

蛹虫草胞内锌多糖对丝裂霉素诱发蚕豆根尖细胞微核的影响

李素婷¹,朱蕴兰²,张 城³,陈宏伟^{2*},宋海燕²

(1. 徐州工业职业技术学院,江苏徐州 221006;2. 徐州工程学院,江苏徐州 221111;
3. 扬州大学,江苏扬州 225127)

摘要:以蛹虫草为材料,利用蚕豆根尖细胞微核实验,探讨了蛹虫草胞内锌多糖对丝裂霉素(MMC)诱发的蚕豆根尖细胞微核的影响。结果表明:胞内锌多糖对蚕豆根尖细胞微核的产生具有显著的抑制作用,且胞内锌多糖抑制微核产生的能力随胞内锌多糖浓度增加而增强,当胞内锌多糖浓度为100 μ g/mL时,抑制MMC诱发的蚕豆根尖细胞微核率最高到达59.56%。蛹虫草胞内锌多糖具有显著抑制蚕豆根尖细胞微核产生的能力。

关键词:蛹虫草,锌,多糖,微核

Effect of intra-polysaccharide zinc-riched of *Cordyceps militaris* on micronucleus of *Vicia faba* root tip cells induced by Mitomycin-c

LI Su-ting¹, ZHU Yun-lan², ZHANG Cheng³, CHEN Hong-wei^{2*}, SONG Hai-yan²

(1. Xuzhou College of Industry Technology, Xuzhou 221006, China;
2. Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou 221111, China; 3. Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

Abstract: With *Cordyceps militaris* as material, micronucleus of *Vicia faba* root tip cells was tested, discussing effects of intra-polysaccharide zinc-riched of *Cordyceps militaris* on micronucleus of *Vicia faba* root tip cells induced by Mitomycin-c. Results showed that: intra-polysaccharids zinc-riched of *Cordyceps militaris* inhibited the production of micronucleus of *Vicia faba* root tip cells significantly. And the inhibition effect of intra-polysaccharide zinc-riched of *Cordyceps militaris* on micronucleus of *Vicia faba* root tip cells was intenser as the concentration of intra-polysaccharids zinc-riched increased. When the concentration of intra-polysaccharids zinc-riched was 100 μ g/mL, the inhibition density of intra-polysaccharids zinc-riched on micronuclear of *Vicia faba* root tip cells induced by Mitomycin-c reached to the highest at 59.56%. Intra-polysaccharide zinc-riched of *Cordyceps militaris* had significant ability to inhibit the production of micronucleus of *Vicia faba* root tip cells.

Key words: *Cordyceps militaris*; zinc; polysaccharide; micronucleus

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)10-0146-04

蛹虫草(*Cordyceps militaris*)又名北虫草、蛹草、北冬虫夏草,属于囊菌亚门(Ascomycotina)麦角菌科(Clavicipitaceae)虫草属(*Cordyceps*),是由子座(草部分)和菌核(虫的尸体部分)两部分组成的复合体,是与冬虫夏草极为相似的一个种。蛹虫草含有虫草素、虫草酸、多糖、腺苷等多种有效成分,具有降血脂,防止动脉硬化,保护心、脑组织,镇静催眠,增强巨噬细胞活性,以及抗炎、抗癌、抗菌、抗衰老等多种功效^[1-3]。蛹虫草多糖作为蛹虫草中含量最高的生物活性物质之一,可活化巨噬细胞、刺激抗体的产生,提高人体免疫力,降低血液中三磷酸甘油酯和胆固醇的含量,

具抗肿瘤、抗辐射、诱生干扰素等多种作用^[4-8]。锌是人体必需的微量元素之一,可加速伤口愈合,具有促进皮肤、骨骼、性腺器官发育的功效;参与体内酶类、核酸、蛋白质、激素等的代谢过程;参与神经细胞的轴突传递,维持神经活动兴奋性;协同胰岛素增强机体组织吸收葡萄糖,改善糖尿病症状;抗肿瘤等多种功能^[9]。研究发现我国膳食结构中锌含量严重不足,儿童缺锌发生率较高,目前补锌产品多数为无机锌,摄入过多对人体有一定的毒害,而且无机锌不利于人体吸收。微生物可以通过生物转化作用将无机锌转化为低毒、利于人体吸收的有机锌,降低毒性和增加锌的利用效率。已有研究表明锌在富锌菌体内主要是与蛋白和多糖结合在一起^[10],而锌多糖抗突变能力的研究还尚未见报道。以富锌蛹虫草多糖为研究材料,通过蚕豆根尖细胞微核实验探讨了富锌蛹

