

人工冬虫夏草多糖提取物对小鼠免疫功能的影响*

钟建春, 张艳, 丁振涛, 叶克难

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要: 为研究人工冬虫夏草多糖提取物对小鼠免疫功能的影响, 采用小鼠的体质量法, 脾脏、胸腺质量法, 迟发型变态反应试验法, 及单核巨噬细胞吞噬功能试验法研究了多糖提取物对小鼠免疫影响。实验结果表明: 人工虫草多糖提取物可以增加小鼠胸腺质量; 改善 DNFB 诱发的小鼠迟发型变态反应; 也能明显提高单核巨噬细胞的吞噬能力, 但对小鼠体质量没有影响。因此人工冬虫夏草多糖具有增强小鼠免疫功能的作用。

关键词: 人工冬虫夏草; 多糖提取物; 免疫功能

中图分类号: R979.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579(2011)06-0099-04

Effect of Polysaccharide Extract from Artificial *Cordyceps sinensis* on Immune Function of Mouse

ZHONG Jianchun, ZHANG Yan, DING Zhentao, YE Kenan

(School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: To study the effect of polysaccharide extract from artificial *Cordyceps sinensis* on immune function of mouse, the methods including weight test of mice themselves and immune organs such as spleen and thymus gland, delayed hypersensitivity test, phagocytic function of monocyte macrophage test were adopted to evaluate the effect of polysaccharide extract on immune function of mouse. The results indicate polysaccharide extract can increase the weight of thymus gland and improve the delayed hypersensitivity induced by DNFB, it also can enhance phagocytic ability of monocyte macrophages but has no effect on the body weight of mouse. So *Cordyceps sinensis* may strengthen the immune function of mouse.

Key words: artificial *Cordyceps sinensis*; polysaccharide extract; immune function

冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc 是我国的一种具有 1 200 多年历史的名贵中草药, 和人参、鹿茸统称为传统的三大补品。冬虫夏草是麦角菌科冬虫夏草菌 *Cordyceps sinensis* 的子座及其寄主蝙蝠蛾科 *Hepialus armoricanus* 冬虫夏草幼虫尸体的复合物。古代医学认为虫草具有保肺益肾, 止血化痰, 已劳嗽的疗效。现代医学研究表明虫草具有良好的抗击肿瘤细胞的生长^[1-2], 延缓衰老^[3-4], 保护肝脏^[5-7]等功能。特别是虫草多糖 (Polysaccharides from cultured mycelium of *Cordyceps sinensis*, PCS) 在增强免疫力^[8-10]方面有重要作用, 但是受

冬虫夏草受特殊生长环境影响和过度采挖的破坏, 野生的冬虫夏草产量已远远不能满足市场需求, 随着现代生物技术的发展, 人工冬虫夏草已大规模生产, 且有研究表明人工冬虫夏草的部分有效成分还略好于野生冬虫夏草^[11], 可以替代野生冬虫夏草用于功能食品上, 具有广阔的开发应用前景。国内第三代功能食品的兴起和蓬勃发展, 也为虫草的开发提供了良好的机遇。本文以人工冬虫夏草水提醇沉后多糖提取物为实验材料, 验证了虫草多糖对小鼠免疫功能影响, 为人工虫草开发提供理论依据。

* 收稿日期: 2011-01-10

基金项目: 广东省科技厅 2008 年粤港关键领域重点突破项目资助 (粤科计字 [2008] 63 号)

作者简介: 钟建春 (1986 年生), 男, 硕士; 通讯作者: 叶克难; E-mail: yekenan@mail.sysu.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 材 料

人工蛹虫草真菌 *Cordyceps sinensis* (L.) Link 由本实验室提供, 在大米培养基上培养 60 d 后收集子实体并烘干, 选择上等子实体用中药粉碎机粉碎后, 用蒸馏水抽提, 氯化钙除蛋白, 酒精沉淀后烘干得淡黄色粗多糖粉末, 称重得粗多糖含量 $w = 8\%$, 苯酚-硫酸法测定纯度约为 $\varphi = 65\%$; 2, 4-二硝基氟苯 (DNFB) (上海试剂一厂), 使用前用天平称取 50 mg, 溶解在 5 mL 的丙酮麻油溶液中 (丙酮: 麻油 = 1:1) 待用; 中华墨汁 (北京一得阁墨业有限责任公司), 使用前用生理盐水稀释 4 倍待用; 吉姆萨工作液 (Beijing Solarbio Science Technology Co. Ltd); 722 可见分光光度计 (上海佑科仪器仪表有限公司, YK72290190); 离心机 (长沙平凡仪器仪表有限公司, 24051); 显微镜 (OLYMPUS, CX21)。

