

蛹虫草中虫草素的研究进展

刘桂君, 周思静, 杨素玲, 孟佑婷, 王 平, 尚宏忠*
(北京市辐射中心, 北京 100015)

摘 要: 虫草素是蛹虫草重要生物活性成分之一, 具有抗肿瘤、调节免疫力、抑菌、抗炎等作用; 目前虫草素主要由蛹虫草培养物分离提取获得, 一般通过菌种选育和培养条件优化来提高虫草素产量。本文主要论述虫草素的生物活性作用, 虫草素产量的提高方法以及虫草素测定方法, 并对虫草素的研究进行展望。

关键词: 蛹虫草; 虫草素; 生物活性; 产量; 测定方法

Research Process of Cordycepin in *Cordyceps militaris*

LIU Gui-jun, ZHOU Si-jing, YANG Su-ling, MENG You-ting, WANG Ping, SHANG Hong-zhong*
(Beijing Radiation Center, Beijing 100015, China)

Abstract: Cordycepin, one of the important compounds in *Cordyceps militaris*, has the activities of anti-tumor, immune regulation, antimicrobial, anti-inflammatory, and so on. Cordycepin is extracted from cultured *Cordyceps militaris*. The yield of cordycepin is improved by strain breeding in the optimized culture medium. In this paper, bioactivity analysis, production enhancement and determination methods of cordycepin have been discussed. The further research directions of cordycepin have also been proposed.

Key words: *Cordyceps militaris*; cordycepin; bioactivity; production; determination methods

中图分类号: Q939.99

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)21-0408-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201321080

蛹虫草(*Cordyceps militaris*(L.)Link)隶属于真菌门(Eumycota)、子囊菌门(Ascomycota)、子囊菌亚门(Ascomycotinia)、粪壳菌纲(Sordariomycetes)、肉座菌亚纲(Hypocreomycetidae)、肉座菌目(Hypocreales)、虫草科(Cordycipitaceae)、虫草属(*Cordyceps*)^[1]。蛹虫草又名北冬虫夏草, 与冬虫夏草具有相似的生物活性成分, 主要包括虫草素、虫草酸、虫草多糖、麦角甾醇、氨基酸、核苷类物质等, 功效与冬虫夏草相似^[2-6], 而且虫草素含量和抗氧化活性高于冬虫夏草^[7-8], 是冬虫夏草的良好代用品^[9]。虫草素(cordycepin)即3'-脱氧腺苷(3'-deoxyadenosine), 属嘌呤类生物碱, 分子式为C₁₀H₁₃N₅O₃, 相对分子质量为251.24, 熔点为230~231℃, 碱性, 针状或片状结晶, 溶于水、热乙醇和甲醇, 不溶于苯、乙醚和氯仿, 紫外光的最大吸收波长为260nm, 其结构式如图1所示^[10-12]。早在1950年, Cunningham等^[13-14]发现被蛹虫草(*Cordyceps militaris*)寄生的昆虫组织不易腐烂, 研究并从中分离出一种抗菌性物质——虫草素, 也是第一个从真菌中分离出来的核苷类抗菌素。后来, 陆续有学者对其研究并进行了验证^[15-16]。本文主要介绍蛹虫草来源的虫草素的生物活性作用、产量提高方法及其测定方法等。

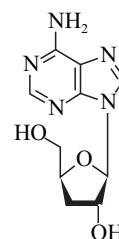


图1 虫草素结构式

Fig.1 Structure of cordycepin

1 虫草素的生物活性

1.1 抗肿瘤作用

虫草素作为蛹虫草重要的生物活性成分之一, 自从20世纪中期被发现并分离得到纯品开始, 人们就不断研究虫草素的生物活性作用, 包括抗肿瘤、免疫调节、抑菌抗炎等作用。在抗肿瘤方面, 虫草素能够有效抑制小鼠S180瘤、口内鳞状瘤、黑色素瘤及人宫颈癌细胞增殖, 并能治疗白血病。

收稿日期: 2013-06-24

基金项目: 北京市科学技术研究院“青年骨干计划”项目(201311); 北京市改革与发展专项经费项目(92201304)

作者简介: 刘桂君(1980—), 女, 助理研究员, 硕士, 研究方向为微生物辐射育种。E-mail: liu_guijun01@163.com

*通信作者: 尚宏忠(1967—), 男, 高级工程师, 硕士, 研究方向为核技术应用。E-mail: hongzhongsh@sina.cn

吴洪臻等^[17]研究不同剂量虫草素及环磷酰胺对接种S180瘤细胞小鼠的作用,虫草素30mg/kg组、60mg/kg组和环磷酰胺20mg/kg组抑瘤率分别为45.72%、49.11%和55.91%,虫草素30mg/kg与环磷酰胺20mg/kg联合使用,则肿瘤抑制率提高到88.55%,说明虫草素可增强抗癌药物环磷酰胺的作用,作为临床抗肿瘤药物辅助药有研究价值。Park^[18]和Lee^[19]等研究表明虫草素能够抑制口内鳞状瘤细胞(OSCC)的增殖,通过刺激A₃腺苷受体表现抗癌活性。Nakamura等^[20]指出虫草素可以显著抑制黑色素瘤细胞B16-BL6和小鼠Lewis肺癌细胞的生长,其机理是激发肿瘤细胞中腺嘌呤核苷A₃受体。Fuller等^[21]研究虫草素抑制黑色素瘤的作用机制,发现虫草素可以通过对信号传导通路的调节抑制酪氨酸激酶(TPK)的活性升高,进而抑制肿瘤的形成。虫草素还能抑制人子宫颈癌传代细胞mRNA的转录,从而起到抑制癌细胞的作用^[22]。

