

蛹虫草几个问题的最新研究进展

韩燕峰 梁建东 杜文 梁宗琦*

(贵州大学南区 生命科学学院 真菌资源研究所 贵州 贵阳 550025)

摘要: 蛹虫草由于具有多种生理活性功能, 在医疗保健及食品开发中具有很好的经济价值。本文重点评述了蛹虫草研发中的(1)无性型菌种的分类地位, (2)有意义的培养研究方法, (3)菌种“退化”与遗传变异, 和(4)生物活性物质及生理功能的新研究进展等问题。

关键词: 蛹虫草无性型, 分类, 人工培养, 菌种退化

Research Progress About Some Problems on *Cordyceps militaris*

HAN Yan-Feng LIANG Jian-Dong DU Wen LIANG Zong-Qi*

(Institute of Fungus Resources, College of Life Science, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract: *Cordyceps militaris* is of significant economic value in medical care and food exploitation because of its many physiological activities. This paper reviews (1) the taxonomic position of its anamorph, (2) interesting culture ways, (3) strain degeneration and genetic variability, and (4) research progress in bioactive compounds and pharmacological functions.

Keywords: Anamorph of *Cordyceps militaris*, Taxonomy, Artificial culture, Strain degeneration

蛹虫草是一种能寄生在多种鳞翅目昆虫蛹及幼虫上的虫草菌。它在功能食品和医药等方面有很好的实用价值。近年研究发现它具有抑制DNA和RNA的合成、抗菌、提高机体免疫力、对膀胱癌、结肠癌及肺癌等多种癌细胞具有抑制作用和调节内分泌与抗疲劳等作用。国内对这方面的研究和人工培养技术已有较多评述^[1-4]。本文拟对在蛹虫草研究开发中的几个重要问题再次进行探讨; 并对近年在活性成分及生理作用研究上的一些新进展作扼要介绍。

1 对蛹虫草无性型分类地位的再认识

自从Kobayasi正式提出蛹虫草的无性型是蛹草头孢霉 *Cephalosporim militaris* 以来^[5], 不同学者对其分类地位先后提出过不同的看法。但他们的研究

都是以Kobayasi发表的种名为出发点, 而对此菌的多型现象则从未涉及, 且他们认定的无性型也未进行拉丁文描述予以合法发表^[1]。本文作者等早期的工作已观察到, 蛹虫草无性型的不同角变株, 在分生孢子聚集方式上存在头状的轮枝孢型和链状拟青霉型两种产孢方式^[6], 基于其野生型是拟青霉型为主, 对定名为蛹草拟青霉 *P. militaris* 的蛹虫草无性型进行了拉丁描述并作了合法的发表^[7]。Zare等人^[8]和Gams等^[9]根据核糖体rDNA ITS序列以及大亚基和小亚基序列分析, 将轮枝孢属中的所有虫种都移入新属蛭霉属 *Lecanicillium* 中, 此属的形态特征是分生孢子常排列呈单叠瓦状, 瓶梗的形状及瓶梗在分生孢子梗上的着生方式则介于拟青霉和轮枝孢两个属之间。李春如^[10]采用了上述分类系统, 将蛹

基金项目: 国家自然科学基金重大项目(No. 39899400)

* 通讯作者: ✉ zqliang472@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-02-14; 接受日期: 2009-04-15

草拟青霉转属组合为蛹草蚱霉 *Lecanicillium militaris* (Liang) C. R. Li, M. Z. Fan & Z. Z. Li.

在拟青霉属中,具轮枝孢型产孢结构的种除蛹草拟青霉外。现研究发现,另一种拟青霉在不同培养基上,也能产生拟青霉型和轮枝孢型两型产孢结构。拟青霉型的产孢结构在花生培养基上最多,其次是查氏培养基和萨氏培养基;而在马铃薯培养基上则以轮枝孢型为主。此外,两型产孢结构的比例与菌丝的发育阶段相关。拟青霉型的产孢结构多从基质菌丝上产生(图 1),菌落中心比边缘产生的数量大;成熟菌丝比幼嫩菌丝上产生的多。

分子系统发育分析表明(图 2),蛹草拟青霉、蜡



图 1 同时形成的拟青霉型和轮枝孢型产孢结构
Fig. 1 paecilomyces-type and verticillium-type conidiogenous structures on the same branch

