

蝙蝠蛾拟青霉质量标准及免疫活性研究

周毓麟¹ 李兰洲¹ 胡文继¹ 滕伟卓¹ 郑德庆² 刘洋^{1,*}

(1 吉林大学 生命科学学院, 长春 130012; 2 吉林省长春市沐石河镇中心校, 长春 130508)

摘要 目的: 建立蝙蝠蛾拟青霉 100 L 发酵菌丝体质量标准, 并验证其安全性和免疫调节活性。方法: 采用高效液相色谱等方法, 在测定菌丝体产量和腺苷含量的基础上, 测定其水分、一般杂质、酸不溶性杂质和重金属含量。此外, 进行了小鼠免疫增强实验。结果: 菌丝体产量不少于 20.80 g/L, 菌丝体中腺苷含量不少于 0.27%, 水分含量不超过 6.71%, 总灰分含量不超过 1.26%, 酸不溶性灰分含量不超过 0.15%, 重金属含量少于国家标准计入质量标准正文。小鼠免疫增强实验显示, 发酵菌丝体显著提高小鼠迟发型超敏反应, 并对 IL-10、IL-12、IL-12R、IFN- α 等炎症相关因子水平具有上调作用。结论: 初步建立了蝙蝠蛾拟青霉 100 L 发酵菌丝体质量标准, 并证实其在小白鼠体内的安全性和免疫调节活性。

关键词 蝙蝠蛾拟青霉; 发酵; 质量标准; 免疫调节

中图分类号 TQ920.1; R932; R927.11 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2017)01-0024-04

Research on the Quality Standard and the Immunoregulation Function of *Paecilomyces Hepialid*

Zhou Yulin¹, Li Lanzhou¹, Hu Wenji¹, Teng Weizhuo¹, Zheng Deqing², Liu Yang¹

(1 College of Life Sciences, Jilin University, Changchun 130022, China;

2 Centre School of Mushihe Town, Changchun 130508, China)

Abstract Objective: Aim to establish the quality standard of the 100 L Fermentation *Paecilomyces hepialid* mycelium, and study on the safety and immunoregulation activity. Methods: With HPLC and other methods, detect the content of moisture, the general impurities, acid insoluble impurities and heavy metals basing on the output and adenosine content of the mycelium to set up the quality standard. At the same time, the safety and immune regulation activity were determined by the immunological experiment of mice. Results: Mycelium yield is more than 20.80 g/L, adenosine is more than 0.27%, moisture content is less than 6.71%, total ash is less than 1.26% and acidinsoluble ash is less than 0.15% and heavy metal is less than mandatory standard as the quality standard. Meanwhile, the immunological experiment results show that *Paecilomyces hepialid* mycelium could observably improve the DTH reaction and improve the content of IL-10, IL-12, IL-12R and IFN- α . Conclusions: The quality standard of 100 L Fermentation *Paecilomyces hepialid* mycelium is established, and the safety and immunoregulation function in mice are approved.

Keywords *Paecilomyces hepialid*; fermentation; quality standard; immunoregulation

冬虫夏草(*Ophiocordyceps sinensis*)是虫草菌寄生于蝙蝠蛾类昆虫的幼虫后形成的虫菌结合体,包括了蝙蝠蛾幼虫的虫体残骸和真菌的子座^[1]。冬虫夏草良好且广泛的生物学活性,吸引越来越多的研究者投入其研究开发中^[2]。但冬虫夏草严格的寄生

性与特殊的生存环境依赖性制约其产业化发展^[3],同时掠夺性挖掘和环境的破坏使冬虫夏草野生资源濒临枯竭。野生冬虫夏草的生长环境开放等原因还导致虫草质量差异巨大、重金属含量超标等问题^[4,5]。为此,国内外学者在寻找质量可控的冬虫夏

收稿日期 2017-02-15 * 通讯作者 刘洋 研究方向:生理药理研究. E-mail: llz1604397692@163.com

作者简介 周毓麟(1983-)男,工程师,博士,研究方向:药剂与分子药理研究. E-mail: zhouyl133@jlu.edu.cn

基金项目 吉林省科技发展计划项目(20130201006ZY)

