

家蚕蛹人工培养巴西虫草研究

方定坚¹ 郑祥明¹ 廖森泰¹ 陈卫东² 黄起鹏³

(1 广东省农业科学院蚕业研究所, 广州, 510640; 2 广州市微生物研究所; 3 中山大学化学系)

摘要 从广东省采集的巴西虫草(*Cordyceps brasiliensis* Henn), 经分离提纯后给家蚕蛹接种, 成功地培养出巴西虫草, 提出了家蚕蛹人工培养巴西虫草的方法。人工培养巴西虫草的麦角甾醇、甘露醇、腺苷、氨基酸、微量元素等的含量与冬虫夏草(*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc) 相近。有提高实验动物免疫功能、降低血清胆固醇等药理作用。

关键词 巴西虫草家蚕蛹; 人工培养

中图分类号 S886.9

冬虫夏草(*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc) 是虫草属真菌的一个种, 寄生于鳞翅目昆虫虫草蝙蝠蛾(*Hepialus armoricanus* Oberthür) (朱弘复, 1965) 所形成的虫菌复合体, 有很高的药用价值, 是我国一种传统的名贵滋补中药材。由于冬虫夏草的生长需要特定的生态环境和寄主昆虫, 故资源稀少, 因此异种虫草的药用及人工培养虫草的研究已引起重视(李廷宝等, 1981)。国内对蛹虫草(*Cordyceps millienris* (vaill) Fr) 的人工培养已有报道(谷桓生等, 1988)。1988年, 作者从广东省采集到6种虫草野生株, 从中筛选到1种可以感染家蚕, 经鉴定为巴西虫草(*Cordyceps brasiliensis* Henn)。本文报告以家蚕蛹为寄主人工培养巴西虫草的研究结果及主要化学成分和药理作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 1988年4月于广东省采集的巴西虫草野生株, 经分离提纯后以米饭培养基保存。

1.1.2 寄主昆虫 二化性家蚕品种的1~2日蛹龄活蛹。

1.1.3 外源性营养液 由复合维生素、蛋白胨、葡萄糖、蒸馏水按0.3:1:10:1 000的比例组成。

1.1.4 冬虫夏草 四川省产, 由广东省中药研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 人工培养方法 从米饭培养基中取出巴西虫草菌种, 以无菌蒸馏水稀释, 调制成OD₄₉₅为0.05的菌液浓度, 在无菌条件下给经体表消毒的1~2日蛹龄家蚕活蛹注射接种, 接种剂量为0.1 mL/头, 蛹体僵化后以外源性营养液包埋, 在不同温湿度及光照条件下培养, 观察子实体萌发和生长。

1.2.2 成分分析 将家蚕蛹人工培养巴西虫草(以下简称人培巴西虫草)样品于55~60℃下干燥至恒重。麦角甾醇测定: 以无水乙醚提取, 薄板点样, 环乙烷与乙酸乙酯组成的展开剂展开, 紫外灯下刮取, 无水乙醇洗脱后于271.1 nm处测定。甘露醇测定: 将50%乙醇提取液除蛋白, 沉淀多糖, 再经717-OH和717-H离子交换树脂, 不吸收部分定容后按中

1994-02-24 收稿

国药典 1985 年版甘露醇测定方法测定。麦角甾醇和甘露醇的测定仪器均用日本岛津—UV240。氨基酸测定: 用日立 835—50 型高速氨基酸分析仪, 游离氨基酸用蒸馏水加热提取, 水溶部分加磺基水杨酸离心去蛋白后供测。酸性氨基酸由盐酸加热水解获得供测。微量元素测定: 将样品以超纯硝酸处理, 超纯高氯酸加热, 逐步升温到 200 ℃ 至透明, 蒸干后把残渣溶于超纯盐酸中, 去离子水定容, 用美国 Jarrell—Ash ICAP 9000 型多道光谱仪检测。腺苷用等离子体光谱仪测定。