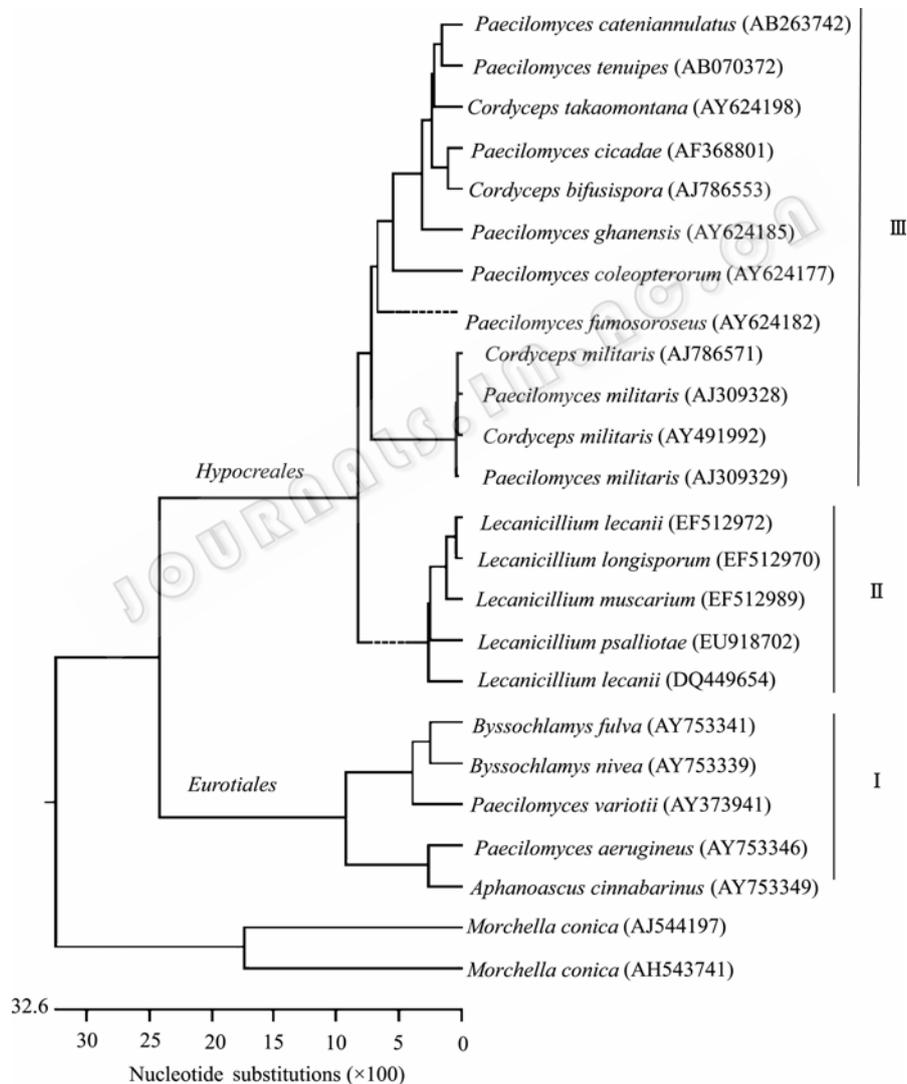


图 2 蛹草拟青霉与其近缘种基于 ITS rDNA 序列采用 DNASTar 软件构建的系统发育树(系统树中的序列全部下载自 GenBank)

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Paecilomyces militaris* and its allies based on ITS rDNA sequences by DNASTar software (all sequences were from GenBank)

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

蚰霉的一些主要成员与一些虫草同处于一个进化分枝中, 它们能与属于散囊菌目的一些耐热或嗜热的拟青霉(进化分支 I)明显分开。蛹草拟青霉与蜡蚰霉虽有较近的亲缘关系。但从系统树中可看出, 蛹草拟青霉与其他虫生拟青霉的关系更为密切(进化分支 III), 而与其蚰霉姊妹群(进化分支 II)则相分离。

2 几个有借鉴意义的培养研究方法

2.1 液体培养

液体培养方法常用于研究和生产多糖、虫草菌素等生物活性物质或菌种生产。

2.1.1 液体培养中菌丝球形态特征研究的意义: Park 等^[11]借助图像分析, 研究了蛹虫草在不同搅拌条件下, 菌丝球直径, 圆度, 粗糙度和紧实度等形态特征与相应多糖含量的相关性(图 3)。这项研究工作对其它虫草液体生产监控和菌种的生产选育等有参考价值。