美国国家癌症研究所(NCI)研究人员等发现虫草素对白血病有很好的疗效,研究已经进入临床试验阶段。脱氧柯福霉素(dCF)是目前公认的治疗末端脱氧核糖核酸转移酶为阳性(TdT⁺)的白血病的有效药物,是一种腺苷脱氨酶(ADA)抑制剂,Kodama等^[23]研究发现,在dCF的存在下,虫草素对TdT⁺白血病细胞的毒性大于对TdT⁻白血病细胞的毒性,实验发现3'-脱氧腺苷-5'-三磷酸(3'-dATP)对虫草素抗白血病不是必需,而对TdT⁺白血病是必需的,同时虫草素在体外对人外周血单核细胞毒性不明显,虫草素可以作为一种抗TdT⁺白血病的药物来开发利用。李婧等^[24]研究发现虫草素对TdT⁺白血病细胞凋亡的诱导与提高蛋白激酶A(PK-A)活性密切相关。

有关蛹虫草抗肿瘤的机制,概括总结主要有:虫草素有一个游离的羟基,可渗入到肿瘤细胞DNA中发生作用;虫草素能够抑制核苷或核苷酸的磷酸化,生成二磷酸盐和三磷酸盐的衍生物,抑制肿瘤细胞核酸的合成;虫草素可能阻断次黄嘌呤核苷酸氨基化生成鸟苷酸^[25];虫草素能够掺入RNA中。究其根本,虫草素的抗肿瘤作用与其抑制DNA和RNA的合成有关。彭俊峰等^[26]研究虫草素与小牛胸腺DNA作用机制,发现虫草素与DNA作用方式可能有2种,一是嵌入方式,即虫草素以腺嘌呤碱基的形式嵌入到DNA双螺旋碱基对间;二是结合方式,与DNA磷酸基团结合发生作用。Koc等^[27]研究表明虫草素可选择性抑制mRNA,因而影响蛋白质合成,其抑制作用可被腺苷取消,这是因为虫草素与腺苷竞争核苷磷酸酶,阻止mRNA的合成。

综上,虫草素的抗肿瘤作用主要与其自身结构密切相关,由于结构与腺苷相似,能够与腺苷形成竞争,在一定程度上可以抑制肿瘤细胞DNA或RNA的合成,从而起到抗肿瘤作用;其次虫草素可以作为抗肿瘤药物的辅助药物,提高抗肿瘤药物本身药效;最后,虫草素作为一种天然来源的抗肿瘤有效成分,安全性高。

1.2 增强免疫力作用

近年研究发现虫草菌素具有免疫调节作用,与其抗肿瘤等作用的关系是密不可分的。Zhou Xiaoxia等^[28]将虫草素添加培养人外周血液单核细胞,并测定其分泌的白细胞介素10和白细胞介素2,确定虫草素对白细胞介素10的产量和白细胞介素10 mRNA的表达具有显著提高作用,虫草素能够抑制植物血球凝集素诱导的白细胞介素2的产生和外周血液单核细胞的扩增,虫草素在有效浓度下表现出轻微的细胞毒性但未增加细胞凋亡,研究表明虫草素具有免疫调节作用。研究发现调节性T细胞(Treg)在诱导免疫耐受和免疫调节中具有重要作用,在虫草素作用下,成熟树突状细胞能够诱导Treg增殖,虫草素具有治疗自身免疫性疾病的间接作用^[29]。李婧等^[30]研究虫草素抗小鼠迟发型超敏反应作用及其免疫机理,以不同剂量的虫草素溶液作为实验组,以生理盐水作为阴性对照,每24h腹腔注射给药,两种给药剂量的虫草素溶液均可减轻小鼠由于充血、水肿等炎症所导致的局部皮损增厚及质量的增加,且剂量越大,抗迟发性超敏反应作用越强,说明虫草素可能通过免疫调节作用对小鼠接触性皮炎具有明显的抑制效应,该效应与给药剂量相关,同时对脾脏组织未见明显毒性作用。

此外,虫草菌素还可抑制细胞分裂,促进细胞的分化,改变细胞膜上物质结构分布,对T淋巴细胞转化有促进作用。它还能提高机体单核巨噬细胞系统的吞噬功能,激活巨噬细胞产生细胞毒素直接杀伤癌细胞,虫草素还能抑制蛋白质激酶活性,抗核苷磷酸化酶对糖基的裂解,对体液免疫有调节作用^[31-33]。

1.3 抑菌与抗炎作用

1951年,Cunningham等^[14]研究虫草素对枯草芽孢杆菌的抑制作用,对45个受试菌株中43株有抑制作用,不同菌株的有效抑菌浓度不同,对枯草芽孢杆菌NCTC6752、鸟结核杆菌和牛型结核分枝杆菌的最低抑制质量浓度为10、100μg/mL和17μg/mL。虫草素还对链球菌、鼻疽杆菌、炭疽杆菌、猪出血性败血症杆菌及葡萄球菌等病原菌的生长具有抑制作用^[29]。虫草素对石膏样小芽孢癣菌、羊毛状小芽孢癣菌及须疮癣菌等皮肤致病性真菌也有抑制作用^[34]。

