

- 269-271.
- [7] Li J T, Chen Q Q, Zeng Y, et al. A new phenol compound from endophytic *Phomopsis* sp. DC01 [J]. *Nat Prod Res*, 2012, 26(21): 2008-2012.
- [8] 贺小平, 栗登权, 丁立建, 等. 海洋真菌 *Alternaria alternata* YX-25 和放线菌 *Streptomyces exfoliates* YX-32 共培养的次级代谢产物研究[J]. *中草药*, 2018, 49(24): 5772-5779.
- [9] 王 宇, 李占林, 白 皎, 等. 海洋真菌烟曲霉 *Aspergillus fumigatus* YK-7 次级代谢产物的分离鉴定及抗肿瘤活性[J]. *中国药物化学杂志*, 2017, 27(5): 382-387.
- [10] Isaka M, Srisanoh U, Lartpormmatulee N, et al. ES-242 derivatives and cycloheptapeptides from *Cordyceps* sp. Strains BCC16173 and BCC 16176[J]. *J Nat Prod*, 2007, 70(10): 1601-1604.
- [11] 李晓君, 陈 铁, 李梦雪, 等. 紫苏内生真菌 *Penicillium* sp. 12Y25 化学成分及抑菌活性研究[J]. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 2015, 43(10): 64-69; 76.
- [12] Dethoup T, Manoch L, Kijjoa A, et al. Merodrimanes and other constituents from *Talaromyces thailandiasis* [J]. *J Nat Prod*, 2007, 70(7): 1200-1202.
- [13] Jeon H, Shim S H. Chemical constituents of the endophyte *Penicillium* sp. isolated from *artemisia princeps* [J]. *Chem Nat Compd*, 2020, 5(6): 122-124.

合成纳米银活性黄芪内生真菌筛选及其抑菌作用研究

张弘弛¹, 赵翊婷², 廉佳佩¹, 李 慧¹, 周 凤¹, 刘 瑞^{1*}

(1. 山西大同大学生命科学学院, 山西 大同 037009; 2. 云南大学生命科学学院, 云南 昆明 650091)

摘要:目的 筛选具有合成纳米银活性的黄芪内生真菌, 并测定其抑菌作用。方法 内生真菌胞外合成纳米银后, 通过分光光度法进行筛选。进行 16sDNA-ITS 序列分析, 鉴定活性菌株。在单因素试验基础上, 以 AgNO₃ 浓度、反应温度、pH 为影响因素, 吸光度为评价指标, 响应面试验优化合成条件。采用最小抑制浓度法, 测定纳米银对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌的抑制作用。结果 Am-R02 具有高合成纳米银活性, 鉴定为 *Aspergillus parvisclerotigenus*。最佳条件为反应时间 12 h, AgNO₃ 浓度 2 mmol/L, 反应温度 28 ℃, pH 8, 吸光度为 0.699。所合成的纳米银对各细菌均有较强的抑制效果, MIC 为 0.24~3.91 μg/mL。结论 具有合成纳米银活性的黄芪内生真菌可为合成金属纳米材料提供理论依据和技术支持。

关键词: 黄芪; 内生真菌; 纳米银; 抑菌作用

中图分类号: R944; R962

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)05-1665-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.05.055

纳米银具有广谱的抗菌和杀菌活性, 由纳米银释放出的 Ag⁺具有抗微生物活性^[1]。研究发现, 纳米银对多种细菌及病毒有抑制作用^[2], 因优秀的抑菌活性, 其在化妆品、纺织品、食品储藏保鲜、膳食补充剂、食品和医药包装等领域得到广泛的应用^[2-4]。除了传统的物理和化学合成纳米材料的方法, 近年来, 利用真菌胞外生物合成纳米银被广泛关注, 此工艺有利于对合成条件的优化, 具有使用常规设备、成本低, 后期不需要破碎真菌细胞等优点, 表现出工业化的潜力^[5-6]。

植物内生真菌几乎在所有植物中都能分离得到^[7], 因其与宿主植物的长期共生关系, 具有更加复杂的酶体系, 成为了一类特殊的纳米银合成载体。已有的内生真菌合成纳米银研究发现, 其合成的纳米银粒径、大小、形状更具有优势, 如薛柏吉^[8]通过粉节皮菌和秘鲁小帚梗柱孢霉合