他们的研究方法是用一个与数码显微镜相连接的软件进行形态学特征分析。定时从液体发酵罐中取样, 固定液固定, 次甲基蓝染液染色。每个样品在 100 倍的视野下, 测菌丝球的形态特征, 包括平均直径、圆度、粗糙度和紧密度。圆度以菌丝球的最

小直径与其最大直径之比表示; 紧密度是以成团菌丝球的投影面积和其中中心突显面积之比表示; 粗糙度 R 用下列公式计算: $R=(\text{菌丝球周长})^2/(4\pi\times\text{菌丝球面积})$ 。测定结果发现, 菌丝球的紧实度是影响胞外多糖生物合成最重要的因素。在 150 r/min 时, 菌丝球紧密(图 3), 胞外多糖含量也最高。表明菌丝球形态是一个鉴别菌丝产胞外多糖含量多少的重要指标。

2.1.2 提高虫草菌素含量的途径: 虫草菌素是蛹虫草标志性的生物活性物质, 具有多种重要生物活性, 而且也是蛹虫草产品质量高低的参数之一。Mao 等^[12]在摇瓶中的研究表明葡萄糖对虫草菌素的形成最有利, 但对菌丝生长则是半乳糖最好。

为了进一步提高虫草菌素含量, Masuda 等人^[13]使用了表面培养法, 表明在 1.8 cm~5.3 cm 的液层深度试验范围内, 培养液厚度为 1.8 cm 时(25°C±1°C, 培养 6 d), 虫草菌素的最大浓度可达到 640 mg/L。

李祝等人^[14]在蛹虫草不同生长阶段用两株真菌粗提物激发子进行处理, 结果在发酵前先加入 80 μg/mL 疫霉 *Phytophthora* sp. Y1 粗提物, 发酵 72 h 后再加入 80 μg/mL 的曲霉 P_{6.1} 菌株粗提物, 再共同发酵 120 h, 虫草菌素含量可比对照提高 5.2

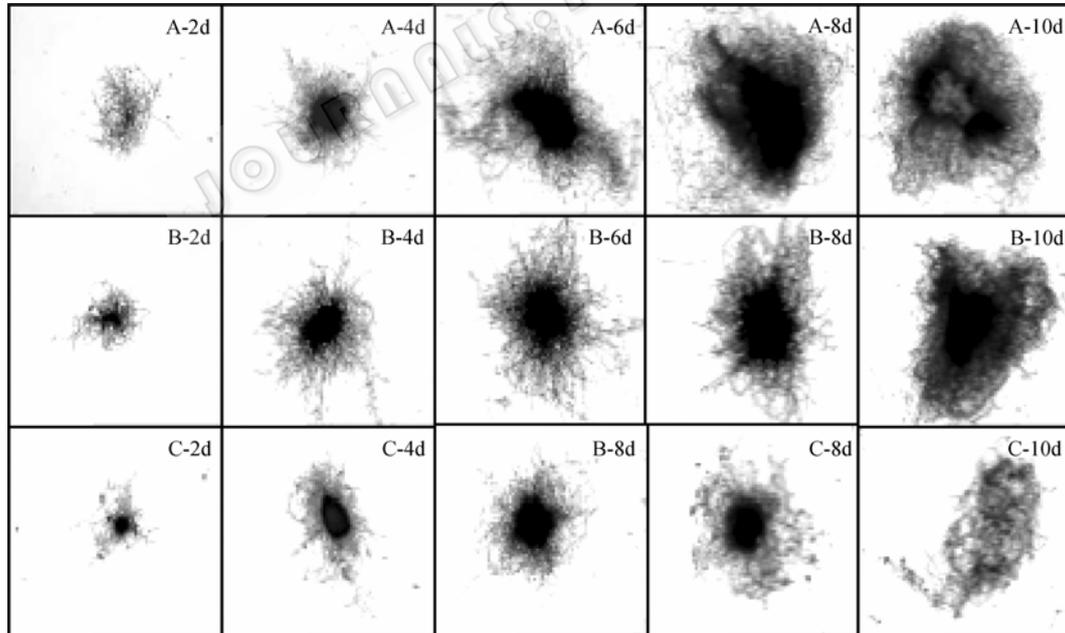


图 3 在不同搅拌速度发酵罐中蛹虫草菌丝球的形态特征^[11]

Fig. 3 Morphological character of mycelium ball of *Cordyceps militaris* during fermentation in the condition of different mixing speed^[11]

注: A: 50 r/min; B: 150 r/min; C: 300 r/min; 发酵时间: 2 d~10 d.