收稿日期:2011-05-23 * 通讯联系人

作者简介:李素婷(1965-),女,副教授,研究方向:食品分析。

基金项目:江苏省“六大人才高峰”项目(06-G-018)。

虫草胞内多糖对丝裂霉素诱发蚕豆根尖细胞微核的影响,为进一步研究虫草多糖的抗突变作用和蛹虫草产品的开发利用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

蛹虫草(*Cordyceps militaris*) 本实验室保藏;蚕豆 购买于中国矿业大学南门菜市场;固体斜面培养基 SDAY培养基^[1];富锌液体培养基 SDY培养基^[1];微核染色剂 取1g结晶紫溶于25mL 95%乙醇中,再与100mL H₂O混溶即得。

TAS-99原子吸收分光光度计、TU-1810紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;CW-2000超声波微波协同萃取仪 上海新拓微波溶样测试技术有限公司;HYG-II回旋式恒温调速摇瓶柜 上海欣蕊自动化设备有限公司;HH.S电热恒温水浴锅 江苏省医疗器械厂;YXQ.SG41.280手提式压力蒸汽灭菌锅 上海医用核子仪器厂;HHLB11.600-S-II电热恒温培养箱 上海跃进医疗器械厂;DL-5低速大容量离心机 上海安亭科学仪器厂;SW-CJ-1F超净工作台 苏州市安泰空气技术有限公司;PHS-3C精密pH计 上海精科雷磁。

1.2 实验方法

1.2.1 蛹虫草菌丝体及富锌菌丝体的制备 按文献[1]方法进行。蛹虫草菌丝体培养的培养基里不含硫酸锌,其它与富锌菌丝体的培养相同。

1.2.2 胞内多糖的提取及测定 称取1g干燥的蛹虫草菌丝体,加入15mL蒸馏水,用超声波微波协同萃取仪萃取25min(30W),取上清液,重复3次合并提取液,用Sevage法除蛋白,重复5次,取上清液浓缩到约20mL,加3倍约60mL的95%乙醇醇析,边加乙醇边搅拌,于冰箱中静置醇析过夜后取出,4000r/min离心,沉淀物用适量的丙酮洗涤,离心去丙酮,加适量乙醚洗涤,沉淀物干燥至恒重即为胞内多糖。

多糖的测定方法:采用苯酚-硫酸法。

多糖含量率(%) = $\frac{\text{多糖量} \times \text{稀释倍数} \times \text{多糖溶液体积}}{\text{样品质量}} \times 100\%$

1.2.3 胞内锌多糖的提取及测定 称取1g干燥的蛹虫草富锌菌丝体,加入15mL蒸馏水,后期处理同胞内多糖的提取及测定。

1.2.4 蛋白质和核酸检测 将提取的胞内锌多糖制成水溶液,在200~400nm波长范围经紫外分光光度计扫描,确定蛋白质和核酸的特征吸收峰,依此来鉴别多糖提取的效果。

1.2.5 锌元素标准曲线的制作及有机锌的测定 按文献[11]方法进行。

1.2.6 微核的测定方法

1.2.6.1 蚕豆处理 选择大小均一的蚕豆种子放入烧杯中,清水浸泡24h。待种子充分吸涨后,置于有湿脱脂棉的培养皿中,并盖上双层湿纱布,于20℃恒温培养箱中培养。每日换水1~2次,待根尖长到1~2cm时,随机分成18组,即阳性对照组(丝裂霉素)、阴性对照组(自来水)和16个实验组。每组15个蚕豆,且做