成金属纳米银材料; 黄槩通过黑附球菌合成金属纳米银材料^[9]; 曲明星等^[10]利用木霉属真菌辅助合成纳米银。毛迪等^[11]利用黄芪提取物生物还原制备纳米银, 但利用黄芪内生真菌生物合成纳米银的研究未有报道。基于此, 本研究筛选出能够产生纳米银的黄芪内生真菌, 为内生真菌合成金属纳米粒子提供了技术支持, 同时对纳米银的合成条件进行优化, 以期为进一步研究奠定基础。

1 材料

1.1 菌株和培养基

1.1.1 内生真菌 课题组前期从恒山黄芪根部分离而来 38 株内生真菌^[12-13], 保存于山西大同大学应用生物技术研究, 批号 Am-R01~Am-R38。活化采用察氏固体培养基, 发酵采用察氏液体培养基。

1.1.2 供试细菌 大肠杆菌 (货号 CGMCC 1.12874)、铜

收稿日期: 2021-01-22

基金项目: 山西省应用基础研究计划项目 (201801D221240, 201901D111313)

作者简介: 张弘弛 (1980—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为微生物资源的开发。E-mail: zhanghclw@163.com

*通信作者: 刘 瑞 (1982—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为化学生物学。E-mail: liurlw@163.com

绿假单胞菌(货号 CGMCC 1.9054)、金黄色葡萄球菌(货号 CGMCC 1.6750)、枯草芽孢杆菌(货号 CGMCC 1.9086)均由山西大同大学应用生物技术研究提供。活化采用牛肉膏蛋白胨固体培养基,培养采用牛肉膏蛋白胨液体培养基,抑菌作用测定采用 LB 液体培养基。

1.2 试剂 硝酸银、蔗糖、硝酸钠、磷酸氢二钾、氯化钾、硫酸镁、硫酸亚铁、牛肉膏、蛋白胨均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 仪器 SW-CJ-2F 型超净工作台(金坛市盛威实验仪器厂);GW-D-100B 型振荡培养箱(北京市六一仪器厂);UV-3200S 型紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);HS 902720 型电泳仪(美国 Thermo 公司);HEAL FORCE 型 PCR 仪(日本岛津公司);ABI 3730XL 型测序仪(日本尼康公司);MASTERSIZER 3000E 型粒度分析仪(德国贺利氏公司);HT7700 型透射电子显微镜(日本日立公司)。

2 方法

2.1 菌株筛选

2.1.1 内生真菌活化及 1 次发酵 将 38 株黄芪内生真菌菌株转接于平板上,在 28 ℃ 下培养 7 d,无菌状态下取出活化的内生真菌菌饼,按 4 饼/100 mL 培养液的密度接种于灭菌的含 100 mL 察氏培养基的 250 mL 锥形瓶中,振荡摇床培养,设置发酵条件为转速 130 r/min,温度 28 ℃,时间 10 d。

2.1.2 内生真菌 2 次发酵 1 次发酵结束后无菌过滤,菌丝体用无菌水洗涤 2~3 次,按接种量 4 g/100 mL 接种于含 100 mL 无菌去离子水的 250 mL 锥形瓶中,振荡摇床培养,设置发酵条件为转速 130 r/min,温度 28 ℃,发酵 24 h,结束后无菌过滤,即得发酵液。

2.1.3 合成纳米粒子筛选 称取 0.17 g AgNO_3 固体,无菌水定容至 1 000 mL,得到 1 mmol/L AgNO_3 溶液,置于棕色试剂瓶中,在 4 ℃ 下保存,将 2 次发酵液与 1 mmol/L AgNO_3 按 9:1 比例混合,在 28 ℃ 下振荡培养 24 h。以未加 AgNO_3 的真菌发酵液作为空白对照,目测反应液颜色变化,以颜色发生明显反差变化的反应液为初步判断该内生真菌具有合成金属纳米粒子的标志,鉴于发酵过程中生物反应量浓度较低,为了增加筛选确定性,将反应液浓缩 5 倍后以纳米银粒子的特殊吸收波长范围(400~460 nm,特定波长 420 nm)为检测依据^[14],全波长扫描范围 300~600 nm,间隔 1 nm,观察 38 株内生真菌的反应液是否在此范围内出现吸收峰。参考文献[14]报道,精确筛选出具有合成金属纳米粒子活性的内生真菌以及活性强弱。

