

中国被毛孢发酵物对睡眠剥夺亚健康大鼠的影响

傅惠英¹, 寿旗扬¹, 李艳伟², 翟云燕², 吕圭源^{1*}

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江大学, 浙江 杭州 310058)

[摘要] 目的: 观察中国被毛孢发酵物对亚健康大鼠血生化等指标的改善作用。方法: 连续 96h 的快速动眼相睡眠剥夺(REMSD)造成亚健康大鼠模型, 灌胃给予中国被毛孢发酵物后观察亚健康大鼠的体重、脏器指数、血 pH 值、血氧分压(PaO₂)、氧饱和度(SO₂%)、肝肾功能、超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)等指标。结果: 中国被毛孢发酵物能不同程度的改善睡眠剥夺大鼠亚健康体征, 增加大鼠体重, 调节血液酸碱度, 提高血氧分压和饱和度, 改善肝功能和自由基代谢异常等; 结论: 中国被毛孢发酵物具有较好的改善亚健康状态。

[关键词] 中国被毛孢发酵物; 亚健康; 睡眠剥夺

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)06-0059-04

Effects of *Hirsutella sinensis* Strain Fermentation in Sub-health Rats with Sleep Deprivation

FU Hui-ying¹, SHOU Qi-yang¹, LI Yan-wei², ZAI Yun-yan², LV Gui-yuan^{1*}

(1. Zhejiang University of TCM, Hangzhou 310053, China; 2. Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

[Abstract] **Object:** To investigate the effect of *Hirsutella sinensis* strain fermentation on sub-health rats with sleep deprivation. **Methods:** Continuous sleep deprivation of 96 hours caused sub-health in rats. After *Hirsutella sinensis* strain fermentation administration, the rats are detected those index, such as weight, organ index, blood pH, PaO₂, SO₂%, SOD and MDA. **Results:** The experimental result indicate that fermentation of *Hirsutella sinensis* strain can improve physical sign, gain weight, regulate blood pH, enhance PaO₂ and SO₂%, improve hepatic and renal function, retrieve free radical metabolism in sub-health rats. **Conclusion:** *Hirsutella sinensis* strain fermentation is benefit to sub-health rats.

[Key words] fermentation of *Hirsutella sinensis* strain; sub-health; sleep deprivation

中国被毛孢菌种(*Hirsutella sinensis* X. J. Liu, Y. L. Guo)最早由沈南英教授从青海冬虫夏草分离得到^[1],并由郭英兰教授正式定名^[2]。随着分子生物学技术发展,90年代后许多真菌学家通过遗传基因分析方法多次证明中国被毛孢为冬虫夏草无性型^[3~5]。同时,中国被毛孢在免疫系统、呼吸系统及泌尿系统等多方面药理实验也证明与天然冬虫夏草有相似的功效。本研究以天然冬虫夏草为对照,观察中国被毛孢发酵物对亚健康大鼠的改善作用,进

一步为人工虫草产品替代天然冬虫夏草提供依据。

1 材料

1.1 药物 中国被毛孢发酵物:黄色粉末,由杭州泰士生物科技有限公司提供(制备方法:以蚕蛹粉、玉米粉、葡萄糖等原料的水煮上清液为培养基,斜面培养菌种接种,培养温度18℃,种子摇瓶培养15~20d,发酵罐培养5~6d,板框过滤,固体匀浆,喷雾干燥,得中国被毛孢发酵物干粉;得率0.8%~1.5%,质控指标:腺苷≥0.05%、多糖≥5%及细胞动力学图谱);冬虫夏草:杭州泰士生物科技有限公司提供,由青海省畜牧兽医科学院沈南英教授鉴定(性状:其外型分为“虫”和“草”两部分,表面呈黄褐

[收稿日期] 2008-12-01

[通讯作者] * 吕圭源, Tel: (0571) 86613601; E-mail: lv.gy@

263.net

色, 环纹明显, 近头部环纹较细, 表面有足八对, 其中 4 对较明显, 头部 3 对和尾部 1 对不明显, 质脆易断)。临用前将冬虫夏草药材 60 °C 烘 1h, 打粉, 称取适量中国被毛孢发酵物和冬虫夏草粉末, 加蒸馏水, 分别配成 50, 5 mg·mL⁻¹ 的混悬液。

1.2 试剂 超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所); 尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)和丙氨酸氨基转移酶(ALT)测试试剂盒(上海申能-德赛诊断技术有限公司); 戊巴比妥钠(国药集团化学试剂有限公司, 批号 F20041117); 血气电解质试剂包(REAGENT PACKM, 批号 CAT No. 19667)。

