

液体发酵的桑黄多糖 对小鼠免疫功能的影响

魏 静,陈 力,邓亚君,邹 祥,徐兴然*

(西南大学药学院,重庆 400715)

摘 要:研究液体发酵分离纯化得到的桑黄多糖对小鼠免疫功能的影响。研究桑黄多糖对小鼠的免疫器官、碳廓清率以及IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IFN- γ 、TNF- α 细胞因子的影响,发现桑黄多糖能显著提高小鼠胸腺重量和脾脏重量,增强小鼠碳廓清率,增加IL-2和IFN- γ 的含量,降低IL-1、IL-6、TNF- α 的含量。证实桑黄多糖能显著增强小鼠的机体免疫力,有一定的抗炎作用。

关键词:液体发酵,桑黄多糖,小鼠,免疫,细胞因子

Effect of polysaccharides from *Phellinus igniarius* by liquid fermentation technology on mouse's immunity function

WEI Jing, CHEN Li, DENG Ya-jun, ZOU Xiang, XU Xing-ran*

(College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: To study the effect of polysaccharides from *Phellinus igniarius* by liquid fermentation technology on mouse's immunity function. It mainly studied the immune organs in mice, carbon clearance rate, and IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α affected by *P. igniarius* polysaccharide. The results showed that it could significantly increase the weight of thymus and spleen, enhance carbon clearance rate, increase the content of IL-2 and IFN- γ , reduce the content of IL-1, IL-6 and TNF- α . It was confirmed that polysaccharides from *Phellinus igniarius* could significantly enhance immunity, and there was a certain anti-inflammatory effects.

Key words: liquid fermentation technology; polysaccharides from *Phellinus igniarius*; mice; immune; cytokines

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)08-0344-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.08.064

桑黄是一种珍贵的药用真菌,是国际公认抗癌效果较好的药物,它的主要活性成分是桑黄多糖^[1-3]。现代研究表明,桑黄多糖通过细胞调节和体液免疫等提高机体免疫力而抑制肿瘤细胞的生长和转移^[4-5]。目前,国内外有各种桑黄类产品,包括抗癌药品、提高机体免疫力的保健品等,市场需求量较大。

然而,桑黄的药理研究大多使用的是桑黄子实体提取物,子实体栽培周期长,容易受自然气候和原料等的限制^[6]。随着现代抗生素工业的迅速发展,液体发酵技术也广泛应用到药用真菌生产领域,该技术具有可大规模连续生产、周期短、产量高和生产效益高等优点^[7]。实验室利用桑黄发酵得到菌丝体^[8],通过分离纯化制得桑黄多糖,本实验参照中华人民共和国卫生部保健食品检测与评价技术规范(2003版)^[9]关于增强免疫力功能评价,研究该桑黄多糖对小鼠的免疫器官、碳廓清率以及IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、

IFN- γ 、TNF- α 细胞因子的影响,为其广泛应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

昆明种(KM)小鼠 SPF级,雄性,13~17 g,购自重庆中药研究所,实验动物生产许可证号SCXK(渝)2012-0006;饲料 购自重庆中药研究所;桑黄多糖口服液 由桑黄液体发酵液及其菌丝体分离纯化制成,成分是桑黄多糖(含量为8.8 mg/mL),桑黄菌种由西南大学药学院制药工程研究室筛选保藏;大肠杆菌 由本实验室保存;黄芪多糖口服液 艾迪森生物科技有限公司;IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IFN- γ 、TNF- α ELISA试剂盒 美国RD公司;注射用印度墨汁 Solarbio公司;0.1% Na₂CO₃。

ELX800型酶标仪 美国伯腾仪器有限公司;离心机 Thermo公司;电子天平 北京赛多利斯仪器

收稿日期:2015-10-19

作者简介:魏静(1990-),女,硕士研究生,研究方向:生物技术药物筛选及其质量控制,E-mail:weijingfenming@126.com。

*通讯作者:徐兴然(1967-),男,博士,副教授,研究方向:生物技术药物筛选及其质量控制,E-mail:623475202@qq.com。

基金项目:国家农业科技成果转化资金项目(2012F1003006);国家自然科学基金资助项目(31472170)。

系统有限公司; T6紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组及处理 100只KM种小鼠,随机分为五组:空白对照组(即为生理盐水组,NS),黄芪多糖口服液组(阳性对照组,3.36 mL/kg),桑黄多糖口服液低剂量组(5 mg/kg)、中剂量组(10 mg/kg)、高剂量组(20 mg/kg)。每组20只,经灌胃给予受试样品15 d,每天一次。给药后间隔一定的时间补充饲料,不间断给水。最后给药1 h后进行测定^[8-9]。

