DOI:10.12441/spyswjs.20241211002 [文章编号] 1673-1689(2025)08-0031-10

3株蛹虫草的分离及其活性成分测定与抗氧化作用研究

孟 云[1,2] 张义方[3] 施金铎[3] 王 敦[1,2*]

(1. 农业农村部西北黄土高原作物有害生物综合治理重点实验室,陕西 咸阳 712100; 2. 西北农林科技大学植物保护学院,陕西 咸阳 712100; 3. 安康市林业局,陕西 安康 725099)

摘要:【目的】从陕西化龙山国家级自然保护区采集到的蛹虫草(*Cordyceps militaris*,*C. militaris*)中筛选出高产虫草素、虫草酸等活性物质的菌株。**【方法】**对采集到的3株蛹虫草LH3、LY1和LY9进行分离和鉴定,并对各菌株的菌丝和发酵液的提取物中最主要活性成分的产量、羟自由基清除活性和细胞氧化保护活性进行测定。**【结果】**蛹虫草的主要活性物质虫草酸、粗多酚和粗多糖的产量在菌株LY9的菌丝提取物中最高,分别为2.94、28.79、65.01 mg/g,而虫草素产量在菌株LY1的发酵液提取物中最高,为0.53 mg/g;菌株LY9的菌丝和发酵液的提取物均具有显著的羟自由基清除活性(IC_{50}值分别为0.923 mg/mL和0.619 mg/mL)和细胞氧化保护活性,当其质量浓度为1.00 mg/mL时,细胞存活率分别为82.65%和78.46%。对这3株蛹虫草进行子实体培养,仅菌株LY9形成了子实体,且其虫草酸、粗多酚和粗多糖产量都高于其菌丝。**【结论】**菌株LY9活性物质产量高,抗氧化和细胞氧化保护能力突出,且能稳定形成活性物质产量高的子实体,具有驯化成商品化蛹虫草的潜力。

关键词:蛹虫草;活性成分;羟自由基清除活性;细胞氧化保护

Isolation of Three Strains of *Cordyceps militaris* and Determination of Their Active Compounds and Antioxidant Effects

MENG Yun[1,2] *ZHANG Yifang*[3] *SHI Jinduo*[3] *WANG Dun*[1,2*]

(1. Key Laboratory of Integrated Pest Management on the Loess Plateau of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xianyang 712100, China; 2. College of plant protection, Northwest A&F University, Xianyang 712100, China; 3. Ankang Forestry Bureau, Ankang 725099, China)

Abstract: [**Objective**] The strains with high-yield for active compounds such as cordycepin and cordycepic acid were screened from *Cordyceps militaris* (*C. militaris*) collected in Shaanxi Hualongshan National Nature Reserve. [**Method**] Three strains LH3, LY1, and LY9 of *C. militaris* were isolated and identified. The yields of the primary active compounds, hydroxyl radical scavenging activity, and cellular oxidative protection activity in the extracts of the mycelial and fermentation broth of each strain were determined. [**Result**] The yields of cordycepic acid, crude polyphenols, and crude polysaccharides, which were the main active compounds of *C. militaris*, were the highest in the mycelia extract of strain LY9, with values of 2.94, 28.79, 65.01 mg/g, respectively, while the yield of cordycepin was the highest (0.53 mg/g) in the fermentation broth extract of strain LY1. Both the extracts of mycelia and fermentation broth of strain LY9 exhibited significant hydroxyl radical

基金项目:国家"十四五"重点研发计划项目(2022YFD1401001);西北农林科技大学秦岭研究院专项项目(2452023301)。

通信作者:王敦(1973—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事微生物生物防治、药用微生物活性研究。 E-mail: dunwang@foxmail.com

收稿日期:2024-12-11 **修回日期:**2025-04-13

scavenging (IC_{50} values of 0.923 mg/mL and 0.619 mg/mL, respectively) and cellular oxidative protection activities, with cell viabilities of 82.65% and 78.46% at a mass concentration of 1.00 mg/mL. When being cultivated for fruiting bodies, only strain LY9 successfully formed fruiting bodies, with higher yields of cordycepic acid, crude polyphenols, and crude polysaccharides than those in its mycelia. [**Conclusion**] Strain LY9 exhibits high yields of active compounds, outstanding antioxidant and cellular oxidative protection activities, and a stable ability to form fruiting bodies with high mass fractions of active compounds. Therefore, it has the potential to be domesticated for commercialization of *C. militaris*.

Keywords: *Cordyceps militaris*; active compound; hydroxyl radical scavenging activity; cellular oxidative protection

蛹虫草属子囊菌门(Ascomycota)、子囊菌纲(Ascomycetes)、肉座菌目(Sorfariomycetidae)、麦角菌科(Clavicipitaceae)、虫草属(*Cordyceps*)[1],多寄生于鳞翅目昆虫的蛹上,可从宿主体内长出黄色至橙红色的子实体[2]。研究表明,蛹虫草中含虫草素、虫草酸、腺苷、多酚、多糖等多种有生物活性的次生代谢物[3-5],其中虫草多糖能调节肠道菌群、改善代谢紊乱并减轻肥胖症状[6];子实体中的虫草素和腺苷具有促进癌细胞凋亡的抗癌活性[7];虫草素可上调 TLR4 和 TNF-α 的表达量,具有提高机体免疫力的活性[8];蛹虫草提取物具有抗氧化[9]、抗菌和抗病毒等活性[10-11]。因此,蛹虫草不仅可作为中草药,同时也是人们日常饮食的一部分[12],越来越受到人们的关注。因此,挖掘利用新的蛹虫草菌株资源,对于丰富药食同源真菌资源库以及促进相关产品的产业化发展均具有重要意义。