1.3 动物 180~ 200g SPF 级雄性 SD 大鼠, 来源: 中科院上海实验动物试验中心/上海斯莱克实验动物公司, 生产许可证: SCXK(沪)2007-0006。

1.4 仪器设备 AF100 雪花状制冰机(美国 SCOTSMAN); 725 型-86 °C 低温冰箱(美国 FORMA); AG204 电子分析天平(瑞士 METTLER); TG-16 型高速冷冻离心机(上海安亭科技); 7020 全自动生化分析仪(日本日立); Micro 自动生化分析仪(荷兰 Merck Vitalab); 血气分析仪(美国 NOVA)。

2 方法

2.1 给药方法 取 60 只体重为 180~ 200 g 的雄性 SD 大鼠, 按体重随机分成 6 组, 即正常对照组、模型对照组、中国被毛孢发酵物高剂量组 0.5 g·kg⁻¹、中国被毛孢发酵物低剂量组 0.05 g·kg⁻¹、冬虫夏草高剂量组 0.5 g·kg⁻¹ 及冬虫夏草低剂量组 0.05 g·kg⁻¹, 每组 10 只。除模型对照组和正常对照组灌胃给予蒸馏水 10 mL·kg⁻¹ 外, 其余四组分别灌胃给予相应剂量的中国被毛孢发酵物和冬虫夏草, 每日一次, 连续给药 14 d。

2.2 亚健康大鼠模型建立^[6] 给药第 10 天, 除正常对照组外, 其余各组进行连续 96 h 的快速动眼相睡眠剥夺(REMSD), 采用小平台水环境法建立大鼠睡眠剥夺(SD)模型, 制作一 30 cm × 30 cm × 30 cm 的鼠箱, 其中央为直径 6.3 cm、高 6.0 cm 的平台, 在平台周边注满水, 水温保持在 20 °C 左右, 水面距平台面约 1.0 cm。大鼠在平台上可自行进食饮水。若其睡眠, 则由于肌肉张力松弛而落入水中, 大鼠只能重振精神爬上平台, 这样反复多次达到睡眠剥夺效果, 在大鼠活动空间内给予 40 W 日光灯持续照明, 室内温度控制在 22~ 24 °C, 连续睡眠剥夺 96 h。

2.3 指标观察 96 h 造模后, 称大鼠禁食后体重, 腹腔注射 3% 戊巴比妥钠(45 mg·kg⁻¹) 麻醉, 打开腹腔, 用 2.5 mL 一次性注射器腹主动脉取血 0.5 mL 并用肝素抗凝, 在血气仪测定血液 pH 值、血氧和血液电解质; 另取 5.0 mL 血分离血清, 用于测定 BUN, Cr, AST, ALT, SOD 和 MDA 的指标, 取胸腺、肝脏和脾脏并用分析天平称重, 计算胸腺、肝脏和脾脏指数。

2.4 统计学方法 所有结果均以($\bar{x} \pm s$)表示, 使用 SPSS10.0 统计软件进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 对体重和脏器指数的影响 模型对照组大鼠睡眠剥夺后, 疲劳困倦程度随睡眠剥夺时间的延长而逐渐加深, 表现为经常低头打盹、精神萎靡不振, 毛发松散失去光泽, 进食减少, 活动减少, 对外界刺激反应减弱等亚健康体征, 体重减轻。与模型对照组比较, 各给药组大鼠精神状况、反应、毛色均有明显改善, 中国被毛孢发酵物和冬虫夏草高剂量组在体重、脾脏、胸腺指数均有不同程度的升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而两者的低剂量组对脾脏和肝脏作用都不明显, 见表 1。