1.2.2 胸腺指数和脾指数测定 各组分别取10只,称重,腹腔注射灭活的大肠杆菌,4 h内进行趾静脉取血,小鼠处死后分别取出胸腺和脾脏,剥离脂肪组织,称重,测定胸腺指数和脾脏指数指标。

胸腺指数(脾脏指数)=胸腺(脾脏)重量/体重

1.2.3 巨噬细胞功能测定 小鼠碳廓清实验:各组分别取10只,称重,每鼠尾静脉注入注射用墨汁(0.1 mL/10 g·bw),注入后立即计时,于注入墨汁后2、10 min,分别从内眦静脉丛取血20 μ L,并立即将其加到2 mL 0.1% Na_2CO_3 溶液中。用紫外分光光度计在600 nm波长处测光密度值(OD),以 Na_2CO_3 溶液作空白对照。按下列公式计算廓清指数K:廓清指数K=($\log \text{OD}_2 - \log \text{OD}_{10}$)/($t_{10} - t_2$)。OD₂、OD₁₀分别指注射墨汁后2 min(t_2)和10 min(t_{10})的光密度值。

在注射墨汁10 min后眦静脉取血,将小鼠处死,取肝脏和脾脏,用滤纸吸干脏器表面血污,称重。以校正的吞噬指数(a)表示小鼠碳廓清的能力^[9],反映了每单位组织重量的吞噬活性,计算公式为: $a = \text{体重}/(\text{肝重} + \text{脾重}) \times \sqrt[3]{K}$ 。

1.2.4 细胞因子测定 由1.2.2趾静脉取得的全血,室温放置1 h以上,3000 r/min离心10 min,取血清,备用。按照ELISA试剂盒的说明书,进行细胞因子IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IFN- γ 、TNF- α 的测定。

1.2.5 数据处理 用SPSS 19软件进行数据处理,采用单因素方差分析法,先进行F检验,再进行多重比较分析(LSD法)。并应用OriginPro 8作图对结果直观显示。

2 结果与分析

2.1 胸腺指数和脾指数测定

分别以不同剂量的桑黄多糖口服液、黄芪多糖口服液和生理盐水灌胃小鼠,研究桑黄多糖对胸腺、

表1 桑黄多糖口服液对小鼠免疫器官重量的影响(n=10)

Table 1 Effect of polysaccharides from *Phellinus igniarius* on the weight of mice's immunity organs(n=10)

组别	胸腺指数(mg/g)	脾脏指数(mg/g)
生理盐水组	3.13 $\pm$ 0.15	2.07 $\pm$ 0.22
黄芪多糖口服液	3.60 $\pm$ 0.22**	2.39 $\pm$ 0.22
低剂量组	3.37 $\pm$ 0.21	2.58 $\pm$ 0.11
中剂量组	3.40 $\pm$ 0.11**	2.63 $\pm$ 0.24*
高剂量组	4.03 $\pm$ 0.21**	2.81 $\pm$ 0.09**

注:**、*表示与生理盐水组比较差异极显著($p < 0.01$),显著($p < 0.05$);表2、图1~图6同。

肝脏等免疫器官的影响,结果见表1。

由表1多重比较可知,与生理盐水组比较,中剂量组(10 mg/kg)的桑黄多糖口服液能使小鼠胸腺指数极显著($p < 0.01$)增加,脾脏指数显著($p < 0.05$)增加,高剂量组(20 mg/kg)的桑黄多糖口服液能使小鼠胸腺指数和脾脏指数极显著($p < 0.01$)增加。黄芪多糖口服液在说明书指定等效剂量下,小鼠胸腺指数极显著($p < 0.01$)增加。胸腺指数和脾脏指数是评价机体免疫功能的重要参数,而桑黄多糖高剂量组的胸腺指数和脾脏指数均高于黄芪多糖口服液组。桑黄多糖说明对小鼠的免疫功能有促进作用,且效果优于黄芪多糖口服液。

2.2 小鼠碳廓清实验

巨噬细胞吞噬功能是特异性和非特异性免疫功能的一个重要指标,测定方法有两大类:体内法和体外法。本实验采用体内法进行小鼠碳廓清实验,以吞噬指数表示小鼠碳廓清的能力,指数越大,则说明对异物的吞噬活性越高。其碳廓清指数和吞噬指数测定结果见表2。

表2 桑黄多糖口服液对小鼠碳粒廓清率的影响

Table 2 Effect of polysaccharides from *Phellinus igniarius* on the carbon clearance rate of mice