一氧化氮(NO)是血管内皮中的小分子,在炎症及其免疫机制中发挥双重作用。Kim等^[35]研究虫草素在脂多糖(LPS)活化的RAW 264.7巨噬细胞中的抗炎作用,虫草素能抑制NO的产生和诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)的表达,能以剂量依赖的方式显著抑制Akt和p38的磷酸化,而且能抑制肿瘤坏死因子(TNF-α)的表达、IkBα的磷酸化和NF-κB的转移,同时能够引起环氧酶-2(COX-2)和iNOS的显著减少,这些研究说明,虫草素能够通过下调

iNOS和COX-2的基因表达来抑制NF- κ B的活性和Akt、p38的磷酸化来实现抑制NO的产生。

另外,虫草素能有效抑制NO,前列腺素E2(PGE2),促炎症细胞因子的过量产生,呈剂量依赖而无细胞毒性^[33]。在抗癌和抗炎等复杂的药理作用中,虫草素是通过抑制NF- κ B、I κ B和IKK的活性来有效的抑制NF- κ B信号途径的^[36]。

1.4 其他作用

Chang等^[37]研究发现虫草素能抑制鼠颈动脉血管平滑肌细胞(RaoSMCs)增殖,是通过抑制COX-2的基因表达来实现的,说明具有抗血管平滑肌作用,是通过调节血管壁重新改造的,可用于术后再狭窄和动脉粥样硬化的治疗。Cho等^[38]为了研究虫草素的抗凝作用机制,取血小板进行体外抗凝实验,以10 μ g/mL的胶原诱导血小板凝集,分别加入不同浓度的CaCl₂和不同浓度的虫草素进行抗凝实验,研究得出,虫草素抑制血小板聚集作用可能是使Ca²⁺向下调节和提高cAMP/cGMP有关。虫草素有较强的纤维蛋白分解作用,可作为一种新的治疗血栓的溶解药,在临床用于心血管疾病的治疗^[39]。

Maser等^[40]报道布鲁锥虫不能自己合成腺苷,只能从宿主中摄取,添加虫草素可以阻断布鲁锥虫从宿主中摄取腺苷,能够抗布鲁锥虫,机理是虫草素作为腺苷受体阻断药。

2 蛹虫草中虫草素产量提高方法

2.1 高产虫草素菌株的选育

自然界原始分离得到的蛹虫草菌株一般而言虫草素产量并不高,需要进一步的诱变选育获得高产菌株。现有报道主要采用了化学试剂诱变、辐射诱变和航天诱变选育等方法,均能有效的提高虫草素的产量。

莫红丽^[41]应用吡啶橙对蛹虫草无性型孢子进行诱变,筛选虫草素含量高的突变菌株,并对获得的稳定遗传的突变株进行再诱变,经二次诱变得到的突变菌株其虫草素含量可达290.60mg/L,比初发菌株提高了7.4倍。张红等^[42]采用⁶⁰Co- γ 射线辐射诱变蛹虫草菌株,筛选出yccGyl016诱变菌株,其生物转化率达12.5%,液体发酵培养菌丝体中虫草素含量达481.6mg/kg,固体培养子实体虫草素含量达9600mg/kg,明显高于对照菌株。李文等^[43]采用低能离子束注入蛹虫草,筛选突变菌株,在70%的乙醇溶液中用微波-超声波提取菌丝体中虫草素,采用紫外分光光度法检测虫草素的含量,选育出虫草素含量较高的15株菌株,菌丝体中最高含量达(11.924 $\pm$ 0.063)mg/g,比原始菌株增长了近30%。温鲁等^[44]研究航天搭载对蛹虫草活性成分的影响,经过测定发现,航天搭载蛹虫草的虫草素含量从6.59mg/g提高到16.40mg/g,是原始菌株的2.5倍。

2.2 优化培养条件提高虫草素产量

2.2.1 液体发酵培养条件优化

目前虫草素主要是从蛹虫草培养物中提取获得,蛹虫草培养物又分为液体培养物及固体培养物,其中液体培养物包括发酵液和菌丝体,文献报道97%~98%的虫草素分泌在发酵液中,且液体发酵周期短,因此优化蛹虫草液体发酵培养条件,提高发酵液中虫草素含量,是提高虫草素产量的一条有效途径。

