

虫草灵芝孢子粉复合物对小鼠免疫功能的影响

张 艳, 叶克难*

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 目的: 探讨虫草灵芝孢子粉复合物对小鼠免疫功能的调节作用。方法: 实验将虫草灵芝孢子粉分为低、中、高 3 个剂量组, 并设置对照组, 分别喂饲小鼠 30d, 观察小鼠体质量及免疫器官指数变化、迟发型变态反应(DTH)、ConA 诱导的淋巴细胞转化能力、血清溶血素生成、碳廓清能力和巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力 6 个项目。结果: 与对照组比较, 虫草灵芝孢子粉高剂量组显著提高小鼠胸腺指数, 低、中剂量组显著提高小鼠迟发型变态反应, 高剂量组显著提高小鼠淋巴细胞的增殖能力, 提示虫草灵芝孢子粉能增强小鼠特异性免疫应答。低、中剂量组还能显著提高巨噬细胞碳廓清能力和吞噬鸡红细胞能力, 提示虫草灵芝孢子粉可增强正常小鼠巨噬细胞吞噬能力, 增强小鼠非特异性免疫应答。结论: 虫草灵芝孢子粉复合物能增强小鼠特异性免疫作用和非特异性免疫作用, 具有增强小鼠免疫功能的作用。

关键词: 虫草; 灵芝孢子粉; 免疫调节

Effects of Cultured *Cordyceps militaris*-*Ganoderma lucidum* Spore Complex on Immune Function in Mice

ZHANG Yan, YE Ke-nan*

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

Abstract: Objective: To study the modulatory effect of cultured *Cordyceps militaris*-*Ganoderma lucidum* spore complex on the immune function of mice. Methods: In this study, mice were orally administered with the complex at low, medium and high doses for 30 days. After the last administration, mouse body weight, immune organ indices, delayed-type hypersensitivity (DTH), T lymphocyte proliferation induced by ConA, serum hemolysin formation, carbon clearance capability and the chicken red blood cell phagocytosis ability of mouse macrophages were assayed. Results: Compared with the control group, the high-dose treatment group significantly improved the body weight and thymus index of mice, the low- and medium- dose treatment groups showed a significant increase in delayed-type hypersensitivity, and the high-dose treatment group significantly enhanced the ability of ConA induced lymphocyte proliferation. These findings suggest that cultured *Cordyceps militaris*-*Ganoderma lucidum* spore complex can enhance specific immune responses in mice. Moreover, both the low and medium doses could also significantly enhance mouse carbon clearance capability and the chicken red blood cell phagocytosis ability of mouse macrophages, suggesting that the complex can enhance non-specific immune responses in mice. Conclusions: Cultured *Cordyceps militaris*-*Ganoderma lucidum* spore complex can enhance specific immune response and non-specific immune responses in mice, thus enhancing the immune system function of mice.

Key words: *Cordyceps militaris*; *Ganoderma lucidum* spores; immune modulation

中图分类号: S567.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)17-0269-05

虫草灵芝孢子粉复合物是以人工蛹虫草(*Cordyceps militaris*)、灵芝(*Ganoderma lucidum*)孢子粉为主要有效成分, 经超微粉碎后按一定比例配制而成的产品。冬虫夏草是麦角菌科真菌冬虫夏草寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座及幼虫尸体的复合体, 是一种传统的名贵滋补中药材^[1]。由于天然虫草产地特殊, 产量有限, 加之掠夺性开采, 导致天然虫草资源匮乏, 不能满足市

场的需要^[2-3]。现代药物研究表明, 人工蛹虫草有效成分及药效成分接近于天然虫草, 且具有提高免疫力、抗肿瘤、抗疲劳等多种功效^[4-6]。灵芝孢子粉是灵芝发育后期弹射出来的种子, 凝聚了灵芝的精华, 具有灵芝的全部遗传活性物质和保健作用^[7]。药理学研究证明灵芝孢子粉具有调节免疫力^[8]、防辐射、抗肿瘤、降血脂、护肝及改善睡眠等作用^[9-11]。因此, 两者分别均有