组别	碳廓清指数	吞噬指数
生理盐水组	0.055 $\pm$ 0.011	7.586 $\pm$ 0.593
黄芪多糖口服液	0.102 $\pm$ 0.004**	8.900 $\pm$ 0.194
低剂量组	0.065 $\pm$ 0.008	7.655 $\pm$ 0.004
中剂量组	0.072 $\pm$ 0.003	8.362 $\pm$ 0.181
高剂量组	0.084 $\pm$ 0.014*	9.102 $\pm$ 0.476*

由表2可知,与生理盐水组相比,桑黄口服液高剂量组碳廓清指数和吞噬指数显著($p < 0.05$)提高,说明显著提高了小鼠碳廓清能力;而黄芪多糖口服液只能极显著($p < 0.01$)提高小鼠的碳廓清指数。说明桑黄多糖对小鼠的非特异性免疫有明显的促进作用。

2.3 细胞因子测定

对实验获得的血清进行ELISA测定,结果见图1~图6。

图1~图3可见,对于IL-1、IL-6、TNF- α 含量,阳

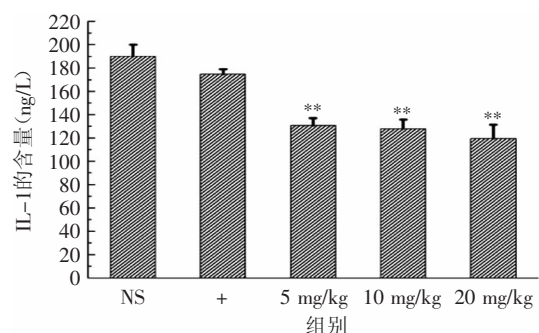


图1 桑黄多糖对小鼠血清中IL-1的影响

Fig.1 Effect of polysaccharides from *Phellinus igniarius* on the concentration of IL-1 in serum of mice

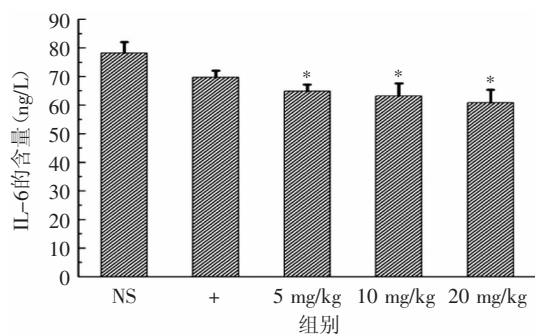


图2 桑黄多糖对小鼠血清中IL-6的影响

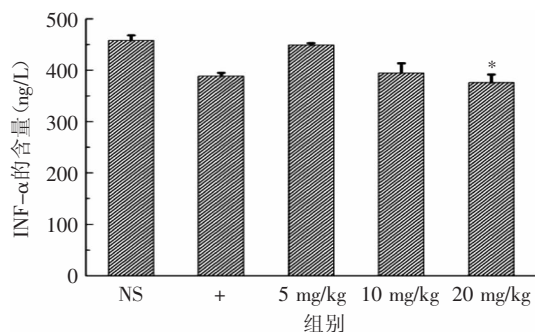
Fig.2 Effect of polysaccharides from *Phellinus igniarius* on the concentration of IL-6 in serum of mice

图3 桑黄多糖对小鼠血清中TNF-α的影响

Fig.3 Effect of polysaccharides from *Phellinus igniarius* on the concentration of TNF-α in serum of mice

性对照组同生理盐水组相比,能一定程度降低其含量,但无显著性差异。而桑黄口服液低、中、高剂量组同生理盐水组相比,均能极显著($p<0.01$)降低IL-1的含量,并且呈剂量依赖型;低、中、高剂量组能显著($p<0.05$)降低IL-6的含量,且呈剂量依赖型;高剂量组能显著($p<0.05$)降低TNF-α的含量。IL-1是一种内源性致热源,炎症介质;IL-6能刺激肝细胞产生急性期反应蛋白,引起发热;TNF-α是引起炎症反应的关键细胞因子,而在实验剂量和时间下,桑黄多糖能显著降低它们的含量,证实桑黄口服液有很好的抗炎作用^[10-11]。

由图4~图6可见,阳性对照组能极显著的升高IL-2的含量,IL-4和IFN-γ同生理盐水组相比无显著性差异。低剂量组的IL-2、IFN-γ含量同生理盐水组相比无显著性差异,中剂量组能显著($p<0.05$)的增加IL-2、IFN-γ含量,高剂量组能极显著的($p<0.01$)增加IL-2、IFN-γ含量。而IL-4含量,各组之间均无显著性差异。外源性微生物刺激固有免疫系统所产生的细胞因子可以活化T细胞,并促使辅助性Th0细胞分化为Th1或Th2。机体正常时,Th1和Th2细胞功能处于动态平衡状态,维持机体正常的细胞免疫和体液免疫功能;当机体受到异己抗原攻击时,Th1和Th2细胞中某一亚群功能升高,另一亚群功能降低,该现象即为Th1/Th2漂移^[12]。Th1分泌IL-2和IFN-γ细胞因子,而桑黄多糖能显著性增加其含量,从而介导细胞免疫,执行细胞内抗感染、抗病毒等;Th2细胞分泌的标志细胞因子IL-4,介导体液免疫,执行细胞外抗