表 1 中国被毛孢发酵物对睡眠剥夺大鼠体重和各脏器指数的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	体重(g)		脾脏指数 (g·kg ⁻¹)	胸腺指数 (g·kg ⁻¹)	肝脏指数 (g·kg ⁻¹)
		给药前	给药 14 d 后			
正常	—	207.40 ± 9.97	311.6 ± 16.5 ²⁾	3.07 ± 0.55 ²⁾	1.57 ± 0.27 ²⁾	40.48 ± 5.55 ²⁾
模型	—	212.50 ± 6.79	239.8 ± 10.8	2.41 ± 0.27	1.07 ± 0.28	33.08 ± 3.47
中国被毛孢	0.5	212.90 ± 5.72	256.8 ± 14.8 ²⁾	2.84 ± 0.35 ¹⁾	1.51 ± 0.28 ²⁾	35.87 ± 2.24
	0.05	212.70 ± 7.63	252.3 ± 14.5 ¹⁾	2.77 ± 0.58	1.35 ± 0.25 ¹⁾	35.56 ± 3.11
冬虫夏草	0.5	212.70 ± 8.64	262.5 ± 15.1 ²⁾	2.80 ± 0.36 ¹⁾	1.51 ± 0.29 ²⁾	36.65 ± 1.65 ¹⁾
	0.05	213.00 ± 9.26	256.6 ± 13.6 ²⁾	2.74 ± 0.44	1.46 ± 0.30 ²⁾	35.18 ± 2.32

注: 与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)

3.2 对睡眠剥夺大鼠肝、肾功能的影响 模型对照组大鼠睡眠剥夺后血清中 ALT, AST 和 BUN 水平明显升高 ($P < 0.01$), 血清中 Cr 水平无变化; 与模型对照组比较, 中国被毛孢发酵物和冬虫夏草高剂量组大鼠血清中 ALT, AST, BUN 显著降低 ($P < 0.01$), 而两者的低剂量组除 ALT 外, 对 AST, BUN 也有明显的降低 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 中国被毛孢发酵物对睡眠剥夺大鼠肝、肾功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	ALT(U·L ⁻¹)	AST(U·L ⁻¹)	BUN(mmol·L ⁻¹)	Cr(μmol·L ⁻¹)
正常	—	37.73 ± 11.09 ²⁾	93.45 ± 34.67 ²⁾	4.48 ± 1.18 ²⁾	37.78 ± 9.59
模型	—	55.43 ± 12.91	147.33 ± 30.74	6.09 ± 0.66	37.50 ± 4.58
中国被毛孢	0.5	41.33 ± 7.02 ¹⁾	110.78 ± 19.61 ²⁾	5.06 ± 0.74 ²⁾	37.50 ± 2.92
	0.05	49.00 ± 7.62	114.00 ± 35.41 ¹⁾	5.21 ± 0.80 ¹⁾	38.13 ± 4.49
冬虫夏草	0.5	43.44 ± 6.33 ¹⁾	72.60 ± 15.64 ²⁾	4.97 ± 0.75 ²⁾	38.10 ± 3.87
	0.05	49.86 ± 9.60	118.60 ± 28.33 ¹⁾	5.17 ± 0.67 ¹⁾	38.67 ± 3.32

3.3 对睡眠剥夺大鼠血清中 SOD 和 MDA 水平的影响 与正常对照组比较, 模型对照组大鼠睡眠剥夺后血清中 SOD 水平明显降低 ($P < 0.01$), 血清中 MDA 水平明显升高 ($P < 0.01$); 与模型对照组比较, 中国被毛孢发酵物和冬虫夏草高、低剂量组均有不同程度的升高大鼠血清 SOD 水平和降低血清 MDA 水平 ($P < 0.05, P < 0.01$), 见表 3。

表 3 中国被毛孢发酵物对睡眠剥夺大鼠 SOD 和 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	SOD (U·L ⁻¹)	MDA (mmol·mL ⁻¹)
正常	—	233.3 ± 12.1 ²⁾	6.40 ± 0.91 ²⁾
模型	—	197.3 ± 12.3	8.28 ± 1.71
中国被毛孢	0.5	215.7 ± 13.5 ¹⁾	5.87 ± 0.58 ²⁾
	0.05	215.4 ± 22.9 ¹⁾	6.19 ± 1.46 ²⁾
冬虫夏草	0.5	227.2 ± 23.2 ²⁾	6.17 ± 0.39 ²⁾
	0.05	222.5 ± 10.3 ²⁾	6.11 ± 1.26 ²⁾

3.4 对睡眠剥夺大鼠血 pH 值和血氧的影响 大鼠睡眠剥夺后体内血液 pH 值降低, 出现酸中毒, 与模型对照组比较, 中国被毛孢发酵物高、低剂量组和冬虫夏草高剂量组均可不同程度提高大鼠血液 pH 值和血液血氧分压 (PaO₂) 和氧饱和度 (SO₂)% ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而冬虫夏草低剂量组对血液 PaO₂ 和 SO₂% 作用不明显 ($P > 0.05$), 见表 4。