1.2 动 物

昆明种 SPF 级小鼠, 160 只, 雌性, 由南方医科大学实验动物中心提供 (许可证号: SCXK 粤 2006-0015), 体质量为 16~18 g, 放入动物房适应 3 d 后, 体质量为 18~22 g 开始实验。

1.3 实 验 方 法

1.3.1 实验剂量确定 参照中大生科牌破壁灵芝孢子粉胶囊服用剂量, 实验分 4 组: 每 kg 体质量的实验剂量为: 对照组 (0 mg), 低剂量组 (8 mg), 中剂量组 (15 mg), 高剂量组 (30 mg), 受试组灌胃剂量相当于人服用剂量的 5, 10, 20 倍。对照组用无菌蒸馏水灌胃, 实验药物用无菌水配制, 每天按每 20 g 体质量 0.1 mL 灌胃动物给予受试动物, 每 3 d 称量小鼠体质量, 根据体质量变化给予不同药量。

1.3.2 脏器/体质量比值实验 选取 40 只昆明种 SPF 小鼠, 每组 10 只, 称量, 按规定剂量灌胃, 连续灌胃 30 d 后称量, 颈椎脱臼处死, 解剖动物, 取出胸腺和脾脏, 用滤纸吸干血迹后称量, 计算脏器和体质量之间的比值。

1.3.3 二硝基氟苯诱导小鼠迟发型变态反应 (DTH) 选取 40 只昆明种 SPF 小鼠, 每组 10 只, 按指定给药方法连续灌胃 30 d 后, 用薇婷牌脱毛膏给小鼠腹部皮肤脱毛, 范围为 3 cm × 3 cm。用 DNFB 溶液 50 μ L 均匀涂抹致敏, 致敏 5 d 后, 用 DNFB 溶液 10 μ L 均匀涂抹于小鼠右耳两面, 再次致敏。24 h 后, 颈椎脱臼处死小鼠, 剪下左右两

耳, 用打孔器取下直径 8 mm 的耳片称量, 小鼠左右两耳质量之差表示 DTH 的程度。

1.3.4 碳廓清实验^[12] 选取 40 只昆明种 SPF 小鼠, 每组 10 只, 将对照组和受试组的小鼠按指定给药方法连续灌胃 30 d 后从小鼠的尾静脉按每 10 g 体质量 0.1 mL 注入浓度为 25% 墨汁, 注射墨汁间隔 2、10 min, 分别从小鼠内毗静脉丛取血 20 μ L, 加入到 2 mL 的 Na_2CO_3 ($w = 0.1\%$) 溶液中。以 Na_2CO_3 溶液作空白对照, 用 722 可见分光光度计在 600 nm 下测定吸光度, 分别记为 A_1 和 A_2 。然后将小鼠处死, 取肝脏和脾脏, 用滤纸吸干脏器表面血污, 称量。把所测出的 A 值、肝脏和脾脏质量代入公式, 算出吞噬指数 a 。

$$K = \frac{\text{Ig}A_1 - \text{Ig}A_2}{T_{10} - T_2}$$

$$\text{吞噬指数 } a = \frac{\text{体质量}}{\text{脾质量} + \text{肝质量}} \sqrt[3]{K}$$

1.3.5 小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验^[12] 选取 40 只昆明种 SPF 小鼠, 每组 10 只, 将受试组和对照组按指定给药方法连续灌胃 30 d 后, 向每只小鼠腹腔注射 $\varphi = 20\%$ 的鸡红细胞悬液 1 mL, 30 min 后, 颈椎脱臼处死动物, 解剖小鼠腹腔, 注入 2 mL 生理盐水, 吸取腹腔液制作涂片, 用吉姆萨工作液染色 15~30 min, 再用蒸馏水漂洗、晾干, 显微镜下计数, 计算吞噬指数和吞噬百分率。

$$\text{吞噬指数} = \frac{\text{吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数}}{\text{巨噬细胞数}} \times 100\%$$

$$\text{吞噬率} = \frac{\text{被吞噬的鸡红细胞数}}{\text{巨噬细胞数}} \times 100\%$$

1.3.6 数据处理 所有数据均采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 用 Microsoft Excel 对实验结果进行单因素方差分析。