化龙山自然保护区位于陕西省最南部,是大巴山系川陕境内最高峰[13],是亚热带温暖过湿山地气候的森林生态系统类型保护区。保护区的森林覆盖率高、湿润多雨,为昆虫和微生物多样性提供了优越的生态环境[14-15],也孕育出了高活性的昆虫病原真菌[16]。作者对从化龙山自然保护区采集到的蛹虫草样品进行分离和鉴定,通过分析各个菌株的菌丝和发酵液中主要活性物质产量及其抗氧化活性,筛选出活性物质产量高的菌株。利用人工培养基对各菌株进行子实体的诱导培养,测定获得的子实体中活性物质的产量,旨在筛选出高产活性物质的蛹虫草菌株,为后续开发利用提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蛹虫草:采集于陕西化龙山国家级自然保护区,生存的植被类型都是针阔混交林,宿主都是鳞翅目蛹,具体采集地点和时间见表1。采集到的蛹虫草保存于西北农林科技大学植物保护学院昆虫与微生物资源利用实验室菌种库;人肾上皮(239T)细胞:西安交通大学医学部。

表1 蛹虫草样品的具体信息

Table 1 Detailed information about *C. militaris* samples

菌株	采集地点	海拔/m	采集时间
LH3	陕西省安康市镇坪县浪河 E 109°29′29″, N 32°4′40″	850	2020年8月1日
LY1	陕西省安康市镇坪县老鸦场 E 109°24′28″, N 32°6′1″	1 051	2020年9月4日
LY9			2020年10月5日

DMEM 高糖培养基:美国 Hyrclone Cytiva 公司;胎牛血清:浙江天杭生物技术有限公司;胰酶:美国 Amresco 公司;体积分数 30% 的 H_2O_2、二甲亚砜、葡萄糖、硝酸钠、蔗糖、硫酸亚铁、磷酸二氢钾、七水合硫酸镁、氯化钾、蔗糖:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;2×Accurate *Taq* 预混液(含 5 U/μL 染料):艾科瑞生物科技有限公司;蛋白酶 K(30 U/mg):北京索莱宝科技有限公司;葡萄糖、虫草素、虫草酸、没食子酸的标准品和氨苄青霉素(USP 级):上海源叶生物科技有限公司;硫酸链霉素(USP 级)、琼脂粉:北京博奥拓达科技有限公司;琼脂糖 G-10:上海玉博生物科技有限公司;酵母提取物:英国 Oxoid 公司;体积分数 95% 医用乙醇消毒液:山东安捷高科消毒科技有限公司;大米:批号 10101513520907,中粮福临门;小麦‘长丰 2112’:陕西长丰种业有限公司;柞蚕蛹粉:山东省美越饲料科技有限公司。

1/4 SDAY 选择性培养基:酵母提取物 2.5 g、葡萄糖 10.0 g、蛋白胨 2.5 g、硫酸链霉素 0.6 g、氨苄青霉素 0.5 g、琼脂 15.0 g、水 1 L。

马铃薯葡萄糖琼脂（potato dextrose agar，PDA）培养基：取去皮马铃薯200.0 g，加水1 L，煮沸10 min，取上清液加入20.0 g葡萄糖和15.0 g琼脂。

查氏培养基：硝酸钠3.0 g、磷酸二氢钾1.0 g、七水合硫酸镁0.5 g、氯化钾0.5 g、硫酸亚铁0.01 g、蔗糖30.0 g、琼脂25.0 g，水1 L。

1.2　仪器与设备

质谱仪：LTQ XL mass spectrometer型，美国Thermo Fisher Scientific公司；LC色谱柱：XTerra MS C18 Column（5 μm×150 mm×4.6 mm）型，美国Waters Corp公司；旋转蒸发仪：RE-201D型，郑州科达机械仪器设备有限公司；真空冷冻干燥机：CTFD-10S型，青岛永合创信电子科技有限公司；CO_2细胞培养箱：HF-90型，力康生物医疗科技控股有限公司；生化培养箱：SPX-420B型，上海南荣实验设备有限公司；多功能酶标仪：Infinite M200 pro型，瑞士Tecan公司；倒置显微镜：TI-S型，日本Olympus公司。

1.3　蛹虫草菌的分离和纯化

将样品在流水下冲洗后用体积分数75%乙醇进行表面消毒，用无菌解剖刀将蛹虫草样品切分成0.5 cm×0.5 cm的组织块，接种于1/4 SDAY培养基上，24 ℃下培养7 d。挑取菌落边缘的菌丝块接种于新的1/4 SDAY培养基上，继代培养14 d。挑取菌落边缘1.5 cm×0.5 cm的菌丝块，配制成浓度为1×10^4个/mL的孢子悬浮液，吸取100 μL接种在1/4 SDAY培养基上，培养48 h后将萌发的单个孢子转接在新的1/4 SDAY培养基上，24 ℃遮光培养。

1.4　菌株形态学观察

将纯化的菌株培养至直径为6 cm，用7 mm打孔器沿菌落边缘打取菌碟并分别接种在PDA、1/4 SDAY和查氏培养基上，24 ℃避光培养14 d，用十字交叉法测量菌落直径，再将菌株置于光周期为16 h/8 h（光/暗）的条件下培养3 d，观察菌落转色情况。选取培养14 d的菌株，用挑针挑取菌落中气生菌丝生长旺盛的部分，在显微镜下观察菌丝形态、孢子形态、产孢结构和孢梗束等。

1.5　DNA提取、PCR扩增和测序

根据Aljanabi等[17]的方法提取各个菌株的DNA。以提取的菌株DNA为模板进行多基因引物扩增及测序，引物序列和对应的PCR程序参照Meng等[18]的方法，其中基因*TEF*程序与基因*ITS*相同。PCR体系为（50.0 μL）：2×Accurate *Taq* 预混液25.0 μL，正、反向引物（10 mol/L）各1.0 μL，DNA模板2.0 μL，ddH_2O 21.0 μL。用1.0 g/dL琼脂糖凝胶检测PCR扩增产物，将PCR未纯化产物送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序。