收稿日期: 2011-07-11

作者简介: 张艳(1986—), 女, 硕士, 研究方向为应用生物技术。E-mail: zhangyansuny@126.com

* 通信作者: 叶克难(1964—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为应用生物技术。E-mail: yekenan@mail.sysu.edu.cn

增强机体免疫功能的作用,但对于两者配伍后的复合产品在改善免疫调节的保健功能研究方面报道不多,为此对这方面进行研究,旨在为虫草、灵芝产品的进一步开发提供理论与实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

人工蛹虫草(多糖含量约8%)、灵芝孢子粉(多糖含量约1.4%),均由本实验室提供。

2,4-二硝基氟苯(DNFB) 上海试剂一厂;中华墨汁北京一得阁墨业有限责任公司;吉姆萨工作液 北京索莱宝科技有限公司;DMEM培养基 美国Invitrogen公司;胎牛血清 浙江天杭生物科技有限公司;噻唑兰(MTT)、刀豆蛋白(ConA) 美国Sigma公司;二甲基亚砷(DMSO) 广州国奥生物技术有限公司。

1.2 动物

SPF级昆明种小鼠,雌性,体质量范围18~22g,由广东省实验动物中心提供(许可证号:SCXK(粤)2008-0002)。

1.3 仪器与设备

722可见分光光度计 上海佑科仪器仪表有限公司;冷冻离心机 日本日立公司;CO₂培养箱、E-330酶标仪 美国Thermo公司;超净工作台 苏州净化设备厂;恒温水浴锅 上海博讯实业有限公司;电子天平北京赛多利斯天平有限公司;电子显微镜 日本Olympus公司。

1.4 方法

根据卫生部《保健食品检验与评价技术规范》(2003年版)中增强免疫力功能检验方法进行^[12]。虫草灵芝孢子粉复合物按照两者多糖比例1:1配制而成,参照中大生科牌破壁灵芝孢子粉胶囊人体推荐日摄入量,为0.9g/60kg(即0.015g/kg)扩大5、10、30倍设置低、中、高3个剂量组,剂量分别为75、150、450mg/kg,同时设置对照组,每组10只昆明种SPF小鼠,连续灌胃4周,灌胃容量为0.1mL/20g,每7d称质量一次,根据体质量变化给予不同剂量。

1.4.1 脏器指数测定

灌胃结束后,称质量,颈椎脱臼处死,解剖动物,取出脾脏及胸腺,用滤纸吸干血后称质量,计算脏器指数,均为脏器质量和小鼠体质量的比值。

1.4.2 二硝基氟苯诱导的小鼠迟发型变态反应(DTH)

灌胃结束后,用薇婷牌脱毛膏给小鼠腹部皮肤脱毛,范围约3cm×3cm,用DNFB溶液50μL均匀涂抹致敏。致敏5d后,用DNFB溶液10μL均匀涂抹于小鼠右耳两面,再次致敏。再次致敏24h后,颈椎脱臼