草代用品方面做了大量工作。

蝙蝠蛾拟青霉(*Paecilomyces hepiali*)是从天然冬虫夏草中分离得到的具有相似化学成分的真菌,其多糖、虫草酸、虫草腺苷(冬虫夏草中的主要有效成分)和虫草素均具有显著的药理活性^[1,6,7],有望成为野生虫草的替代产品^[8,9]。

目前关于蝙蝠蛾拟青霉质量标准研究主要集中在菌丝体产量和其有效成分如腺苷、甘露醇和多糖等的含量上^[10,11]。并且,产业化必须的大规模发酵方面的研究报道还很少。本文在菌丝体产量和腺苷含量的基础上,通过对水分、灰分、酸不溶性灰分和重金属等含量的测定,建立了蝙蝠蛾拟青霉 100 L 发酵菌丝体质量标准,并利用小鼠免疫增强实验对菌丝体动物安全性和免疫调节活性进行评估,为进一步的放大发酵规模奠定实验基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株

蝙蝠蛾拟青霉 SY02 菌株(本实验室选育)。

1.1.2 实验动物

昆明种小鼠,体重 20~22 g,(购自长春生物制品研究所)许可证号:SCXK-(吉)2014-0005。

1.1.3 试剂

腺苷标准品、甲醇(色谱纯,Sigma 公司),金水宝胶囊(江西济民可信公司),IL-10、IL-10R、IL-12、IL-12R、IFN- α 、NF- κ B 等 ELISA 试剂盒及绵羊红细胞(SRBC)(上海源叶生物科技有限公司),其他试剂均为国产分析纯。

1.1.4 仪器

台式恒温摇床(INNOVA 4000,美国),高速冷冻离心机(GentrifuGe5810R,德国 Eppendorf),真空冷冻干燥机(HLPHA-1-4,德国 Christ),高效液相色谱仪(SPD-10A,日本岛津),紫外分析仪(UV-1V,北京新技术公司)。

1.2 蝙蝠蛾拟青霉菌丝体质量标准建立

1.2.1 菌粉制备

培养基组成(1 L):30 g 蔗糖,10 g 蛋白胨,18 g 酵母浸粉,3 g $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$,3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.235 g VB_1 ,0.011 g ZnCl_2 ,10 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。

菌种活化:100 mL 摇瓶装液 40 mL 培养基,接种斜面保存的蝙蝠蛾拟青霉 SY02 菌株,培养温度 26 $^{\circ}\text{C}$ 转速 150 r/min,培养时间 3 d,既得蝙蝠蛾拟

青霉种子培养基。

菌粉制备:100 L 发酵罐装液 70 L 培养基,接入 5% 种子培养液进行培养,26 $^{\circ}\text{C}$ (150 r/min) 培养 5 d,得到的发酵培养液 4000 r/min 离心 10 min,沉淀冻干,即得蝙蝠蛾拟青霉菌丝体冻干粉末,备用。

1.2.2 蝙蝠蛾拟青霉性状鉴别实验

通过直接观察菌粉的形态、颜色、气味、质地来鉴别。

1.2.3 蝙蝠蛾拟青霉菌丝体产量

取 5 批发酵菌丝体冻干粉末,称量计算每升发酵液菌粉质量,即为菌丝体产量。

1.2.4 腺苷含量的测定

采用高效液相色谱法(中国药典 2010 年版一部附录 VI D)测定腺苷含量。

取 5 批样品,依法制备供试品溶液,每批 2 份,每份平行进样 2 针,精密吸取供试品溶液 20 μL ,注入液相色谱仪,测定峰面积,计算 5 批样品中腺苷含量。