1.6　序列对比及系统发育分析

将测序结果在NCBI（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）中进行同源序列比对，根据比对结果下载相似性较高的菌株相关序列，用MEGA-X逐一比对各序列，最后用PhyloSuite v1.2.1的最大似然法（maximum likelihood，ML）联合*ITS*、*nrSSU*、*nrLSU*、*TEF*、*RPB1*、*RPB2*基因序列构建系统发育树，确定分离菌株的种属，见表2。

1.7　发酵液和菌丝提取物的制备

根据唐鱼等[19]的方法对分离到的菌种进行液体发酵培养，培养液为1/4 SDY液体培养液，24 ℃、145 r/min培养10 d。用4层纱布进行初步过滤并收集菌丝，用抽滤法进一步除去其中的菌丝，用石油醚萃取发酵液，用旋转蒸发仪浓缩发酵液，于4 ℃保存。3株蛹虫草发酵液提取物分别为LH3F、LY1F和LY9F。

将收集到的菌丝冷冻干燥后，用ddH_2O以液料比20 mL∶1 g进行提取，提取液用旋转蒸发仪浓缩，3株蛹虫草菌丝提取物分别为LH3H、LY1H和LY9H。

1.8　提取物中主要活性物质产量测定

将1.7制备的样品配成0.1 mg/mL进行主要活性成分的测定，提取物中虫草素、虫草酸产量的测定参照文献[20]。用硫酸-苯酚法测定提取物中粗多糖产量[21]，具体方法为：称取100 ℃恒温干燥后的葡萄糖标准品20.0 mg，配成质量浓度为200 mg/L的葡萄糖标准溶液，分别量取0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL并加水至1.0 mL，依次加入质量分数5%的苯酚1 mL、硫酸5 mL，室温反应30 min，于487 nm波长下测定吸光度，建立标准曲线；再用同样的方法对稀释10倍后的样品（1.0 mL）中的粗多糖产量进行测定，以蒸馏水为对照，试验重复3次。粗多酚产量测定方法为：将质量浓度为0.05、0.10、0.50、1.00、5.00 mg/mL的没食子酸标准溶液在790 nm下测吸光度，建立标准曲线，测定6种提取物中的粗多酚产量[22]。

表2 用于多基因序列分析的来自于GenBank中的菌株及序列登录号

Table 2 Strains and GenBank accession number of genes for multi-gene sequence analysis

物种	菌株	基因序列登录号					
		ITS	*nrLSU*	*nrSSU*	*TEF*	*RPB1*	*RPB2*
C. militaris	BUC1112		MW242679	MW242911	MW245728	MW350133	MW426475
C. militaris	NBRC30377	JN943300	JN941385	JN941756		JN992490	
C. militaris	J1	KC242657	KC242632	KC242705	KC242680	KC242729	
C. militaris	YFCC6587		MN576818	MN576762	MN576988	MN576878	MN576932
C. militaris	YFCC5840		MN576819	MN576763	MN576989	MN576879	MN576933
C. militaris	ARSEF5050	HQ880829			HQ881020	HQ880901	HQ880973
C. militaris	NBRC5298	JN943299	JN941383	JN941383		JN992492	
C. militaris	OSC93623	JN049825	AY184966	AY184977	DQ522332	DQ522377	
C. militaris	NBRC100741	JN943437	JN941386	JN941755	AB968606	JN992489	AB968567
C. militaris	NBRC9787	JN943433	JN941384	JN941757	AB968604	JN992491	AB968565
C. javancia	CBS134.22		MF416558	MF416610	MF416504	MF416661	MF416455
C. militaris	LH3	ON795100	OR194075	OR194092	PP024974	PP034586	PP034584
C. militaris	LY1	ON795947	OR194085	OR194101	PP024975	PP034587	PP034585
C. militaris	LY9	ON796497	OR194088	OR194104	PP024976	PP034588	PP024977

1.9 提取物的羟自由基清除能力

用Fenton法对提取物的羟自由基清除能力进行测定[23]。提取物用超纯水配制成质量浓度为0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、7.5、10.0 mg/mL的溶液，以超纯水为对照，用酶标仪于510 nm处测定吸光度，羟自由基清除率计算见式(1)，试验重复3次。

$$y=\frac{(A_1-A_2)}{A_1}\times 100\% \quad (1)$$

式中：

y——羟自由基清除率，%；

A_1——未加药组的吸光度；

A_2——加样品组的吸光度。

1.10 提取物对293T细胞氧化保护活性

1.10.1 细胞培养

将293T细胞培养在含有体积分数10%胎牛血清、100 μg/mL青霉素和50 μg/mL链霉素的DMEM高糖培养液中，于37 ℃含体积分数5% CO_2的培养箱中培养，在细胞密度达细胞培养瓶底面积80%时进行1∶3传代培养，取第3代或4代细胞进行后续试验。

1.10.2 细胞损伤模型的构建

在96孔板中接种200 μL浓度为5×10^4个/mL的293T细胞悬液，将其分为对照组和损伤组[24]，于37 ℃、含体积分数5% CO_2的培养箱中培养24 h。损伤组分别加入10 μL终浓度为0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.4、1.6、2.0 mmol/L的H_2O_2，同时在对照组中加入等体积的培养液。H_2O_2处理12 h后除去培养液，加入200 μL质量浓度为0.5 mg/mL的MTT溶液，在37 ℃、含体积分数5% CO_2的培养箱中孵育4 h，DMSO充分溶解后，测定各孔吸光度(检测波长为490 nm，参考波长为630 nm)，计算H_2O_2的IC_{50}值。每组设置5个平行孔，试验重复3次。