处死小鼠,剪下左右两耳,用打孔器取下直径8mm的耳片称质量,小鼠左右两耳质量之差,即耳肿胀度来表示DTH的程度。

1.4.3 ConA诱导的小鼠淋巴细胞转化能力实验

灌胃结束后,颈椎脱臼处死小鼠,75%酒精浸泡,无菌取脾,置于盛有适量无菌PBS的小平皿中,用小镊子轻轻将小鼠的脾撕碎,制成单细胞悬液。经200目筛网过滤,然后将小鼠的脾细胞悬浮于2mL DMEM培养液中,且调整脾细胞浓度为1×10⁷个/mL。按照常规方法进行脾细胞增殖反应:将小鼠脾细胞悬液分别加入24孔培养板中,每个处理使用两孔,每孔1mL,一孔加入50μL ConA,另一孔加入50μL的双蒸水作为对照,然后将培养板置于5% CO₂,37℃的CO₂培养箱中培养48h,培养结束前4h,每孔轻轻吸去上清液0.7mL,加入0.7mL不含小牛血清的DMEM培养液,同时每孔加入MTT 50μL,继续培养4只小鼠。培养结束后,每孔加入1mL DMSO,吹打混匀,使紫色结晶完全溶解,然后分装到96孔培养板中,每孔分装3孔作为平行对照,用酶联免疫检测仪,以570nm波长处读取OD_{570nm}值,小鼠淋巴细胞的转化能力以ΔOD_{570nm}值表示,其中ΔOD_{570nm}值为加入ConA孔的OD'_{570nm}值与未加入ConA孔的OD_{570nm}值之差。

1.4.4 血清溶血素效价的测定

灌胃结束后,每只小鼠腹腔注射5g/100mL鸡红细胞悬液0.2mL进行免疫,免疫7d后,内毗静脉丛取血,室温条件下放置1h,用长针将凝固血与管壁分离,以2000r/min离心10min。取血清用生理盐水稀释100倍,取稀释血清1mL,与5g/100mL鸡红细胞悬液0.5mL、10g/100mL补体(豚鼠血清,用生理盐水配成10%)0.5mL混合,37℃保温30min,0℃终止反应。1000r/min离心5min后,取上清液与722分光光度计于540nm波长处比色,记录OD_{540nm}值。

1.4.5 小鼠单核-巨噬细胞碳廓清能力实验

灌胃结束后,从小鼠的尾静脉按0.1mL/10g剂量注射质量浓度为20g/100mL的墨汁,间隔2、15min后,分别从小鼠内毗静脉丛取血20μL,加入到2mL的0.1%Na₂CO₃溶液中。用分光光度计在600nm波长处分别测定OD_{600nm}值,以Na₂CO₃溶液作对照。然后颈椎脱臼处死小鼠,取出肝脏和脾脏,用滤纸吸干脏器表面的血污,称质量。将测出的OD_{600nm}值、肝脏和脾脏质量代入公式,算出吞噬指数。

$$K = \frac{\lg OD_1 - \lg OD_2}{15 - 2}, \text{吞噬指数} = \frac{\text{体质量}}{\text{脾脏质量} + \text{肝脏质量}} \sqrt[3]{K} \quad (1)$$

式中:K是修正系数;OD₁、OD₂分别为15、2min对应条件下的OD_{600nm}值。

1.4.6 小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验

灌胃结束后,向每只小鼠腹腔注射 20g/100mL 鸡红细胞悬液 1mL。间隔 30min,颈椎脱臼处死小鼠,正中剪开小鼠腹壁皮肤,经腹腔注入生理盐水 2mL,轻揉 1min。然后吸出腹腔洗液 1mL,平均分滴于 2 片玻片上,放入垫有湿纱布的搪瓷盒内,37℃温育 30min。生理盐水漂洗,除去未贴片的巨噬细胞。晾干,以体积比 1:1 丙酮-甲醇溶液固定,体积分数 4% Giemsa-磷酸缓冲液染色 3min,再用蒸馏水漂洗晾干,显微镜下计数,计算吞噬率和吞噬指数。

$$\text{吞噬率} / \% = \frac{\text{吞噬鸡红细胞的吞噬细胞数}}{\text{计数的吞噬细胞数}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{吞噬指数} = \frac{\text{被吞噬的鸡红细胞数}}{\text{计数的吞噬细胞数}} \quad (3)$$

