

王磊, 梁峰, 赵宏伟, 等. 含灵芝多糖的复方制剂免疫调节功能及安全性评价 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 338–349. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100046

WANG Lei, LIANG Feng, ZHAO Hongwei, et al. Immunomodulatory Function and Safety Evaluation of Compound Preparation Containing *Ganoderma lucidum* Polysaccharides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 338–349. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100046

· 营养与保健 ·

含灵芝多糖的复方制剂免疫调节功能 及安全性评价

王磊¹, 梁峰², 赵宏伟^{1,3,*}, 宁德山¹, 尹丽华⁴, 叶小敏⁴, 尹国骁⁴

(1.无限极(中国)有限公司, 广东广州 510520;

2.广州暨南生物医药研究开发基地有限公司, 广东广州 510632;

3.中国中药协会药食同源物质评价和利用专业委员会, 北京 100061;

4.武汉药品医疗器械检验所, 湖北武汉 430075)

摘要:目的: 评价含灵芝多糖的复方制剂免疫调节功能及安全性。方法: 参照保健食品检验与评价技术规范(2003 版), 通过测定正常小鼠淋巴细胞增殖能力、耳肿胀程度、溶血空斑数、吞噬百分率和吞噬指数、自然杀伤(NK)细胞活性, 分别从细胞免疫、体液免疫及非特异性免疫综合评价含灵芝多糖的复方制剂免疫调节功能; 通过小鼠急性经口毒性试验、细菌回复突变(Ames)试验和大鼠 30 d 喂养试验综合评价其安全性。结果: 在细胞免疫试验中, 受试物对刀豆蛋白 A (ConA) 诱导的淋巴细胞增殖能力和耳肿胀程度均无显著影响 ($P>0.05$); 在体液免疫试验中, 受试物低剂量组 (0.17 g/kg)、中剂量组 (0.33 g/kg)、高剂量组 (1.00 g/kg) 分别使小鼠抗体生成细胞数目提高 10.98%、12.08%、17.63% ($P<0.05$); 在非特异性免疫试验中, 受试物中剂量组、高剂量组能显著提高单核巨噬细胞的吞噬能力 ($P<0.05$) 和 NK 细胞活性 ($P<0.01$)。受试物对雌雄小鼠急性经口剂量最大耐受量 (MTD) 均大于 42.56 g/kg, 属无毒级物质; Ames 试验结果阴性, 未见致突变作用; 大鼠 30 d 喂养试验中, 受试物各剂量组对大鼠体质量、周食物利用率、血常规指标、血液生化学指标及主要脏器系数均未产生显著影响 ($P>0.05$), 组织学检查未发现明显病理变化。结论: 含灵芝多糖的复方制剂可以调节小鼠免疫功能, 作为保健食品食用是安全的。

关键词: 灵芝多糖, 灵芝酸 A, 复方制剂, 安全性, 免疫调节

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)21-0338-12

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100046



本文网刊:

Immunomodulatory Function and Safety Evaluation of Compound Preparation Containing *Ganoderma lucidum* Polysaccharides

WANG Lei¹, LIANG Feng², ZHAO Hongwei^{1,3,*}, NING Deshan¹, YIN Lihua⁴, YE Xiaomin⁴, YIN Guoxiao⁴

(1. Infinitus (China) Co., Ltd., Guangzhou 510520, China;

2. Guangzhou Jinan Biomedical Research and Development Center Co., Ltd., Guangzhou 510632, China;

3. Medicine Food Homology Evaluation and Utilization Committee, China Association of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100061, China;

4. Wuhan Institute for Drug and Medical Device Control, Wuhan 430075, China)

Abstract: Objective: To evaluate the immunomodulatory function and safety of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides. Methods: According to the Technical Standards for Testing and Assessment of Health Food (2003 Edition), the immunomodulatory function of compound preparation containing *Ganoderma lucidum*

收稿日期: 2023-10-11

作者简介: 王磊 (1979-), 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 保健食品、食品药品研发, E-mail: Kira.Wang@infinitus-int.com.

* 通信作者: 赵宏伟 (1977-), 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 保健食品、食品研发, E-mail: Lisa.Hongwei.Zhao@infinitus-int.com.

polysaccharides was evaluated comprehensively from cellular immunity, humoral immunity and non-specific immunity by measuring the ability of lymphocyte proliferation, degree of ear swelling, number of hemolytic plaques, phagocytic percentage, phagocytic index and natural killer (NK) cells activity in normal mice. Its safety was evaluated comprehensively by acute oral toxicity test in mice, Ames test and 30 d feeding test in rats. Results: In cellular immunity test, the tested substance had no significant effect on lymphocyte proliferation induced by concanavalin A and degree of ear swelling ($P>0.05$). In the humoral immunity test, the low dose group (0.17 g/kg), the middle dose group (0.33 g/kg) and the high dose group (1.00 g/kg) could increase the level of antibody-producing cells by 10.98%, 12.08%, 17.63% ($P<0.05$). In the non-specific immunity test, the middle dose group and the high dose group could significantly increase the phagocytosis ability of mononuclear macrophages ($P<0.05$) and the activity of NK cells ($P<0.01$). The maximum tolerance dose (MTD) of the tested substance to the acute oral dose of both male and female mice was more than 42.56 g/kg, which belonged to non-toxic substances. The results of Ames test were negative and no mutagenicity was found. In the 30 d feeding test, each dose group had no significant effect on body weight, weekly food utilization rate, blood routine index, blood biochemical index and main organ coefficient ($P>0.05$), and no obvious pathological changes were found by histological examination. Conclusion: Compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides had a positive effect on immunomodulatory function in mice, and it had a good safety as a health food.

Key words: *Ganoderma lucidum* polysaccharides; ganoderic acid A; compound preparation; safety; immunomodulatory

随着社会的发展,我国人口老龄化、亚健康人群年轻化态势逐渐严峻^[1],人们对于非疾病人群的预防保健愈加重视,而增强免疫力是预防疾病的关键^[2]。据国际健康策略和管理咨询机构 Lewin 集团的一项循证研究显示,食用保健食品可以调节机体机能,提高人体抵御疾病的能力^[3]。在中国及亚洲许多地区,天然中草药具有多年食用历史或药用历史。然而天然中草药存在口感差、携带和使用不便等缺点^[4],为克服这些缺点,本课题组以中医理论为指导进行组方配比筛选,利用减压蒸馏、喷雾干燥等技术制备了一种含灵芝多糖及灵芝酸 A 的复方制剂,具有整体调理、相互协同的保健功效。研究表明,多糖能在免疫器官、免疫细胞、免疫因子多层次进行免疫调节^[5],是一种较为公认的天然免疫调节剂。本方主材灵芝是药食同源的典型代表之一,《神农本草经》载:灵芝“保神,益精气,坚筋骨,好颜色,久服轻身不老延年。”其主要生物活性物质是多糖类和三萜类,2020 版《中国药典》对灵芝成分的含量测定包括灵芝多糖、灵芝三萜及甾醇,日本则以灵芝酸的含量为质控标准,本制剂按保健食品产品技术要求制定总多糖和灵芝酸 A 为标志性成分。Jin 等^[6]研究表明灵芝多糖可以增强大鼠免疫力和抗氧化活性,Pan 等^[7]报道了灵芝酸 A 可通过 JAK-STAT3 信号通路显著抑制酪氨酸磷酸化,能有效缓解神经炎症和阿尔茨海默氏细胞衰老,在人体免疫中发挥重要的药理学作用。薏苡仁多糖是薏苡仁发挥药理活性的重要物质基础,它通过改善先天免疫细胞的募集并刺激准确有效的免疫反应以消除外部生物和受损细胞来缓解结肠炎^[8-9]。茯苓多糖是茯苓的主要药用活性成分,可以增强体液免疫、细胞免疫及黏膜免疫^[10-11]。其他中草药如白术^[12-13]、菟丝子^[14-15]、黄精^[16-17]、麦冬^[18-19]、甘草^[20-21]、枸杞子^[22-23]、五味子^[24-25]、菊花^[26-27]等皆含有丰富的活性多糖,均被报道具有扶正固本、调节免疫的功效。