1.2.5 一般杂质含量测定

水分含量测定:取 5 批样品,按照水分测定法(《中国药典》2010 年版一部附录 IX H 第二法)测定,计算供试品中含水量(%)。

总灰分含量测定:取 5 批样品,按照总灰分测定法(《中国药典》2010 年版一部附录 IX K)测定,计算供试品中总灰分的含量(%)。

酸不溶性灰分测定:取 5 批样品,按照酸不溶性灰分测定法(《中国药典》2010 年版一部附录 IX K)测定,计算供试品中酸不溶性灰分的含量(%)。

1.2.6 重金属检查

取 5 批样品,测定其铅、汞、铬、镉、砷重金属含量,均采用食品安全国家标准 GB5009 现行执行标准检查。

1.3 蝙蝠蛾拟青霉免疫调节活性研究

1.3.1 小鼠分组及给药

将 120 只雌雄各半的健康小鼠,根据体重平均分为 5 组,即空白对照组、0.6 g/kg 金水宝胶囊组、3.0 g/kg 蝙蝠蛾拟青霉组、1.5 g/kg 蝙蝠蛾拟青霉组和 0.3 g/kg 蝙蝠蛾拟青霉组,空白对照组予同等体积蒸馏水,连续灌胃 15 d。

1.3.2 小鼠脏器指数测定

取灌胃 15 d 的各组小鼠,于末次给药 2 h 后,称重,脱颈处死,取脾脏,剔除结缔组织,用滤纸吸干脾脏表面液体,称重、记录,由下式计算脾脏指数(%)。

脾脏指数 = (脾脏重量 g / 小鼠体重 g) × 100.

1.3.3 迟发型变态反应实验

取各组灌胃 15 d 的小鼠, 每组各 12 只, 雌雄各半. 制备 2% SRBC 悬液 (V / V), 于每只受试小鼠腹腔注射 0.2 mL, 致敏后 4 d, 用游标卡尺测量左后足跖的厚度. 制备 20% SRBC 悬液 (V / V), 在每只鼠测量部位处皮下注射 20 μ L. 注射 24 h 后再次测量该足跖厚度, 连续测定 3 次, 计算平均值.

1.3.4 免疫相关细胞因子测定

取灌胃 15 d 的各组小鼠, 在最后一次灌胃 2 h 后眼球取血, 室温放置 0.5 h, 3000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 上清液再次 3000 r/min 离心 5 min, 取 2 次离心上清液备用. 按照检测试剂盒说明书要求检测 IL-10、IL-10R、IL-12、IL-12R、IFN- α 、NF- κ B 等含量.

2 结果与分析

2.1 性状鉴别结果

菌粉呈粉末状, 米黄色至深黄色, 粉末无明显气味, 触感细腻.

2.2 质量标准实验结果

2.2.1 发酵菌丝体产量

根据 5 批样品测定结果, 菌丝体产量在 23.11 ~ 27.31 g/L 区间. 以 5 批样品平均产量的 85% 作为下限列入质量标准, 因此暂定每升发酵液中菌粉干重不少于 20.80 g.

2.2.2 腺苷含量

腺苷色谱结果(图 1)所示, 在 10 min 时腺苷标准品与菌粉都有吸收峰.

5 批样品腺苷测定结果, 含量范围在 2.93 ~ 3.41 g/kg 之间, 以最低含量的 85% 计入质量标准, 因此暂定腺苷含量不少于 0.27%.

表 2 蝙蝠蛾拟青霉重金属含量

Tab. 2 The heavy metals content of *Paecilomyces hepiali*

项目	铅	汞	铬	镉	砷
含量 / (mg/kg)	<0.10 ± 0.03	<1.23 ± 0.08	1.60 ± 0.06	<0.02 ± 0.03	<0.20 ± 0.05

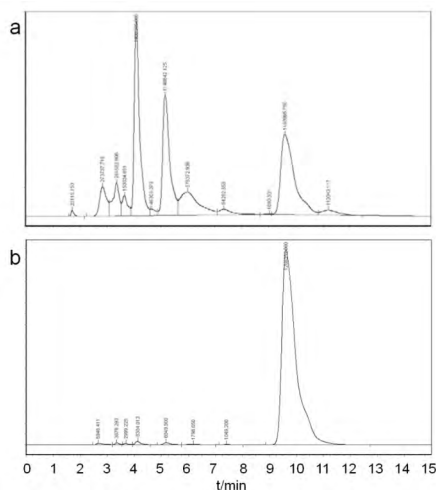
2.3 小鼠免疫增强实验结果

2.3.1 小鼠脏器指数测定结果

0.3、1.5、3.0 g/kg 蝙蝠蛾拟青霉组小鼠的脾脏指数与空白对照组比较均无显著性差异(图 2), 蝙蝠蛾拟青霉对小鼠脾脏指数无显著影响($p > 0.05$).

