强。结果见表 1。

表 1 姜黄素微生物转化产物自由基清除能力

Tab 1 Radical scavenging effects of the transformed curcu min

	浓度/μg·mL ⁻¹			
	10 000	2 000	400	100
姜黄素转化产物	95.43	92.19	79.06	47.46
菌体对照	3.0	1.2	0.75	0.75
底物对照	88.0	84.7	36.9	5.6

2.2 姜黄素转化产物对高脂血症小鼠脂质过氧化的影响

考察姜黄素转化产物对食饵性高脂血症小鼠肝脏脂质过氧化的影响,发现 500 mg·kg·d⁻¹ (相当于含姜黄素 5 mg·kg·d⁻¹)、200 mg·kg·d⁻¹ (相当于含姜黄素 2 mg·kg·d⁻¹)、100 mg·kg·d⁻¹ (相当于含姜黄素 1 mg·kg·d⁻¹) 剂量转化产物均能降低高脂血症小鼠肝脏的过氧化脂质 MDA 的含量,而菌株对照组(500 mg·kg·d⁻¹)和底物对照组(500 mg·kg·d⁻¹,相当于含姜黄素 5 mg·kg·d⁻¹) 抗脂质过氧化作用不明显;研究 SOD、GSH-Px 发现姜黄素转化产物对此二酶的作用不明显,其抗氧化作用可能并非通过改变 SOD、GSH-Px 的活性。结果见表 2。

姜黄素微生物转化产物对食饵性高脂血症小鼠血清脂质的影响与肝脏基本类似,结果见表 3。

表 3 姜黄素微生物转化产物对食饵性高脂血症小鼠血清抗脂质过氧化作用

Tab 3 The Antioxidation activity of the transformed curcumin in hyperlipidemia mices serum

	剂量/mg·kg·d ⁻¹	相当于姜黄素含量/mg·kg·d ⁻¹	MDA/nmol·mL ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	GSH-Px/mg·L ⁻¹
正常组	-	-	0.31±0.02	227.47± 155.6	9.97±2.32
高脂血症组	-	-	1.16 ±0.09	345.60± 133.2	6.62±0.78
高剂量	500	5	0.34 ±0.03	298.96 ± 30.62	9.32±1.74
中剂量	200	2	0.58 ±0.07	235.33± 31.34	8.08±1.93
低剂量	100	1	0.65±0.09	251.78 ±29.58	9.20±1.45
菌体对照	500	0	1.12 ±0.15	245.06 ±18.16	7.71±0.98
底物对照	500	5	1.13 ±0.18	284.10±69.82	6.74±1.37

2.3 姜黄素微生物转化产物的 TLC 分析

姜黄素转化产物烘干后用氯仿提取，提取液浓缩至干，加氯仿溶解定容至 0.2 mL，点于硅胶 G 薄层板，展开剂(氯仿：甲醇：甲酸=96：2：0.1)中展开，可见光及紫外下观察，斑点分布如图 1、2 所示。结果显示，在紫外光下，转化产物出现了强荧光的新斑点，与姜黄素标准品相近，极性比姜黄素大。

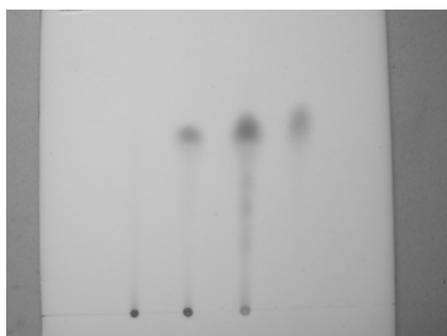


图 1 姜黄素微生物转化产物可见光下 TLC 结果

注：自左至右依次为：菌体对照、底物对照、转化产物、姜黄素标准品

Fig 1 TLC analysis of transformed cucumin under visible light

Note: culture control, substrate control, transformed cucumin, standard curcu-min respectively



图 2 姜黄素微生物转化产物紫外光下 TLC 结果

注：自左至右依次为：菌体对照、底物对照、转化产物、姜黄素标准品

Fig 2 TLC analysis of transformed cucumin under UV light

Note: culture control, substrate control, transformed cucumin, standard curcu-min respectively