2.1.4 具有纳米粒子合成活性菌株的粒度分析 取具有合成金属纳米粒子生物活性菌株的 2 次发酵液适量,采用粒度分析仪检测纳米银粒径,并进行粒度分析。

2.2 具有金属纳米粒子合成活性内生真菌的分子鉴定 高活性内生真菌 Am-R02 经平板培养后,无菌提取真菌菌块,经真空干燥后制备干燥的菌丝,在液氮条件下将菌丝组织块研磨至 100 目粉状,采用 CTAB 法来提取内生真菌 DNA,

并检测 DNA 纯度和浓度,经 PCR 反应后,送三联兄弟生物医药研究(北京)有限公司测序,获得 ITS 序列在 GenBank, Blast 进行比对分析,选择相似率最高的真菌 ITS 序列,用 MEGA 软件 Clustal X 方法进行系统发育分析,采用 Neighbor-Joining 法,Bootstrap 值设置 1 000 构建系统发育树对内生真菌鉴定^[15]。

2.3 内生真菌 Am-R02 生物合成纳米银条件优化

2.3.1 单因素试验 对反应时间(1、2、4、6、8、10、12、24 h)、 AgNO_3 浓度(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L)、反应温度(24、26、28、30、32 ℃)、pH 值(5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)进行考察。

2.3.2 响应面试验 在单因素试验基础上,以 AgNO_3 浓度(A)、反应温度(B)、pH 值(C)为影响因素,吸光度为评价指标,采用 Design-Expert V 8.05 软件进行响应面试验,因素水平见表 1。

表 1 因素水平

因素	水平		
	-1	0	1
A $\text{AgNO}_3/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	1.5	2	2.5
B 反应温度/℃	26	28	30
C pH 值	7	8	9

2.4 透射电镜分析 在马弗炉中灼烧纳米银后,研磨再溶解于乙醇,超声清洗器分散 5 min,取 10 μL 制备液滴在碳支持膜铜网,静置 5 min,去除多余液体,滴加 2% 磷钨酸于碳支持膜铜网静置 2 min,去除多余液体,室温干燥后置透射电子显微镜下观察,采集图像分析。

2.5 抑菌试验

2.5.1 纳米银制备 按“2.1.2”项下方法制备 Am-R02 二次发酵液共 3 L,按“2.3”项下优化条件制备纳米银,收集反应液,15 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀,进行冷冻干燥,即得。取适量在无菌条件下超声分散于去离子水中,得到 1.0 mg/mL 溶液。

2.5.2 抑菌作用测定 采用二倍梯度稀释法^[16]测定。取 1.0 mg/mL 纳米银溶液 100 μL 至 96 孔细胞培养板中,用 LB 液体培养基以二倍梯度稀释法依次稀释至 0.03~500 $\mu\text{g/mL}$ 。将 2.0×10^7 CFU/mL 细菌悬液以 100 μL /孔密度接种至 96 孔细胞培养板中,设培养基对照孔、菌液对照孔、阳性对照孔(氨苄西林、四环素),微孔板加盖,保鲜膜密封以减少孵育过程中的水分蒸发,置于 37 ℃ 培养箱中培养 12 h 后,在 630 nm 波长处测定吸光度,确定最小抑菌浓度(MIC)。

3 结果

3.1 活性菌株筛选 根据反应液颜色变化(图 1)和全波长扫描测定结果,筛选得到具有合成纳米银活性的黄芪内生真菌有 4 株,分别为 Am-R02、Am-R11、Am-R16、Am-R24,见表 2。在 400~460 nm 波长处,Am-R02、Am-R11、Am-R16、Am-R24 均有最大吸收峰,在 420 nm 处的光密度分别为 1.532 1、0.436 2、0.747 9、0.423 3,表明 Am-R02

合成纳米银能力最强, 其次为 Am-R16、Am-R11, Am-R24 最弱。



注: 左边二次发酵液无金属离子, 右边二次发酵液添加了金属离子。

图 1 活性菌株 Am-R02 颜色

3.2 粒度分析 Am-R02 产生的纳米银粒径分布较均匀, 以 0~5 nm 为主, 占总数的 1/3, 5~10、10~15、15~20 nm 的粒径均占 15%; Am-R11 产生的纳米银粒径大多在 25 nm 以下, 以 0~5 nm 为主, 占总数 50% 以上, 而 5~10 nm 占 1/3, 10~25 nm 在 10% 以内; Am-R16 产生的纳米银粒径大多在 30 nm 以下, 以 0~5 nm 为主, 占总数 50% 以上,