在大健康时代背景下,这些中草药作为保健食品原料得到广泛的开发和利用。由于复方制剂成分复杂,其如何发挥功效尚不明确,且预防保健是一个长期缓慢的过程,在长期使用过程中可能会出现一些不良反应或毒副作用,有时还会出现危及生命的并发症^[28]。因此本研究根据《保健食品检验与评价技术规范》(2003 版)^[29]有关要求,进行较为系统的评价含灵芝多糖的复方制剂的免疫调节功能及安全性,以期为其合理安全应用提供科学数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

灵芝、薏苡仁、茯苓、白术、菟丝子、黄精、麦冬、甘草、枸杞子、五味子、菊粉 天方健(中国)药业有限公司;无特定病原体(SPF)级昆明小鼠 雌雄各 10 只,体质量 18~20 g,购自湖南斯莱克景达试验动物有限公司,试验动物生产许可证号:SCXK(湘)2016-0002;SPF 级 SD 大鼠 雌雄各 44 只,体质量 75~90 g,购自北京维通利华试验动物技术有限公司,试验动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0006;SPF 级 Balb/C 小鼠 雄性 120 只,体质量 18~20 g,购自南方医科大学实验动物中心,试验动物生产许可证号:SCXK(粤)2016-0041;试验动物环境 温度 20~24 ℃,相对湿度 40%~70%,12 h 的明暗周期的屏障系统(使用许可证号:SYXK(鄂)2014-0077,使用证明号:00270498),动物试验经武汉药品医疗器械检验所试验动物伦理委员会审批,符合试验动物伦理学要求;Ames 试验标准菌株 鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型 TA97、TA98、TA100、TA102,购自上海康成生物科技有限公司,批号分别为 5281D、5282D、5249D、5280D;小鼠淋巴瘤细胞(YAC-1) 广州暨南生物医药研究开发基地有限公司自传代;哺乳动物肝微粒体酶系统(肝 S9) Moltex 公司;叠氮化钠 Amresco 公司;2-氨基苊、敌克松、二甲基亚砜 Sigma 公司;1,8-二羟基蒽醌 Aladdin 公司;2,4-

二硝基氟苯(DNFB) 上海麦克林生化科技有限公司; 刀豆蛋白 A、补体、吉姆萨染液、4% 多聚甲醛、鸡红细胞、绵羊红细胞 北京索莱宝科技有限公司; SA 缓冲液 上海源叶生物科技有限公司; 胎牛血清、乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒 碧云天生物技术有限公司。

BS-820 型全自动生化分析仪 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司; XT-2000i 型全自动动物血液细胞分析仪 日本希森美康公司; DM2500 型显微照相仪、EG1150 型包埋机、RM2265 型全自动切片机、HI1220 型烤片机、ASP200S 型真空组织脱水机、EG1150C 型包埋冷冻台、HI1210 型摊片机 Leica 公司; Elx800 型酶标仪 Bio-Tek 公司; BS 110S 型电子天平 北京赛多利斯天平有限公司; PB 302 型电子天平 瑞士梅特勒公司; UV-2600 型分光光度计 Shimadzu 公司; PHS-3C 型 pH 计 成都世纪方舟科技有限公司; LT-BIX300L 型低温生化培养箱 立德泰勃(上海)科学仪器有限公司; IM1200 型全自动细胞计数仪 艾力特生物科技(上海)有限公司; ECLIPSE-TI2 型倒置显微镜 尼康仪器有限公司; SW-CJ-1F 型标准型净化工作台 苏州吴江华夏空调净化设备厂; YA28X6T/8 型高压灭菌锅 宁波甬安医疗器械制造有限公司; DHG-9053A 型鼓风干燥箱、DK-24 型恒温水浴锅 上海精宏试验设备有限公司; TS-110X50 型恒温摇床 上海天呈科技有限公司; H-1850R 型台式高速冷冻离心机 湖南湘仪试验仪器开发有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 含灵芝多糖的复方制剂的制备 将检验合格的灵芝、薏苡仁、茯苓、白术、菟丝子、黄精、麦冬、甘草、枸杞子、五味子按质量比 16:8:8:5:5:5:1:0.5:0.5:0.5 称量并投入提取罐内,加入 10 倍的水煎煮提取 2 h,滤网过滤后收集滤液,滤渣重新加 15 倍的水煎煮 4 h,收集滤液,合并两次滤液,旋转蒸发真空浓缩至固形物质量浓度为(35±5)%。浓缩液加入 50 倍质量的菊粉,搅拌均匀后投入真空带式干燥机,干燥物料经粉碎后过 80 目筛,即得含灵芝多糖的复方制剂。主要功效成分及含量:采用苯酚-硫酸法^[30]测得总多糖含量≥14.00 mg/g,采用液质联用质谱分析(LC-MS/MS)^[31]测得灵芝酸 A 含量≥0.25 mg/g。

1.2.2 急性经口毒性试验(最大耐受量试验) 称取受试物 28.37 g,用蒸馏水溶解至 40.00 mL,得到最大使用质量浓度为 0.71 g/mL 的供试液。取 SPF 级昆明种小鼠雌雄各 10 只,适应性饲养一周后,灌胃前禁食过夜但不禁水,次日按 20 mL/kg 体积分三次灌胃给予上述供试液,每次间隔 4 h,一日内总剂量为 42.56 g/kg,相当于人摄入量的 1290 倍(以每日口服 2 g、体质量 60 kg 计,折算剂量则为 0.03 g/kg)。给药后雌雄小鼠分笼饲养,连续观察 14 d,记录小鼠的一般状况、中毒症状、死亡状况等^[32]。

1.2.3 Ames 试验(平板渗入法) 根据受试物毒性测定结果,设 5000.00、1000.00、200.00、40.00、8.00 μg/皿 5 个剂量组,同时设置溶剂对照(DMSO)、自发回变对照(阴性对照)和阳性对照。阳性对照采用敌克松、叠氮化钠、2-氨基苄、1-8 二羟基蒽醌,剂量分别为 50.00、2.50、10.00、50.00 μg/皿。用经过生物学鉴定合格的 Ames 试验标准菌株 TA97、TA98、TA100、TA102,在加和不加肝 S9 活化系统条件下,分别对受试物做平板渗入法 Ames 试验。各菌株每个剂量组做 3 个平行皿,37 ℃ 培养 48 h,计算平均回变菌落数。在加或不加 S9 活化系统条件下,若受试物的回变菌落数是自发回变菌落数的 2 倍以上并有剂量-反应关系者则定为阳性。阴性结果需至少做 2 次测试,阳性结果至少做 3 次测试^[33]。

1.2.4 30 d 喂养试验 选取 SPF 级 SD 大鼠 88 只,雌雄各半,按体质量随机分为 4 组,每组 22 只。根据人体日推荐量的 100、50、25 倍,受试物设 3 个剂量组,分别为 3.30、1.65、0.83 g/kg,另设阴性对照组,给予等量蒸馏水。各组每天按 10 mL/kg 体积灌胃 1 次,连续 30 d。动物自由饮食和饮水,每天观察并记录大鼠的一般表现,每周称体质量及进食量,通过公式(1)计算每周食物利用率。试验末期,将大鼠禁食不禁水 16 h,腹主动脉采血测定血常规指标血红蛋白(Hb)、红细胞计数(RBC)、白细胞计数(WBC)、白细胞分类计数(DC)及血生化指标丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、白蛋白(ALB)、总蛋白(TP)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TCHO)、血糖(GLU),计算白蛋白/球蛋白比值(ALB/GIO)。腹主动脉放血处死,进行大体解剖,肉眼观察有无异常,取肝、肾、脾、睾丸(卵巢)等脏器进行称量,计算脏器比值,并对肝、肾、脾、胃、肠、睾丸(卵巢)等脏器固定保存,进行组织病理学检查^[34]。

$$A(\%) = \frac{m}{M} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中:A 表示周食物利用率,%;m 表示每周体质量增量,g;M 表示每周饲料摄入量,g。