1.4.7 数据处理

所有数据均采用均数±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 结果与分析

2.1 虫草灵芝孢子粉复合物对小鼠免疫器官指数的影响

表 1 虫草灵芝孢子粉复合物对小鼠免疫器官指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of cultured *Cordyceps militaris*-*Ganoderma lucidum* spore complex on immune organ indices in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg/kg)	脾脏指数/(mg/g)	胸腺指数/(mg/g)
对照组		3.52 ± 0.82	3.35 ± 0.94
虫草灵芝孢子粉复合物	低剂量组 75	3.51 ± 0.62	3.52 ± 0.86
	中剂量组 150	3.24 ± 0.56	3.76 ± 0.45
	高剂量组 450	3.31 ± 0.43	4.34 ± 0.84*

注: *与对照组比较,差异显著($P < 0.05$)。下同。

由表 1 可见,与对照组相比,虫草灵芝孢子粉复合物高剂量组在小鼠胸腺指数上具有显著性统计学差异($P < 0.05$),而在小鼠脾脏指数上无显著性差异;低、中剂量组在小鼠脾脏指数、胸腺指数上均不具有显著性差异($P > 0.05$)。说明复合物有助于提高小鼠胸腺指数。

2.2 虫草灵芝孢子粉复合物对小鼠迟发型变态反应的影响

由表 2 可见,与对照组相比,虫草灵芝孢子粉复合物低、中剂量组在小鼠耳肿胀度上具有显著性统计学差异($P < 0.05$),高剂量组不具有显著性统计学差异($P > 0.05$)。说明复合物对小鼠迟发型变态反应(DTH)具有显著增强作用。

表 2 虫草灵芝孢子粉复合物对小鼠迟发型变态反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of cultured *Cordyceps militaris*-*Ganoderma lucidum* spore complex on DTH in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg/kg)	耳肿胀度/mg
对照组		0.52 ± 0.40
虫草灵芝孢子粉复合物	低剂量组 75	1.39 ± 0.87*
	中剂量组 150	0.96 ± 0.70*
	高剂量组 450	0.94 ± 0.65

2.3 虫草灵芝孢子粉复合物对小鼠淋巴细胞转化能力的影响

表 3 虫草灵芝孢子粉复合物对小鼠淋巴细胞转化能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of cultured *Cordyceps militaris*-*Ganoderma lucidum* spore complex on ConA induced lymphopoiesis in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg/kg)	ΔOD_{570nm}
对照组		0.045 ± 0.034
虫草灵芝孢子粉复合物	低剂量组 75	0.059 ± 0.041
	中剂量组 150	0.062 ± 0.056
	高剂量组 450	0.103 ± 0.070*

由表 3 可见,与对照组相比,虫草灵芝孢子粉复合物 3 个剂量组在小鼠淋巴细胞转化能力上均高于对照组,且随剂量的增加而增加,呈一定的量效关系,但低、中剂量组不具有显著性统计学差异($P > 0.05$),只有高剂量组具有显著性统计学差异($P < 0.05$)。说明复合物有助于提高 ConA 诱导的小鼠淋巴细胞的增殖能力。

2.4 虫草灵芝孢子粉复合物对小鼠血清溶血素生成的影响

表 4 虫草灵芝孢子粉复合物对小鼠血清溶血素生成的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effect of cultured *Cordyceps militaris*-*Ganoderma lucidum* spore complex on serum hemolysin in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg/kg)	OD _{540nm}
对照组		0.129 ± 0.021
虫草灵芝孢子粉复合物	低剂量组 75	0.132 ± 0.020
	中剂量组 150	0.140 ± 0.019
	高剂量组 450	0.155 ± 0.059

由表 4 可见,与对照组相比,虫草灵芝孢子粉复合物 3 个剂量组在小鼠血清溶血素生成的影响上均高于对照组,且随剂量的增加而增加,呈一定的量效关系,但均无显著性统计学差异($P > 0.05$)。说明复合物对小鼠血清溶血素的生成无明显影响。