Note: A: 50 r/min; B: 150 r/min; C: 300 r/min; Fermentation time: 2 d~10 d.

倍。若将腺苷作为前体, 疫霉 YL 作为真菌激发子, 腺苷以 3.6 mg/mL 的量在发酵前单独加入, 摇瓶培养 7 d, 虫草菌素含量达到了对照的 2.2 倍^[15]。

虫草菌素的检测通常多用 UV 分光光度计测定。Rao 等^[16]建立和优化了在 254 nm UV 下检测虫草菌素的新毛细管电泳方法。在虫草菌素浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ ~100 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内, 测定条件为 20 mmol/L 28.6% 甲醇四硼酸钠缓冲液, pH 9.5, 分离电压 20 kV, 动力进样时间 10 s, 温度 25°C。此法可用于各种虫草菌素的药物产品检测。与高效液相层析法(HPLC)相比, 它的主要优点是分析时间短, 分析费用低。

2.2 菌丝段悬液注射——一种突破昆虫体壁屏障快速感染的方法

在自然界和生产实践中, 蛹虫草的子囊孢子、分生孢子或菌丝体要侵染致死昆虫需经过感染体吸附、孢子萌发, 穿透体壁、菌丝段在血腔中增殖、内菌核形成和子座的形成。它在寄主体腔内除菌丝生长外, 以酵母状细胞出芽增殖的菌丝段是另一个营养生长方式, 这种现象不仅在寄主昆虫血腔中发现, 而且在液体培养基中也能以菌丝段的方式生长。Sato H 和 Shimazu M^[17]用微体积、高剂量的蛹虫草菌丝段悬液注射接种甘蓝夜蛾、斜纹夜蛾、家蚕和黄粉虫蛹, 结果发现在 20°C 和 25°C 下, 这 4 种昆虫全被感染致死并最终产生了成熟的子座。这种方法突破了昆虫体壁的保护屏障, 跳过了吸附、孢子萌发和穿透体壁 3 个阶段, 因而能较快地引起寄主感染死亡和成熟子座在虫体上形成。这为研究开发其他对寄主有专一性的虫草提供了重要参考。

该法的主要步骤是将培养好的菌液用灭菌餐巾纸或纱布过滤以除去菌丝体, 用灭菌蒸馏水稀释到适宜的浓度用以注射昆虫用。一般注射浓度为 1×10^7 菌丝段/mL~ 2×10^7 菌丝段/mL, 容量 5 μL , 用配有 25 号针头的 1 mL 微量注射器, 从试虫的第 2 和第 3 背甲间注入血淋巴中。注射后的试虫置于一个放有湿滤纸的塑料杯内, 25°C, 直至变硬死亡。用 100 μL 大容量注射 2 d~3 d 老的家蚕蛹后, 4 d 内死亡, 6 d 内变硬, 处理的蛹 76% 以上形成子座。与喷雾法和浸渍法相比, 菌丝段注射是在短期内获得子座和子囊孢子的一个适宜的手段。

蛹虫草在液体培养时形成菌丝体或产生单细胞酵母状细胞受下列因素影响^[18]:

1) 培养基组成: 低碳源如 1% 葡萄糖有利于菌

丝体形态生长, 而酵母状细胞的产量则随糖的浓度增加而增加。当蛋白胨和甘油的浓度分别达到 3% 和 7% 时, 酵母状细胞产量可高达 8.2×10^8 /mL, 若是 0.5% 的蛋白胨和 1% 的甘油, 酵母状细胞则只有 2.2×10^8 /mL。氮源影响的一般趋势是无机氮有利于酵母状细胞形成, 而有机氮如酪蛋白水解物则更有利于菌丝生长。

2) 搅拌: 在 50 r/min~300 r/min 的条件下, 蛹虫草酵母状细胞的数量随搅拌速度的加快而提高。

3) 接种量: 在蛋白胨甘油培养基或 Czapek-Dox 培养基中, 接种量为 8×10^6 分生孢子/mL 时为酵母状细胞量最高(4.8×10^8 酵母状细胞/mL)。