文庭池等^[45]发现添加 α -萘乙酸(NAA)能显著提高蛹虫草BCEC07菌株虫草素产量,优化液体培养条件,得到发酵液中虫草素含量最高为378.75mg/L,培养基成分为蔗糖30g/L、蛋白胨25g/L、磷酸二氢钾1.5g/L、硫酸镁0.5g/L和NAA 3.0mg/L。刘艳芳等^[46]研究发现添加0.5g/L的腺嘌呤,可使发酵液中虫草素含量提高约30%,同时腺嘌呤的添加可以加快虫草素的合成;并得出静置培养有利于虫草素的产生和积累,静置培养28d,所得发酵液中虫草素含量达2050mg/L,培养基配方为蔗糖40g/L、蛋白胨15g/L、磷酸二氢钾0.5g/L、磷酸氢二钾0.5g/L、硫酸镁0.5g/L和腺嘌呤0.5g/L。李祝等^[47]以腺苷为前体,疫霉菌多糖作为真菌激发子,研究对蛹虫草0706菌株虫草素产量及生物量的影响。发现单独添加腺苷,能使菌丝体中虫草素产量提高1.2倍,达到(8.55 $\pm$ 0.09)mg/g;添加腺苷和多糖,虫草素产量与只添加腺苷无显著差异,说明疫霉菌多糖作为真菌激发子对虫草素产量没有显著影响,腺苷对虫草素产量的提高具有显著影响。毛先兵等^[48-49]研究氨基酸对液体培养蛹虫草产虫草素的影响,得出半胱氨酸、丝氨酸、丙氨酸等促进虫草素形成,在5L发酵罐中培养60h后添加20mmol/L丝氨酸,虫草素产量最大值为211mg/L,比对照提高26%,有效的提高了虫草素产量;又研究发现NH₄⁺对蛹虫草液体发酵培养产虫草素具有显著影响,优化分批补料NH₄⁺的添加时间和添加量,在第7天开始添加40mmol/L NH₄⁺,在第17天时得到虫草素产量最高为(420.5 $\pm$ 15.1)mg/L,比对照批次发酵提高70%。Fan Dan等^[50]研究添加硫酸亚铁对摇瓶培养蛹虫草虫草素产量的影响,得到0d添加1g/L的硫酸亚铁,得到虫草素最高产量为(569.59 $\pm$ 85.5)mg/L,比对照提高70%,在添加硫酸亚铁培养后, *purA*基因转录水平显著上调,而*purH*和*guaB*基因转录水平轻微下调。Hung等^[51]研究温度对蛹虫草BCC2819菌株产虫草素的影响,蛹虫草用250mL三角瓶装45mL液体培养基静置在15、20、25、30 $^{\circ}$ C培养15d,得到虫草素最高产量为(587.68 $\pm$ 16.82)mg/L,25 $^{\circ}$ C为虫草素最适培养温度,30 $^{\circ}$ C培养虫草素产量仅为(8.65 $\pm$ 0.40)mg/L,说明培养温度增加会抑制虫草素的合成。Shih等^[52]研究起始pH值、各种氮源、植物油以及培养方式等对蛹虫草菌株CCRC32219菌丝体、胞外多糖、

腺苷和虫草素的影响, 得出酵母提取物为产虫草素最适氮源, 相对较低的C/N比有利于虫草素的产生, 过低则会减少产量, 植物油对腺苷和虫草素产量没有影响。通过Box-Behnken试验设计优化培养条件, 得到虫草素最佳培养条件为, 在pH6.0, 酵母提取物质量浓度为45g/L的条件下, 经过8d的摇瓶培养和16d的静置培养, 虫草素的含量可达到2214.5mg/L。

Masuda等^[53-54]优化蛹虫草NBRC9787菌株液体培养条件, 得到最佳氮源为蛋白胨和酵母提取物, 在以葡萄糖为碳源时, 最佳碳氮比为2:1, 虫草素最高产量为640mg/L, 在添加与嘌呤合成相关的化合物、辅酶和表面活性剂等物质后, 发现甘氨酸、L-天冬氨酸、L-谷氨酰胺、腺嘌呤、腺苷等能促进虫草素的产生, 在添加1g/L腺苷、16g/L甘氨酸时, 虫草素最高产量为2.5g/L, 且97%~98%的虫草素分布在发酵液中。Das等^[55-56]采用高能质子束对蛹虫草NBRC9787菌株进行诱变, 筛选得到突变菌株G81-3, 并采用“表面液体培养法”培养21d, 虫草素产量为3.1g/L; 通过响应面法优化G81-3菌株液体培养基组分, 最佳培养条件为: 葡萄糖86.2g/L、酵母提取物93.8g/L、柠檬酸钠0.28g/L、磷酸二氢钾0.5g/L、硝酸铵0.5g/L、硫酸镁0.02g/L、氯化钙0.01g/L等, 发酵液中虫草素含量为6.84g/L。Das等^[57]在培养基中添加6g/L的腺苷, 得到虫草素的产量为8.57g/L; 在培养基中以甘氨酸替代部分酵母提取物, 虫草素产量提高12.40%; 实验证明, 与甘氨酸相比, 腺苷对虫草素产量影响更大, 但是在高浓度时, 二者均对虫草素的产生具有抑制作用。Masuda等^[58]研究反复分批发酵培养对蛹虫草突变菌株G81-3虫草素产量的影响, 4个循环后, 无论是突变菌株还是野生型菌株虫草素产量均比第一个循环提高85%。

在对蛹虫草液体发酵培养条件优化方面研究报道最多的是日本福井大学的学者Masuda和Das等, 他们对蛹虫草的虫草素研究进行一系列报道^[53-58], 首先对蛹虫草液体培养基碳源、氮源及碳氮比等进行优化, 并且通过添加前体物质等优化培养蛹虫草NBRC9787菌株, 得到虫草素产量最高为2.5g/L, 该菌株经过高能质子束诱变后得到突变菌株G81-3, 并对该菌株进行培养条件优化, 得到虫草素产量最高为8.57g/L, 也是目前为止虫草素产量最高的。