1.2.5 免疫功能评价试验

1.2.5.1 试验分组与处理 选用 SPF 级雄性 Balb/c 小鼠 120 只,适应性饲养一周后,按体质量随机分为 12 组,每组 10 只。其中 4 组小鼠用于迟发型变态反应试验,测定耳肿胀程度;4 组用于抗体生成细胞检测试验和腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验,分别测定溶血空斑数和吞噬百分率及吞噬指数;4 组小鼠用于脾淋巴细胞转化试验和 NK 细胞活性测定试验,分别测定淋巴细胞增殖能力和 NK 细胞杀伤活性。根据人体日推荐量的 5、10、30 倍,受试物设 3 个剂量组,分别为 0.17、0.33、1.00 g/kg,另设阴性对照组,给予等量蒸馏水。受试物每日经口一次给予,灌胃体积为 10 mL/kg,连续给药 30 d 后检测各项指

标。动物自由饮食和饮水,每周根据体质量变化调整给药量。

1.2.5.2 脾淋巴细胞转化试验 末次给药后 1 h,颈椎脱臼处死小鼠,无菌取脾脏,研磨制备单细胞悬液,调整细胞密度为 3×10^6 个/mL。将细胞悬液分为 2 组,一组加入 ConA 溶液(终质量浓度为 $7.50 \mu\text{g/mL}$)作为试验孔,另一组作为对照,每组 2 个重复。于恒温培养箱内 $5\% \text{CO}_2$ 、 37°C 孵育培养 72 h。噻唑蓝(MTT)法在波长 570 nm 处酶标仪检测每孔的吸光度(A),脾淋巴细胞的增殖能力为 ConA 组与对照组吸光度差值^[35]。

1.2.5.3 迟发型变态反应(DTH) 小鼠给予受试物 30 d 后,腹部脱毛约 $3 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$,均匀涂抹 $50.00 \mu\text{L}$ 2,4-二硝基氟苯(DNFB)溶液(质量浓度 10.00 mg/mL)致敏。致敏后第 5 d,用 DNFB 溶液 $10.00 \mu\text{L}$ 均匀涂抹于小鼠右耳的两面进行攻击,攻击后 24 h 颈椎脱臼处死小鼠,剪下左右耳壳,用打孔器取下直径 8.00 mm 的耳片,称重。用左右耳质量之差表示 DTH 的程度^[36]。

1.2.5.4 抗体生成细胞检测(改良法) 小鼠给予受试物 30 d 后,腹腔注射 2.00% 体积分数的压积绵羊红细胞(SRBC)悬液 0.20 mL ,免疫 4 d 后颈椎脱臼处死小鼠,取脾脏并研磨制备成单细胞悬液,调整细胞密度为 5×10^6 个/mL。将 10.00% 体积分数的 SRBC $50.00 \mu\text{L}$ 、脾细胞悬液 $20.00 \mu\text{L}$ 与 0.50% 质量分数的琼脂糖溶液 $500.00 \mu\text{L}$ 混匀,倾倒入琼脂糖玻片上,待凝固后放入恒温培养箱中孵育 1.5 h,加入 SA 缓冲液稀释十倍的补体 $500.00 \mu\text{L}$,继续孵育 1.5 h,计数溶血空斑数。结果用空斑数/ 10^6 脾细胞表示^[37]。

1.2.5.5 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验 小鼠给予受试物 30 d 后,腹腔注射 2.00% 体积分数的压积 SRBC 悬液 0.20 mL ,免疫 4 d 后颈椎脱臼处死小鼠,每只腹腔注射 4.00 mL Hank's 溶液,揉按腹腔 20 次,腹腔壁开口后吸取 0.50 mL 腹腔洗液与等体积 1.00% 体积分数鸡血红细胞悬液混匀。吸取混合液 0.50 mL 滴入玻片的琼脂圈内,置于恒温培养箱中孵育 20 min,用生理盐水将未贴壁的细胞洗掉, 4.00% 体积分数的多聚甲醛溶液固定 1 min,吉姆萨液染色 15 min。蒸馏水冲洗、晾干,用 $40 \times$ 显微镜计数巨噬细胞和被吞噬的鸡血红细胞数,按照公式(2)和(3)计算吞噬百分率和吞噬指数^[38]。

$$W(\%) = \frac{n_1}{n_0} \times 100 \quad \text{式 (2)}$$

$$T = \frac{n_2}{n_0} \quad \text{式 (3)}$$

式中: W 表示吞噬百分率,%; T 表示吞噬指数; n_1 表示吞噬鸡血红细胞的巨噬细胞数; n_2 表示被吞噬的鸡红细胞总数; n_0 表示计数的巨噬细胞数。

1.2.5.6 NK 细胞活性测定(乳酸脱氢酶测定法) 将对数生长期的靶细胞 YAC-1 消化,调整细胞密度为 4×10^5 个/mL。小鼠给予受试物 30 d 后,颈椎脱臼处死小鼠,无菌取脾脏,研磨制备单细胞悬液,调整细胞密度为 2×10^7 个/mL。取靶细胞和效应细胞(脾细胞)各 $100.00 \mu\text{L}$ 加入到 96 孔培养板内,作为反应孔。靶细胞自然释放孔加靶细胞和培养液各 $100.00 \mu\text{L}$,靶细胞最大释放孔加靶细胞和 1.00% 体积分数的 NP40 各 $100.00 \mu\text{L}$ 。上述各试验组均设置 3 个平行孔,恒温培养箱培养 4 h,培养板低速离心 5 min (1000 r/min ,离心半径 6 cm),每孔吸取上清 $100.00 \mu\text{L}$ 转至平底 96 孔培养板内。利用 LDH 检测试剂盒, 490 nm 检测每孔的 A。按照公式(4)计算 NK 细胞活性^[39]。

$$S(\%) = \frac{A_1 - A_0}{A - A_0} \times 100 \quad \text{式 (4)}$$

式中: S 表示细胞活性,%; A_1 表示反应孔吸光度; A_0 表示自然释放孔吸光度; A 表示最大释放孔吸光度。

1.3 数据处理

采用 SPSS 19.0 进行统计分析,计量数据用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,若方差齐,组间比较采用单因素方差分析;若方差不齐,采用秩和检验进行统计分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 急性经口毒性试验

受试物给予小鼠灌胃后,14 d 观察期内小鼠饮食活动和大小便正常,生长良好,未发现明显中毒症状和死亡,体重增加,体重变化见表 1。试验结束后解剖小鼠进行大体观察,心、肝、肾、脾、肺、肠、胃、性腺等主要脏器未见明显异常。结果表明,受试物对雌雄小鼠最大耐受剂量(MTD)超过 42.56 g/kg ,其剂量相当于人体推荐用量的 1290 倍。根据《保健食品检验与评价技术规范》急性毒性剂量分级标准,含灵芝多糖的复方制剂属于无毒物质。

表 1 含灵芝多糖的复方制剂急性经口毒性试验($n=10$)
Table 1 Acute oral toxicity test results of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides in mice ($n=10$)

性别	初体重(g)	一周体重(g)	末体重(g)	死亡数(只)	MTD(g/kg)
雄	20.96 ± 0.80	30.71 ± 2.96	35.85 ± 4.98	0	>42.56
雌	22.06 ± 0.97	29.06 ± 1.15	33.14 ± 2.45	0	>42.56

2.2 Ames 试验

Ames 试验是利用营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌来检测受试物的致突变作用。营养缺陷型菌株自身不能合成组氨酸,若在无组氨酸培养基上不能生长,仅有少数自发回复突变的细菌生长,而致突变物可使营养缺陷型菌株诱导突变为野生型菌株,野生型菌株可自身合成组氨酸,因此在无组氨酸培养基上可见大量细菌生长。许多外源性物质是间接诱变剂,需要经