1.2.3 人培巴西虫草的毒理和药理试验 委托广东医学院预防医学系和广东省药物研究所按卫生部 1985 年颁发的新药审批办法所规定的项目和方法进行。

2 结果

2.1 巴西虫草野生株描述

子座单根或分枝, 长 6 ~ 7.3 cm, 柄部粗 1.5 ~ 2 mm, 弯曲, 由寄主虫体头端抽出, 青黄色至黄绿色。头部近圆柱状, 略扁, 15 ~ 20 mm × 3 ~ 5 mm, 青黄色至黄绿色, 无不孕顶端。子囊壳 1 ~ 2 层, 埋于子座四周, 瓶状或卵圆形, 有短颈, 壳底宽, 350 ~ 700 μm × 175 ~ 315 μm。壳口呈疣状突出子座。子囊蠕虫形, 无色, 70 ~ 333 μm × 3.5 ~ 5 μm。子囊孢子线形, 横断成 3.5 ~ 7 μm × 0.7 μm 的小段。后期在头部长满灰白至灰黄色的孢子角, 状如针毡, 为无性世代孢子。寄生于鞘翅目昆虫幼虫上, 寄主虫体为绿色或黄绿色菌丝缠绕。

2.2 人工培养

2.2.1 生态条件对接种巴西虫草后蛹体僵化的影响 如表 1, 接种巴西虫草后的蚕蛹, 在高湿度环境中保护僵化不良, 25 ℃ 以上温度僵化亦不充分, 而在 15 ~ 20 ℃ 和适干条件下则蛹体僵化良好, 光照对僵化无影响。

表 1 生态条件对接种巴西虫草后蛹体僵化的影响

温度	15 ℃			20 ℃			25 ℃		
光照	自然光照	全黑暗	全光照	自然光照	全黑暗	全光照	自然光照	全黑暗	全光照
相对湿度 70%~75%	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
相对湿度 90%~95%	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(1) +++——僵化良好, ++——僵化一般, +——僵化不良

2.2.2 生态条件对人培巴西虫草子实体萌发的影响 如表 2, 蛹体充分僵化后, 在 15 ℃ 以下和 25 ℃ 以上温度下, 不论湿度和光照如何, 子实体均不能萌发。在 20 ℃ 条件下, 以自然光照和高湿度保护, 僵化蛹体约经 10 ~ 15 d, 体表菌丝聚集小水珠, 蛹体萌发出乳黄色小芽体, 如每日再补充 4 h 蓝紫光照, 则子实体萌发率更高。干燥环境不利于子实体萌发, 无光照不能形成子实体。

表 2 生态条件对人培巴西虫草子实体萌发的影响⁽¹⁾

温度	15 ℃				20 ℃				25 ℃			
光照	自然光照	自然光照 加蓝紫光	全黑暗	全光照	自然光照	自然光照 加蓝紫光	全黑暗	全光照	自然光照	自然光照 加蓝紫光	全黑暗	全光照
相对湿度 70%~75%	—	—	—	—	+	+	—	+	—	—	—	—
相对湿度 >95%	—	—	—	—	++	+++	—	+	—	—	—	—

(1) +++——萌发率 >80%, ++——萌发率 50%~80%, +——萌发率 <50%; ———不萌发

于检测限。

東山紅樓宋西遊記路路接來

0.29%, 0.97% 和 0.66%, 人培巴西虫草为 0.59%, 2.71% 和 0.80%。在无水乙醚提取部分, 两种虫草均检出 3-苯基-2-丙烯醇、三烷基取代苯酚 14-甲-十五酸、9-十八烯酸、单质硫。人培巴西虫草还检出 12-甲基十三酸和 15-甲基十七烷酸。