1.10.3 提取物对293T细胞氧化保护活性

96孔板中每孔接种200 μL浓度为5×10^4个/mL的细胞悬浮液，在37 ℃、含体积分数5% CO_2的培养箱中孵育24 h。将293T细胞分为空白组、对照组、损伤组和提取物保护组，每组设5个平行孔[25-26]。各组的处理方法分别为：提取物保护组中加入质量浓度为0.50、0.75、1.00 mg/mL的各提取物，空白组和损伤组加入等量DMEM培养液，对照组中加入质量浓度为1 mg/mL的提取液，在37 ℃、体积分数5%的CO_2培养箱中孵育24 h；随后在损伤组和提取物保护组中加入终浓度为1.6 mmol/L的H_2O_2，空白组和对照组中加入DMEM培养液培养12 h；最后用MTT法测定各组细胞的存活率。

1.11 各菌株子实体培养及主要活性成分产量的测定

大米-小麦培养基：大米8 g、小麦8 g、蚕蛹粉

0.2 g，加入含质量分数2.5%蛋白胨的培养液100 mL，置于500 mL锥形瓶中，高压灭菌后备用。

将菌株LH3、LY1和LY9培养至6 cm，用7 mm的打孔器打取菌碟接种于1/4 SDY培养液中，每250 mL培养液接种5个菌碟，于24 ℃、145 r/min条件下避光培养7 d。每个培养基中接种5 mL种子液，于15 ℃遮光培养至菌丝长满培养基表面，转移至光照周期为16 h/8 h（光/暗）的24 ℃培养箱中培养30 d，观察菌株的子实体生长情况。收集子实体进行干燥，以物料液比20 g∶1 mL进行提取，再根据1.8的方法对子实体提取物中活性成分进行测定。

1.12　统计学分析

试验数据用平均值±标准误差表示，采用Excel 2019软件进行分析，用SPSS 26.0（IBM）的ANOVA检验和邓肯法进行显著性分析（$P<0.05$），用GraphPad Prism 8.0进行柱状图的绘制。

2　结果与讨论

2.1　蛹虫草的形态学鉴定

对采集于陕西化龙国家级自然保护区的蛹虫草进行分离鉴定，最终获得3株菌落形态、显微结构相似的蛹虫草，分别命名为LH3、LY1、LY9。菌株LH3分离于浪河采集的样品，单个子实体从寄主顶端长出，基部为白色，头部为橙黄色，有分枝，见图1（a）。菌株LY1分离于老鸦场采集的样品，单个子实体从寄主背部长出，基部为白色，头部为橙黄色，细长有分枝，见图1（b）。菌株LY9分离于老鸦场采集的样品，双生子实体从寄主头部长出，基部为白色，头部为橙黄色，见图1（c）。蛹虫草适生区广泛，在亚洲、欧洲和美洲均有分布。在我国西藏、吉林、云南和海南等地都可采集到蛹虫草，野生蛹虫草的子实体数量和形态差异显著，且都分离到了蛹虫草[27]。



(a) LH3寄主　(b) LY1寄主　(c) LY9寄主

图1　LH3、LY1和LY9的寄主情况

Fig. 1　Host status of LH3, LY1, and LY9

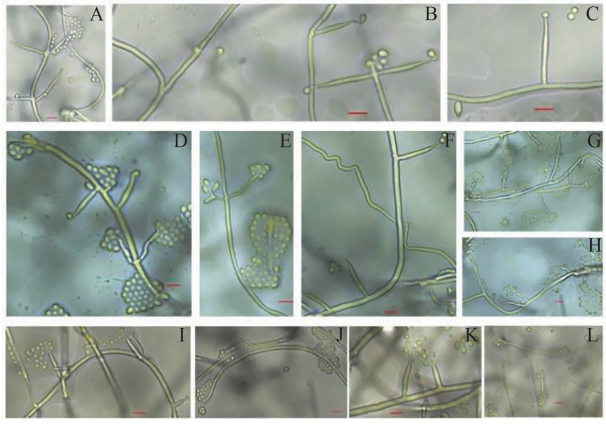
2.1.1　3株蛹虫草的显微形态特征

蛹虫草LH3、LY1、LY9的菌丝形态结构相似，均无色透明，表面光滑且具有分隔，宽2.0~3.5 μm。分生孢子梗单生或簇生，（15~20）μm×（2.0~3.5）μm。分生孢子多为球形，1.5~2.0 μm，成伞形分布于分生孢子梗周围，见图2。

2.1.2　3株蛹虫草的菌落形态特征

各菌株在PDA、1/4SDAY、查氏培养基中于24 ℃培养14 d，其菌落形态和生长速率差异见图3。

在避光条件下，菌株LH3、LY1和LY9在3种培养基上生长，菌丝正面为白色致密结构，菌落背面为米黄或浅黄色，菌株LH3和LY1在PDA培养基上生长速率最快，分别为（5.400±0.071）mm/d和（6.750±0.070）mm/d；而菌株LY9在1/4 SDAY培养基上生长最快，生长速率为（5.500±0.140）mm/d。菌株LH3、LY1和LY9在16 h/8 h（光/暗）光周期下培养3 d时出现转色现象，其中在1/4 SDAY培养基上菌株LY1菌落正面为橙黄色。