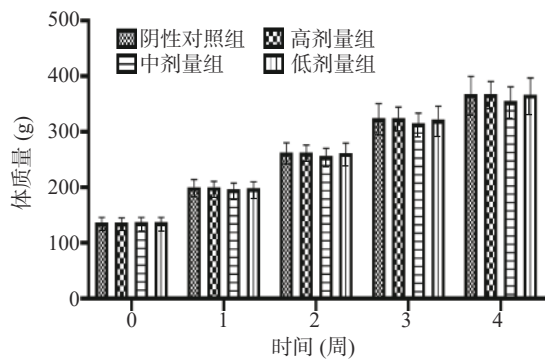


图2 含灵芝多糖的复方制剂对雄性大鼠体质量的影响(n=11)

Fig.2 Effect of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides on body mass of male rats (n=11)

表4 含灵芝多糖的复方制剂对大鼠周食物利用率的影响(n=11, %)

Table 4 Effect of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides on weekly food utilization rate in rats (n=11, %)

性别	时间	阴性对照组	高剂量组	中剂量组	低剂量组
雌性	第1周	34.00±2.10	37.30±6.30	35.30±3.30	37.50±5.70
	第2周	27.90±8.10	30.70±9.40	25.80±8.20	27.00±10.40
	第3周	21.50±12.30	21.20±10.10	25.30±8.70	25.60±14.70
	第4周	17.00±6.40	16.60±7.00	18.60±4.00	13.30±3.60
雄性	第1周	52.00±4.20	50.80±3.10	49.90±1.90	50.70±3.50
	第2周	37.40±5.30	39.40±2.60	36.90±4.40	38.80±6.70
	第3周	36.10±10.20	37.90±6.40	34.70±7.80	36.40±4.00
	第4周	25.00±3.30	25.30±8.60	23.40±4.10	25.60±6.10

单核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞)、红细胞计数(RBC)、血红蛋白浓度(Hb)等血常规指标。由于大鼠血液学(血常规和血液生化)指标受到动物品系、年龄、来源、饲养环境、取样方法、取样部位、检测仪器与方法、麻醉剂使用等众多因素影响,不同实

验室之间动物的相关生物学指标都会有所差异。如表5所示,受试物中剂量组雌性大鼠WBC为 $2.04\times 10^9/L$,中剂量组雌性大鼠单核细胞比例为3.87%,高剂量组雌性大鼠Hb为128.50 g/L,虽然与阴性对照组雌性大鼠对应的指标相比均有统计学差异($P<0.05$),但这些差异的剂量效应关系不明显,且数值仍处于SD大鼠正常参考区间内(雌性WBC: $0.80\times 10^9/L\sim 10.60\times 10^9/L$;单核细胞比例:0.90%~18.00%;Hb:110.00~165.00 g/L)^[40],可以认为这种统计学差异没有临床意义。因此各实验室应该建立本实验室的参考值区间,为结果评判提供参考。其余指标的差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.3.3 血液生化学指标 上文提到,不同实验室之间的血液生化学指标也受各种因素影响而有所差异。表6所示,受试物各剂量组与阴性对照组相比,雌性大鼠高剂量和中剂量组ALT分别下降5.53、4.70 U/L,高、中、低三个剂量组AST分别下降27.97、20.85、24.25 U/L,高剂量组ALB下降1.40 g/L,高剂量和中剂量组TP分别下降3.77、3.61 g/L;雄性大鼠中、低剂量组BUN分别上升0.83、1.11 mmol/L。虽然与阴性对照组大鼠对应的指标相比均有统计学差异($P<0.05$),但这些差异的剂量效应关系不明显,且数值仍处于SD大鼠正常参考区间内(雌性ALT:6.00~114.00 U/L;AST:37.00~205.00 U/L;ALB:29.00~48.00 g/L;TP:54.00~85.00 g/L。雄性BUN:4.63~10.32 mmol/L)^[40],可以认为这种统计学差异没有临床意义。其余指标的差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.3.4 脏器质量和脏器比值 由表7可得,受试物各剂量组大鼠肝脏、肾脏、脾脏、卵巢(雌性)、睾丸(雄性)的脏器的绝对质量和相对质量(脏器比值)与阴性

表5 含灵芝多糖的复方制剂对大鼠血常规指标的影响(n=11)

Table 5 Effect of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides on hematological indexes in rats (n=11)

性别	血常规指标	阴性对照组	高剂量组	中剂量组	低剂量组
雌性	WBC($10^9/L$)	3.06±0.88	2.61±0.68	2.04±0.64**	3.41±1.19
	中性粒细胞(%)	22.18±9.59	21.90±5.57	22.03±7.80	21.16±7.92
	淋巴细胞(%)	73.31±9.53	72.92±4.24	71.29±7.14	73.61±8.48
	单核细胞(%)	2.44±1.02	2.94±1.15	3.87±2.03*	2.95±1.09
	嗜酸性粒细胞(%)	2.07±0.82	2.25±1.19	2.51±1.20	2.28±0.68
	嗜碱性粒细胞(%)	0.00±0.00	0.00±0.00	3.13±10.24	0.00±0.00
	RBC($10^{12}/L$)	6.98±0.22	6.73±0.36	7.02±0.38	6.95±0.37
	Hb(g/L)	133.50±2.90	128.50±4.10*	131.50±6.40	133.10±4.00
雄性	WBC($10^9/L$)	4.36±1.18	4.77±1.52	4.29±1.15	4.89±1.57
	中性粒细胞(%)	19.26±5.10	20.05±7.37	19.43±6.17	18.02±6.04
	淋巴细胞(%)	76.26±5.35	74.74±7.28	75.43±5.48	76.92±5.67
	单核细胞(%)	2.68±1.01	3.38±1.37	3.60±1.31	3.50±1.40
	嗜酸性粒细胞(%)	1.79±0.60	1.84±0.89	1.55±0.49	1.56±0.43
	嗜碱性粒细胞(%)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	RBC($10^{12}/L$)	7.10±0.35	7.06±0.29	7.12±0.42	7.21±0.29
	Hb(g/L)	135.40±4.70	136.30±5.00	134.90±5.50	136.80±5.10

注:与阴性对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;表6同。

表 6 含灵芝多糖的复方制剂对大鼠血液生化指标的影响(n=11)

Table 6 Effect of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides on blood biochemical indexes in rats (n=11)

性别	生化指标	阴性对照组	高剂量组	中剂量组	低剂量组
雌性	ALT(U/L)	31.93±4.62	26.40±2.45**	27.23±4.81*	31.09±5.72
	AST(U/L)	143.12±21.55	115.15±11.92**	122.27±28.62*	118.87±11.58**
	ALB(g/L)	31.47±1.66	30.07±1.29*	30.18±1.60	30.88±1.77
	TP(g/L)	58.24±3.93	54.47±1.79**	54.63±2.25*	57.33±3.94
	BUN(mmol/L)	5.98±0.79	6.58±1.18	6.27±1.07	5.89±0.37
	Cr(μmol/L)	29.89±3.01	29.02±3.01	28.33±2.35	29.00±3.07
	TG(mmol/L)	0.54±0.33	0.71±0.45	0.50±0.18	0.80±0.28
	TCHO(mmol/L)	2.04±0.54	2.01±0.20	1.90±0.28	2.10±0.36
	GLU(mmol/L)	5.52±0.79	5.86±0.60	5.55±0.67	6.81±1.53
	ALB/GIO	1.18±0.07	1.23±0.05	1.24±0.07	1.17±0.08
雄性	ALT(U/L)	31.35±4.21	32.82±6.83	32.10±3.61	32.04±4.80
	AST(U/L)	119.19±22.90	124.36±24.51	114.66±18.91	125.14±22.51
	ALB(g/L)	30.07±1.46	30.77±1.94	30.40±2.07	30.39±2.03
	TP(g/L)	58.95±3.03	61.09±5.72	60.08±5.52	59.78±4.82
	BUN(mmol/L)	5.22±0.80	5.34±0.98	6.05±0.97*	6.33±0.91**
	Cr(μmol/L)	25.89±2.91	26.24±2.67	25.64±2.87	26.98±2.93
	TG(mmol/L)	0.82±0.37	0.90±0.33	0.77±0.26	0.80±0.36
	TCHO(mmol/L)	2.20±0.29	2.11±0.32	1.95±0.42	2.07±0.37
	GLU(mmol/L)	5.59±0.94	4.84±0.77	5.46±0.63	5.13±0.82
	ALB/GIO	1.05±0.06	1.02±0.07	1.03±0.06	1.04±0.05