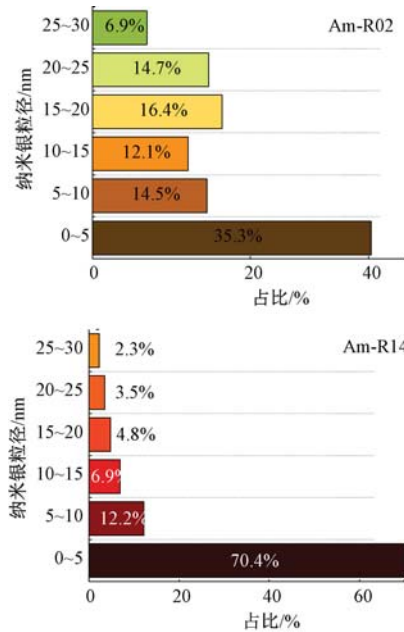


图 2 纳米银粒径分布

3.3 Am-R02 测序和进化树分析 Am-R02 的 ITS 序列长度为 556 bp, BLAST 比对结果表明, 其 rDNA-ITS 序列与 *Aspergillus parvisclerotigenus* 的相应序列的同源性为 100%。系统进化树 (图 3) 显示, 该菌株与 *Aspergillus parvisclerotigenus* 聚在一支, 支持率为 100。最终, 将 Am-R02 鉴定为 *Aspergillus parvisclerotigenus*。

3.4 合成条件优化

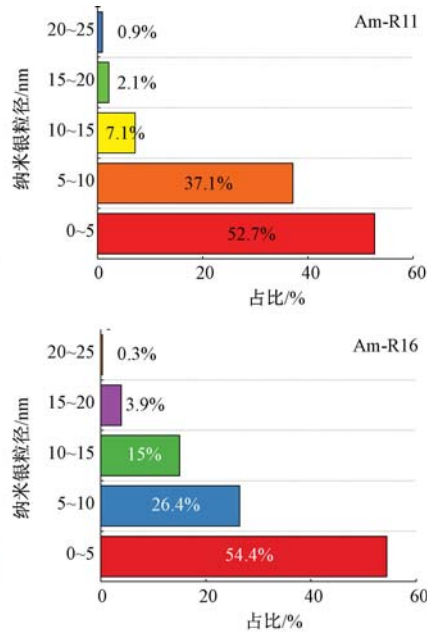
3.4.1 反应时间 由图 4 可知, 反应 10 min 时开始有纳米银合成, 随着时间延长逐渐增多, 在 12 h 时吸光度最高, 但之后逐渐降低, 可能是因为纳米银开始大量分解, 故选

表 2 活性菌株筛选结果

编号	纳米银	编号	纳米银	编号	纳米银	编号	纳米银
Am-R01	-	Am-R11	++	Am-R21	-	Am-R31	-
Am-R02	++++	Am-R12	-	Am-R22	-	Am-R32	-
Am-R03	-	Am-R13	-	Am-R23	-	Am-R33	-
Am-R04	-	Am-R14	-	Am-R24	++	Am-R34	-
Am-R05	-	Am-R15	-	Am-R25	-	Am-R35	-
Am-R06	-	Am-R16	+++	Am-R26	-	Am-R36	-
Am-R07	-	Am-R17	-	Am-R27	-	Am-R37	-
Am-R08	-	Am-R18	-	Am-R28	-	Am-R38	-
Am-R09	-	Am-R19	-	Am-R29	-		
Am-R10	-	Am-R20	-	Am-R30	-		

注: -表示吸光度在 0.1 以下, 没有合成纳米粒能力; ++表示吸光度在 0.3~0.5 之间, 有较强的合成纳米粒能力; +++表示吸光度在 0.5~0.7 之间, 有很强的合成纳米粒能力; ++++表示吸光度在 0.7 以上, 有最强的合成纳米粒能力。

而 5~10 nm 占 1/3, 10~20 nm 在 20% 以内; Am-R24 产生的纳米银粒径大多在 30 nm 以下, 以 0~5 nm 为主, 占总数 70%, 而 5~10 nm 占 10%, 10~25 nm 占 20%, 见图 2。