A~C—LH3; D~F—LY1; H~L—LY9。

图2　LH3、LY1和LY9的显微形态特征

Fig. 2　Microscopic features of LH3, LY1, and LY9

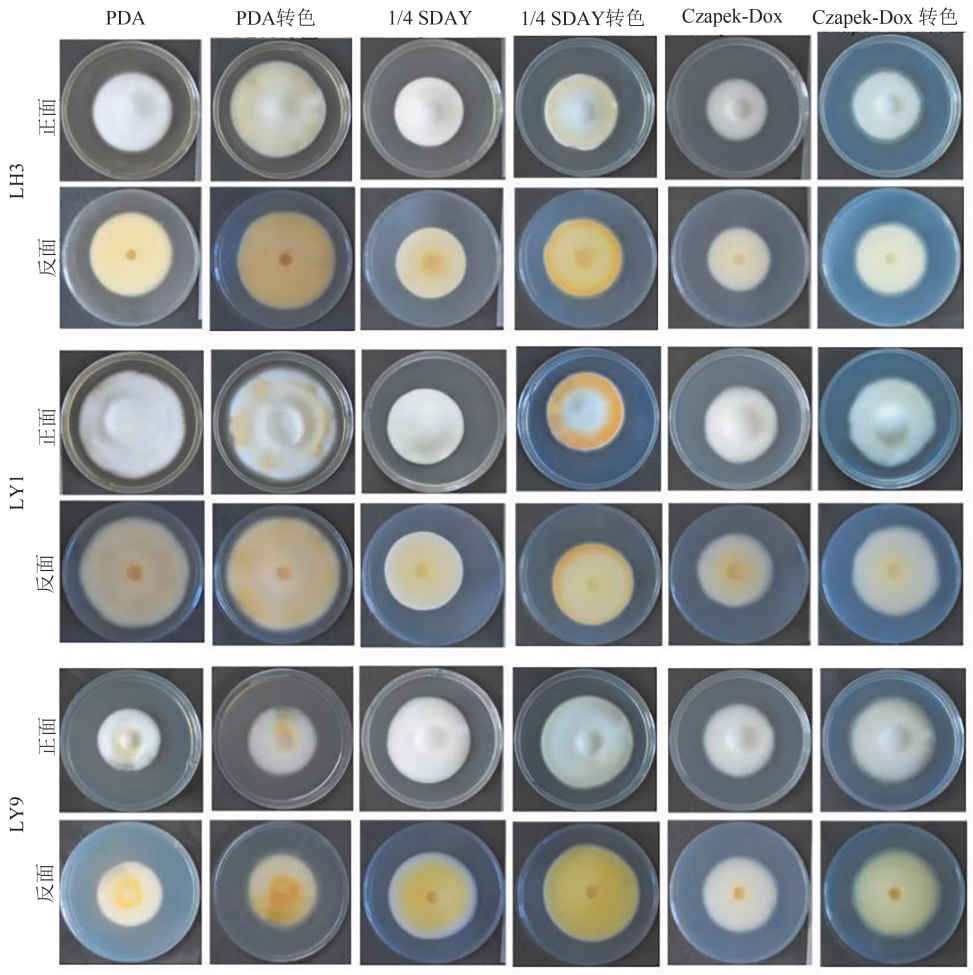


图 3　LH3、LY1 和 LY9 在不同培养基的菌落特征

Fig. 3　Colony features of LH3, LY1, and LY9 on different media

2.2　多基因系统发育分析

以 *Cordyceps javancia* CBS143.22 为外群建立系统发育树，结果显示：菌株 LH3 与菌株 *C. militaris* OSC93623 聚类在同一个小分支上；菌株 LY1 与 *C. militaris* NBRC 30377 聚类在同一个小分支上；菌株 LY9 与 *C. militaris* NBRC100741 聚类在同一个小分支上，见图 4。

2.3　提取物中主要活性成分产量

用 LS-MS 法分别测定虫草酸和虫草素的出峰时间和产量，虫草酸样品的标准曲线为

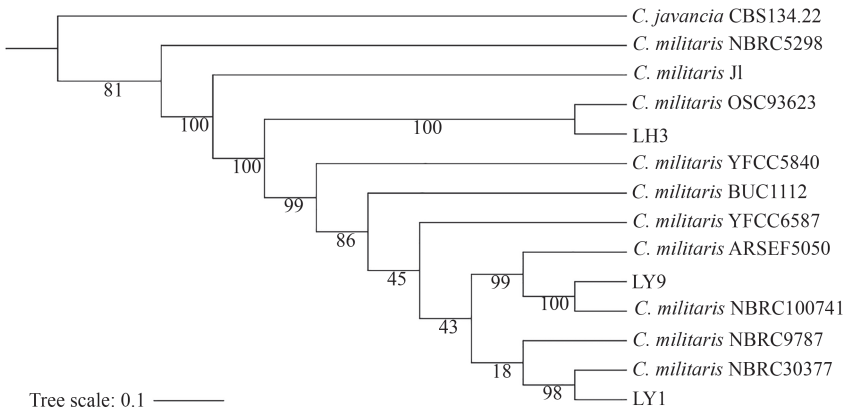


图 4　基于 *ITS*、*nrSSU*、*nrLSU*、*TEF*、*RPB1* 和 *RPB2* 基因构建系统发育树

Fig. 4　Phylogenetic tree based on *ITS*, *nrSSU*, *nrLSU*, *TEF*, *RPB1*, and *RPB2* genes

y=2 301.18x，R^2=0.995 7，保留时间为3.12 min；虫草素标准品的标准曲线为y=3 429 370x，R^2=0.994 7，保留时间为6.60 min；粗多糖的标准曲线为y=0.004x+0.145，R^2=0.999 2；没食子酸的标准曲线为y=0.000 058x+0.036，R^2=0.949 9。6种提取物的主要活性成分产量见表3。LY9H中虫草酸、粗多酚和粗多糖的产量显著高于其他提取物，而虫草素产量最高的是LY1F。虫草素是蛹虫草次生代谢物中最重要的指标物质，可用于蛹虫草品质鉴定和菌种资源筛选[28]。除了上述活性物质外，类胡萝卜素也是蛹虫草的一种重要次生代谢物，在高产菌株中类胡萝卜素产量可达472.3 μg/g[29]。