表 7 含灵芝多糖的复方制剂对大鼠脏器质量及脏体比值的影响(n=11)

Table 7 Effect of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides on organ mass and organ-body ratio in rats (n=11)

性别	脏器指标		阴性对照组	高剂量组	中剂量组	低剂量组	
雌性	肝脏	质量(g)	7.79±0.79	7.82±0.74	7.79±1.02	9.08±2.28	
		脏体比值(%)	3.27±0.22	3.20±0.18	3.27±0.55	3.68±1.04	
	肾脏	质量(g)	1.85±0.13	1.80±0.17	1.80±0.15	1.87±0.20	
		脏体比值(%)	0.78±0.04	0.74±0.03	0.75±0.08	0.76±0.13	
	脾脏	质量(g)	0.65±0.07	0.68±0.13	0.61±0.07	0.72±0.14	
		脏体比值(%)	0.27±0.03	0.28±0.05	0.26±0.03	0.30±0.07	
	卵巢	质量(g)	0.15±0.02	0.15±0.02	0.15±0.02	0.14±0.02	
		脏体比值(%)	0.06±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01	
	雄性	肝脏	质量(g)	12.38±2.05	11.93±1.48	12.21±1.42	11.69±1.48
			脏体比值(%)	3.47±0.42	3.32±0.27	3.53±0.21	3.34±0.24
肾脏		质量(g)	2.78±0.38	2.66±0.32	2.56±0.32	2.67±0.31	
		脏体比值(%)	0.78±0.07	0.74±0.05	0.74±0.06	0.76±0.05	
脾脏		质量(g)	1.04±0.14	1.00±0.10	0.97±0.16	0.93±0.14	
		脏体比值(%)	0.29±0.04	0.28±0.03	0.28±0.05	0.27±0.04	
睾丸		质量(g)	3.39±0.34	3.35±0.23	3.23±0.18	3.17±0.21	
		脏体比值(%)	0.96±0.08	0.94±0.06	0.94±0.05	0.91±0.06	

对照组比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.3.5 大体解剖及组织病理学检查 各组动物大体解剖心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、胃肠等主要脏器未见肉眼可见的中毒症状, 脏器外观颜色和大小正常, 均未出现明显渗出、增生、水肿、萎缩等病变。通过对各组动物脏器组织病理学检查发现, 阴性对照组仅一只雄性大鼠肠粘膜下层出现轻度水肿(图 3A), 未见炎性细胞浸润, 其他脏器均未见异常病理变化; 受试物高剂量组一只雄性大鼠肝脏局部淋巴细胞轻度增生(图 3B); 高剂量组两只雌性大鼠肾小

球萎缩(图 3C), 肾小管内管型增多(图 3D), 肾结构正常, 肾小管、肾小球及间质均未见异常病理变化; 其余大鼠各脏器未见异常病理变化。

各组动物中仅有个别大鼠出现轻度病理改变, 且病变性质和程度无明显差异, 所有病变类型在大鼠中为常见的自发性病理改变, 无明显生物学意义。

综上, 大鼠 30 d 喂养试验中通过对大鼠体重、周食物利用率、血常规指标、血液生化指标、主要脏器系数、组织病理学检查、一般状况等指标的检测, 均未发现含灵芝多糖的复方制剂对大鼠有明显

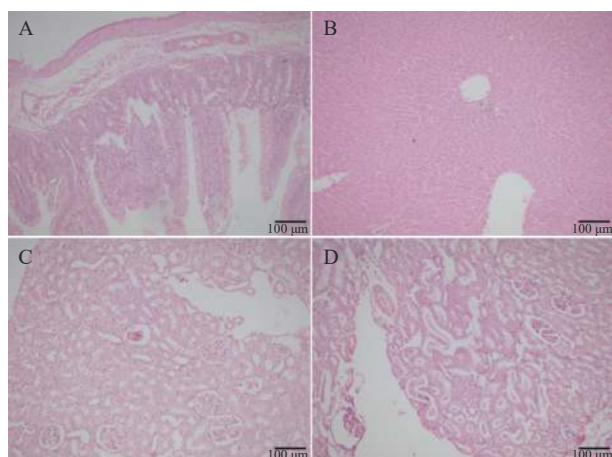


图 3 含灵芝多糖的复方制剂各组大鼠组织病理学变化

Fig.3 Histopathological changes of rats in different dose groups of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides

注: A.阴性对照组肠粘膜; B.高剂量组肝脏; C.高剂量组肾小球; D.高剂量组肾小管。

的毒性作用。

2.4 免疫功能评价试验

2.4.1 脾淋巴细胞转化试验 当脾淋巴细胞受到 ConA 刺激后,可出现细胞体积增大、代谢旺盛、蛋白质及核酸合成增加等生物学现象,部分小淋巴细胞可转化为淋巴母细胞并进行有丝分裂,淋巴母细胞中的线粒体水解酶可将 MTT 分解为紫色结晶,其光密度差值能反映机体细胞免疫水平。如图 4 所示,受试物高、中、低三个剂量组 ConA 孔吸光度差值分别为 0.81、0.81、0.80,与阴性对照孔的吸光度差值(0.84)相比,差异均无统计学意义($P>0.05$)。表明含灵芝多糖的复方制剂不能促进脾淋巴细胞转化为淋巴母细胞,不能提升细胞免疫功能。

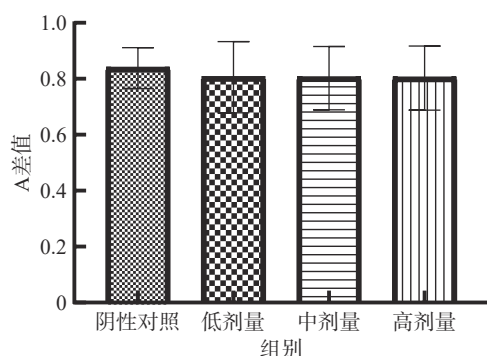


图 4 含灵芝多糖的复方制剂对脾淋巴细胞增殖的影响 (n=10)

Fig.4 Effect of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides on the proliferation of spleen lymphocytes (n=10)

2.4.2 迟发型变态反应 T 淋巴细胞经抗原 DNFB 刺激后形成致敏淋巴细胞,当再次接触抗原后,主要造成单核细胞浸润及细胞变性坏死为特征的局部变态反应性炎症,具体表现为局部迟发型肿胀,通过检

测耳重量差值可以反映迟发型变态反应程度。如图 5 所示,受试物高、中、低三个剂量组左右耳质量差值分别为 14.37、14.96、16.19 mg,与阴性对照组差值(17.09 mg)相比,差异均无统计学意义($P>0.05$)。表明含灵芝多糖的复方制剂不能增强迟发型变态反应,不能提升细胞免疫功能。

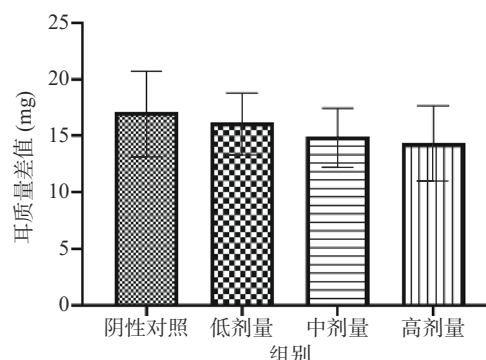


图 5 含灵芝多糖的复方制剂对迟发型变态反应的影响(n=10)