表 4 中国被毛孢发酵物对睡眠剥夺大鼠血 pH 值和血氧的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	血 pH 值	PaO ₂ (mmHg)	氧饱和度 (SO ₂ %)
正常	—	7.418 ± 0.031 ²⁾	99.94 ± 13.29 ²⁾	95.16 ± 1.80 ²⁾
模型	—	7.362 ± 0.018	73.03 ± 6.39	76.80 ± 3.52
中国被毛孢	0.5	7.399 ± 0.025 ²⁾	92.05 ± 11.76 ²⁾	91.73 ± 8.23 ²⁾
	0.05	7.400 ± 0.029 ¹⁾	90.07 ± 7.26 ²⁾	89.4 ± 10.64 ¹⁾
冬虫夏草	0.5	7.408 ± 0.035 ²⁾	92.95 ± 15.07 ²⁾	91.75 ± 6.10 ²⁾
	0.05	7.409 ± 0.020 ²⁾	85.33 ± 16.03	86.56 ± 8.36

4 讨论

研究发现大鼠睡眠剥夺后伴随体重下降, 机体免疫系统减弱, 对病原抵抗力下降, 表现为疲惫不堪、皮毛蓬乱无光泽, 先烦躁后抑制等症^[7]。本研究结果表明中国被毛孢发酵物对睡眠剥夺后的大鼠精神状况、反应能力、毛色均有明显改善, 并能在一定程度上抵抗睡眠剥夺后引起的体重下降及脾脏、胸腺等免疫器官的萎缩。在长时间睡眠剥夺的情况下, 机体为维持清醒状态会大量消耗能量而处于高代谢状态, 机体需大量进食以补充能量消耗, 势必增加体内耗氧量, 血液 PaO₂ 下降, 血液 pH 值下降, 严重会引起酸中毒, 本研究结果表明中国被毛孢发酵物能抵抗睡眠剥夺引起的 PaO₂ 和血 pH 值下降, 提高血液 SO₂%。长时间的睡眠剥夺是一种中枢性疲劳^[8], 模型组大鼠血清中 ALT, AST 和 BUN 水平明显升高, 研究结果表明中国被毛孢发酵物高剂量组能显著降低睡眠剥夺大鼠血清中 ALT, AST, BUN 水平; 睡眠剥夺引起的病理变化过程中还伴有活性氧的形成, 若超过机体的抗氧化能力, 可引起氧化应激。唐庆娟等^[9] 研究显示睡眠剥夺使机体抗氧化能力降低: 睡眠剥夺大鼠体重在 48 h 后有降低趋势, 72 h 后显著降低; 血浆 MDA 含量在 48 h 有增高趋势, 72 h 显著增高。研究结果表明中国被毛孢发酵物高、低剂量组均能明显升高 SOD 活性, 降低 MDA 水平, 改善自由基代谢异常。

综上所述, 中国被毛孢发酵物能明显改善睡眠剥夺大鼠亚健康体征, 减轻睡眠剥夺引起的体重下降, 调节血液酸碱度, 提高血液氧分压和饱和度及改善肝肾功能等, 具有较好的改善亚健康状态和抗疲劳作用, 且中国被毛孢发酵物和天然冬虫夏草对改善亚健康状态效果基本一致, 为人工虫草替代天然冬虫夏草进一步提供依据。

[参考文献]

- [1] 沈南英,曾璐,张显耻,等.冬虫夏草真菌的分离[J].食用菌,1983,(5):1.
- [2] 刘锡17郭英兰,俞永信,等.冬虫夏草菌无性阶段的分离和鉴定[J].真菌学报,1989,8:35.
- [3] 赵锦,王宁,陈月琴,等.冬虫夏草无性型的分子鉴别[J].中山大学学报(自然科学版),1999,38(1):121.
- [4] 王宁,陈月琴,章卫民,等.虫草属多元起源的分子生物学证据[J].中山大学学报(自然科学版),2000,39(14):70.
- [5] 魏鑫丽,印象初,郭英兰,等.冬虫夏草及其相关类群的分子系统学分析[J].菌物学报,2006,25(2):192.
- [6] 陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1994:356.
- [7] 赵莲,赵凤.睡眠剥夺影响机体生理功能[J].青海医药杂志,2006,36(1):26.
- [8] 李晓勇,靳文,赵晓山,等.复合因素致慢性疲劳大鼠运动能力及血生化变化[J].广东医学,2008,29(6):892.
- [9] 唐庆娟,陶凯忠,崔瑞耀,等.全睡眠剥夺对大鼠氧化应激水平的影响[J].中国公共卫生,2004,20(6):748.