表3　6种提取物中主要活性成分产量

Table 3　Yields of main active compounds from six extracts

单位：mg/g

提取物	虫草酸产量	虫草素产量	粗多酚产量	粗多糖产量
LH3F	0.31±0.05^{e}	0.01±0.00^{f}	22.70±3.40^{b}	32.37±2.62^{d}
LY1F	0.00±0.00^{e}	0.53±0.02^{a}	16.72±3.63^{c}	32.94±1.90^{d}
LY9F	1.63±0.16^{b}	0.28±0.01^{c}	16.49±3.13^{c}	43.89±1.93^{c}
LH3H	1.18±0.05^{c}	0.10±0.00^{e}	21.59±2.17^{bc}	48.69±2.06^{b}
LY1H	0.61±0.06^{d}	0.32±0.01^{b}	19.90±3.35^{b}	48.15±2.97^{b}
LY9H	2.94±0.20^{a}	0.25±0.01^{d}	28.79±2.41^{a}	65.01± 4.85^{a}

注：不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

2.4　提取物的羟自由基清除作用

6种提取物均表现出较强的羟自由基清除能力，且呈现质量浓度依赖性，见表4。不同菌株的菌丝和发酵液提取物对羟自由基的清除能力有显著差异，其中菌株LY9的发酵液和菌丝提取物清除作用显著强于菌株LH3和LY1。

2.5　提取物对293T细胞氧化保护活性

羟自由基是机体受到氧化应激时产生的，机体内过量的羟自由基会损伤正常的抗氧化酶系统，甚至形成不可逆的损伤。当用1.00 mg/mL的各提取物处理293T细胞24 h后，细胞存活率接近100%，而用1.6 mmol/L的H_2O_2处理293T细胞后，细胞存活率接近50%。不同质量浓度的6种提取物预处理后的293T细胞在H_2O_2氧化胁迫后，细胞存活率变化见图5。在供试质量浓度范围内，对293T细胞的羟自由基氧化保护作用呈现质量浓度依赖性；当提取物质量浓度为1.00 mg/mL时，菌株LY9的菌丝提取物和发酵液提取物对293T细胞的羟自由基氧化保护作用最好。研究表明，蛹虫草

表4　6种提取物的羟自由基清除作用

Table 4　Hydroxyl radical scavenging effects of six extracts

提取物	IC_{50}值/（mg/mL）	95%置信区间	回归方程	x^2	P
LH3F	1.828	1.438~2.203	y=0.680x−0.178	12.869	0.993
LY1F	0.977	0.821~1.129	y=1.317x+0.014	10.026	0.999
LY9F	0.619	0.481~0.758	y=1.199x+0.250	11.905	0.997
LH3H	2.365	2.085~2.619	y=2.607x−0.975	32.035	0.077
LY1H	1.520	0.995~1.574	y=1.818x−0.205	1.558	1.000
LY9H	0.923	0.813~1.030	y=1.881x+0.066	23.452	0.710

注：IC_{50}值是通过SPSS的回归-概率模型进行数据分析得出。

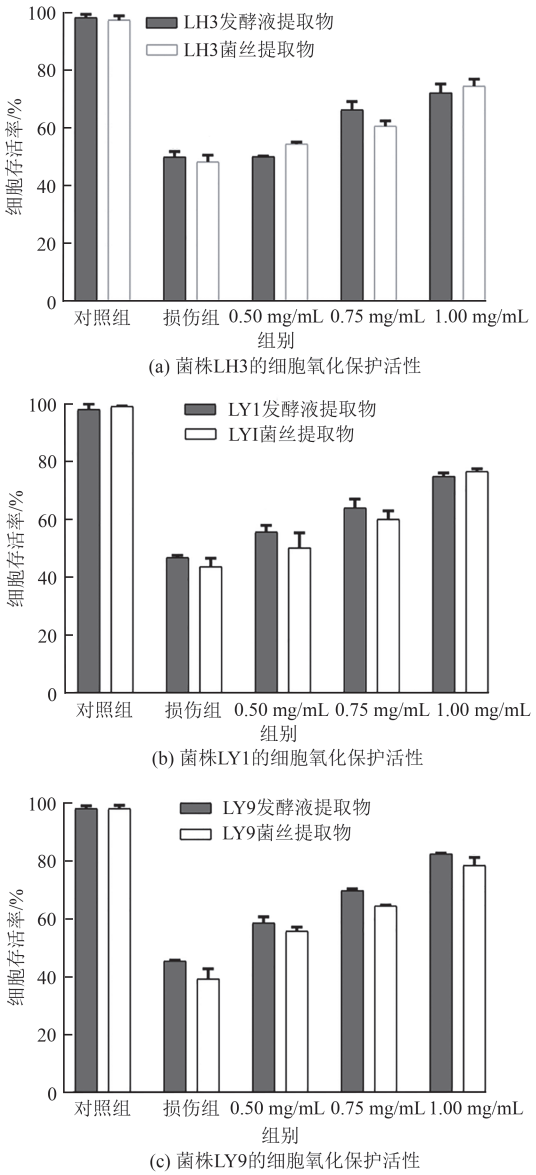


图5　6种提取物对H_2O_2诱导的293T细胞氧化保护活性的影响

Fig. 5　Effects of six extracts on the celluar oxidative protection viability of 293T cells exposed to H_2O_2

提取物能够消除细胞中过多的活性氧和丙二醛，同时还可以激活细胞中谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活性，从而提高细胞中氧化物的代谢水平[30]。

2.6 LY9子实体中主要活性成分产量

对3株虫草菌的子实体进行诱导培养后，仅LY9生长出正常的子实体，测定其主要活性物质的产量，见图6。相较于菌株LY9的菌丝和发酵液提取物，子实体中虫草素、粗多酚和粗多糖产量均显著提高，分别为（11.22±0.54）、（202.14±2.42）、（34.85±0.93）mg/g，但虫草酸产量显著降低，为（0.19±0.01）mg/g。菌株LY9的子实体中虫草素产量比其他高产菌株低，如菌株ZGCM子实体中虫草素产量为（12.82±0.85）mg/g[31]。蛹虫草中活性物质的产量可以通过改变培养方式[32-33]和营养条件[34]等来提高，如用液体培养基诱导子实体，可以缩短子实体的形成周期，其中蛋白质、脂肪及粗纤维较固体培养基中形成的子实体有显著差异[35]。从陕西化龙山国家级自然保护区分离到的蛹虫草LY9菌株可通过子实体的诱导培养来提升其活性物质产量。