Fig.5 Effect of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides on delayed type hypersensitivity (n=10)

2.4.3 抗体生成细胞检测 当脾淋巴细胞接触绵羊红细胞(抗原)后,刺激 B 细胞活化分泌特异性抗体,抗原抗体复合物在补体的参与下使红细胞溶解,在琼脂糖玻片形成一个肉眼可见的溶血空斑,一个空斑即代表一个抗体生成细胞(浆细胞),因此溶血空斑数可反映体液免疫强弱^[29]。如图 6 所示,受试物低、中、高剂量组溶血空斑数分别为 453.80、458.30、481.00,与阴性对照组(408.90)相比分别提高 10.98%、12.08%、17.63%,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。表明含灵芝多糖的复方制剂能增加抗体生成细胞数,具有增强体液免疫的潜力。

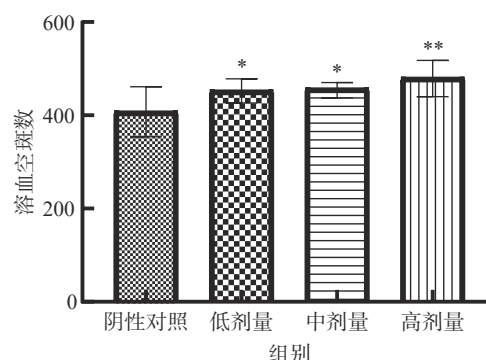


图 6 含灵芝多糖的复方制剂对抗体生成细胞的影响(n=10)

Fig.6 Effect of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides on antibody-producing cells (n=10)
注: 与阴性对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 图 7~图 9 同。

2.4.4 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验 当绵羊红细胞注射入小鼠腹腔,机体固有免疫功能首先发挥作用,静息状态下的巨噬细胞被激活,当再次接触

到异物(鸡红细胞)入侵,活化的巨噬细胞将鸡红细胞吞入,经染色后显微镜下可观察并计数巨噬细胞和被吞噬的鸡血红细胞数,通过公式计算吞噬百分率和吞噬指数可评估巨噬细胞的吞噬能力。如图 7 所示,受试物中、高剂量组吞噬百分率分别为 24.28%、23.81%,与阴性对照组(17.11%)相比分别提高 7.17%、6.70%,差异具有统计学意义($P<0.05$)。如图 8 所示,受试物中、高剂量组吞噬指数均为 0.41,与阴性对照组(0.27)相比均提高 0.14,差异具有统计学意义($P<0.05$)。表明含灵芝多糖的复方制剂能提高巨噬细胞吞噬能力,具有增强非特异性免疫的潜力。

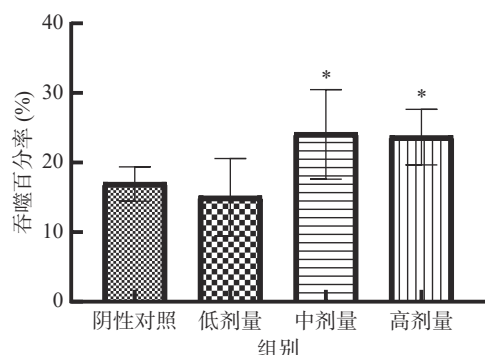


图 7 含灵芝多糖的复方制剂对巨噬细胞吞噬百分率的影响(n=10)

Fig.7 Effect of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides on phagocytosis percentage of macrophages (n=10)

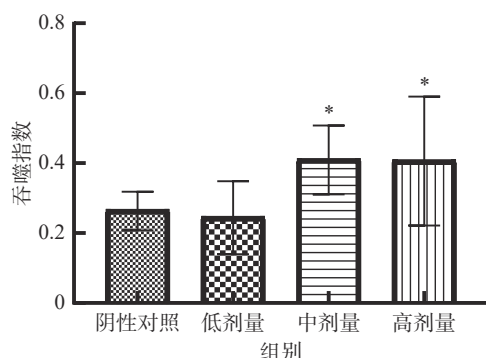


图 8 含灵芝多糖的复方制剂对巨噬细胞吞噬指数的影响(n=10)

Fig.8 Effect of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides on phagocytosis index of macrophages (n=10)

2.4.5 NK 细胞活性测定 正常情况下,靶细胞 YAC-1 胞浆内的乳酸脱氢酶(LDH)不能透过细胞膜,当细胞受到 NK 细胞杀伤后,LDH 释放到胞外,经过一系列反应后生成紫红色甲臍化合物,其光密度值可反映 NK 细胞杀伤活性^[29]。如图 9 所示,受试物中、高剂量组 NK 细胞活性分别为 54.01%、52.57%,与阴性对照组(36.57%)相比分别提高 17.44%、16.00%,差异具有统计学意义($P<0.01$)。表明含灵芝多糖的复方制剂能提高 NK 细胞活性,具有增强

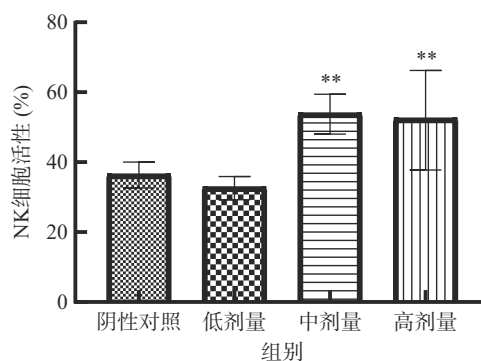


图 9 含灵芝多糖的复方制剂对 NK 细胞活性的影响(n=10)

Fig.9 Effect of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides on the activity of NK cells (n=10)

非特异性免疫的潜力。

3 讨论与结论

现代医学认为,人的免疫系统由免疫器官、免疫细胞及免疫分子构成,根据防御反应类型可分为非特异性免疫和特异性免疫,具有识别、清除外来病原微生物及体内突变细胞,维持机体内环境平衡稳定的功能^[41-43]。免疫力低下时容易受到外界病原微生物入侵或导致过敏反应,患病风险极大增加。传统医学认为“正气存内,邪不可干”和“邪之所凑,其气必虚”,免疫反应本质是正邪相争,正气充实能够祛除外邪,邪气亢盛则导致免疫自稳失调^[44],中医从整体观念出发,通过“扶正祛邪”,调节机体阴阳平衡,增强免疫自稳^[45]。故此,从现代医学和传统医学的角度均揭示了免疫功能的可调节性质。

体液免疫是特异性免疫的重要组成部分,体液免疫主要是通过浆细胞分泌抗体从而发挥免疫应答作用的。通过对溶血空斑数目或吸光度值的检测,可以反映抗体生成细胞的多少,提示体液免疫的强弱。桑卡娜等^[46]研究表明五加芪粉显著提高了小鼠抗体形成细胞水平,具有提升动物体液免疫能力的作用。王溪竹^[47]研究发现人参原三醇组皂苷酶解产物能诱导 B 淋巴细胞分化形成抗体生成细胞,发挥免疫调节作用。本研究表明含灵芝多糖的复方制剂低、中、高剂量组分别使小鼠抗体生成细胞数目提高 10.98%、12.08%、17.63%,具有正向调节体液免疫应答的潜力。

非特异性免疫是机体先天具有的免疫功能,是特异性免疫的基础。对病原体入侵最先产生免疫应答的细胞是巨噬细胞,它们是执行非特异性免疫的主要效应细胞^[48]。单核-巨噬细胞的吞噬能力是衡量机体非特异性免疫功能的标志之一,当病原体、异物等抗原物质进入机体后,其通过趋化、吞噬、杀灭作用迅速清除,因而对巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验的吞噬指数和吞噬百分率检测,可反映吞噬功能的强弱^[49]。本研究表明含灵芝多糖的复方制剂中、高剂量组能分别提高吞噬百分率 7.17%、6.70%,吞噬指数均提高 0.14,即可增强吞噬细胞的吞噬能力。NK 细胞不