综合上述文献报道, 蛹虫草液体培养发酵液中虫草素含量高低各不相同, 且差异较大, 与菌株不同、培养方式不同等密切相关, 具体数据见表1。蛹虫草不同菌株之间虫草素产量差异显著, 同一菌株采用不同的培养基组分得到的虫草素产量也各不相同; 培养基中添加物能够有效提高虫草素产量; 总体来说静置培养的方式能够大大提高虫草素产量, 缺点是培养周期长, 需要20~30d。

表1 发酵液中虫草素含量

Table 1 Contents of cordycepin in fermentation broth

序号	菌株编号	培养方式	虫草素产量/(mg/L)	参考文献
1	BCEC07	摇床	378.75	[45]
2	21	摇床+静置	2050	[46]
3	无	摇床	420.5±15.1	[49]
4	无	摇床	569.59±85.50	[50]
5	BCC2819	摇床	587.68±16.82	[51]
6	CCRC32219	摇床+静置	2214.5	[52]
7	NBRC9787	静置表面培养	640	[53]
8	NBRC9787	静置表面培养	2500	[54]
9	G81-3	静置表面培养	3100	[55]
10	G81-3	静置表面培养	6840	[56]
11	G81-3	静置表面培养	8570	[57]

2.2.2 固体培养条件优化

蛹虫草是目前已经成功实现规模化固体栽培的虫草种类之一, 优化固体培养条件提高虫草素产量也是一条重要途径。温鲁等^[59]研究提高固体培养蛹虫草核苷类代谢物的产率, 从蛹虫草菌株、培养基碳源、氮源水平、加水量、培养时间和光照等方面进行研究, 在以20%豆粉为氮源、按1:1加营养液、接种Cm-2菌株、遮光培养35d的条件下培养物的虫草素含量可达5.49mg/g, 高于蛹虫草全草2.83mg/g。为提高蛹虫草的虫草素含量, 从寄主培养、液体培养、固体培养和代料栽培等方面进行研究, 使蛹虫草培养物的虫草素含量获得显著提高, 寄主培养的蚕虫草虫草素含量超过12mg/g, 菌核超过30mg/g; 固体培养物超过10mg/g, 代料栽培子实体超过3mg/g, 采后培养基的虫草素含量比子实体还要高^[60]。

蛹虫草中虫草素产量提高方法很多, 概括主要有以下两方面, 一是蛹虫草菌种本身, 收集菌种资源筛选高产菌株, 或通过物理、化学方法的诱变选育高产菌株; 二是通过优化培养基配方及培养条件提高虫草素产量。在菌种选育方面, 主要是通过紫外、⁶⁰Co-γ射线、低能离子束等方法诱变选育, 通过吡啶橙等进行化学诱变, 得到突变菌株产量提高的幅度也各不相同。在优化培养基方面, 主要是对碳源、氮源和无机盐种类进行优选, 得到最佳碳源均为葡萄糖或蔗糖, 氮源均为蛋白胨和酵母提取物, 无机盐多为磷酸二氢钾和硫酸镁, 添加前体物质主要有腺苷、腺嘌呤、氨基酸、α-萘乙酸等, 在培养方式上, 先液体摇床培养再静置培养最有利于虫草素产量的提高, 缺点就是培养周期长, 需要20~30d。研究表明虫草素主要在液体培养的发酵液中, 菌丝体中含量很少, 仅占总含量的2%~3%。

3 虫草素测定方法

虫草素作为一种有效的生物活性成分, 对其含量的测定方法很多, 主要有紫外分光光度法、高效液相色谱法(HPLC)、毛细管电泳法、高效液相色谱-质谱联用(HPLC-ESI/MS)法及薄层色谱扫描法等。

HPLC方法检测虫草素使用最多,采用C₁₈填料的色谱柱,柱子填料粒径为5 μ m,柱子直径为4.6mm,柱子长为150mm和250mm,流动相为甲醇、水或甲醇、磷酸盐缓冲液,检测波长为254、259nm和260nm,检测温度为20~40℃,柱流速为0.5~1.0mL/min,进样量为5~20 μ L^[61-65]。李文等^[42]采用紫外分光光度法测定蛹虫草菌丝体中虫草素含量,样品中虫草素用50%乙醇微波-超声提取,测定时首先全波长扫描选定259nm为测定波长,然后制作标准曲线,测定样品虫草素含量。紫外分光光度法与HPLC方法相比,HPLC方法检测虫草素,能够在测定时候将样品出峰时间与标样出峰时间比对,保证检测的样品成分为虫草素,能够保证结果的准确性,而紫外分光光度法是检测样品在259nm波长处的吸光度,测定的样品是提取得到的混合物,不能排除样品中其他核苷类物质等的影响,不能精确的测定虫草素的含量。