2.3.2 迟发型变态反应

足趾肿胀度(DTH)结果显示(图 3) 0.3 g/kg、



a 样品; b 腺苷对照品

图 1 样品和腺苷对照品色谱图

Fig. 1 The chromatograms of *Paecilomyces hepialid* and adenosine reference substance

2.2.3 一般杂质含量

表 1 为一般杂质检查结果, 以 5 批样品中杂质平均含量的 150% 作为上限列入质量标准. 将水分含量不超过 6.71%, 总灰分含量不超过 1.26%, 酸不溶性灰分含量不超过 0.15% 列入本品质量标准正文检查项下.

表 1 蝙蝠蛾拟青霉一般杂质含量

Tab. 1 The normal impurity content of *Paecilomyces hepiali*

项目	水分含量	总灰分含量	酸不溶性灰分
平均含量 / %	4.47 ± 0.27	0.84 ± 0.14	0.10 ± 0.03
含量上限 / %	6.71	1.26	0.15

2.2.4 重金属含量结果

菌粉中重金属含量检测结果(表 2), 含量均小于国家保健(功能)食品通用标准 GB16740—1997 规定或低于中国药典标准, 故重金属未列入质量标准正文检查项下.

1.5 g/kg 和 3.0 g/kg 蝙蝠蛾拟青霉给药组与空白对照组相比肿胀程度差异显著($p < 0.01$), 没有明显的剂量依赖性. 表明蝙蝠蛾拟青霉具有增强机体迟发型变态反应的作用.

2.3.3 免疫细胞因子测定结果

从表 3 可以看出, 蝙蝠蛾拟青霉对 IL-10、IL-12、IL-12R、IFN- α 等细胞因子水平有显著上调作用($p <$

0.05) 其中 3.0 g/kg 蝙蝠蛾拟青霉组效果最显著。

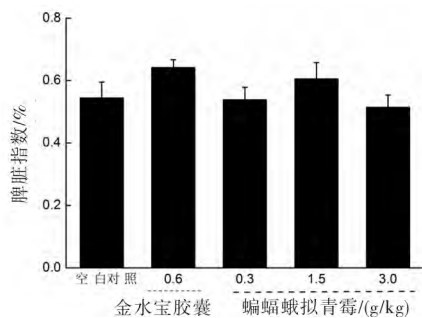
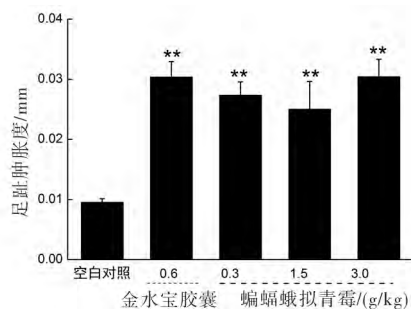