同于 T、B 两类淋巴细胞,它没有主要组织相容复合体(MHC)限制,不依赖补体和抗体就能够发挥调节免疫及直接杀伤靶细胞的作用,是机体非特异性免疫的重要组成部分。NK 细胞活化后,还能分泌细胞因子发挥免疫调节作用^[50]。当靶细胞 YAC-1 受到 NK 细胞杀伤后,胞内乳酸脱氢酶被释放到细胞外,进一步通过氧化还原反应生成有色的甲臞类化合物,检测其吸光度值可反映 NK 细胞活性^[29]。本研究表明含灵芝多糖的复方制剂中、高剂量组能使小鼠 NK 细胞活性分别提高 17.44%、16.00%。两项试验结果均表明含灵芝多糖的复方制剂具有增强非特异性免疫的潜力。

此外,为考察含灵芝多糖的复方制剂的食用安全性,本研究采用了小鼠急性经口毒性试验、Ames 试验和大鼠 30 d 喂养试验。结果表明受试物对雌雄小鼠最大耐受剂量(MTD)超过 42.56 g/kg,其剂量相当于人体推荐用量的 1290 倍,急性毒性分级属于无毒物质;受试物 Ames 试验结果阴性,未显示出致突变作用;30 d 喂养试验中,受试物对大鼠体质量、周食物利用率、血常规指标、血液生化学指标及主要脏器系数均未产生显著影响($P>0.05$),组织学检查未发现明显病理变化。

综上所述,本研究从细胞免疫、体液免疫及非特异性免疫的角度,较为系统全面地评价了含灵芝多糖的复方制剂免疫调节功能,结果表明了含灵芝多糖的复方制剂是通过增强体液免疫功能和非特异性免疫功能来发挥免疫调节作用的。在毒理学研究中未发现不良反应或毒副作用。因此,含灵芝多糖的复方制剂是一种可以调节机体免疫功能且安全性良好的保健食品。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] 夏淑洁,李灿东.基于“治未病”理论的特色健康管理模式探讨[J]. 中医导报,2019,25(6): 15-17,23. [XIA S J, LI C D. Discussion on health management model with Chinese characteristics based on the theory of "preventive treatment of diseases"[J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 25(6): 15-17,23.]
- [2] ABABNEH M A, HALLOUSH S, ALTAWALBEH S, et al. Knowledge and attitudes towards herbal and dietary products use during the COVID-19 pandemic[J]. *Clinical Nutrition Open Science*, 2023, 49: 118-129.
- [3] 马征.冬凌草免疫调节作用研究及安全性评价[D].长沙:中南大学,2010. [MA Z. Study on immune regulation of *Rabdosia rubescens* and its safety assessment[D]. Changsha: Central South University, 2010.]
- [4] 乔海博.高纯中药复方多糖免疫调节作用及其安全性评价[D].石河子:石河子大学,2013. [QIAO H B. The immunomodulatory function and safety evaluation of the high-purity Chinese compound polysaccharide[D]. Shihezi: Shihezi University, 2013.]
- [5] 孙帆.桦褐孔菌多糖提高免疫力活性研究与系列产品开发[D].长春:吉林农业大学,2018. [SUN F. Study on the enhancement of immune activity of *Inonotus obliquus* polysaccharides and development of series products[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2018.]
- [6] JIN X, RUIZ BEGUERIE J, SZE D M, et al. *Ganoderma lucidum* (Reishi mushroom) for cancer treatment[J]. The Cochrane Database of Systematic Reviews, 2016, 4(4): Cd007731.
- [7] PAN K, JIANG Q, LIU G, et al. Optimization extraction of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its immunity and antioxidant activities[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 55: 301-306.
- [8] ZHOU Q, YU R, LIU T, et al. Coix seed diet ameliorates immune function disorders in experimental colitis mice[J]. *Nutrients*, 2021, 14(1): 123.
- [9] 王彦芳,杨彬彬,陈倩,等.薏苡仁多糖通过调控 JAK3/STAT5 通路改善细胞免疫功能的体内外研究[J]. 中华中医药杂志,2021,36(11): 6414-6417. [WANG Y F, YANG B B, CHEN Q, et al. *In vitro* and *in vivo* study of coixan improving cellular immune function by regulating the JAK3/STAT5 pathway[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(11): 6414-6417.]
- [10] 王萍,王玉堃,王尚明,等.茯苓多糖对大鼠免疫功能的影响[J]. 山东畜牧兽医,2022,43(8): 11-14,17. [WANG P, WANG Y K, WANG S M, et al. Effects of *Poria cocos* polysaccharide on the immune function of rats[J]. *Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2022, 43(8): 11-14,17.]
- [11] TIAN H, LIU Z J, PU Y W, et al. Immunomodulatory effects exerted by *Poria cocos* polysaccharides via TLR4/TRAF6/NF- κ B signaling *in vitro* and *in vivo*[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 112: 108709.
- [12] LIU C, WANG S, XIANG Z, et al. The chemistry and efficacy benefits of polysaccharides from *Atractylodes macrocephala* Koidz[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 952061.
- [13] XIANG X, CAO N, CHEN F, et al. Polysaccharide of *Atractylodes macrocephala* Koidz (PAMK) alleviates cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice by upregulating CD28/IP3R/PLC γ -1/AP-1/NFAT signal pathway[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 529657.
- [14] WANG Z, FANG J N, GE D L, et al. Chemical characterization and immunological activities of an acidic polysaccharide isolated from the seeds of *Cuscuta chinensis* Lam[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2000, 21(12): 1136-1140.
- [15] 张庆平,石森林.菟丝子对小鼠免疫功能影响的实验研究[J]. 浙江临床医学,2006(6): 568-569. [ZHANG Q P, SHI S L. Study on immunity functions of *Cuscuta chinensis* Lam in mice[J]. *Zhejiang Clinical Medical Journal*, 2006(6): 568-569.]
- [16] ZHAO L, XU C, ZHOU W, et al. *Polygonati rhizoma* with the homology of medicine and food: A review of ethnopharmacology, botany, phytochemistry, pharmacology and applications[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2023, 309: 116296.
- [17] SU L L, LI X, GUO Z J, et al. Effects of different steaming times on the composition, structure and immune activity of *Polygonatum* polysaccharide[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2023, 310: 116351.
- [18] FAN Y, MA X, MA L, et al. Antioxidative and immunological activities of ophiopogon polysaccharide liposome from the root of *Ophiopogon japonicus*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 135: 110-120.
- [19] FAN Y, MA X, ZHANG J, et al. Ophiopogon polysaccha-