3 菌种“退化”的遗传变异背景

菌种“退化”在蛹虫草生产实践是经常出现的问题。通常解决的办法是生产选育、野外重新采集分离和虫体复壮。近年一些研究者关注了菌种“退化”的遗传变异机制。这将为最终解决退化问题提供理论依据。

异核现象广泛地存在于有丝分裂产孢的真菌中。外界因素特别是营养成分影响着真菌异核体的配比及异核体的分解。在虫草无性型菌种的保存和移植过程中, 如何选择合适的培养基以防止异核体分解和不利于子实体形成的同核体的累积, 具有很重要的实践意义^[19,20]。李美娜等^[21]对蛹虫草正常产子实体菌株和退化菌株进行了分子水平上的差异分析。结果表明, 在 5.8S+ITS 这个区段, 正常菌株与退化菌株在 DNA 水平上产生了明显的变异。李闽锋等^[22]对一蛹虫草野生型菌株进行单孢子分离, 对获得的产子实体和不产子实体单孢子菌株, 用 RAPD 分子标记对它们的遗传多样性进行了分析, 结果同样表明, 产子实体和退化菌株间的扩增谱带具有非常明显的差异。但 Wang 等人^[22]用来自国内各地(包括用于工业生产)、南韩及挪威等地的菌株和 GenBank 下载的一些菌株, 用几种软件对它们的 rDNA-ITS 序列进行遗传距离和系统树分析后, 则得出不完全相同的结论: 在所研究条件下, 来自不同地区的蛹虫草, 其遗传变异性很小, 与地理来源没有明显相关性, 大生产也不影响蛹虫草遗传的稳定性^[23]。

在生产中为获得稳定高产的子实体和虫草菌素,

日本科技人员用离子束照射蛹虫草菌株, 经筛选获得了比常用菌种产虫草菌素高出 10 倍的突变株。车振明等^[24]用紫外诱变处理蛹虫草原生质体, 经筛选获得了 2 个子实体和多糖都更稳定高产的诱变株。

4 生物活性物质及其生理功能研究新进展

4.1 抗癌作用机制

Lee 等^[25]研究观察到蛹虫草人工培养子座的热水浸出物对人早幼粒白血病细胞 HL-60 增生有明显的细胞毒作用。在处理 12 h 后, IC₅₀ 值为 0.8 mg/mL。用 1 mg/mL 剂量处理 12 h~16 h 内, 诱导细胞凋亡, 其典型特征是细胞收缩、核崩溃、DNA 裂解破碎和染色质凝集(图 4)。胱冬肽酶-3 (Caspase-3) 被激活, 是引起癌细胞凋亡的主要诱因, 进而抑制癌细胞的增生。

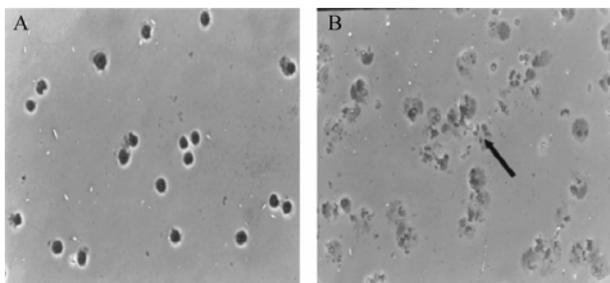


图 4 蛹虫草处理的 HL-60 细胞的形态学(箭头所指为破碎凋亡的细胞)^[25]

Fig. 4 Morphology of HL-60 treated by *Cordyceps militaris* (apoptosis cell indicated by arrow)^[25]

Note: A: Control cell; B: Apoptosis cell.

4.2 促进中枢神经轴突的生长

Schmidt 等对从中国各省采集分离的 8 属 32 株昆虫病原真菌, 进行了对中枢神经系统变性疾病有活性物质的筛选^[26]。一些拟青霉的提取物明显地诱导 PC-12 细胞类轴突(Axonal-like)的旺盛生长。用从 *P. militaris* RCEF 0095 菌株提取物中分离的色素作进一步试验, 证实了亲神经特性与这些色素有关, 经鉴定这些色素是吡啶酮生物碱及其生物合成前体^[26]。