三次重复。具体实验组合情况见表1。

表1 实验分组与剂量

组别	胞内锌多糖 ($\mu\text{g/mL}$)	胞内多糖 ($\mu\text{g/mL}$)	丝裂霉素 ($\mu\text{g/mL}$)
阴性对照组	-	-	-
胞内锌多糖	100	-	-
	80	-	-
	50	-	-
	30	-	-
胞内锌多糖+	100	-	0.5
	80	-	0.5
	50	-	0.5
丝裂霉素	30	-	0.5
	-	100	-
	-	80	-
胞内多糖	-	50	-
	-	30	-
	-	100	0.5
胞内多糖+丝	-	80	0.5
	-	50	0.5
	-	30	0.5
阳性对照组	-	-	0.5

各组在20℃分别处理4h后用自来水清洗,再于20℃清水培养24h。切0.5~1cm蚕豆根尖于卡诺氏液中固定24h。然后分别用95%、85%、75%乙醇处理10min,最后于70%乙醇中保存,待测。

1.2.6.2 微核测定 每组随机选取蚕豆根尖,于1mol/L HCl 60℃解离10min后用蒸馏水冲洗。用干净的刀片将根冠和延长区部分切去,将余下的根尖切碎,用微核染色剂染色8~10min。常规压片镜检,统计细胞微核率(micronucleus frequencies, MCN),以每1000个细胞中所含微核数即微核千分率(MCN‰)来表示。每组至少观察5个根尖,每个根尖至少观察1000个细胞。

$$\text{MCN}(\%) = \frac{\text{含有微核的细胞数}}{\text{观察细胞总数}} \times 1000\%$$

$$\text{微核抑制率}(\%) =$$

$$\frac{\text{对照组微核细胞数} - \text{实验组微核细胞数}}{\text{对照组微核细胞数}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 蛹虫草富锌菌丝体胞内粗锌多糖有机锌含量

经测定,锌标准曲线回归方程为: $y=0.01175x+0.039$, $R^2=0.998$,其中: y :锌标准液的吸光度值; x :锌标准液的锌浓度($\mu\text{g/mL}$)。对蛹虫草胞内锌多糖进行有机锌含量测定,根据锌标准曲线回归方程得出蛹虫草胞内锌多糖有机锌含量为30.74 $\mu\text{g/g}$ 。

2.2 蛹虫草富锌菌丝体胞内粗锌多糖的多糖含量

经测定,每克菌丝体干粉可获胞内粗锌多糖21.08mg。根据多糖测定的葡萄糖标准回归方程: $y=0.0156x-0.0426$, $R^2=0.9972$, y :吸光度值; x :多糖含量 $\mu\text{g/mL}$ 。对胞内粗锌多糖进行多糖含量测定,其多糖含量为59.85%。

2.3 蛹虫草菌丝体胞内粗多糖的有机锌含量

经测定,蛹虫草菌丝体胞内粗多糖的有机锌含量为9.84 $\mu\text{g/g}$ 。

2.4 蛹虫草菌丝体胞内粗多糖的多糖含量

经测定,蛹虫草菌丝体胞内粗多糖的多糖含量

为58.56%。

2.5 蛹虫草锌多糖的纯度鉴定

经紫外光谱扫描显示,如图1所示,蛹虫草锌多糖溶液在260nm和280nm处的核酸和蛋白质的特征吸收峰消失,表明锌多糖不含核酸和蛋白质。

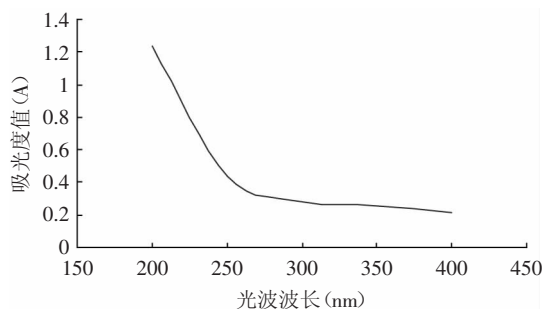


图1 锌多糖的紫外光谱扫描图

2.6 蛹虫草胞内锌多糖浓度对蚕豆根尖细胞微核率的影响

表2 蛹虫草富锌胞内多糖不同浓度下蚕豆根尖细胞微核率

组别	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	MCN (%)	抑制率 (%)	P_1	P_2
胞内锌多糖	100	2.86 \pm 0.58	54.82	<0.01	>0.05
	80	3.24 \pm 1.15	48.82	<0.05	>0.05
	50	4.67 \pm 1.53	26.22	>0.05	>0.05
	30	5.23 \pm 1.53	17.38	>0.05	-
阴性对照组	自来水	6.33 \pm 0.58	-	-	-