2.5 虫草灵芝孢子粉复合物对小鼠单核-巨噬细胞碳廓清能力的影响

表5 虫草灵芝孢子粉复合物对小鼠巨噬细胞碳廓清能力的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 5 Effect of cultured *Cordyceps militaris*-*Ganoderma lucidum* spore complex on carbon clearance capability in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg/kg)	吞噬指数
对照组		4.74 ± 1.18
虫草灵芝孢子粉复合物	低剂量组	75
	中剂量组	150
	高剂量组	450
		5.57 ± 0.38*
		5.60 ± 0.54*
		5.12 ± 1.14

由表5可见,与对照组相比,虫草灵芝孢子粉复合物低、中剂量组在小鼠巨噬细胞碳廓清能力上具有显著性统计学差异($P < 0.05$),高剂量组不具有显著性统计学差异($P > 0.05$)。说明复合物对小鼠单核-巨噬细胞碳廓清能力具有显著增强作用。

2.6 虫草灵芝孢子粉复合物对小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力的影响

表6 虫草灵芝孢子粉复合物对小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 6 Effect of cultured *Cordyceps militaris*-*Ganoderma lucidum* spore complex on mouse macrophage phagocytosis for chicken red blood cells($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg/kg)	吞噬率/%	吞噬指数
对照组		20.3 ± 3.8	0.34 ± 0.07
虫草灵芝孢子粉复合物	低剂量组	75	28.4 ± 4.2*
	中剂量组	150	29.3 ± 6.4*
	高剂量组	450	22.6 ± 4.9
		0.44 ± 0.11*	
		0.43 ± 0.05*	
		0.40 ± 0.12	

由表6可见,与对照组相比,虫草灵芝孢子粉复合物低、中剂量组在小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力上具有显著性统计学差异($P < 0.05$),高剂量组不具有显著性统计学差异($P > 0.05$)。说明复合物对小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力具有显著增强作用。

3 讨论

免疫是指机体免疫系统识别自身与异己物质,并通过免疫应答排除抗原性异物,以维持机体生理平衡的功能。人体免疫系统是由免疫器官(骨髓、胸腺、脾等)、免疫细胞(吞噬细胞、淋巴细胞)和免疫活性物质(抗体、淋巴因子等)组成,是免疫功能发挥的物质基础。目前,人们普遍认为机体的健康状况及寿命的长短与机体的免疫功能息息相关^[13-15]。当机体免疫功能下降或受抑制时,机体不能有效地识别并清除突变的细胞及外来的细菌、病毒等,肿瘤及感染性疾病发生率增高^[16-17]。因此,如何提高自身免疫力成了人们最关注的话题,开发出具有免疫增强作用的安全功能食品成为研究热点。

冬虫夏草、灵芝作为传统的名贵中药材,具有很多药理活性,尤其是免疫活性,自古以来就被人们广

泛关注^[18-19]。人工蛹虫草作为应运而生的天然冬虫夏草替代物,具有和天然冬虫夏草同样的药理功能^[20-21]。本实验结果表明,虫草灵芝孢子粉复合物能显著增强DNFB诱导的小鼠的DTH,对ConA诱导的小鼠淋巴细胞增殖能力具有一定的促进作用,说明其在细胞免疫方面具有显著增强作用;能显著提高小鼠巨噬细胞碳廓清能力和巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力,说明其在非特异性免疫方面具有显著增强作用。综上所述,虫草灵芝孢子粉复合物可以增强机体的特异性免疫应答和非特异性免疫应答,具有增强免疫功能的作用。