图 2 小鼠脾脏指数测定结果

Fig.2 Spleen index in mice



与空白对照组相比, * * p < 0.01

图 3 足趾肿胀度测定结果

Fig.3 Measurements of footpad reaction

表 3 免疫相关细胞因子表达测定结果

Tab.3 Expressions of immune related cytokines

	空白对照组	0.6 g/kg 金水宝胶囊	0.3 g/kg 蝙蝠蛾拟青霉	1.5 g/kg 蝙蝠蛾拟青霉	3.0 g/kg 蝙蝠蛾拟青霉
IL-10/($\mu\text{mol/L}$)	174.17 \pm 11.98	218.75 \pm 15.75*	277.25 \pm 11.95**	232.75 \pm 28.76	259.17 \pm 14.12**
IL-10R/($\mu\text{mol/L}$)	178.93 \pm 8.85	250.36 \pm 23.07*	204.64 \pm 23.76	181.07 \pm 14.12	202.02 \pm 18.53
IL-12/($\mu\text{mol/L}$)	2.81 \pm 0.18	4.11 \pm 1.48**	4.06 \pm 0.25**	4.35 \pm 0.33**	3.76 \pm 0.38*
IL-12R/($\mu\text{mol/L}$)	15.57 \pm 1.05	19.05 \pm 1.26	26.71 \pm 2.28**	15.43 \pm 1.21	21.95 \pm 1.20**
NF- κ B/($\mu\text{mol/L}$)	465.63 \pm 13.76	454.17 \pm 33.24	462.50 \pm 36.53	437.50 \pm 42.24	450.00 \pm 30.15
INF- α /($\mu\text{mol/L}$)	12.05 \pm 0.83	10.51 \pm 0.37	10.12 \pm 0.31	10.12 \pm 0.21	22.96 \pm 6.25**

注:与空白对照组相比,* p < 0.05,* * p < 0.01

3 结论

本文建立了蝙蝠蛾拟青霉 100 L 发酵菌丝体质量标准。将菌丝体产量不少于 20.80 g/L,腺苷含量不少于 0.27%,水分含量不超过 6.71%,总灰分含量不超过 1.26%,酸不溶性灰分含量不超过 0.15%,重金属含量少于国家标准计入蝙蝠蛾拟青霉 100 L 发酵菌丝体的质量标准正文。

本文利用小鼠免疫增强实验,检测蝙蝠蛾拟青霉 100 L 发酵菌丝体的免疫增强活性,结果显示 100 L 发酵菌丝体对小鼠脾脏指数无显著影响,且能显著增强小鼠超敏反应,提高 IL-10、IL-12、IL-12R、IFN- α 等炎症因子含量,证实蝙蝠蛾拟青霉 100 L 发酵菌丝体体内安全性和有提高小鼠细胞免疫功能,减轻机体炎症反应的作用。

参 考 文 献

[1] 陈晓燕. 冬虫夏草的药理与临床研究进展 [J]. 中医药导报, 2009, 15(2): 91-93.
 [2] Liu W C, Wang S C, Tsai M L, et al. Protection against radiation-induced bone marrow and intestinal injuries by *Cordyceps sinensis*, a Chinese herbal medicine [J]. Radiation Research, 2006, 166(6): 900-907.
 [3] Jang S H, Kim S H, Lee H Y, et al. Immune-modulating activity of extract prepared from mycelial culture of

Chinese caterpillar mushroom, *Ophiocordyceps sinensis* (Ascomycetes) [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2015, 17(12): 1189-1199.

[4] 王钢力,金红宇,韩小萍,等. 冬虫夏草药材的质量研究及存在问题 [J]. 中草药 2008, 39(1): 115-118.
 [5] 李文佳,董彩虹,刘杏忠,等. 冬虫夏草培植技术研究进展 [J]. 菌物学报 2016, 35(4): 375-387.
 [6] 沈伟,胡玲玲,李赫宇,等. 两段培养冬虫夏草菌丝体中腺苷积累动态研究 [J]. 食品研究与发展 2015, 36(14): 53-56.
 [7] 朱如彩,谭电波,秦优,等. 不同采收时期雪峰虫草中腺苷含量的动态变化 [J]. 中国现代中药 2015, 17(11): 1180-1183.
 [8] 金莉莉,马俊,李婷,等. 不同来源北冬虫夏草活性成分差异及其对小鼠免疫功能的影响 [J]. 食品科学 2015, 36(13): 243-246.
 [9] Kim H, Lee T H, Kwon Y S, et al. Immunomodulatory activities of ethanol extract of *Cordyceps militaris* in immunocompromised mice [J]. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 2012, 41(4): 494-500.
 [10] 张露蓉,江国荣,许恒. 冬虫夏草和虫草菌丝体中腺苷成分的比较 [J]. 安徽医药, 2011, 15(4): 439-441.
 [11] 樊晓飞,杨明,姜磊,等. 蝙蝠蛾拟青霉菌丝体化学成分的研究 [J]. 菌物研究, 2013, 11(2): 72-77.