择 12 h 作为反应时间。另外, 超过 12 h 后纳米银积累值趋于饱和, 故响应面实验不再将反应时间作为影响因素。

3.4.2 AgNO₃ 浓度 由图 5 可知, 不同浓度 AgNO₃ 溶液与发酵液反应时, 吸光度呈明显差异, 在 2 mmol/L 时最高, 故选择 2 mmol/L 左右作为 AgNO₃ 浓度。

3.4.3 反应温度 由图 6 可知, 随着反应温度增加, 纳米银合成速率加快, 在 28 ℃ 时吸光度最高, 故选择 28 ℃ 左右作为反应温度。

3.4.4 pH 由图 7 可知, 在 pH 为 8.0 时吸光度最高, 即纳米银合成效率最高, 而在 9.0 时吸光度略有下降, 5.0 时

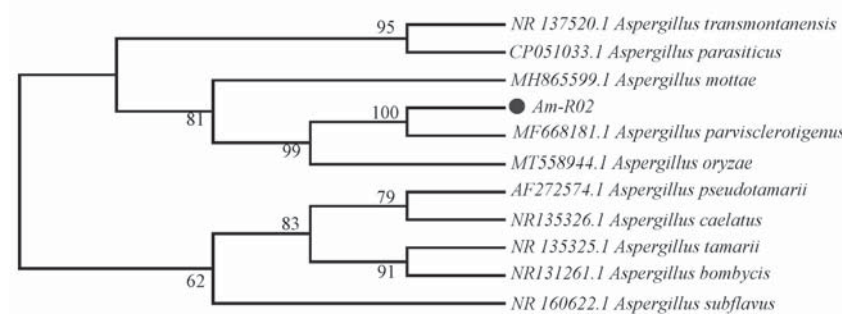


图 3 Am-R02 系统发育分析

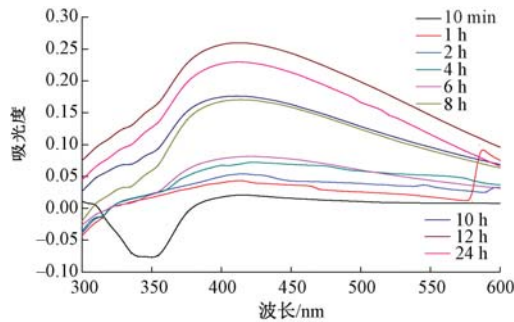


图 4 反应时间对合成纳米银的影响

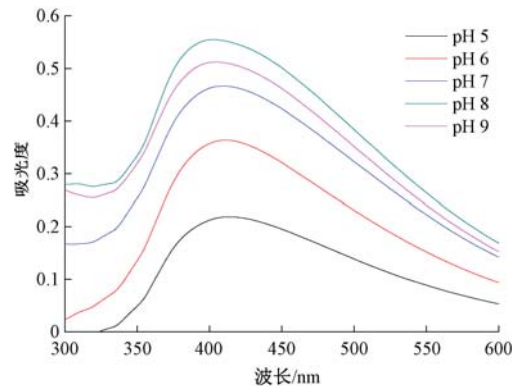


图 7 pH 值对合成纳米银的影响

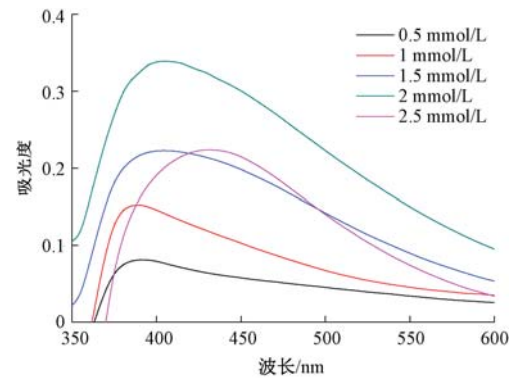


图 5 AgNO₃ 浓度对合成纳米银的影响

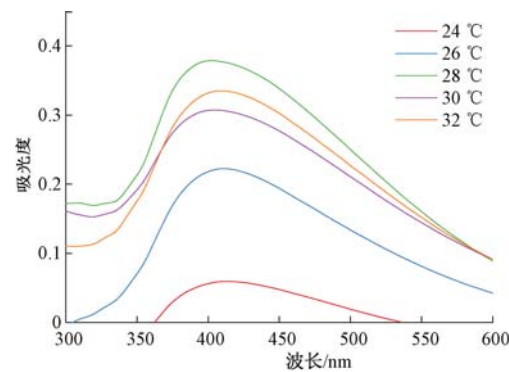


图 6 反应温度对合成纳米银的影响

3.4.5 响应面试验 以 AgNO₃ 浓度 (A)、反应温度 (B)、pH (C) 为影响因素, 吸光度 (Y) 为评价指标, 响应面试验优化合成条件, 结果见表 3。