2 实 验 结 果

2.1 人工虫草多糖提取物对小鼠体质量, 脾脏、胸腺指数影响

结果见表 1 所示, 与对照组比较, 其余各灌胃组小鼠体质量增加差异不显著 ($P > 0.05$), 说明人工虫草多糖提取物对小鼠体质量没有影响。脾脏/体质量实验组和对照组比较差异不显著 ($P > 0.05$), 人工虫草多糖提取物对小鼠脾指数没有影响; 低剂量组的多糖提取物灌胃组和对照组相比, 胸腺增质量差异不明显 ($P > 0.05$), 中高剂量组可显著提高小鼠胸腺指数, 差异具有显著性 ($P < 0.05$), 间接提示较高浓度的人工虫草多糖有助于增强小鼠的特异性免疫。

表1 多糖提取物对小鼠体质量及脾脏、胸腺质量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of polysaccharide extract on body weight and the weight of mice spleen and thymus gland

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	<i>n</i>	初始体质量/g	终期增质量/g	脾脏/体质量/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	胸腺/体质量/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
对照组		10	21.43 ± 0.73	9.60 ± 3.72	5.00 ± 0.98	3.93 ± 1.11
低剂量	8	10	21.38 ± 0.34	9.15 ± 2.36	5.05 ± 0.87	4.45 ± 1.27
中剂量	15	10	21.55 ± 0.38	7.36 ± 2.51	5.66 ± 0.92	5.27 ± 0.88*
高剂量	30	10	21.37 ± 0.54	7.76 ± 2.21	5.55 ± 1.45	5.22 ± 1.11*

注 * 与对照组比较 $P < 0.05$

2.2 人工虫草多糖提取物对小鼠迟发型变态反应的影响

表2结果提示,中高剂量组的人工虫草多糖提取物对小鼠迟发型变态反应影响差异不显著($P > 0.05$),低剂量组的人工虫草多糖提取物和对照组相比差异显著($P < 0.05$),可以明显改善DNFB诱发的小鼠迟发型变态反应,对小鼠特异性细胞免疫具有促进作用。

表2 多糖提取物对迟发型变态反应的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of polysaccharide extract on delayed hypersensitivity of mouse

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	<i>n</i>	耳肿胀度 /mg	<i>P</i> 值 (对照组相比)
对照组		10	0.50 ± 0.30	
低剂量	8	10	0.84 ± 0.24*	<0.05
中剂量	15	10	0.58 ± 0.41	>0.05
高剂量	30	10	0.53 ± 0.52	>0.05

注 * 与对照组比较 $P < 0.05$

2.3 人工虫草多糖提取物对小鼠碳廓清能力、巨噬细胞吞噬鸡红细胞影响

表3结果显示人工虫草多糖提取物以高剂量灌胃时可以明显提高小鼠的碳廓清能力,与对照组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。中高剂量组人工虫草多糖提取物能明显提高小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞的能力,与对照组相比,差异显著($P < 0.05$),说明人工虫草多糖对小鼠的非特异性免疫具有增强作用。

表3 多糖提取物对小鼠碳廓清及巨噬细胞吞噬功能影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of polysaccharide extract on the clearance ability of carbon and phagocytic function of macrophage

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	<i>n</i>	碳廓清 吞噬指数	吞噬 百分数/%	吞噬指数
对照组		10	4.78 ± 0.91	35.28 ± 10.20	0.49 ± 0.10
低剂量	8	10	5.21 ± 0.89	34.63 ± 14.79	0.46 ± 0.14
中剂量	15	10	4.92 ± 0.91	53.38 ± 13.19*	0.60 ± 0.11*
高剂量	30	10	5.55 ± 0.33*	57.65 ± 18.23*	0.63 ± 0.17*

注 * 与对照组比较 $P < 0.05$

3 讨论与结论

免疫是机体对一切异物或抗原性物质进行非特异或特异性识别和排斥清除的一种生理学功能,主要包括非特异性免疫和特异性免疫。小鼠免疫系统主要由免疫器官和免疫细胞组成,免疫器官由中枢免疫器官和外周免疫器官组成,胸腺是重要的中枢免疫器官,是淋巴细胞分化和成熟的场所,脾脏是重要的外周免疫器官,胸腺和脾脏的重量和结构变化在一定程度上反映了动物的免疫水平^[13],包括体液免疫和细胞免疫^[14]。细胞免疫是以T细胞为主的免疫应答,T细胞的性质状态对细胞免疫有重要影响^[15],迟发型变态反应是T细胞介导的一种超敏反应,用变应原(DNFB)刺激小鼠时T淋巴细胞会增殖成致敏淋巴细胞,部分还会分化成记忆细胞,当再次用同种变应原刺激时,记忆细胞会迅速增殖,发生以单核细胞浸润为主的炎症反应,与机体细胞免疫一致^[16]。巨噬细胞是免疫效应细胞,具有多种免疫功能,包括免疫防御,免疫监视,免疫调节及抗原呈递等^[17],具体是通过吞噬作用清除体内衰老损伤和凋亡细胞,及免疫复合物和病原体等抗原性异物^[18]。单核巨噬细胞是衡量机体非特异性免疫功能的指标之一,当墨汁被注入到小鼠尾静脉血液中,血液中的外周血单核巨噬细胞会吞噬异物颗粒,可用巨噬细胞的吞噬指数(*a*)反应其吞噬能力,鸡红细胞因其表面具有多种蛋白复合物,注入到小鼠腹腔中能激活巨噬细胞并将其吞噬,吞噬指数是衡量巨噬细胞吞噬能力的标志。

