

羊肚菌活性成分应急性抗疲劳功能的研究

段巍鹤¹, 郭瑞², 张起莹², 刘建², 孙桦楠³, 王一东^{2*} (1. 长春理工大学校医院, 吉林长春 130022; 2. 长春理工大学生命科学技术学院, 吉林长春 130022; 3. 吉林省动物疫病预防控制中心, 吉林长春 130062)

摘要 [目的]为了解羊肚菌抗疲劳保健作用。[方法]通过水提法获得羊肚菌胞外多糖、胞内多糖,破碎菌丝获得胞内活性物质,对小鼠应急性一次灌胃处理后进行负重游泳实验。为保证结果的可靠性,首次进行了对菌丝的ELISA免疫学方法检测。[结果]胞外多糖组和胞内多糖组小鼠游泳时间与对照组比较均具有显著性差异,说明胞外多糖、胞内多糖应急摄入后具有明显的抗疲劳的作用。[结论]该研究为羊肚菌抗疲劳保健品的研发提供了参考。

关键词 羊肚菌多糖;酶联免疫吸附试验(ELISA);抗疲劳

中图分类号 S646.7 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)08-001-03

Study on Quick Anti-Fatigue Function of Morchella Active Ingredients

Duan Wei-he¹, GUO Rui², ZHANG Qi-ying², WANG Yi-dang^{2*} et al (1. Changchun University of Science and Technology University Hospital, Changchun, Jilin 130022; 2. College of Life Science and Technology, Changchun University of Science and Technology, Changchun, Jilin 130022)

Abstract [Objective]The research aimed to learn about the anti-fatigued function of Morchella. [Method]Water extraction was adopted to obtain extracellular polysaccharide and intracellular polysaccharide from Morchella, and active intracellular substances were obtained by breaking mycelia. After one quick intragastric administration was made, mice weight loading swimming experiment was carried out. ELISA test was used to make sure the reliability of the result for the first time. [Result] Extracellular and intracellular polysaccharide groups had sharp difference with control group, indicating that extracellular and intracellular polysaccharide in taken at one time had obvious anti-fatigue function. [Conclusion]This research provided a case for the invention of anti-fatigue care products of Morchella.

Key words Morchella polysaccharide; ELISA; Anti-fatigue

羊肚菌是一种世界公认的珍稀美味食用菌,目前还不能实现完全的人工栽培,通过深层发酵技术可以获得羊肚菌菌丝体^[1-5]。近年来的研究表明,羊肚菌还具有提高人体免疫力、抗疲劳、抗衰老、抗肿瘤等保健功效^[6]。随着现代生活节奏的加快,由于疲劳及过度疲劳、体力透支、身体抵抗力下降等亚健康状态,工作效率降低,健康状况受到威胁,抗疲劳药物及保健品的研发越来越被人们所重视。参照通行的抗疲劳试验方法,将提取的羊肚菌菌丝不同活性成分分为胞外多糖、胞内多糖、胞内活性物质组分,测定各组分对试验动物的应急摄入后对增强机体在运动过程中抵抗疲劳、延长运动时间、增强机体的运动能力的影响^[7-12]。研究结果表明,羊肚菌胞外多糖、胞内多糖与阴性对照组、羊肚菌胞内活性物质组相比具有明显的抗疲劳作用。该研究结果为开发利用羊肚菌多糖,研制羊肚菌抗疲劳保健品提供有益的参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株。羊肚菌菌株(51589号),购于中国农业微生物菌种保藏中心。

1.1.2 试验动物。ICR鼠由吉林大学白求恩医学院实验动物中心提供。

1.1.3 试剂。鼠抗羊肚菌单克隆抗体(C6A8株,单抗为经过初步处理的腹水),长春理工大学生命科学技术学院制备

并保存^[13];HRP标记山羊抗鼠IgG(H+L)与HRP标记山羊抗兔IgG(H+L),购于北京中杉金桥生物技术有限责任公司;TMB Sigma公司产品;PDA液体培养基组成为马铃薯200g、葡萄糖20g、磷酸二氢钾1g、硫酸镁0.5g、蛋白胨3g,加蒸馏水1000ml,pH自然,121℃灭菌20min。其他试剂均为国产分析纯化学试剂。

1.1.4 主要仪器及设备。恒温振荡培养箱,超净工作台,天平,CF-16RX离心机-HITACHI, ELx800TM酶标仪-美国伯腾仪器有限公司,U-2800紫外型可见分光光度计-日本日立公司,Y92-II超声波细胞破碎机,游泳槽。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种的活化、鉴定及扩大培养。