Rao等^[66]采用毛细管电泳法对蛹虫草中虫草素进行定性和定量分析,检测波长为254nm,检测条件为:20mmol/L的硼酸钠溶于28.6%甲醇的缓冲液,pH9.5,分离电压20kV,水力喷射时间10s,温度25℃,线性范围为20~100 μ g/mL。与HPLC检测结果有可比性,优点是快速分析和低检测成本。黄兰芳等^[67]用高效液相色谱-质谱联用(HPLC-ESI/MS)方法测定虫草素含量,用甲醇为提取溶剂,采用选择性离子检测(SIM)和电喷雾离子化(ESI),Shimadzu VP-ODS色谱柱,流动相为水-甲醇-甲酸(94:5:1, V/V),以2-氯腺苷为内标,该方法检测设备投入高,不适宜大规模虫草素样品含量测定。欧阳召等^[68]以半定量薄层色谱法为检测手段,以虫草素含量为指标,通过单因素试验及正交试验优选适于虫草素积累的发酵培养基和发酵培养条件,该方法不能对虫草素进行准确定量。

测定方法不同会导致蛹虫草中虫草素含量的测定结果不同,在上述虫草素测定方法中,应用较多的是HPLC方法,通过对虫草素标样的测定及标准曲线的制作,能够准确测定虫草素的含量,而且灵敏度高,稳定性好,但是采用不同的流动相及不同的色谱柱测定的结果会不同,目前尚无统一标准。

4 结 语

虫草素生物活性作用研究报道越来越多,而且机理研究越来越深入,为虫草素作为药品进入临床应用提供更多的科学依据。在提高虫草素产量方面,主要集中在培养条件优化,由于菌株不同,得到的虫草素产量相差悬殊,菌丝体、发酵液和固体培养物不同来源的虫草素产量也各不相同,而且优化的培养条件还要考虑到大规模生产的成本、周期等问题,还有很多研究工作需要进

一步推进。在虫草素测定方法方面,目前公认的方法为高效液相色谱法,灵敏度高且准确可靠。

虫草素是蛹虫草中重要生物活性成分之一,具有抗肿瘤、治疗白血病、调节免疫力、治疗心血管疾病抑菌、抗炎等作用,具有很高的保健食品和药用研究价值。虫草素疗效显著,但由于化学合成难度大成本高,主要依靠从蛹虫草培养物中分离提取,导致价格昂贵,Sigma公司出售的蛹虫草来源的虫草素(C3394—25mg)价格为2765.88元,因此提高蛹虫草的虫草素产量具有重要意义。虫草素是蛹虫草的重要生物活性成分之一,产量的限制导致虫草素的应用及产业化开发之路还很漫长,需要我们科研工作者更深入的研究,争取早日让虫草素造福于人类,而不是仅停留在研究阶段。

参考文献:

- [1] 黄年来,林志彬,陈国良,等.中国食用菌学[M].上海:上海科学技术文献出版社,2010:1763.
- [2] 梁宗琦.中国真菌志第32卷-虫草属[M].北京:科学出版社,2007:10-47.
- [3] NAG T B, WANG Hexiang. Pharmacological actions of *Cordyceps*, a prized folk medicine[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2005, 57: 1509-1519.
- [4] 肖亦农,韩梅,赵春燕.不同培养基对蛹虫草子实体甘露醇、多糖和矿质元素含量的影响[J].沈阳农业大学学报,2009,40(2):227-229.
- [5] 陈宏伟,陈安徽,邵颖,等.蛹虫草胞外锌多糖抗氧化能力的研究[J].食品与发酵工业,2009,35(6):54-58.
- [6] 胡丰林,李增智.虫草及相关真菌的次生代谢产物及其活性[J].菌物学报,2007,26(4):607-632.
- [7] 陈畅,罗珊珊,李彦,等.三种虫草抗氧化活性的化学发光法研究[J].上海中医药杂志,2004,38(7):53-55.
- [8] 杨听,斯陆勤,涂秩平,等.不同产地人工蛹虫草子实体及冬虫夏草中核苷类成分的比较[J].医药导报,2009,28(10):1354-1356.
- [9] 曾宏彬,宋斌,李泰辉.蛹虫草研究进展及其产业化前景[J].食用菌学报,2011,18(2):70-74.
- [10] 苏哈道尼克 R J.核苷类抗菌素[M].谢其明,王恕蓉,译.北京:科学出版社,1982:476.
- [11] 焦彦朝,梁宗琦,刘爱英.虫草生物活性物质研究概况[J].贵州农业科学,1990(3):53-54.
- [12] 抗菌素生物理化特性编写组.抗菌素生物理化特性(第一分册)[M].北京:人民出版社,1977:983.
- [13] CUNNINGHAM K G, MANSON W, SPRING F S, et al. Cordycepin, a metabolic product isolated from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link[J]. Nature, 1950, 166: 949.
- [14] CUNNINGHAM K G, HUTCHINSON S A, MANSON W, et al. Cordycepin, a metabolic product from cultures of *Cordyceps militaris* Link. Part I. Isolation and characterization[J]. Journal of Chemical Society, 1951, 2: 2299-3000.
- [15] FREDERIKSEN S, MALLING H, KLENOV H. Isolation of 3'-deoxyadenosine (cordycepin) from the liquid medium of *Cordyceps militaris* (L. ex Fr.) Link[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1965, 95(2): 189-193.
- [16] KACZKA E A, TRENNER N R, ARISON B, et al. Identification of cordycepin, a metabolite of *Cordyceps militaris*, as 3'-deoxyadenosine[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1964, 14: 456-457.
- [17] 吴洪臻,江伟,马德恩.虫草菌素对小鼠S180瘤抑制作用研究[J].时珍国医国药,2000,11(10):873-874.
- [18] PARK S J, MYOUNG H, KIM Y Y, et al. Anticancer effects of genistein, green tea catechins, and cordycepin on oral squamous cell carcinoma[J]. Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, 2008, 34(1): 1-10.
- [19] LEE J H, HONG S M, YUN J Y, et al. Anti-cancer effects of cordycepin on oral squamous cell carcinoma proliferation and