表 3 试验设计与结果

试验号	A AgNO ₃ /(mmol·L ⁻¹)	B 反应温度/°C	C pH 值	Y 吸光度
1	2	28	8	0.721
2	2.5	28	7	0.536
3	2	30	7	0.465
4	2	26	7	0.498
5	2.5	28	9	0.452
6	2.5	26	8	0.477
7	2	26	9	0.567
8	2	28	8	0.611
9	2	28	8	0.708
10	2	28	8	0.688
11	2	30	9	0.445
12	2.5	30	8	0.503
13	1.5	26	8	0.579
14	1.5	28	9	0.472
15	2	28	8	0.719
16	1.5	30	8	0.512
17	1.5	28	7	0.464

再对表 3 数据进行回归拟合, 得方程为 $Y = -25.32130 + 1.17745A + 2.25933B + 1.14255C - 0.04600AB + 0.02325AC - 0.011125BC - 0.3688A^2 - 0.1162B^2 - 0.019862C^2$, 方差分析见表 4。由此可知, 模型 $P < 0.01$, R^2 为 0.9043, 表明模型具有显著性, 拟合情况良好; R^2_{Adj} 为 0.9371, 表明实验误差较小, 可解释模型中 93.71% 响应值的变化; 失拟项 $P >$

最低, 说明在酸性条件下抑制了纳米银合成, 故选择 8.0 左右作为 pH。另外, pH 对合成纳米银的影响程度大于反应时间、AgNO₃ 浓度, 其原因可能是 pH 影响了纳米银合成通路的酶活性, 具体需要深入研究。

0.05, 表明模型拟合情况良好; 因素 C 、 A^2 、 B^2 、 C^2 具有极显著影响 ($P < 0.01$), 而 A 、 B 、 AB 、 AC 、 BC 影响不显著 ($P > 0.05$), 表明响应值与各因素之间并非简单的线性关系; 各因素影响程度依次为 $C > B > A$, 即 pH 值 > 反应温度 > AgNO_3 浓度。

表 4 方差分析

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.140	9	0.016	7.35	0.007 7
A	9.633×10^{-5}	1	9.633×10^{-5}	0.04	0.839 5
B	1.121×10^{-3}	1	1.121×10^{-3}	0.51	0.496 6
C	0.030	1	0.030	13.67	0.007 7
AB	2.116×10^{-3}	1	2.116×10^{-3}	0.97	0.357 5
AC	2.162×10^{-3}	1	2.162×10^{-3}	0.99	0.352 6
BC	1.980×10^{-3}	1	1.980×10^{-3}	0.91	0.372 4
A^2	0.036	1	0.036	16.41	0.004 9
B^2	0.057	1	0.057	26.07	0.001 4
C^2	0.027	1	0.027	12.19	0.009 1
残差	0.015	7	2.181×10^{-3}	—	—
失拟值	6.899×10^{-3}	3	2.300×10^{-3}	1.10	0.446 5
净误差	8.369×10^{-3}	4	2.092×10^{-3}	—	—
总离差	0.160	16	—	—	—

响应面分析显示, 随着各因素增加或延长, 吸光度随之升高, 但之后反而有降低趋势, 并且各因素之间交互作用不显著, 与方差分析结果一致。残差图分析显示, 模型呈正态分布, 残差拟合曲线为线性, 预测值呈散点分布, 表明拟合结果可靠。另外, 预测值与实际值的拟合情况良好, 实验数据呈散点分布并位于直线两侧, 同时误差较小。

最终确定, 最优条件为 AgNO_3 浓度 1.97 mmol/L, 反应温度 27.67 $^{\circ}\text{C}$, pH 8.01, 吸光度 0.711, 考虑到实验操作的可行性, 将其修正为 AgNO_3 浓度 2.0 mmol/L, 反应温度 28 $^{\circ}\text{C}$, pH 8。

3.5 验证试验 按“3.4”项下优化条件进行 3 批验证试验, 测得吸光度分别为 0.681、0.702、0.715, 平均值为 0.699, RSD 为 2.45%, 表明该条件稳定可靠。