1.2.1.1 菌种活化。无菌操作将羊肚菌菌种试管斜面培养物移至无菌培养皿PDA固体培养基上,23℃培养5~7d,得到菌丝培养物。

1.2.1.2 菌丝鉴定^[14-15]。取适量培养得到的菌丝,加入到含有一定量的无菌海砂及一定体积的无菌生理盐水的研钵中,研磨30min,收集研磨液于离心管中,3000r/min离心5min,取上清液作为待检抗原。将研磨得到的抗原用包被缓冲液(pH9.6碳酸盐缓冲液)分别进行5、10倍稀释,在12孔酶标条上1~4孔包被5倍稀释的抗原,5孔为PBS缓冲液做阴性对照,6~10孔包被10倍稀释的抗原,11孔为羊肚菌阴性对照,12孔做试剂空白对照;向包被好的各酶标孔加入100μl50倍稀释的抗羊肚菌单克隆抗体,孵育60min,洗涤3次,甩干,再向各孔中加入100μl2000倍稀释的HRP标记山羊抗鼠IgG(H+L),孵育60min,洗涤3次,甩干,每孔中加入100μlTMB底物,室温避光15min,每孔中加入50μl2mol/L硫酸终止反应,经酶标仪检测各孔的OD值。

基金项目 长春理工大学“大学生创新创业训练计划项目”(项目编号:2012S46;2013x108)。

作者简介 段巍鹤(1971-),女,吉林长春人,主管技师,从事康复保健机理及临床应用研究。*通讯作者,高级实验师,从事食品卫生检测方面的研究。

收稿日期 2015-01-26

1.2.1.3 菌丝扩大培养。将经检测、鉴定了的羊肚菌菌丝,无菌操作转移至含有无菌的 100 ml 液体 PDA 培养液的 250 ml 三角瓶中,用半透膜封口,置于 21 °C、115 r/min 恒温振荡培养箱中培养 5 d,做标记,收集培养物(菌丝球)、培养液,备用。

1.2.2 羊肚菌胞外多糖、胞内多糖及胞内活性物质的提取。

1.2.2.1 胞外多糖的提取。取 300 ml 过滤、离心获得的不含菌丝的羊肚菌培养液,50 °C 恒温水浴搅拌将体积浓缩至原体积的一半;采取 Sevage 法去蛋白,将去蛋白后的培养液加入其 3 倍体积的浓度 95% 乙醇在 -20 °C 沉降 24 h,析出絮状白色物质,以 4 000 r/min 离心 20 min 得到白色沉淀,加入 50 ml 蒸馏水溶解后 50 °C 水浴除去样品中残留的乙醇,得到胞外多糖,备用。

1.2.2.2 胞内多糖的提取。对经液体培养得到的菌丝体(球状)用蒸馏水离心洗涤 2 次,获得菌丝沉淀物,对沉淀按浸提比 50:1 加入去离子水,85 °C 恒温水浴浸提 120 min,离心去除菌丝,离心上清液 50 °C 恒温水浴至原体积的一半,离心去沉淀,上清液沉淀多糖方法同胞外多糖沉淀方法,得到胞内多糖,备用。

1.2.2.3 胞内活性物质。取液体培养得到的菌丝体用蒸馏水离心洗涤 2 次,用超声细胞破碎机对菌丝体进行破碎,功率 180 W,每次超声破碎时间 10 s,间隔 15 s,循环 30 次。可用冰浴降温或停机避免破碎液温度过高,破碎液经 100 × 普通光学显微镜下检验,至菌丝体完全破碎后,离心取上清液,上清液即为胞内活性物质,备用。

1.2.3 葡萄糖浓度曲线的建立与多糖浓度的测定。利用苯酚硫酸法,测定溶液中多糖的浓度。分别配置 100 μg/ml 葡萄糖标准溶液和浓度 6% 的苯酚溶液各 100 ml。准确吸取葡萄糖标准溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml,分别置于试管中,加蒸馏水补足至 2.0 ml,加入浓度 6% 的苯酚溶液 1.0 ml,混匀,小心地加入浓硫酸 5 ml,混匀,置于沸水浴中煮沸 15 min,迅速冷却,以试剂空白溶液作参比,用 1 cm 比色皿在 490 nm 波长处测定吸光度。以葡萄糖质量(g)为横坐标,以吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,求得标准曲线的回归方程。根据曲线的线性范围,将样品浓度做适当调整,检测样品吸光度,由线性方程求得样品多糖浓度。

1.2.4 羊肚菌胞内、胞外多糖及胞内活性物质抗疲劳作用浓度的初步选择。随机选择 ICR 小鼠 8 只,称重,随机分成对照组、胞外多糖组、胞内多糖组、胞内物质组 4 组,每组 2 只,将上述各组分提取液分别配制成多糖浓度为 14、4 mg/ml 的溶液,对照组为蒸馏水。空腹灌胃,每只 1 ml,立即测定各组小鼠力竭游泳时间,比较各组分与对照组及组内不同浓度多糖对小鼠力竭游泳时间的影响,根据试验结果确定下一步试验的多糖浓度。