表 3 人培巴西虫草的氨基酸含量

%

氨基酸 种 类	游 离 氨 基 酸							酸 解 氨 基 酸						
	子实体		僵虫体		全 草			子实体		僵虫体		全 草		
	冬虫夏草	人培巴西虫草	冬虫夏草	人培巴西虫草	冬虫夏草	人培巴西虫草	人培巴西虫草僵化蚕蛹	冬虫夏草	人培巴西虫草	冬虫夏草	人培巴西虫草	冬虫夏草	人培巴西虫草	人培巴西虫草僵化蚕蛹
门冬氨酸	0.311	0.009	0.121	0.048	0.164	0.044	0.181	0.251	2.860	2.065	5.465	2.167	5.186	6.955
苏氨酸 ⁽¹⁾	0.155	0.140	0.065	0.160	0.085	0.158	0.172	1.310	1.170	1.155	2.646	1.190	2.552	2.966
丝氨酸	0.087	0.196	0.135	0.041	0.124	0.057	0.106	1.097	1.464	0.952	1.983	0.984	1.928	2.536
谷氨酸	0.756	1.947	0.620	0.414	0.651	0.578	0.501	4.006	4.820	3.636	6.435	3.719	6.262	7.453
脯氨酸	0.139	0.251	0.150	0.272	0.148	0.270	0.388	1.344	1.325	1.412	1.702	1.397	1.662	2.888
甘氨酸	0.043	0.070	0.005	0.024	0.014	0.029	0.066	1.285	1.438	1.189	2.303	1.210	2.210	2.913
丙氨酸	0.187	0.292	0.108	0.198	0.126	0.208	0.316	1.492	1.699	1.307	2.594	1.348	2.498	3.297
胱氨酸	微量	0.088	微量	0.085	微量	0.085	微量	0.473	0.470	0.387	0.692	0.406	0.669	0.768
缬氨酸 ⁽¹⁾	0.117	0.086	0.168	0.093	0.157	0.092	0.119	1.456	1.578	1.468	2.941	1.466	2.795	3.546
蛋氨酸 ⁽¹⁾	微量	0.013	微量	0.011	微量	0.011	微量	0.324	0.300	0.471	1.342	0.438	1.231	1.698
异亮氨酸 ⁽¹⁾	0.026	0.025	0.058	0.037	0.051	0.035	0.036	0.867	1.170	1.019	2.333	0.985	2.209	2.960
亮氨酸 ⁽¹⁾	0.023	0.024	0.070	0.052	0.060	0.049	0.044	1.478	1.666	1.609	3.697	1.580	3.480	4.638
酪氨酸	0.099	0.116	0.118	0.101	0.114	0.103	0.126	0.637	1.158	1.115	2.519	1.008	2.373	3.613
苯丙氨酸 ⁽¹⁾	0.195	0.177	0.216	0.135	0.211	0.140	0.222	1.163	1.699	1.177	2.923	1.174	2.792	3.633
赖氨酸 ⁽¹⁾	0.139	0.240	0.283	0.219	0.251	0.221	0.260	1.716	1.759	1.677	3.654	1.686	3.451	4.694
氨	0.082	0.046	0.057	0.048	0.063	0.048	0.063	1.074	1.446	0.824	1.726	0.880	1.696	1.583
组氨酸	0.115	0.176	0.149	0.085	0.141	0.095	0.321	1.542	0.793	1.254	1.371	1.318	1.309	2.062
色氨酸 ⁽¹⁾	微量	0.024	微量	0.014	微量	0.015	0.019							
精氨酸	0.312	1.195	0.377	0.076	0.363	0.196	0.463	2.645	1.293	2.116	3.142	2.235	2.950	4.316
氨基酸总量	2.70	5.06	2.64	2.06	2.66	2.38	3.34	25.35	27.26	24.01	47.74	24.30	45.56	60.94
人体必需氨基酸总量	0.65	0.73	0.86	0.72	0.81	0.72	0.87	8.31	9.94	8.58	19.54	8.52	18.51	24.13