综上所述,人工虫草多糖提取物可以提高小鼠胸腺指数,可能原因是多糖提取物延缓了胸腺的衰退进程。低剂量组多糖提取物可以增强T细胞的免疫应答反应,而高剂量则表现为抑制趋势,表明人工虫草多糖对小鼠特异性细胞免疫具有剂量依赖性的双向调节作用。碳廓清和吞噬鸡红细胞实验中,较高浓度的多糖提取物可明显提高小鼠巨噬细胞的吞噬能力,说明了多糖提取物可促进小鼠的非

特异性免疫。本实验证明了人工虫草多糖提取物小鼠免疫功能具有增强作用,根据《保健食品评价技术规范-2003》要求,可为人工虫草开发提供理论依据。

参考文献:

- [1] 高立文,张臻,周建芹,等. 中国弯颈酶提取物抗氧化和抗肿瘤体外活性研究[J]. 食品科学,2009,30(5): 227-232.
- [2] PARK S E, KIM J S, LEE Y W. Antitumor activity of water extract from cordyceps militaries in NCI-H460 cell xenografted nude mice[J]. J Apucunct Meridian Stdu, 2009,2(4):294-300.
- [3] 安康,巫文政,毛宁. 虫草胞外多糖延缓果蝇衰老暨减轻香烟毒害作用的研究[J]. 中国老年学杂志,2010,30:232-233.
- [4] JI D B, YE J, LI C L. Antiaging effect of Cordyceps sinensis Extract [J]. Phytotherapy Research, 2009, 23: 116-122.
- [5] 姜维苓,孙万峰,孙荣玲. 复方虫草脂质体口服液抗肝纤维化临床观察[J]. 抗感染药学,2007,4(3):126-127.
- [6] 朱雅红,颜辉,桂仲争. 蛹虫草多糖对四氯化碳诱导大鼠原代肝细胞损伤的保护作用研究[J]. 蚕业科学,2009,30(1):106-110.
- [7] 商玉萍,方士英,葛金芳,等. 虫草多糖对小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J]. 华西药学杂志,2007,22(6):654-655.
- [8] 马林,刘春光,姚小曼. 虫草多糖对小鼠免疫的影响[J]. 卫生毒理学杂志,1995,9(3):162-163.
- [9] QIAO D L, LUO J G, KE C L. Immunostimulatory activity of the polysaccharide from hyriopsis cumingii[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 47: 657-680.
- [10] 任健,张倩落,郑丽. 人工虫草多糖对免疫低下小鼠免疫功能影响[J]. 第四军医大学学报,2007,28(21):1967-1969.
- [11] 董巍巍,吕效平,李祥. 人工虫草及野生虫草的成分比较研究[J]. 现代中药研究与实践,2007,22(2):39-41.
- [12] 李奎仪. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1989:157-158.
- [13] 陈福星,陈文英,郝艳霜. 蒲公英多糖对小鼠免疫器官的影响[J]. 动物医学进展,2008,29(4):10-12.
- [14] 高旭,李丽芬,刘斌钰. 黄芩多糖对小鼠免疫功能影响的实验研究[J]. 山西大同大学学报,2010,26(4):42-44.
- [15] 张擎,胡质毅,王荃,等. 灵芝菌丝体碱提多糖对小鼠细胞免疫的作用[J]. 中山大学学报:自然科学版,2005,44(5):79-82.
- [16] 戈士文,高元法,朱建立,等. 痹痛清胶囊对小鼠免疫功能影响的研究[J]. 中成药,2003,25(10):850-851.
- [17] 张莘莘,李文娟,聂少平,等. 黑灵芝多糖对体外培养的小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响[J]. 中国药理学通报,2010,26(9):1139-1142.
- [18] 熊评源,胡艺兰,郭凯文,等. 何首乌对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响[J]. 药学研究,2007,20(3):370-371.