

金针菇发酵液的溶栓作用研究

沈明花, 彭 瀛, 宋晓琳
(延边大学医学部, 吉林 延吉 133000)

摘 要:目的: 探讨金针菇发酵液的溶栓作用。方法: 在体外检测金针菇发酵液水解纤维蛋白的能力和对兔血凝块溶解时间; 观察金针菇发酵液对昆明种小鼠体内出血、凝血时间的影响; 采用高脂血症小鼠模型, 观察对血脂水平的影响。结果: 金针菇发酵液可水解纤维蛋白, 明显延长小鼠凝血时间及出血时间, 明显降低高脂血症小鼠总甘油三酯和总胆固醇含量。结论: 金针菇发酵液具有溶栓作用, 其机制可能与其抗凝、降脂作用以及水解纤维蛋白作用有关。

关键词: 金针菇发酵液; 溶栓; 抗凝; 血脂

Thrombolytic Function of Fermentation Broth of *Flammulina velutipes*

SHEN Ming-hua, PENG Ying, SONG Xiao-lin
(College of Medical, Yanbian University, Yanji 133000, China)

Abstract: Objective: To explore the thrombolytic function of fermentation broth of *Flammulina velutipes* (FV). Methods: The fibrinolytic and clot liquefaction activity of the fermentation broth *in vitro* was measured, and its effect on bleeding time and coagulation time in Kunming mice were evaluated. Meanwhile, its effect on blood lipids was also evaluated in hyperlipidemic animal models. Results: The fermentation broth had fibrinolytic activity, and could prolong coagulation time and bleeding time, and reduce serum levels of total triglycerides and total cholesterol in hyperlipidemic animals. Conclusion: FV fermentation broth has thrombolytic function due to its anticoagulant, hypolipidemic and fibrinolytic functions.

Key words: fermentation broth of *Flammulina velutipes*; thrombolytic activity; anticoagulation; blood lipid

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)17-0246-03

金针菇(*Flammulina velutipes* F.v), 又名冬菇、青杠菌、朴菇, 隶属担子菌亚门、层菌纲、伞菌目、口蘑科、金钱菌属。作为药食用菌, 金针菇具有抗肿瘤^[1]、抗氧化^[2]、护肝^[3-4]、调节免疫^[5-6]等功效。Park等^[7]从金针菇菌丝体中分离纯化了分子质量为37kD的溶栓酶。本实验主要研究金针菇发酵液的体外溶栓作用、对机体的出血、凝血时间以及血脂的影响, 为其综合利用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

金针菇菌种由韩国益山大学特种作物加工实验室提供。在25℃、150r/min液体深层二级培养15d。将发酵液用纱布过滤, 收集滤液以3000r/min离心15min后将上清液进行冷冻干燥, 得样品。

纤维蛋白原、凝血酶 美国Sigma公司; 阿司匹林肠溶片 吉林华康药业股份有限公司; 洛伐他汀胶囊 扬子江药业集团有限公司; 总甘油三酯、总胆固醇试剂盒 南京建成生物工程研究所。

1.2 动物

清洁级健康昆明种小鼠, 18~22g, 雌雄各半; 雄性家兔, 均由延边大学医学部动物科提供。

1.3 方法

1.3.1 纤溶活性的鉴定

采用纤维蛋白平板法^[8]。用无菌打孔器在纤维蛋白平板内打5个孔, 每孔加样20μL, 样品分别为5、10、20mg/mL的金针菇发酵液、生理盐水(正常对照)和阳性对照尿激酶(酶活力 1×10^4 U)。置于37℃培养箱中保温18h后取出, 观察平板内纤维蛋白水解而形成的透明溶圈。

1.3.2 金针菇发酵液对血凝块的体外溶解作用

收稿日期: 2011-07-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(30760150)

作者简介: 沈明花(1970—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食用菌生物活性。E-mail: sdjjch@ybu.edu.cn