3.6 形态表征 Am-R02 胞内提取物合成的纳米银呈球形或近球形, 大小形态均一, 粒径主要为 1~20 nm, 分散性较好, 呈单一分散状态, 见图 8。

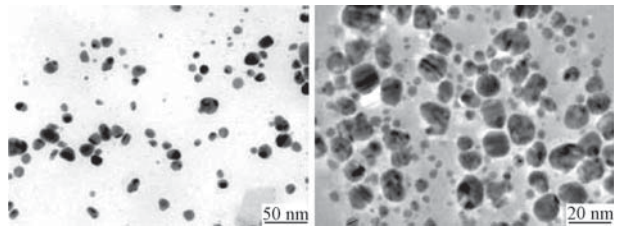


图 8 纳米银透射电镜图

3.7 抑菌作用实验 由表 5 可知, 纳米银对各细菌均有较强的抑制效果, 介于氨苄西林和四环素之间。

4 讨论

本研究从黄芪根的 38 株内生真菌筛选具有合成金属纳米粒子能力的内生真菌, 获得了 4 株能合成纳米银的菌株,

表 5 抑菌作用实验结果

样品	MIC/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)			
	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	大肠杆菌	铜绿假单胞菌
Am-R02 合成纳米银	0.24	0.98	1.95	3.91
氨苄西林	0.06	0.12	0.98	0.49
四环素	1.95	3.91	3.91	3.91

其中合成活性最高的内生真菌 Am-R02 鉴定为 *Aspergillus parvisclerotigenus*。对 Am-R02 合成纳米银的条件优化得到最佳条件为 pH 8.0, AgNO_3 浓度 2 mmol/L, 反应时间 12 h。在影响纳米银合成的条件中, pH 值属于显著性因素, 后续 pH 值的影响机制需要深入研究。

Mohan 等^[17]研究发现, 较低浓度的纳米银即能够抑制铜绿假单胞菌和大肠杆菌的生长。Morones 等^[18]发现粒径 1~100 nm 的纳米银对革兰氏阴性菌有很好的杀菌作用, 推测可能是纳米银缓释银离子, 进而起到一定的杀菌效果。本研究发现, Am-R02 合成的纳米银的粒径主要分布在 20 nm 以下, 抑菌作用实验也证实了其在低浓度时就对大肠杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌有很好的抑制作用, 本研究合成的纳米银表征形态以及其在低浓度的抗菌活性数据与张映^[19]利用钩状木霉生物还原制备纳米银的性质类似, 而抑菌性研究结果与以上学者利用其它植物内生真菌合成纳米银的研究结果有一定的差异性, 说明真菌胞外生物合成纳米银的抑菌能力与真菌种属类别有一定的关系。

参考文献:

[1] 胡烈海, 朱新根, 余 双, 等. 纳米银抗菌应用的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2020, 45(8): 745-750.

[2] 徐明铭, 谢强胜, 张雅楠, 等. 纳米银的制备方法及其在医药领域应用中影响因素的研究进展[J]. 药物生物技术, 2018, 25(5): 467-470.

[3] 于子越, 陈 飞, 董威杰, 等. 纳米银的抑菌机理及其在食品储藏方面的研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(19): 305-309.

[4] Gericke M, Pinches A. Biological synthesis of metal nanoparticles[J]. *Hydrometallurgy*, 2006, 83(1-4): 132-140.

[5] 厉舒祯, 沈文丽, 刘洋荧, 等. 真菌介导的纳米金合成及其应用研究进展[J]. 环境科学与技术, 2016, 39(9): 82-87; 158.

[6] 乔自鹏, 王奇志, 杨道茂, 等. 真菌介导纳米银生物合成的研究进展[J]. 生物技术通报, 2021, 37(3): 185-197.

[7] Li X J, Zhang Q, Zhang A L, et al. Metabolites from *Aspergillus fumigatus*, an endophytic fungus associated with *Melia azedarach*, and their antifungal, antifeedant, and toxic activities [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(13): 3424-3431.

[8] 薛柏吉. 真菌介导的金属纳米粒子的生物合成及其应用研究[D]. 长春: 吉林大学, 2017.

[9] Castro-Longoria E, Vilchis-Nestor A R, Avalos-Borja M.

- Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa* [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011, 83(1): 42-48.
- [10] 曲明星, 姚 薇, 高增贵, 等. 木霉菌辅助合成纳米银对甜瓜的防病促生作用研究[J]. *生态环境学报*, 2020, 29(1): 149-155.
- [11] 毛 迪, 杜 宇, 赵婷婷, 等. 黄芪制备纳米银材料的抑菌性能研究[J]. *潍坊医学院学报*, 2019, 41(4): 247-250.
- [12] 周 凤, 张弘弛, 刘 瑞, 等. 恒山黄芪内生真菌分离鉴定及抗菌活性的研究[J]. *食品科技*, 2012, 37(1): 22-25; 28.
- [13] 孔 悦, 王腾龙, 王新源, 等. 利用二级模型筛选源自恒山黄芪的活性内生真菌[J]. *陕西农业科学*, 2016, 62(3): 44-46.
- [14] Ahila N K, Ramkumar V S, Prakash S, et al. Synthesis of stable nanosilver particles (AgNPs) by the proteins of seagrass *Syringodium isoetifolium* and its biomedical properties[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 60-70.
- [15] 刘 瑞, 张弘弛, 安志鹏, 等. 一株黄芪内生真菌甾醇类代谢产物的分离和鉴定[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(8): 120-124; 130.
- [16] Bassole I H N, Ouattara A S, Nebie R, et al. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso[J]. *Phytochemistry*, 2003, 62: 209-212.
- [17] Mohan S, Oluwafemi O S, George S C, et al. Completely green synthesis of dextrose reduced silver nanoparticles, its antimicrobial and sensing properties[J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 106: 469-474.
- [18] Morones J R, Elechiguerra J L, Camacho A, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles[J]. *Nanotechnology*, 2005, 16(10): 2346.
- [19] 张 映. 钩状木霉生物还原制备纳米银的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2015.

淫羊藿-川芎药对 HPLC 指纹图谱建立与骨关节炎的谱效关系研究

陈文钧¹, 骆 媛¹, 章建华^{2*}, 尹 华^{1*}

(1. 浙江中医药大学药学院中药标准化研究实验室, 浙江 杭州 311402; 2. 浙江中医药大学附属第一医院, 浙江 杭州 310006)

摘要: **目的** 建立淫羊藿-川芎药对 HPLC 指纹图谱, 并分析它与骨关节炎的谱效关系。**方法** HPLC 法建立 22 批药对的指纹图谱, HPLC 法建立大鼠骨关节炎模型, 酶免法检测大鼠血浆中 MMP-13、MMP-3、IL-1 β 、NO、PGE₂ 水平, 双变量相关分析、灰色关联度分析、遗传神经网络研究其谱效关系。**结果** 指纹图谱中共确定 20 个共有峰, 通过对照品比对指出 10 个。给予淫羊藿-川芎药对后, 大鼠血浆中 MMP-13、MMP-3、IL-1 β 、NO、PGE₂ 水平降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。药对中抑制 MMPs 表达贡献较大的有 9 个峰, 为淫羊藿成分; 抑制炎症因子贡献较大的有 7 个峰, 为淫羊藿-川芎药对成分。**结论** 淫羊藿既可调控 MMPs 表达, 又具有抗炎作用, 而川芎主要发挥抗炎作用。

关键词: 淫羊藿-川芎药对; HPLC 指纹图谱; 骨关节炎; 谱效关系; 双变量相关分析; 灰色关联度分析; 遗传神经网络

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)05-1670-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.05.056

骨关节炎是一种以关节软骨退行性病变为核心, 累及骨质并包括滑膜、关节囊及关节其他结构的慢性炎症^[1-2]。骨关节炎属中医“骨痹”范畴, 临床多采用补肾活血方药治疗。淫羊藿-川芎药对取自《太平圣惠方》中的仙灵脾散, 由淫羊藿、川芎、威灵仙、肉桂、苍耳子组成, 取淫

羊藿补肾阳、强筋骨之功, 川芎活血行气、祛风止痛之效, 两药合用可标本兼治。中医骨伤科临床诊治骨关节炎时, 常以淫羊藿、川芎配伍使用, 再随证加减其他药味, 疗效显著。研究表明, 淫羊藿苷可调控软骨细胞代谢, 促进滑膜细胞增殖, 抑制 MMP-13、MMP-3、IL-1 β 、PGE₂ 表达,

收稿日期: 2020-10-14

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81874340)

作者简介: 陈文钧 (1995—), 女, 硕士生, 研究方向为中药分析及新药开发。Tel: 13588162411, E-mail: 13588162411@163.com

***通信作者:** 章建华 (1962—), 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向为骨关节病的基础研究、临床诊治及骨伤中药新药开发。Tel: 13588193391, E-mail: zhangjh311@163.com

尹 华 (1965—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药分析及质量评价、药效物质基础及中药新药开发。Tel: (0571) 61768172, E-mail: maryinhua@163.com