4.3 抑制人体有害细菌

天然存在于肠道中的双歧杆菌等益生菌群对人体有害细菌如梭状芽孢杆菌和大肠杆菌等的生长抑制是目前人们感兴趣的有关人类健康的重要问题之一。梭状芽孢杆菌 *Clostridium* spp. 是人类多种疾病的罪魁祸首, 如突然死亡、中毒、致突、致癌或在胃肠道里经生物转化形成各种有害化合物而导致衰

老。Ahn 等^[27]首次报道了来自蛹虫草培养液的虫草菌素对类腐败梭菌 *Clostridium paraputrificum* 和产气荚膜梭菌 *C. perfringens* 有显著的生长抑制作用, 而对人类有益的分叉双歧杆菌 *Bifidobacterium bifidum*、短双歧杆菌 *B. breve*、长双歧杆菌 *B. longum*、青春双歧杆菌 *B. adolescentis*、嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus* 和干酪乳杆菌 *L. casei* 等则没有抑制作用。此研究结果为开发新的益生菌产品提供了启示。

4.4 降血糖

Zhang 等^[28]从蛹虫草子实体经热水粗提, 后用乙醇沉淀获得一个富含多糖的组分。当以 10 mg 多糖制剂/kg 体重和 100 mg 粗提物/kg 体重的剂量, 饲喂 40 mg/kg 体重、24 h 前腹腔注射链脲霉素 (Streptozotocin) 诱发的高血糖试验鼠时, 蛹虫草多糖有很好的降血糖活性, 其强度比冬虫夏草高约 10 倍, 子实体浸出物的降糖活性比菌丝高, 显示了蛹虫草多糖作为一种降血糖药物的开发前景。

4.5 其他新药理作用

Watanabe 等^[29]从培养于家蚕蛹的蛹虫草拟青霉子实体滤液中, 分离到一个酚氧化酶 (Prophenoloxidase) 的活性抑制剂, 吡啶二羧酸 (Dipicolinic acid), 其药理活性未见报道。但当他们进一步对麦角菌科 Clavicipitaceae 中, 18S rDNA 做系统发育分析时发现, 产生吡啶二羧酸的虫生真菌可聚集成一个群而与其他成员相分离, 这意味着在麦角菌科中的一些植物病原真菌, 在进化为昆虫病原真菌时需要吡啶二羧酸的形成。

Shimada 等人^[30]还发现蛹虫草菌丝提取物能通过激活芳烃受体, 专一性地抑制 3T3-L1 前脂肪细胞分化成成熟的脂肪细胞, 显著降低脂肪积累和成熟脂肪细胞的肥大。

传统上虫草常用作提高性功能, 但一直缺乏直接的证据。Chang 等人^[31]用蛹虫草菌丝体作食物添加剂(1%和 5%) 饲喂 7 周左右鼠龄的大鼠, 结果表明大鼠的精子数与蛹虫草的处理时间和虫草菌素的含量成正相关。蛹虫草明显改善试验鼠精子的数量和质量。

参 考 文 献

- [1] 梁宗琦, 刘爱英, 刘作易. 中国真菌志《虫草属》. 北京: 科学出版社, 2007, 32: 1-190.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