注: P_1 为与阴性对照组比较; P_2 为相邻组比较(是同一组别内与低一级浓度之间的比较)。

从表2可以看出,富锌胞内多糖含量在100 $\mu\text{g/mL}$ 和80 $\mu\text{g/mL}$ 时,对蚕豆微核的产生具有显著的抑制作用,而其它富锌胞内多糖浓度组对蚕豆微核产生的抑制作用不够显著。相邻各浓度组间无显著差异,但总体趋势是随着富锌胞内多糖含量的增加,对蚕豆微核产生的抑制作用增强。

2.7 蛹虫草不同胞内多糖及浓度对丝裂霉素诱发蚕豆根尖细胞微核率的影响

从表3可以看出,以自来水为阴性对照组,经方差分析可知,胞内多糖本身没有诱变蚕豆产生微核的作用,不同浓度的虫草胞内多糖对微核的产生具有不同的抑制作用,100 $\mu\text{g/mL}$ 和80 $\mu\text{g/mL}$ 的多糖浓度具有显著的抑制作用,50 $\mu\text{g/mL}$ 和30 $\mu\text{g/mL}$ 的多糖浓度对微核的产生尽管具有一定的抑制,但效果不显著,胞内多糖各相邻浓度组间无显著差异,胞内多糖对微核产生的抑制作用随胞内多糖剂量的增加抑制作用有增强的趋势。

蛹虫草胞内多糖的各浓度组对丝裂霉素诱发的蚕豆根尖细胞微核均具有显著的抑制作用,各浓度组之间除多糖浓度100 $\mu\text{g/mL}$ 和80 $\mu\text{g/mL}$ 之间没有显著差异外,其它各组之间具有显著差异,说明多糖浓度在一定范围内具有较好地抑制微核产生的作用,当多糖浓度达到一定值,抑制微核产生的能力趋于平稳。胞内锌多糖各浓度组均具有显著抑制微核产生的作用,而且随着多糖浓度的增加微核抑制率也不断提高,各浓度组之间除多糖浓度100 $\mu\text{g/mL}$ 和

80 $\mu\text{g/mL}$ 之间没有显著差异外,其它各组之间具有显著差异,而且低浓度组之间的差异极显著。

表3 蛹虫草胞内多糖不同浓度下丝裂霉素诱导的蚕豆根尖细胞微核率

组别	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	丝裂 霉素 ($\mu\text{g/mL}$)	MCN (%)	抑制率 (%)	P_1	P_2
阴性对照组	自来水	0	6.33 \pm 0.58	-	-	-
	100	0	3.33 \pm 0.58	47.39	<0.01*	>0.05
胞内多糖	80	0	3.67 \pm 1.15	42.02	<0.05*	>0.05
	50	0	5.00 \pm 1.00	21.01	>0.05*	>0.05
	30	0	5.33 \pm 0.58	15.79	>0.05*	-
	100	0.5	13.33 \pm 1.53	57.45	<0.01	>0.05
胞内多糖 + 丝裂霉素	80	0.5	16.67 \pm 2.08	46.79	<0.01	<0.05
	50	0.5	22.33 \pm 1.53	28.73	<0.01	<0.05
	30	0.5	26.67 \pm 1.53	14.87	<0.05	-
胞内锌多糖 + 丝裂霉素	100	0.5	12.67 \pm 1.53	59.56	<0.01	>0.05
	80	0.5	15.33 \pm 1.73	51.07	<0.01	<0.05
	50	0.5	20.34 \pm 1.15	35.08	<0.01	<0.01
30	0.5	24.67 \pm 1.15	21.26	<0.01	-	
阳性对照组	-	0.5	31.33 \pm 2.08	-	-	-