图6 LY9子实体

Fig. 6 Fruiting bodies of LY9

3 结论

作者从陕西化龙山国家级自然保护区采集并分离获得3株生长特性和生物学活性具有明显差异的蛹虫草，为蛹虫草菌株资源库增添了新的成员。对获得的3株菌株中的主要活性成分产量、抗氧化活性和细胞氧化保护活性进行测定，结果表明菌株LY9菌丝提取物和发酵液提取物的生物活性较高，同时菌株LY9可以在大米-小麦培养基形成子实体，且有效成分显著高于菌丝和发酵液提取物。综上所述，菌株LY9的虫草素、虫草酸等活性物质的产量较高，具有良好的抗氧化和氧化保护活性以及子实体形成能力，具有商品化潜力。

参考文献

[1] 韩利红，付小林，王远献，等. 药用真菌蛹虫草优良菌株筛选及资源特性研究[J]. 热带作物学报，2022，43（8）：1604-1612.
HAN L H，FU X L，WANG Y X，et al. Screening of excellent strains and resource characteristics of the medicinal fungus *Cordyceps militaris*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops，2022，43（8）：1604-1612.（in Chinese）

[2] 梁宗琦，刘爱英，刘作易. 中国真菌志（第三十二卷）[M]. 北京：科学出版社，2013.

[3] 吴志刚，曹璨. ICP-MS法分析不同培养基培育蛹虫草及制品中23种元素[J]. 食品与发酵科技，2023，59（3）：96-102.
WU Z G，CAO C. Analysis of 23 kinds of elements in *Cordyceps militaris* and its products cultivated with different culture media by ICP-MS [J]. Food and Fermentation Science & Technology，2023，59（3）：96-102.（in Chinese）

[4] JIANG W，SUI Z J，ZHU Z Y. Effect of *Cordyceps militaris* polysaccharide on the solubility，stability and antioxidant properties of dihydromyricetin [J]. Process Biochemistry，2023，130：606-613.

[5] XU L N，GUO S，LI Y T，et al. Ultrasound-assisted enzymatic extraction and bioactivity analysis of polypeptides from *Cordyceps militaris* [J]. Journal of Chemistry，2023，2023（1）：1233867.

[6] HUANG S S，ZOU Y，TANG H B，et al. *Cordyceps militaris* polysaccharides modulate gut microbiota and improve metabolic disorders in mice with diet-induced obesity [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture，2023，103（4）：1885-1894.

[7] BACH M X，MINH T N，ANH D T N，et al. Protection and rehabilitation effects of *Cordyceps militaris* fruit body extract and possible roles of cordycepin and adenosine[J]. Compounds，2022，2（4）：388-403.

[8] DHONG K R，KWON H K，PARK H J. Immunostimulatory activity of *Cordyceps militaris* fermented with *Pediococcus pentosaceus* SC11 isolated from a salted small octopus in cyclophosphamide-induced immunocompromised mice and

its inhibitory activity against SARS-CoV 3CL protease[J]. Microorganisms，2022，10(12)：2321.

[9] LIU W W，DUN M Q，LIU X Y，et al. Effects on total phenolic and flavonoid content，antioxidant properties，and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of beans by solid-state fermentation with *Cordyceps militaris* [J]. International Journal of Food Properties，2022，25(1)：477-491.

[10] SUKSIRIWORAPONG J，PONGPRASERT N，BUNSUPA S，et al. CD44-targeted lipid polymer hybrid nanoparticles enhance anti-breast cancer effect of *Cordyceps militaris* extracts[J]. Pharmaceutics，2023，15(6)：1771.

[11] PEI H Y，HE Z M，CHEN W J，et al. Network pharmacology and molecular docking analysis on the mechanism of *Cordyceps militaris* polysaccharide regulating immunity through TLR4/TNF-α pathwayss[J]. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology，2023，37(6)：e23345.

[12] JĘDREJKO K，KAŁA K，SUŁKOWSKA-ZIAJA K，et al. *Cordyceps militaris*-fruiting bodies，mycelium，and supplements：valuable component of daily diet [J]. Antioxidants，2022，11(10)：1861.

[13] 王启军，许涛请，邓捷，等. 陕西化龙山国家自然保护区鱼类多样性分析[J]. 基因组学与应用生物学，2015，34(10)：2262-2269.
WANG Q J，XU T Q，DENG J，et al. Fish diversity analysis of Shaanxi Hualongshan Nature Reserve [J]. Genomics and Applied Biology，2015，34(10)：2262-2269.(in Chinese)

[14] 施金铎，唐汉尧，强子涵，等. 化龙山自然保护区甲虫自然分布规律[J]. 林业科技通讯，2022(11)：103-105.
SHI J D，TANG H Y，QIANG Z H，et al. Natural distribution of beetles in Hualong Mountain Reserve[J]. Forest Science and Technology，2022(11)：103-105.(in Chinese)

[15] 李德贤，施金铎，李昊杰，等. 陕西化龙山国家级自然保护区鳞翅目昆虫多样性与垂直分布研究[J]. 西北林学院学报，2022，37(1)：177-182，266.
LI D X，SHI J D，LI H J，et al. Diversity and vertical distribution of Lepidoptera insect communities in the Hualong Mountain National Nature Reserve，Shaanxi[J]. Journal of Northwest Forestry University，2022，37(1)：177-182，266.(in Chinese)

[16] ZHENG J Y，SHI J D，WANG D. Diversity of soil fungi and entomopathogenic fungi in subtropical mountain forest in southwest China [J]. Environmental Microbiology Reports，2024，16(4)：e13267.