采集兔子血使其发生自然凝固,用滤纸吸干其表面。将血块切成0.5g小块,放入试管中后分别加入5、10、20mg/mL质量浓度的金针菇发酵液1mL,置于37℃恒温水浴。隔2、4、8h将血块取出,吸干称质量,连续测定3次,计算其溶栓率。以生理盐水作为正常对照组,阿司匹林(50mg/mL)作为阳性对照组。

$$\text{溶栓率}/\% = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100$$

式中: m_1 为加药前血块质量/g; m_2 为加药后血块质量/g。

1.3.3 金针菇发酵液对体外血凝的影响

将兔子断头取血。取15支试管分5组,每组3个平行管,各加入兔动脉血0.5mL,再分别加入生理盐水(正常对照)、阿司匹林(50mg/mL)阳性对照,不同质量浓度(5、10、20mg/mL)的金针菇发酵液各0.3mL。置37℃恒温水浴,用玻片法^[9]测定凝血时间。

1.3.4 金针菇发酵液对小鼠凝血、出血时间的影响

将50只小鼠按体质量随机分为5组,设正常对照组,阳性对照组(阿司匹林组,5mg/(kg·d)),金针菇发酵液低、中、高剂量组(50、100、200mg/(kg·d))。每日灌胃给药1次,连续10d(正常对照组灌等量的生理盐水)。末次给药1h后,以弯头眼科镊迅速摘取眼球,将血滴于载玻片两端各1滴,每隔30s用大头针轻轻地跳动血滴1次,当有血丝被挑起时停止计时,记录凝血时间,此段时间为全血凝固时间,另1滴血供复验。

动物分组及处理同1.3.4节。采用断尾法^[10]测定小鼠出血时间。

1.3.5 金针菇发酵液对高脂血症小鼠血脂的影响

将60只小鼠按体质量随机分为6组,设正常对照组,高脂模型组,阳性对照组(洛伐他汀组),金针菇发酵液低、中、高剂量组(50、100、200mg/(kg·d))。每日灌胃给药1次,连续10d,正常对照组和高脂模型组灌等量的生理盐水。于末次给药后2h,除正常对照组外,其余各组小鼠均腹腔注射75%新鲜蛋黄乳液(0.5mL/只)造成实验性高脂血症。造模后禁食20h,摘除眼球取血,分离血清,测小鼠血清中总甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)含量。

1.3.6 指标测定方法

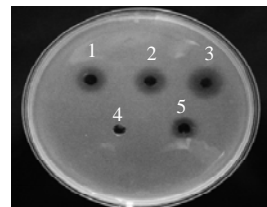
实验指标测定均按试剂盒说明书操作。

1.3.7 统计学处理

用SPSS统计软件处理,进行单因素方差分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与分析

2.1 金针菇发酵液的纤溶活性鉴定



孔1~3分别表示5、10、20mg/mL的金针菇发酵液,孔4为生理盐水,孔5为尿激酶。

图1 金针菇发酵液的纤溶活性鉴定

Fig.1 Fibrinolytic activity of FV fermentation broth

由图1可知,孔1~3透明环透明度相同,其抑菌圈直径分别为1.47、1.51、1.94cm,呈递增趋势,第4孔无透明环。第5孔的透明环直径1.45cm,即尿激酶与金针菇低剂量溶解效果相似。

2.2 金针菇发酵液对血凝块的溶解作用

表1 金针菇发酵液对血块的体外溶解作用($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Thrombolytic effect of FV fermentation broth *in vitro* ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	溶栓率/%		
	2h	4h	8h
正常对照组	16	16	25
阳性对照组	19	19	49
金针菇发酵液	低剂量组	20	36
	中剂量组	24	54
	高剂量组	35	42

由表1可知,在同一时间段内阿司匹林和金针菇发酵液的血凝块溶解效果高于生理盐水,说明它们具有一定的溶栓能力。除了高剂量组8h时间段以外,其余各时间段各剂量用药组的溶栓率均大于阿司匹林组。