注: P_1 为与对照组比较;*为与阴性对照比较; P_2 为相邻组比较(是同一组别内与低一级浓度之间的比较)。

胞内锌多糖抑制丝裂霉素诱发的微核能力比胞内多糖的效果好,经方差分析可知,两者之间抑制微核产生的能力除高浓度组外,其它各组之间均具有显著差异,说明胞内锌多糖抑制微核产生的能力比胞内多糖强。

3 讨论与结论

微核是由染色体片段或整条丢失的染色体或细胞核出芽等形式形成,其频率可反映细胞遗传物质损伤的程度。微核产生的原因是多方面的,由于生物受到内外环境的影响,染色体的结构发生异常,形成无着丝粒片段或滞后染色体不能向细胞两极运动,而是残留在细胞中央的赤道板附近,当子代细胞形成时,游离于细胞质中形成微核^[12-14]。

在自然情况下也会有低频率的微核出现,主要由于个体细胞内的超氧化物自由基等因素引起,也可由个体细胞内 V_{B12} 、叶酸等含量减少或高半胱氨酸浓度过高及自发产生微核^[15]。

丝裂霉素为一种染色体断裂剂,它作用于细胞之后会使染色体DNA发生损伤,并产生微核。但是DNA的初级损伤要受到细胞的修复作用,未被修复或修复错误的损伤将导致染色体畸变,出现微核。

蛹虫草胞内锌多糖是蛹虫草在代谢过程中富集培养基中的无机锌,将其转变为有机锌。已有研究表明,锌在体内主要与多糖、蛋白质和核酸等大分子物质结合在一起形成有机锌。有机锌的生理功能是多方面的,在体内参与细胞各种生命现象的调节,激活免疫细胞,提高机体免疫功能等作用。

本实验用不同浓度的蛹虫草胞内锌多糖处理蚕豆根尖,其MMC诱发的微核率随多糖浓度的增加而逐渐减少,微核抑制率随多糖浓度的增加而逐渐

(下转第152页)

渐发暗,而且面包易掉渣,口感变粗糙。其原因可能是蕨麻粉易吸水膨胀,膨胀的蕨麻粉形成空间障碍而限制面筋的充分扩展;另一方面,蕨麻粉的添加对面筋蛋白有较强的稀释作用,导致面团形成面筋网络结构的能力减弱,从而劣化了面包的品质。

从面包总体评分来看,随着蕨麻粉添加比例的增加,面包的体积是不断缩小的。其中当添加量在5%以下时,体积缩小幅度较小,无显著差异,同时可以增加面包的弹柔性以及总体得分,对于其他面包品质指标的不利影响不大;但是当添加量大于5%时,对面包的品质产生了副作用,表现为体积急剧减少,面包纹理结构变差,质地和口感都明显下降,可能是由于过多蕨麻粉的添加影响了面筋的形成所致。

添加5%蕨麻粉的面包与普通面包相比,纹理结构得到了改善,各指标与普通面包相差不大。因此,蕨麻粉在面包粉中的合理添加比例为5%。添加量过低对于面包营养的补充效果较弱,添加量太高则严重影响面包的品质。

3 结论

本文探讨了在面包粉中分别添加0%、1%、3%、5%、7%和9%的蕨麻粉对面团粉质特性以及面包品质的影响,研究结果如下:

3.1 随着蕨麻粉添加量的增大,形成时间、稳定时间及吸水率有所增加,弱化度有所下降,而稠度的变化幅度不大;蕨麻粉的添加比例为5%时,粉质曲线

各指标均居于中等水平,可以形成较好的面团。

3.2 面包芯的硬度和咀嚼性随着添加量的增加而增加,弹性随之减小。

3.3 根据感官评定,当蕨麻粉添加量在5%时面包质量与对照相当。在添加量增大到一定比例时,面包体积缩小幅度变大,质量变劣。

参考文献

- [1] 刘春兰,雷美康,邓义红. 蕨麻水溶性多糖的提取及其单糖组分的分析[J]. 中央民族大学学报:自然科学版,2007(1):49-51.
- [2] 王晋,张坚,康胜利,等. 青海产蕨麻营养成分的研究[J]. 青海医药杂志,1998,28(2):52-53.
- [3] 李栋元,毛东风,杨具田,等. 蕨麻营养成分测定与分析[J]. 中兽医医药杂志,2007(3):43-44.
- [4] 王亚伟,张一鸣,钟晓林. 大豆膳食纤维在面包中的应用[J]. 郑州粮油学院学报,2000,21(3):75-77.
- [5] 陈正宏,於朝广. 高纤维豆渣面包的研究[J]. 食品工业科技,2000,21(5):31-33.
- [6] 王辰,许魁鹏. 苹果膳食纤维面包的研制[J]. 食品研究与开发,2001,22(8):29-31.
- [7] 石长波,马永强,韩春然,等. 可溶性玉米膳食纤维在面包中的应用[J]. 食品科学,2007,28(5):181-184.
- [8] 徐桂花,张洁,尤丽琴. 蚕豆皮膳食纤维在面包中的开发与应用[J]. 粮油加工,2009(11):117-119.

(上接第148页)

增加。蛹虫草菌丝体锌多糖低浓度组间对微核的抑制率具有显著差别,而高浓度组间无显著差别。其原因可能是蛹虫草菌丝体锌多糖进入生物体内后,促进了细胞的新陈代谢,激活生物体内某些因子,或增强某些酶的活力,有利于DNA损伤的修复或减少染色体的损伤,降低微核细胞的数量。锌多糖可能阻止MMC与DNA作用,参与影响细胞的代谢,促进SOD酶活力,清除自由基等原因来抑制微核的产生,详细机理有待进一步研究。

本实验表明,蛹虫草胞内锌多糖可有效抑制丝裂霉素诱导的蚕豆根尖细胞微核的产生,且在实验浓度内随着锌多糖浓度增加其蚕豆根尖细胞微核率降低,当胞内锌多糖浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,抑制微核产生的效果最佳,其微核抑制率为59.56%。

参考文献

- [1] 蒲哲龙,李增智. 昆虫真菌学[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,1996:228.
- [2] 林群英,宋斌,李泰辉. 蛹虫草研究进展[J]. 微生物学通报,2006,33(4):154-157.
- [3] 王建芳,杨春清. 蛹虫草有效成分及药理作用研究进展[J]. 中医药信息,2005,22(5):30-32.
- [4] 王根维,李鲜红,田峰,等. 冬虫夏草水提取液对小鼠抗红细胞抗体产生的影响[J]. 山西药科大学学报,1999,30(4):301-302.

- [5] 王根维,唐仕川,陈向佛,等. 冬虫夏草水提取物对巨噬细胞吞噬功能的实验研究[J]. 山西医科大学学报,2000,31(1):20-23.
- [6] Tadashi kiho. Polysaccharides in Fungi. XXXVI. Hypoglycemic Activity of a polysaccharide the Cultural Mycelium of *Cordyceps sinensis* and its effect on Glucose Metabolism in Mouse Liver[J]. Biol Pharm Bull,1996,19(2):294-296.
- [7] 李金峰. 抑瘤多糖-LAK细胞活性增强剂[J]. 中国肿瘤临床,1996,23(6):433-436.
- [8] 焦彦朝,梁宗琦,刘爱英,等. 虫草生物活性物质研究概况[J]. 贵州农业科学,1990(3):53-58.
- [9] 张建辉. 冬虫夏草、蛹虫草、姬松茸的液体培养条件及其富锌、硒的研究[D]. 东北农业大学,2003.
- [10] 孙希雯,李奇庚. 金针菇富锌条件及锌结合形态的研究[J]. 微生物学报,1997:40-46.
- [11] 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.
- [12] 中华人民共和国卫生部药政局. 新药(西药)临床研究指导原则汇编(毒理学)[M].1993.
- [13] Angela E. Mutagenicity test schemes and guidelines: U S EPA office of pollution prevention and toxics and office of pesticide programs[J]. Environ Mole Mutagen,1993,21(1):38-45.
- [14] Sofuni T. Japanese guidelines for mutagenicity testing[J]. Environ Mole Mutagen,1993,21(1):2-7.
- [15] 邢卫平,赵恒奎,姜宗荣. 微核及微核实验在遗传毒理学中的应用[J]. 安徽预防医学杂志,2002,8(5):317-320.