- apoptosis *in vitro*[J]. Journal of Cancer Therapy, 2011, 2: 224-234.
- [20] NAKAMURA K, YOSHIKAWA N, YAMAGUCHI Y, et al. Antitumor effect of cordycepin (3'-deoxyadenosine) on mouse melanoma and lung carcinoma cells involves adenosine A₃ receptor stimulation[J]. Anticancer Research, 2006, 26(1A): 43-47.
- [21] FULLER B B, LUNSFORD J B, IMAN D S. Alpha-melanocyte-stimulating hormone regulation of tyrosinase in cloudman S-91 mouse melanoma cell cultures[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1987, 262(9): 4024-4033.
- [22] GLAZER R I, LOTT T J, PEALE A L. Potentiation by 2'-deoxycytosine of the inhibitory effect by 3'-deoxyadenosine (cordycepin) on nuclear RNA synthesis in L1210 cells *in vitro*[J]. Cancer Research, 1978, 38(8): 2233-2238.
- [23] KODAMA E N, RONALD P, MCCAFFREY K Y. Antileukemic activity and mechanism of action of cordycepin against terminal deoxynucleotidyl transferase-positive(TdT) leukemic Cells[J]. Biochemical Pharmacology, 2000, 59(3): 273-281.
- [24] 李婧, 姜汉英. 虫草素的体内代谢特点及药理作用[J]. 国外医学: 中医中药分册, 2005, 27(5): 283-285.
- [25] 戴小军, 柳冬梅, 孟霞. 冬虫夏草抗癌作用研究现状[J]. 时珍国医国药, 2000, 11(4): 376.
- [26] 彭俊峰, 凌建亚, 张晗星, 等. 虫草素与DNA作用的光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(7): 858-861.
- [27] KOC Y, URBACO A G, SWEENEY E B, et al. Induction of apoptosis by cordycepin in ADA-inhibited TdT positive leukemia cells[J]. Leukemia, 1996, 10(6): 1019-1024.
- [28] ZHOU Xiaoxia, CLAUDIUS U M, PRTER S, et al. Effect of cordycepin on interleukin-10 production of human peripheral blood mononuclear cell[J]. European Journal of Pharmacology, 2002, 453(2/3): 309-317.
- [29] 蔡友华, 刘学铭. 虫草素的研究与开发进展[J]. 中草药, 2007, 38(8): 1269-1272.
- [30] 李婧, 汪燕, 马传荣, 等. 国产虫草素抗小鼠迟发型超敏反应的实验研究[J]. 中国免疫学杂志, 2006(5): 456-458.
- [31] KUO Y C, TSAI W J, SHIAO M S, et al. *Cordyceps sinensis* as an immunomodulatory agent[J]. American Journal of Chinese Medicine, 1996, 24(2): 111-125.
- [32] FAN Baoyan, ZHANG Haibo. Cordycepin: pharmacological properties and their relevant mechanisms[J]. TANG, 2012, 2(2): e14; 1-7.
- [33] 康冀川, 康超, 文庭池, 等. 虫草菌素药理学研究进展[J]. 菌物学报, 2011, 30(2): 191-197.
- [34] 李祝, 刘爱英, 梁宗琦. 虫草菌素的生物活性及检测方法[J]. 食用菌学报, 2002, 9(1): 57-61.
- [35] KIM H G, SHRESTH B, LIM SY, et al. Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF- κ B through Akt and p38 inhibition in RAW264.7 macrophage cells[J]. European Journal of Pharmacology, 2006, 545(2): 192-199.
- [36] REN Zhenghua, CUI Jianhua, HUO Zeren, et al. Cordycepin suppresses TNF- α -induced NF- κ B activation by reducing p65 transcriptional activity, inhibiting I κ B α phosphorylation, and blocking IKK γ ubiquitination[J]. International Immunopharmacology, 2012, 14(4): 698-703.
- [37] CHANG W, LIMA S, SONG H, et al. Cordycepin inhibits vascular smooth muscle cell proliferation[J]. European Journal of Pharmacology, 2008, 597(1): 64-69.
- [38] CHO H J, CHO J Y, RHEE M H, et al. Cordycepin(3'-deoxyadenosine)inhibits human platelet aggregation in a cyclic AMP-and cyclic GMP-dependent manner[J]. European Journal of Pharmacology, 2007, 558(1): 43-51.
- [39] 吴勇, 陈卫东. 蛹虫草药理作用研究概述[J]. 中国药师, 2011, 14(5): 732-734.
- [40] MASTER P, VOGEL D, SCHMID C, et al. Identification and characterization of trypanocides by functional expression of an adenosine transporter from *Trypanosoma brucei* in yeast[J]. Journal of Molecular Medicine, 2001, 79(2): 121-127.
- [41] 莫红丽. 吡啶橙诱变提高蛹虫草虫草素含量的研究[J]. 广东蚕业, 2011, 45(2): 23-26.
- [42] 张红, 于桂英, 徐方旭, 等. 辐射诱变高产虫草素蛹虫草菌株的研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(27): 16575-16576.