- ride liposome can enhance the non-specific and specific immune response in chickens[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 119: 219–227.
- [20] AYEKA P A, BIAN Y, MWITARI P G, et al. Immunomodulatory and anticancer potential of Gan Cao (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) polysaccharides by CT-26 colon carcinoma cell growth inhibition and cytokine IL-7 upregulation *in vitro*[J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 16: 206.
- [21] AYEKA P A, BIAN Y, GITHAIGA P M, et al. The immunomodulatory activities of licorice polysaccharides (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) in CT 26 tumor-bearing mice[J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 17(1): 536.
- [22] TIAN X, LIANG T. Extraction, structural characterization, and biological functions of *Lycium barbarum* polysaccharides: A review[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(9): 389.
- [23] 田阳, 龚桂萍, 路宇, 等. 枸杞子多糖不同组分的双向免疫调节机制研究进展[J]. *食品科学*, 2022, 43(23): 356–366. [TIAN Y, GONG G P, LU Y, et al. Research progress on the dual-directional immunoregulatory effect of different polysaccharide fractions from *Lycium barbarum* fruit[J]. *Food Science*, 2022, 43(23): 356–366.]
- [24] ZHAO T, MAO G, MAO R, et al. Antitumor and immunomodulatory activity of a water-soluble low molecular weight polysaccharide from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill[J]. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 2013, 55: 609–616.
- [25] ZHAO T, FENG Y, LI J, et al. Schisandra polysaccharide evokes immunomodulatory activity through TLR 4-mediated activation of macrophages[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, 65: 33–40.
- [26] TAO J H, DUAN J A, JIANG S, et al. Polysaccharides from *Chrysanthemum morifolium* Ramat ameliorate colitis rats by modulating the intestinal microbiota community[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(46): 80790–80803.
- [27] 郑昌平. 菊花多糖的分离纯化、结构鉴定及其生物活性研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2015. [ZHENG C P. Studies on purification, structural elucidation and bioactivities of polysaccharides from *Chrysanthemum morifolium* flowers[D]. Nanchang: Nanchang University, 2015.]
- [28] ALOTIBY A, ALSHAREEF M. Comparison between healthcare professionals and the general population on parameters related to natural remedies used during the COVID-19 pandemic[J]. *Journal of Multidisciplinary Healthcare*, 2021, 14: 3523–3532.
- [29] 中华人民共和国卫生部. 保健食品功能学评价程序和检验方法规范(2003版)[M]. 北京: 中国标准出版社, 2003. [Ministry of Health of the People's Republic of China. Technical standards for testing assessment of health food (2003 edition)[M]. Beijing: Standards Press of China, 2003.]
- [30] 肖志伟, 乐智勇, 朱国雪, 等. 人参多糖检测方法 & 提取工艺优选[J]. *中国现代中药*, 2016, 18(1): 106–109. [XIAO Z W, LE Z Y, ZHU G X, et al. Optimization of detection method and extraction technology of ginseng polysaccharides[J]. *Modern Chinese Medicine*, 2016, 18(1): 106–109.]
- [31] 张佳莉, 李莉. LC-MS/MS 同时测定灵芝胶囊中 7 种三萜酸的含量[J]. *中国现代应用药学*, 2021, 38(22): 2852–2857. [ZHANG J L, LI L. Simultaneous determination of contents of 7 triterpenoid acids in Lingzhi capsule by LC-MS/MS[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2021, 38(22): 2852–2857.]
- [32] 廖植, 温艳, 王利芳, 等. 苾之康牌红曲丹参胶囊动物毒理学安全性评价研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(15): 4112–4118. [LIAO Z, WEN Y, WANG L F, et al. Toxicological safety evaluation of XinZhiKang brand monascus and Radix Salviae Miltiorrhiae combination capsule[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2018, 9(15): 4112–4118.]
- [33] ZHANG Y, CHEN Q, LUO X, et al. Mutagenicity and safety evaluation of the water extract of *Camellia oleifera* Abel[J]. *Journal of Food Science*, 2011, 76(3): T84–89.
- [34] LU K H, OU G L, CHANG H P, et al. Safety evaluation of water extract of *Gastrodia elata* Blume: Genotoxicity and 28-day oral toxicity studies[J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2020, 114: 104657.
- [35] 李清光, 李世芬, 胡奇, 等. 蝙蝠蛾被毛孢菌丝体的活性成分分析及对小鼠免疫功能的调节作用[J]. *食品科技*, 2020, 45(8): 28–32. [LI Q G, LI S F, HU Q, et al. Analysis of active component of *Hirsutella sinensis* and its effect on immune function in mice[J]. *Food Science and Technology*, 2020, 45(8): 28–32.]
- [36] 李雪梅. 石参胶囊对免疫功能的影响研究及毒理学研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2015. [LI X M. Study on immunity functions and toxicology of Shi-shen capsule[D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2015.]
- [37] 贾秀秀. 人参林蛙油软胶囊的安全性评价及增强免疫功能研究[D]. 长春: 吉林大学, 2017. [JIA X X. Study on safety evaluation and enhancement of immune function of ginseng forest frog oil soft capsule[D]. Changchun: Jilin University, 2017.]
- [38] 王权, 杨婉纯, 凌莉, 等. 灵芝蝙蝠蛾拟青霉菌丝体复合物增强免疫作用研究[J]. *中药材*, 2022, 45(5): 1247–1252. [WANG Q, YANG W C, LING L, et al. Study on immunity-enhancing of a compound of *Ganoderma lucidum* and *Paecilomyces hepiali*[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2022, 45(5): 1247–1252.]
- [39] 张婷婷, 叶子, 王萌, 等. 参贝咀嚼片的免疫调节活性及其安全性评价[J]. *现代食品科技*, 2022, 38(9): 80–91. [ZHANG T T, YE Z, WANG M, et al. Study on immune regulation of ginseng-fritillaria bulb tablet and its safety assessment[J]. *Modern Food Science & Technology*, 2022, 38(9): 80–91.]
- [40] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010. [WEI W, WU X M, LI Y J. Experimental methodology of pharmacology[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2010.]
- [41] 史顶聪. 红景天蛹虫草片增强机体免疫力研究[D]. 长春: 长春工业大学, 2020. [SHI D C. Study on enhancing immunity of cordyceps militaris tablet of *Rhodiola rosea*[D]. Changchun: Changchun University of Technology, 2020.]
- [42] 朱薇薇. 三株健酒毒理学安全性评价及抗疲劳、调节免疫作用研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2010. [ZHU W W. Study on toxicological safety evaluation and anti-fatigue effect and immune functions of Sam Tung God of wine[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010.]
- [43] 焦春伟, 梁慧嘉, 随晶晶, 等. 蝙蝠蛾拟青霉-蛹虫草复方的安全性评价及调节免疫活性研究[J]. *食品安全导刊*, 2022(14): 76–80. [JIAO C W, LIANG H J, SUI J J, et al. Safety evaluation and immunomodulatory activity of a combination of *Paecilomyces hepiali* and *Cordyceps militaris*[J]. *China Food Safety Magazine*, 2022(14): 76–80.]
- [44] 徐晓楠, 方钰发, 王妍. 中医阴阳与免疫的关系初探[J]. *四川中医*, 2019, 37(2): 25–27. [XU X N, FANG Y F, WANG Y. Discussing on the relationship between Yin and Yang of traditional Chinese medicine and immunity[J]. *Journal of Sichuan of Traditional Chinese Medicine*, 2019, 37(2): 25–27.]

- [45] 刘维庆, 陈书保, 沙涛. 中医学与免疫学关系探析[J]. [辽宁中医杂志](#), 2005(12): 1257-1258. [LIU W Q, CHEN S B, SHA T. Analysis of the relationship between traditional Chinese medicine and immunology[J]. [Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine](#), 2005(12): 1257-1258.]
- [46] 桑卡娜, 高艳艳, 周德刚. 五加芪粉对小鼠淋巴细胞增殖功能和抗体形成细胞的影响[J]. [中国兽药杂志](#), 2017, 51(3): 44-47. [SANG K N, GAO Y Y, ZHOU D G. Influence of Wujiaqi powder on lymphocyte proliferation and antibody-forming cells of mice[J]. [Chin J Vet Drug](#), 2017, 51(3): 44-47.]
- [47] 王溪竹. 人参原三醇组皂苷酶解产物改善记忆及提高免疫力研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2019. [WANG X Z. Improvement of memory and immunity by enzymatic hydrolysates of protopanaxatriol[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2019.]
- [48] UTHAISANGSOOK S, DAY N K, BAHNA S L, et al. Innate immunity and its role against infections[J]. [Ann Allergy Asthma Immunol](#), 2002, 88(3): 253-265.
- [49] 宫晓燕, 曲晓波, 王泽玉. 扶正除疫颗粒对免疫功能低下动物免疫调节的影响[J]. [中国临床药理学与治疗学](#), 2005(8): 929-931. [GONG X Y, QU X B, WANG Z Y. Influence on immunological regulation of Fuzhengchuyi granule in mice with immune hypofunction[J]. [Chin J Clin Pharm Therap](#), 2005(8): 929-931.]
- [50] 李博, 王春风, 杨桂连. 自然杀伤细胞在机体免疫中的作用及机制研究进展[J]. [中国免疫学杂志](#), 2015, 31(5): 719-721. [LI B, WANG C F, YANG G L. Research progress on the role and mechanism of natural killer cells in immunity[J]. [Chinese Journal of Immunology](#), 2015, 31(5): 719-721.]