(1) 人体必需氨基酸

表 4 人培巴西虫草的微量元素含量

μg/g

虫草种类	Li	Ba	Zn	Al	Sr	Pb	Ca	Mg	Fe	K	Cu	Na	Mn	Si	Ti	P
冬虫夏草	1.12	11.07	66.1	1676.3	3.01	1.75	563.7	1178.0	558.6	8389.6	11.84	755.9	233.5	503.8	23.35	5192.8
人培巴西虫草	<0.2	2.70	184.8	34.8	1.05	5.49	1265.6	3842.9	45.9	22203.0	10.80	835.7	138.2	15.9	0.66	11985.8
巴西虫草僵化蛹体	<0.2	0.45	145.0	90.0	0.40	<1.25	850.0	3100.0	36.0	14600.0	12.0	215.0	105.0	29.0	0.70	10450.0

2.4 毒理试验结果

人培巴西虫草对 NIH 小鼠和 SD 大鼠的急性毒性 LD₅₀ 分别大于43 g/kg 体重和50 g/kg 体重,属无毒,亦无亚慢性毒性。微生物回复突变试验、小鼠骨髓多染红细胞诱发微核试验、精子致畸试验均为阴性。

2.5 药理试验结果

已试验的药理项目结果表明,人培巴西虫草的药理作用与冬虫夏草相似,都有免疫调节与补益作用。对实验动物能增加胸腺和脾脏重量,对抗氢化可的松所致的胸腺及脾脏萎缩和白细胞降低。可以明显提高碳粒廓清速率,增加网状内皮系统的吞噬功能,能提高正常小鼠体内淋巴细胞转化率,明显对抗氢化可的松所致小鼠淋巴细胞转化的抑制作用。对正常小鼠有促进血清溶血素抗体生成的趋势,对氢化可的松所致免疫抑制状态小鼠有明显促进溶血素抗体生成作用,提示对机体体液免疫有一定调节作用。有明显降低血清胆固醇(TC)的作用,有降低甘油三酯(TG)和升高高密度脂蛋白(HDL-C)的趋势。对雄性小鼠的睾丸和肾上腺有增重作用,可使去势小鼠的精囊腺明显增重,提示有雄性激素样作用。一般药理试验证明,人培巴西虫草还能减少小鼠的自主活动,延长戊巴比妥钠所致睡眠时间,具有中枢镇静作用。对大鼠心电图和离体下肢血管灌流无明显影响,十二指肠给药对麻醉大鼠的血压有轻度降压作用,能减慢呼吸和心率。现将主要药理试验结果列于表 5 和表 6。

表 5 人培巴西虫草提高实验小鼠免疫机能与雄性激素的实验结果

组别	动物数	剂量	小鼠免疫器官重量		白细胞	小鼠碳粒廓清指数K值	小鼠淋巴细胞转化率	小鼠血清溶血素抗体HC ₅₀	雄性小鼠睾丸、肾上腺重量		去势鼠精囊腺重量
			$\bar{x} \pm SD/\text{mg} \cdot (10\text{g})^{-1}$						$\bar{x} \pm SD$		
			/只	/g·kg ⁻¹	胸腺	脾脏	$\bar{x} \pm SD \times 10^9/\text{个} \cdot \text{L}^{-1}$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD/\%$	$\bar{x} \pm SD$	睾丸
mg/10g											
人培巴西虫草	10	8	31.5	45	67.30	0.051	22.5	216	64.0	4.2	7.6
			±6.0	±4.8	±13.80	±0.014 [*]	±8.0 [*]	±18.4	±12.5 [*]	±0.5 [*]	±3.0 [*]
冬虫夏草	10	8	33	46	60.90	0.055	24.4	255	68.5	4.4	8.8
			±5.2	±5.4	±15.70	±0.019 ^{**}	±9.2 [*]	±20.3	±15.0 [*]	±0.6 [*]	±2.6 [*]
对照	10		28.5	42	63.80	0.042	15.6	185	52.0	3.0	5.8
			±4.5	±6.0	±5.70	±0.016	±6.8	±17.6	±15.4	±0.4	±3.2
人培巴西虫草+氢化可的松	10	8+0.05	24	35	40.70		22.6	150			
			±2.3 [*]	±1.3 [*]	±8.92 [*]		±8.4 [*]	±11.0 [*]			
冬虫夏草+氢化可的松	10	8+0.05	26	38	42.60		24.0	182			
			±4.0 ^{**}	±5.4 ^{**}	±9.16 [*]		±6.8 ^{**}	±12.6 ^{**}			
氢化可的松	10	0.05	17	28	32.40		13.4	104			
			±2.5	±3.6	±8.40		±4.3	±13.6			