2.4 转化产物的 HPLC 结果

转化产物经 HPLC-DAD 分析，用 254，280，360，420 nm 共 4 个波长检测，发现可能存在 6 个代谢产物，其保留时间分别为 16.3，22.1，23.2，28.0，33.0，36.1 min；而姜黄素为 42.0 min。结果见表 4。

表 4 姜黄素转化产物的保留时间/min

Tab 4 Retention time of curcumin metabolites in HPLC /min

	254 nm	280 nm	360 nm	420 nm
代谢产物 1	16.3	16.3	16.3	—
代谢产物 2	22.1	22.1	22.1	22.3
代谢产物 3	23.2	23.2	23.2	22.6
代谢产物 4	28.0	28.0	28.0	27.8
代谢产物 5	33.0	33.0	33.0	33.2
代谢产物 6	36.1	36.0	36.0	36.2
姜黄素标准品	42.0	42.0	42.0	42.0

对检测到的 6 个可能代谢产物进行光谱分析，转化产物 1 在 243 nm 和 339 nm 有显著的吸收峰、转化产物 2 在 238 nm 和 365 nm 有显著的吸收峰、转化产物 3 在 246 nm 和 351 nm 有显著的吸收峰、转化产物 4 在 254 nm 和 372 nm 有显著的吸收峰、转化产物 5 在 242 nm 和 403 nm 有显著的吸收峰、转化产物 6 在 240 nm 和 405 nm 有显著的吸收峰、与姜黄素标准品(209 nm，425 nm)的光谱图相似，存在明显差异。

3 讨论

组合化学 (Combinatorial Chemistry) 是近年来在化学和药物基础研究领域兴起的一门新研究分支，余伯阳教授^[5]提出将天然药物的生物转化研究与组合化学理论相结合建立生物组合化学(Bio—combinatorial chemistry)研究方法，对具有明确生物活性又有中国药物研究特色的天然复杂化合

物或活性组分的研究,使这些化合物(或组分)在具多种反应催化酶的微生物或酶的作用下转化产生新的组合型天然化合物群。再通过与药理筛选手段结合,寻找新的高活性或低毒性的天然活性先导化合物,或通过活性组分中不同成分结构变化与活性强度消长关系的分析发现关键活性成分。

姜黄素具有降血脂、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤等广泛的药理活性^[1-4],但姜黄素口服吸收率低、生物半衰期短、易降解,稳定性差,制约了在临床的广泛应用。本试验利用微生物转化技术对姜黄素结构进行生物改造,对转化后姜黄素总产物进行分析,HPLC结果显示存在6个代谢产物,其光谱图与姜黄素略有差异,初步认为是姜黄素衍生物,姜黄素经微生物转化形成了新组合型天然化合物群。

进一步分离纯化新组合型姜黄素化合物群的单体,并深入研究其抗氧化机制,有望获得姜黄素类新型高效化合物。

REFERENCES

- [1] STRIMPAKOS A S, SHARMA R A. Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10(3):511-545.
- [2] TIAN B, WANG Z, ZHAO Y, et al. Effects of curcumin on bladder cancer cells and development of urothelial tumors in a rat bladder carcinogenesis model [J]. *Cancer Lett*, 2008, 264(2): 299-308.
- [3] JAVVADI P, SEGANN A T, TUTTLE SW, et al. The chemopreventive agent curcumin is a potent radiosensitizer of human cervical tumor cells via increased reactive oxygen species production and overactivation of the mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *Mol Pharmacol*, 2008, 73(5): 1491-1501.
- [4] WANG Y J, PAN M H, CHENG A L, et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1997, 15 (12): 1867-1876.
- [5] YU B Y. Studies on the biocombinatorial chemistry as the new method for finding higher bioactive or lower toxicity leading compound [J]. *Chin J Nat Med (中国天然药物)*, 2007, 5(3): 169-173.

收稿日期: 2008-09-11