1.2.5 羊肚菌胞内、胞外多糖及胞内物质抗疲劳作用的测定。随机选择健康成年 ICR 小鼠 20 只,断食 1 d 后称重,随机分成 4 组,每组 5 只鼠,分为对照组、胞外多糖组、胞内多糖组、胞内活性物质组。选择上一步试验确定的有显著提高

游泳时间的胞外多糖组、胞内多糖组、胞内活性物质组灌胃液多糖浓度,空腹灌胃,每只 1 ml,立即测定各组每只小鼠力竭游泳时间。最后,对数据用 SPSS19.0 软件进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 菌株 ELISA 间接法鉴定结果 由表 1 可知,经活化培养的菌丝,破碎处理后经 5X(A1 ~ A4 孔)及 10X(A6 ~ A10 孔)稀释包被,P/N 均大于 2.1,为阳性;试验的阳性(A11 孔)、阴性(A5 孔)对照成立。这说明活化培养后得到的菌丝为羊肚菌菌丝。

表 1 ELISA 间接法进行菌种鉴定

组别	A	P/N
1	0.187	2.6
2	0.190	2.6
3	0.185	2.6
4	0.188	2.6
5	0.072	1.0
6	0.164	2.3
7	0.162	2.3
8	0.158	2.2
9	0.161	2.3
10	0.170	2.4
11	0.175	2.4
12	0.056	0.8

2.2 羊肚菌胞内、胞外多糖及胞内物质多糖浓度 根据测得的葡萄糖标准液含量与 OD 值的关系,求得线性方程为 $y = 6.798 1x, R^2 = 0.996 4$,标准曲线见图 1。测得的样品 OD 值及由线性方程求得的样品多糖浓度见表 2。

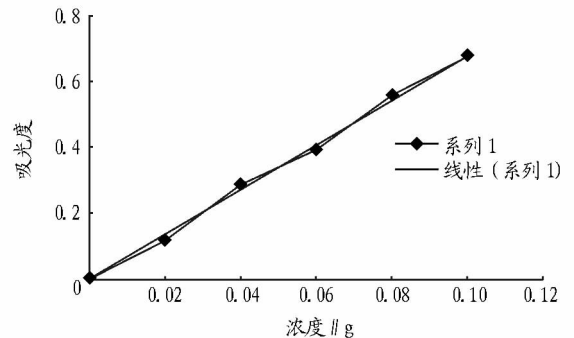


图 1 葡萄糖浓度曲线

表 2 水法提取的多糖浓度的测定结果

项目	吸光度	浓度 // mg/ml
空白	0	0
胞外多糖	2.935	21.6
胞内多糖	2.076	15.3
胞内物质	1.916	14.1

2.3 羊肚菌胞内、胞外多糖及胞内物质抗疲劳作用浓度的初步选择 由表 3 可知,灌胃液的多糖浓度为 14 mg/ml 小鼠游泳时间明显高于多糖浓度为 4 mg/ml。

表 3 灌胃多糖浓度为 14、4 mg/ml 时小鼠负重游泳时间的比较

组别	灌胃多糖浓度 mg/ml	灌胃体积 ml	n	体重 g	持续游泳时间 min	时间增加量 %
对照组	0	1	1	28.04	8.77	0
	0	1	1	27.30	8.65	0
胞外多糖组	14	1	1	26.01	19.90	126.9
	4	1	1	29.18	15.40	78.0
胞内多糖组	14	1	1	28.56	14.87	70.1
	4	1	1	25.67	12.06	39.4
胞内物质组	14	1	1	29.32	15.83	80.5
	4	1	1	27.25	5.48	-16.6

2.4 羊肚菌胞内、胞外多糖及胞内物质抗疲劳作用 由表 4 可知,胞外多糖组与对照组比较 $P=0.000\ 05$,即 $P<0.01$,表明胞外多糖组小鼠游泳时间与对照组小鼠游泳时间有 0.01 水平显著性差异;胞内多糖组与对照组比较 $P=0.03$,即 $P<0.05$,表明胞内多糖组小鼠游泳时间与对照组小鼠游泳时间相比有 0.05 水平显著性差异;胞内物质组小鼠游泳时间与对照组比较 $P=0.07$, $P>0.05$,表明胞内活性物质组小鼠游泳时间与对照组小鼠游泳时间没有显著性差异;胞外多糖组与胞内多糖组比较 $P=0.297$, $P>0.05$,表明胞外多糖组与胞内多糖组比较小鼠游泳时间没有显著性差异。