- [2] 梁宗琦. 虫草及其人工培养. 贵州农学院丛刊(增刊), 1994, **26**: 1-21.
- [3] 林群英, 宋 斌, 李泰辉. 蛹虫草研究进展. 微生物学通报, 2006, **33**(4): 154-157.
- [4] 钟 石, 计东风, 陈 诗, 等. 蛹虫草研究进展. 蚕桑通报, 2006, **37**(4): 6-10.
- [5] Kobayasi Y. The genus *Cordyceps* and its allies. *Sci Rep Tokyo Bun Daigaku*, 1941, **5**(84): 253-260.
- [6] 梁宗琦, Roland TV Fox. 蛹虫草 *Cordyceps militaris* 无性型的多型现象. 菌物系统, 1998, **17**(1): 57-62.
- [7] 梁宗琦. 蛹虫草无性型——蛹草拟青霉的确证. 食用菌学报, 2001, **8**(4): 28-32.
- [8] Zare R, Gains W, Culham A. A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata* I. Phylogenetic studies using ITS sequences. *Nova Hedwigia*, 2000, **71**: 465-480.
- [9] Gams W, Zare R. A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata* III. Generic classification. *Nova Hedwigia*, 2001, **72**: 329-337.
- [10] 李春如, 黄 勃, 南圣姬, 等. 具抗癌活性的 RCEF0718 虫草菌株的鉴定研究. 莱阳农学院学报(自然科学版), 2006, **23**(4): 263-267.
- [11] Park JP, Kim YM, Kim SW, *et al.* Effect of agitation intensity on the exo-biopolymer production and mycelial morphology in *Cordyceps militaris*. *Letters in applied microbiology*, 2002, **34**(6): 433-438.
- [12] Mao XB, Eksriwong T, Chauvatcharin S, *et al.* Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps Militaris*. *Process Biochemistry*, 2005, **40**(5): 1667-1672.
- [13] Masuda M, Urabe E, Sakurai A, *et al.* Production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, **39**: 641-646.
- [14] 李 祝, 宋保安, 肖 洋, 等. 用正交试验优化真菌激发子提高虫草菌素含量(英文). 西南农业大学学报, 2006, **28**(5): 766-770.
- [15] 李 祝, 郁建平, 梁宗琦, 等. 前体物质与真菌激发子对虫草菌素产量的影响. 食品科学, 2008, **29**(6): 273-275.
- [16] Rao YK, Chou CH, Tzeng YM. A simple and rapid method for identification and determination of cordycepin in *Cordyceps militaris* by capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, 2006, **566**: 253-258.
- [17] Sato H, Shimazu M. Stromata production for *Cordyceps militaris* (Clavicipitales: Clavicipitaceae) by injection of hyphal bodies to alternative host insects. *Appl Entomol Zool*, 2002, **37**(1): 85-92.
- [18] Carilli A, Pacioni G. Growth and sporulation of *Cordyceps militaris* (Link ex Fr.) link in submerged culture. *Trans Br Mycol Soc*, 1977, **68**(2): 237-243.
- [19] 刘 森, 武覬文. 粉拟青霉异核性研究. 真菌学报, 1992, **11**(3): 234-242.
- [20] 武覬文, 韩 朝. 粉拟青霉异核性的遗传分析. 安徽农业大学学报, 1996, **23**(3): 446-450.
- [21] 李美娜, 吴谢军, 李春燕, 等. 人工栽培蛹虫草退化现象的分子分析. 菌物系统, 2003, **22**(2): 277-282.
- [22] 李闽锋, 何 劲, 丁 玲, 等. 不产子实体蛹虫草单孢子分离株的获得及 RAPD 分析. 西南农业学报, 2007, **20**(3): 547-550.
- [23] Wang L, Zhang WM, Hu B, *et al.* Genetic variation of *Cordyceps militaris* and its allies based on phylogenetic analysis of rDNA ITS sequence data. *Fungal Diversity*, 2008, **31**: 147-155.
- [24] 车振明, 王 燕, 周黎黎, 等. 原生质体紫外诱变选育蛹虫草新菌种的研究. 食品与发酵工业, 2004, **30**(8): 35-38.
- [25] Lee H, Kim YJ, Kim HW, *et al.* Induction of Apoptosis by *Cordyceps militaris* through Activation of Caspase-3 in Leukemia HL-60 Cells. *Biol Pharm Bull*, 2006, **29**(4): 670-674.
- [26] Schmidt K, Li Z, Schubert B, *et al.* Screening of entomopathogenic Deuteromycetes for activities on targets involved in degenerative diseases of the central nervous system. *Journal of Ethnopharmacology*, 2003, **89**: 251-260.
- [27] Ahn YJ, Park SJ, Lee SG, *et al.* Cordycepin: selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp.. *J Agric Food Chem*, 2000, **48**: 2744-2748.
- [28] Zhang GQ, Huang YD, Bian Y, *et al.* Hypoglycemic activity of the fungi *Cordyceps militaris*, *Cordyceps sinensis*, *Tricholoma mongolicum*, and *Omphalia lapidescens* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **72**: 1152-1156.
- [29] Watanabe M, Hattori E, Yokoyama S, *et al.* Entomogenous fungi that produce 2,6-pyridine dicarboxylic acid (dipicolinic acid). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, **102**(4): 365-368.
- [30] Shimada T, Hiramatsu N, Kasai A, *et al.* Suppression of adipocyte differentiation by *Cordyceps militaris* through activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, **295**: 859-867.
- [31] Chang Y, Jeng KC, Huang KF, *et al.* Effect of *Cordyceps militaris* supplementation on sperm production, sperm motility and hormones in Sprague-Dawley rats. *Am J Chin Med*, 2008, **36**(5): 849-859.