2.3 金针菇发酵液对体外血凝的影响结果

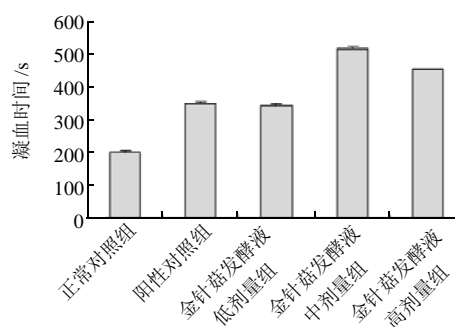


图2 金针菇发酵液对体外血凝的影响

Fig.2 Effect of FV fermentation broth on blood coagulation *in vitro*

由图2可知,不同剂量的金针菇发酵液作用以后的凝血时间长于正常对照组,尤其是中、高剂量组效果显著,与阳性对照组也有显著差异。

2.4 金针菇发酵液对小鼠出血、凝血时间的影响

表2 金针菇发酵液对小鼠出血、凝血时间的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of FV fermentation broth on bleeding time and coagulation time($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	出血时间/s	凝血时间/s
正常对照组	189.1 \pm 57.9	149.3 \pm 50.8
阳性对照组	251.6 \pm 34.2 [#]	220.0 \pm 44.0 [#]
低剂量组	243.4 \pm 52.8	150.3 \pm 19.8**
金针菇发酵液 中剂量组	398.7 \pm 98.3 ^{##*}	217.0 \pm 68.6
高剂量组	342.0 \pm 54.4 ^{##}	243.6 \pm 61.1 [#]

注: #.与正常对照组比较,差异显著($P < 0.05$); ##.与正常对照组比较,差异极显著($P < 0.01$); *.与阳性对照组比较,差异显著($P < 0.05$); **.与阳性对照组比较,差异极显著($P < 0.01$)。下同。

由表2可知,对出血时间而言,除金针菇发酵液低剂量组与正常对照组无显著差异以外,其余各组出血时间明显延长。中剂量组出血时间明显长于阳性对照组。高剂量组凝血时间与正常对照组相比有显著性差异,但与阳性对照组比较无统计学差异。

2.5 金针菇发酵液对小鼠血脂的影响

表3 金针菇发酵液对小鼠血脂的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Effect of FV fermentation broth on blood lipids ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	TG 含量/(mmol/L)	TC 含量/(mmol/L)
正常对照组	0.89 \pm 0.17 ^{***}	1.65 \pm 0.15 ^{***}
高脂模型组	5.01 \pm 1.27 [*]	6.78 \pm 1.71 ^{**}
阳性对照组	2.95 \pm 1.70 [#]	3.21 \pm 0.77 ^{##}
低剂量组	2.32 \pm 0.57 ^{##}	2.78 \pm 0.70 ^{##}
金针菇发酵液 中剂量组	2.29 \pm 1.35 ^{##}	2.70 \pm 0.39 ^{##}
高剂量组	1.88 \pm 0.49 ^{##}	2.29 \pm 0.63 ^{##}

由表3可知,高脂模型组TG和TC含量显著高于正常对照组,说明高脂血症模型成功。阳性对照组和金针菇发酵液组显著降低血脂水平,与高脂模型组相比有显著性差异。金针菇发酵液组剂量与血脂水平呈剂量依赖性。金针菇发酵液组血脂水平与阳性对照组相比较低,但因标准差大,统计学上无显著性差异。

3 讨论

血栓形成的机制比较复杂,其形成与血管内膜损伤、血小板功能异常、血液黏度改变、凝血和纤溶系统功能异常等密切相关。本实验主要观察金针菇发酵液的体外溶栓作用以及对机体的出、凝血时间的影响和对血脂水平的影响。在本实验所测定的剂量范围内金针菇发酵液的溶栓率大于阿司匹林,并在体外可水解纤维蛋白,明显延长机体的出、凝血时间,这就说明其发酵液中有可能含有溶解血栓或抗凝的某种活性成分。Park