但是从量效关系看,DTH反应、碳廓清和巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验中均呈现低、中剂量组效果明显,高剂量组效果不明显;淋巴细胞转化实验和血清溶血素生成实验中则呈现效果随剂量的增加而加强的现象,提示临床使用时不应过量使用,适量使用效果最好,原因可能是过高剂量引起免疫系统应答机制的反应不明显,有关这方面的机理需进一步研究。因此今后的研究重点应该放在具体的量效关系上。此外,与本实验室人工虫草多糖提取物对小鼠免疫功能影响的研究相比,虫草灵芝孢子粉复合物对小鼠免疫功能影响的效果呈现出大体一致的关系,但具体产生的作用是协同还是拮抗而导致对机体免疫增强效果的升高或降低仍需进一步研究。此外,虫草与孢子粉的配伍方式、具体的作用机制以及人群应用的效果与动物实验的结果与剂量关系是否完全一致仍需进一步探讨。

参考文献:

- [1] 胡晓云,赖艳.冬虫夏草的开发研究进展[J].江西农业学报,2007,19(12):83-86.
- [2] 吴雪晶,马慧俊,刘宁.北冬虫夏草与冬虫夏草的药用价值比较[J].浙江食用菌,2009,17(5):12-14.
- [3] DAS S K, MASUDA M, SAKURAI A, et al. Medicinal uses of the *Cordyceps militaris* mushroom current state and prospects[J]. Fitoterapia, 2010, 81: 961-968.
- [4] 官东秀,冯祚臻.天然和人工冬虫夏草化学成分的定量测定方法[J].中国药师,2004,7(2):134-136.
- [5] 连云岚,杨中林.北冬虫夏草化学成分及药理作用研究进展[J].山西医药杂志,2006,35(1):44-46.
- [6] 张平,朱述钧,钱大顺,等.北冬虫夏草功能成分及保健作用分析[J].江苏农业科学,2003(6):105-107.
- [7] 陈宝田,龙亚秋,李华,等.灵芝孢子粉的药理作用研究进展[J].中国药房,2010,21(15):1439-1440.
- [8] CHAN W K, LAM D T W, LAW H K W, et al. *Ganoderma lucidum* mycelium and spore extracts as natural adjuvants for immunotherapy[J]. Journal of Alternative and Complimentary Medicine, 2005, 11(6): 1047-1057.
- [9] 肖智杰,王进军,连宾.灵芝产品的研究与开发现状[J].食品科学,2006,27(12):837-841.
- [10] 刘虹,周甄鸿,刘志宏.灵芝孢子粉药理作用研究进展[J].天津中医学院学报,2002,21(4):50-51.
- [11] 陈萍.灵芝孢子粉研究进展[J].食品研究与开发,1999,20(2):11-14.

- [12] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检测与评价技术规范[EB/OL]. [2011-06-29]. <http://ishare.iask.sina.com.cn/f/16713282.html>.
- [13] 赵晓东. 免疫调节与疾病[J]. 实用儿科临床杂志, 2006, 21(21): 1441-1442.
- [14] 吕力为. 免疫系统的衰老及其机制[J]. 实用老年医学, 2010, 24(3): 181-183.
- [15] GOOD R A, FERNANDES G, YUNIS E J, et al. Nutritional deficiency, immunologic function and disease[J]. American Journal of Pathology, 1976, 84(3): 599-614.
- [16] 李文娟, 聂少平, 余强, 等. 黑灵芝多糖对免疫抑制小鼠的免疫调节作用[J]. 食品科学, 2009, 30(19): 297-299.
- [17] 刘徽婷, 王嘉军. 乳腺肿瘤细胞免疫逃逸机制的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2010, 38(1): 79-82.
- [18] 史宇翔. 冬虫夏草药理作用研究概况[J]. 中国药业, 2005, 14(2): 72-84.
- [19] 刘建萍, 刘雪平. 灵芝免疫活性成分及其制剂的研究概况[J]. 天津药学, 2004, 16(6): 43-45.
- [20] 刘春泉, 郑安俭, 李大婧, 等. 北冬虫夏草超微粉对小鼠免疫功能的增强作用[J]. 江苏农业学报, 2007, 23(11): 63-66.
- [21] WON S Y, PAK E K. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris* [J]. Journal of Thnopharmacology, 2005, 96: 556-561.