表 4 羊肚菌多糖对小鼠力竭游泳时间的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	持续游泳	灌胃量	体重	多糖浓度
		时间//min	ml	g	mg/ml
对照组	5	6.39 ± 1.43	1	20.00 ± 0.73	0
胞外多糖组	5	16.05 ± 0.44	1	20.54 ± 1.70	14
胞内多糖组	5	14.56 ± 2.86	1	19.55 ± 0.45	14
胞内物质组	5	5.70 ± 1.23	1	20.01 ± 0.29	14

3 讨论

(1)羊肚菌发酵液中的多糖(胞外多糖)及羊肚菌菌丝体内多糖(胞内多糖)溶液应急摄入后小鼠负重游泳时间与对照组比较存在着显著性差异($P<0.05$),表明 2 种多糖溶液均具有明显的应激性抗疲劳作用。

(2)4、14 mg/ml 羊肚菌胞外多糖和胞内多糖均可以延长小鼠负重游泳时间;在相同条件下,高浓度的羊肚菌多糖(胞外多糖、胞内多糖)对小鼠负重游泳时间明显大于低浓度的羊肚菌多糖。

(3)胞内活性物质组小鼠游泳时间与对照组小鼠游泳时间没有显著性差异,说明影响小鼠应急性抗疲劳作用的主要

成分是羊肚菌胞内与胞外多糖。胞内活性物质组内含有与胞内多糖的抗疲劳作用相互拮抗的物质,其成分、作用机理有待进一步研究。

(4)该研究结果验证了羊肚菌多糖具有明显的应急性抗疲劳保健作用。所采用的小鼠负重游泳试验方法是在相关试验方法的基础上,根据试验目的进行了一次性应急灌胃改动。该改动可以获得直观的试验数据,并且有抗疲劳保健品使用上的实际意义。该研究中试验方法的创新为研发具有应急性抗疲劳作用的保健品提供参考与借鉴。

(5)与相关文献相比,该研究中首次引入 ELISA 免疫学检测方法对菌丝进行鉴定检测,对试验结果的可靠性提供了保障。

(6)与相关文献相比,该研究得到的应急性灌胃小鼠游泳时间即羊肚菌多糖的抗疲劳作用明显高于其他报道。这个结果或许与该研究所采用菌种的长期传代驯化培养、菌丝活性多糖组分的含量变化有关。

参考文献

- [1] 龙正海. 羊肚菌的研究及应用开发前景[J]. 中国生化药物杂志, 1997, 18(3): 160-161.
- [2] 李茹光. 东北地区大型经济真菌[M]. 长春: 东北师范大学出版社, 1998: 77-78.
- [3] 朱斗锡. 羊肚菌人工栽培研究进展[J]. 中国食用菌, 2008, 27(4): 3-5.
- [4] 贺新生, 张玲, 李玉律, 等. 羊肚菌菌丝体的培养[J]. 资源开发与市场, 1994, 19(1): 23-25.
- [5] 吴国定, 张昕艳. 羊肚菌菌丝形态观察[J]. 山西农业科学, 1993, 21(1): 62.
- [6] 陈彦, 潘见, 周丽伟, 等. 羊肚菌胞外多糖抗肿瘤作用的研究[J]. 食品科学, 2008(9): 553-556.
- [7] 贾建会, 吕晓莲, 樊利春. 深层发酵羊肚菌多糖的提取、分离及纯化研究[J]. 食品科学, 2002, 23(4): 59-61.
- [8] 武秋立, 安家彦. 羊肚菌多糖提取、分离条件的选择[J]. 食品科学, 2005, 26(1): 116-120.
- [9] 孙晓明, 张卫明, 吴素玲, 等. 羊肚菌抗疲劳作用研究[J]. 中国野生植物资源, 2001, 20(1): 17-18.
- [10] 国家蜂产品质量监督检验中心. 保健(功能)食品评价通用标准. GB 16740-1997[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [11] 于海玲, 李华伟, 李雪花, 等. 复方黄芪多糖对小鼠的抗疲劳和耐缺氧作用[J]. 延边大学医学学报, 2009, 32(3): 160-162.
- [12] 胡彦营. 羊肚菌多糖发酵、提取及抗疲劳作用研究[D]. 济南: 山东大学, 2010.
- [13] 王一东, 刘建. 一株抗羊肚菌单克隆抗体及其制备方法: 中国, 200910218152. 8[P]. 2010-06-09.
- [14] 马帅, 陈华林, 王雅文, 等. 免疫酶染色法对羊肚菌菌丝特异性靶位的初步定位与分析[J]. 菌物研究, 2014, 12(6): 115-118.
- [15] 田雪, 刘建, 孙桦楠, 等. 以羊肚菌菌丝为抗原的不同免疫程序对 Balb/c 鼠抗体水平的影响[J]. 长春理工大学学报: 自然科学版, 2012, 35(1): 156-160.