*P<0.05 **P<0.01

表 6 人培巴西虫草对实验性高血脂症大鼠血脂的影响

组别	动物数	剂量	TC	TG	HDL-C
	/只	/g·kg ⁻¹			mmol/L
正常对照	10		1.65±0.2	0.76±0.13	0.69±0.10
高脂对照	10		3.89±0.7 ^Δ	0.90±0.18 ^Δ	0.56±0.21
人培巴西虫草	10	4	2.40±0.5*	0.84±0.16	0.62±0.18
冬虫夏草	10	4	2.20±0.3*	0.82±0.14	0.66±0.16

与正常对照组比较 ^Δ P<0.05, 与高脂对照组比较 *P<0.05

3 讨论

虫草属真菌的种已报道有近 300 种之多(李廷宝等, 1981), 但成功地做为药用的还仅冬虫夏草一种, 为弥补资源不足, 开展其他虫草的药用和人工培养的研究势在必行。虫草的人工培养有培养菌丝体入药和以异种昆虫为寄主培养虫菌复合体两种途径。关于后者, 必须解决有药用价值的虫草种、寄主昆虫和培养条件 3 个问题。作者以分布于广东的巴西虫草为菌种, 以易繁易养的家蚕蛹体为寄主人工培养成功, 整个培养时间只需 60 d 左右, 培养条件虽极严格, 但相对较为简单, 意味着可以规模培养。人培巴西虫草的安全性, 主要成分和增强机体免疫功能、降低血清胆固醇等药理作用亦与传统的冬虫夏草相似, 如能进一步拓展药理、药化研究继而进行临床试验, 人培巴西虫草是有药用前景的。

致谢 巴西虫草野生株由广东省微生物研究所郑国扬研究员、李泰辉副研究员鉴定, 广东省农业科学院刘仕贤研究员参与立题并指导研究, 谨致谢意。参加本研究的还有广东省农科院蚕业研究所朱德贞、广州市微生物研究所张嘉健、梁淑娃、黄义勇、中山大学测试中心连咏朋。

参 考 文 献

- 朱弘复. 1965. 冬虫夏草的寄主昆虫是虫草蝙蝠蛾. 昆虫学报, 14(6):620~621
李廷宝, 肖志明, 陈华荣, 等. 1981. 关于虫草的研究. 中草药, 12(11):45~48
谷恒生, 梁曼逸, 苑桂华, 等. 1988. 以柞蚕家蚕为寄主培育蛹虫草的初步研究. 蚕业科学, 14(2):108~110

STUDIES ON ARTIFICIAL CULTURE OF *Cordyceps brasiliensis* USING THE PUPA OF *Bombyx mori*.

Fang Dingjian¹ Zheng Xiangming¹ Liao Sentai¹ Chen Weidong² Huang Qipeng³

(1 Sericultural Research Institute, Guangdong Academy of Agr. Sci., Guangzhou, 510640;

2 Guangzhou Institute of Microbiology; 3 Dept. of Chemistry, Zhongshan Univ.)

Abstract

Cordyceps brasiliensis was collected in Guangdong Province and inoculated into pupae of *Bombyx mori*, and artificial culture of *Cordyceps brasiliensis* was successfully achieved. The method of artificial culture using the pupa of *Bombyx mori* is described in this paper. The ergosterol, mannitol, adenosine, amino acid and microelement content of the artificially cultured *Cordyceps brasiliensis* was similar to that of *Cordyceps sinensis*. It had the pharmacologic effect of enhancing immunity and decreasing serum cholesterol in experimental animals.

Key words *Cordyceps brasiliensis* Henn; pupa of *Bombyx mori*; artificial culture