等^[7]研究结果表明,从金针菇菌丝体中分离的溶栓酶在体外可直接水解纤维蛋白和纤维蛋白原。由此,认为在液体发酵过程中,金针菇菌丝体有可能向培养液分泌一些溶栓酶或抗凝成分。这种溶栓酶有可能直接或间接水解纤维蛋白或纤维蛋白原,从而抑制血液凝固或抑制血小板聚集,起到抗血栓或溶血栓的作用。此外,实验还进行了金针菇发酵液对血脂的影响方面的初步研究。在血栓形成的诸多因素中,高脂血症占十分重要的地位。血脂增加或脂质异常都可引起血管内皮损伤,导致内皮脱落,组织因子释放,激活凝血系统,出现高凝状态^[11]。因此,通过降低血脂水平可达到防治血栓性疾病的目。本实验结果显示,金针菇发酵液降低血清TC和TG水平,说明它可降低血液黏稠度。这种血液黏度的改变与溶栓机制有密切联系。有文献报道金针菇具有抗氧化作用^[12]。本研究过程中发现,金针菇发酵液具有清除超氧阴离子自由基、羟自由基、DPPH自由基等,并提高机体的总抗氧化能力(实验结果未体现)。初步认为金针菇的这种抗氧化作用有可能成为降脂作用的机制之一。至于金针菇发酵液是否具有体内溶栓作用或其相关机制的研究有待进一步进行。金针菇发酵液具有纤溶、抗凝和降脂作用,这有可能成为其溶栓作用的机制。

参考文献:

- [1] HIROFUMI M, TETSURO I. Immunomodulation and antitumor activity of a mushroom product, proflamin, isolated from *Flammulina velutipes* (W. Curt.: Fr.) Singer (Agaricomycetidae)[J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2007, 9(2): 109-122.
- [2] BAO H N, OCHIAI Y, OHSHIMA T. Antioxidative activities of hydrophilic extracts prepared from the fruiting body and spent culture medium of *Flammulina velutipes*[J]. Bioresource Technol, 2010, 101(15): 6248-6255.
- [3] PANG Xiubing, YAO Wenbing, YANG Xiaobing. Purification, characterization and biological activity on hepatocytes of a polysaccharide from *Flammulina velutipes* mycelium[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 70(3): 291-297.
- [4] 李怡芳, 曾怀苇, 王敏金, 等. 针菇多糖对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 广东药学院学报, 2010, 26(2): 162-165.
- [5] YIN H, WANG Y, WANG Y, et al. Purification, characterization and immuno-modulating properties of polysaccharides isolated from *Flammulina velutipes* mycelium[J]. Am J Chin Med, 2010, 38(1): 191-204.
- [6] CHANG Hualei, LEI Linsheng, YU Chuanlin, et al. Effect of *Flammulina velutipes* polysaccharides on production of cytokines by murine immunocytes and serum levels of cytokines in tumor-bearing mice[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2009, 32(4): 561-563.
- [7] PARK S E, LI M H, KIM J S, et al. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from a culture supernatant of *Flammulina velutipes* mycelia[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2007, 71(9): 2214-2222.
- [8] ASTRUP T, MULLERTZ S. The fibrin plate method for estimating of fibrinolytic activity[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1952, 40: 346-351.
- [9] 龚国清, 钱之玉, 周曙. 新药复方地龙胶囊的药效学研究[J]. 中国新药杂志, 2001, 10(11): 821-823.
- [10] 蔺新英, 郭冬梅, 苏维娜, 等. 豆豉提取液抗凝血作用的实验研究[J]. 中国老年学杂志, 2006, 26(8): 1081-1082.
- [11] 张秋灵, 孙萌. 缺血性脑卒中患者血黏度和血脂关系探讨[J]. 实用临床医药杂志, 2009, 13(6): 80-81.
- [12] 缪成贵, 韩飞园, 钟敏. 金针菇总黄酮的提取及抗油脂氧化作用研究[J]. 安徽农学通报, 2009, 15(23): 157-159.