- [43] 李文, 赵世光, 陈宏伟, 等. 低能离子束修饰蛹虫草菌株高产虫草素[J]. 生物工程学报, 2009, 25(11): 1725-1731.
- [44] 温鲁, 张诚, 夏敏, 等. 蛹虫草航天搭载对活性成分含量的影响[J]. 食品科学, 2008, 29(5): 382-384.
- [45] 文庭池, 李光荣, 康冀川, 等. 蛹虫草液体种制备及发酵生产菌丝体和虫草菌素工艺优化[J]. 食品科学, 2012, 33(5): 144-149.
- [46] 刘艳芳, 唐庆九, 顾俊杰, 等. 北冬虫夏草深层发酵高产虫草素工艺的优化[J]. 上海农业学报, 2010, 26(3): 26-30.
- [47] 李祝, 郁建平, 梁宗琦, 等. 前体物质与真菌孢子对虫草菌素产量的影响[J]. 食品科学, 2008, 29(6): 273-275.
- [48] 毛先兵, 涂永勤. 采用氨基酸补料分批培养策略促进蛹虫草生产虫草素的研究[J]. 重庆中草药研究, 2005(1): 18-22.
- [49] MAO Xianbing, ZHONG Jianjiang. Significant effect of NH₄⁺ on cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 38: 343-350.
- [50] FAN Dandan, WANG Wei, ZHONG Jianjiang. Enhancement of cordycepin production in submerged cultures of *Cordyceps militaris* by addition of ferrous sulfate[J]. Biochemical Engineering Journal, 2012, 60: 30-35.
- [51] HUNG L T, KEAWSOMPONG S, HANH V T, et al. Effect of temperature on cordycepin production in *Cordyceps militaris*[J]. Thai Journal of Agricultural Science, 2009, 42(4): 219-225.
- [52] SHIH I L, TSAI K L, HSIEH Chienyan. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 33: 193-201.
- [53] MASUDA M, URABE E, SAKURAI A, et al. Production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39: 641-646.
- [54] MASUDA M, URABE E, HONDA H, et al. Enhanced production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40: 1199-1205.
- [55] DAS S K, MASUDA M, HATASHITA M, et al. A new approach for improving cordycepin productivity in surface liquid culture of *Cordyceps militaris* using high-energy ion beam irradiation[J]. Letters in Applied Microbiology, 2008, 47: 534-538.
- [56] DAS S K, MASUDA M, HATASHITA M, et al. Optimization of culture medium for cordycepin production using *Cordyceps militaris* mutant obtained by ion beam irradiation[J]. Process Biochemistry, 2010, 45: 129-132.
- [57] DAS S K, MASUDA M, SAKURAI A, et al. Effects of additives on cordycepin production using a *Cordyceps militaris* mutant induced by ion beam irradiation[J]. African Journal of Biology, 2009, 8(13): 3041-3047.
- [58] MASUDA M, DAS S K, FUJIHARA S, et al. Production of cordycepin by a repeated batch culture of a *Cordyceps militaris* mutant obtained by proton beam irradiation[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011, 111(1): 55-60.
- [59] 温鲁, 夏敏, 宋虎卫, 等. 固体培养蛹虫草核苷类次生代谢物的产率[J]. 食品科学, 2005, 26(11): 65-68.
- [60] 温鲁. 提高蛹虫草培养物中虫草素含量的研究[J]. 江苏农业科学, 2005(6): 118-120.
- [61] 张红霞, 黄开华, 陈伟, 等. 蛹虫草不同栽培菌株产虫草素及腺苷差异性研究[J]. 食用菌, 2011(5): 63-64.
- [62] 谭琪明, 何璐, 文庭池, 等. 蛹虫草小麦培养基中虫草素提取工艺研究[J]. 山地农业生物学报, 2011, 30(4): 357-361.
- [63] 孙军德, 白立红, 房琳琳, 等. 蛹虫草中虫草素测定方法的比较[J]. 沈阳农业大学学报, 2011, 42(2): 212-215.
- [64] NI He, ZHOU Xiaohong, LI Haihang, et al. Column chromatographic extraction and preparation of cordycepin from *Cordyceps militaris* waste medium[J]. Journal of Chromatography B, 2009, 877: 2135-2141.
- [65] YU Rongmin, YE Bin, YAN Chunyan, et al. Fingerprint analysis of fruiting bodies of cultured *Cordyceps militaris* by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection[J]. Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis, 2007, 44: 818-823.
- [66] RAO Y K, CHOU C H, TZENG Y M. A simple and rapid method for identification and determination of cordycepin in *Cordyceps militaris* by capillary electrophoresis[J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 566: 253-258.
- [67] 黄兰芳, 郭方遒, 梁逸曾, 等. HPLC-ESI-MS测定冬虫夏草和蛹虫草中腺苷和虫草素含量[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(8): 764-764.
- [68] 欧阳召, 王春梅, 陶志. 适合虫草素积累的蛹虫草液体培养条件的优化[J]. 中国食用菌, 2012, 31(1): 26-28.