[17] ALJANABI S M，MARTINEZ I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques[J]. Nucleic Acids Research，1997，25(22)：4692-4693.

[18] MENG Y，DAMITHRI W H D P，WANG D. A new strain of *Lecanicillium uredinophilum* isolated from Tibetan Plateau and its insecticidal activity[J]. Microorganisms，2022，10(9)：1832.

[19] 唐鱼，孟云，王敦，等. 四株虫生真菌的鉴定及其醇提取物对Hela细胞的抑制作用[J]. 微生物学通报，2021，48(3)：797-810.
TANG Y，MENG Y，WANG D，et al. Identification of four entomogenous fungi and the inhibitory effect of their ethanol extracts on Hela cells[J]. Microbiology China，2021，48(3)：797-810.(in Chinese)

[20] 孟云，唐汉尧，施金铎，等. 三种分离自冬虫夏草真菌及培养条件[J]. 菌物学报，2021，40(8)：1991-2007.
MENG Y，TANG H Y，SHI J D，et al. Three fungal strains isolated from stroma of *Ophiocordyceps sinensis* and their culture conditions[J]. Mycosystema，2021，40(8)：1991-2007.(in Chinese)

[21] DUBOIS M，GILLES K A，HAMILTON J K，et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. Analytical Chemistry，1956，28(3)：350-356.

[22] 李剑梅，朱万芹，柴林山，等. 蛹虫草多酚提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发，2023，44(8)：111-117.
LI J M，ZHU W Q，CHAI L S，et al. Optimization of extraction process of *Cordyceps militaris* polyphenols and its antioxidant activity [J]. Food Research and Development，2023，44(8)：111-117.(in Chinese)

[23] CHEN X，HUANG G L. Synthesis and antioxidant activities of garlic polysaccharide-Fe(III) complex[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2020，145：813-818.

[24] Lewandowski Ł，Bednarz-Misa I，Kucharska A Z，et al. Cornelian cherry (*Cornus mas* L.) extracts exert cytotoxicity in two selected melanoma cell lines-a factorial analysis of time-dependent alterations in values obtained with SRB and MTT assays [J]. Molecules，2022：27(13)：4193.

[25] WU G C，SHEN Y B，NIE R，et al. The bioactive compounds and cellular antioxidant activity of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall) seed oil from China[J].

Journal of Food Science，2020，85(11)：3815-3822.

[26] YANG D K，KIM S J. Cucurbitacin I protects H9c2 cardiomyoblasts against H_2O_2-induced oxidative stress *via* protection of mitochondrial dysfunction[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity，2018(1)：3016382.

[27] 刘晴，刘梦潜，王芬，等. 我国东北及山东部分地区野生蛹虫草资源采集及观察[J]. 菌物学报，2022，41(11)：1761-1771.
LIU Q，LIU M Q，WANG F，et al. Collection and observation of wild *Cordyceps militaris* resources in partial areas of Northeast China and Shandong province[J]. Mycosystema，2022，41(11)：1761-1771.(in Chinese)

[28] KRISHNA K V，DEVASIA J，MALAVIYA A. Development and validation of the UV-spectrophotometric method for the determination of cordycepin，a nucleoside[J]. Journal of Applied Spectroscopy，2024，91(1)：228-235.

[29] 付鸣佳. 蛹虫草产类胡萝卜素的研究[J]. 食品与生物技术学报，2005，24(5)：107-110.
FU M J. Study on the carotenoid produced from *Cordyceps militaris* L.[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2005，24(5)：107-110.(in Chinese)

[30] 孙彦庆，张京良，朱宗敏，等. 蛹虫草水提物及其对HaCaT细胞氧化损伤的保护作用[J]. 菌物学报，2025，44(4)：126-138.
SUN Y Q，ZHANG J L，ZHU Z M，et al. *Cordyceps militaris* aqueous extract and its protective effects against oxidative damage in HaCaT cells[J]. Mycosystema，2025，44(4)：126-138.(in Chinese)

[31] 林培捷，陈柏雄，陈乐涛，等. 高产虫草素的蛹虫草新品种选育[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(3)：59-65.
LIN P J，CHEN B X，CHEN L T，et al. Breeding of *Cordyceps militaris* with high content of cordycepin[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41(3)：59-65.(in Chinese)

[32] 岳翠翠，沈健增，蔡宇杰，等. 蛹虫草 *Cordyceps militaris* JN168产虫草素液态发酵条件的优化[J]. 食品与生物技术学报，2013，32(2)：135-141.
YUE C C，SHEN J Z，CAI Y J，et al. Optimization of fermentation conditions for cordycepin by *Cordyceps militaris* JN168[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2013，32(2)：135-141.(in Chinese)

[33] 杨帆，刘金彬，管政兵，等. 蛹虫草固态发酵产虫草素的优化[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(10)：30-36.
YANG F，LIU J B，GUAN Z B，et al. Optimization of cordycepin production by solid-state fermentation of *Cordyceps militaris*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2019，38(10)：30-36.(in Chinese)

[34] 麦梦贤，郭丽琼，魏韬，等. 蛹虫草新菌株ZA10-C4的培养体系优化及虫草素高效制备[J]. 食品与生物技术学报，2024，43(7)：85-94.
MAI M X，GUO L Q，WEI T，et al. Cultivation system of a novel *Cordyceps militaris* strain ZA10-C4 and efficient preparation of cordycepin[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2024，43(7)：85-94.(in Chinese)

[35] 郑世仲，林钦，姜春玲，等. 蛹虫草液体发酵培育子实体及其营养成分、色素稳定性分析[J]. 微生物学通报，2024，51(10)：4075-4088.
ZHENG S Z，LIN Q，JIANG C L，et al. *Cordyceps militaris* fruiting bodies：cultivation by liquid fermentation，nutrient composition，and pigment stability[J]. Microbiology China，2024，51(10)：4075-4088.(in Chinese)

（责任编辑：李春丽）