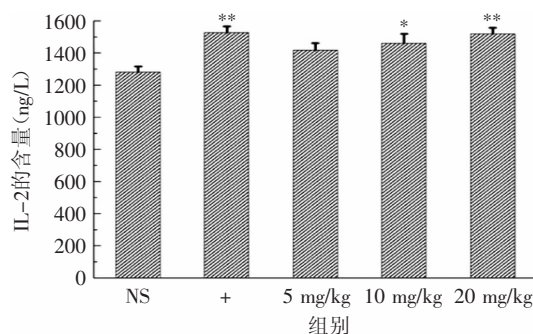


图4 桑黄多糖对小鼠血清中IL-2的影响

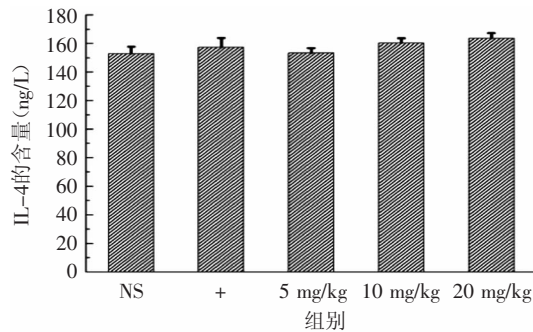
Fig.4 Effect of polysaccharides from *Phellinus igniarius* on the concentration of IL-2 in serum of mice

图5 桑黄多糖对小鼠血清中IL-4的影响

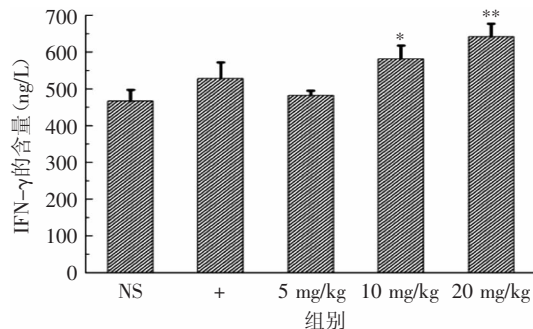
Fig.5 Effect of polysaccharides from *Phellinus igniarius* on the concentration of IL-4 in serum of mice

图6 桑黄多糖对小鼠血清中IFN-γ的影响

Fig.6 Effect of polysaccharides from *Phellinus igniarius* on the concentration of IFN-γ in serum of mice

感染、抗肿瘤,而桑黄多糖实验组IL-4的含量虽然高于空白对照组,但无显著性差异,说明桑黄多糖能够增强特异性细胞免疫,对Th1的作用较明显。

3 结论与讨论

免疫功能包括非特异性免疫和特异性免疫。脏器指数可从侧面反应机体免疫强弱,碳廓清能力反应非特异性免疫状况,细胞因子的测定反应特异性免疫状况。白细胞介素在机体免疫应答和炎症反应过程中发挥着重要的调节作用。TNF-α是一种多功能细胞因子,亦可作为内源性致热原,参与败血症性或内毒素性休克等。IFN-γ能防止病毒在靶细胞内复制,可激活NK细胞,加强巨噬细胞的溶菌能力。

实验选用13~17 g的KM种小鼠,避免随时间的

(下转第357页)

- [37] 蔡燕,周红波,吴锦明. 超声辐射对脂肪氧合酶活性和构象的影响[J]. 广东化工,2015,42(19):13-14.
- [38] 张波波,王丹,马越,等. 超高压技术对草莓汁果胶甲酯酶钝化作用的研究[J]. 食品工业科技,2013,34(24):314-316.
- [39] 赵红岩. 果胶酶在果蔬汁加工中的应用研究[J]. 中国酿造,2012,31(12):18-19.
- [40] Kuldiloke J, Eshtiaghi M, Zenker M, et al. Inactivation of lemon pectinesterase by thermosonication[J]. International Journal of Food Engineering, 2007, 3(2):1-8.
- [41] 朱海清. 超声波对牛奶的均质效果研究[J]. 粮油加工与食品机械,2002(5):42-43.
- [42] Wu H, Hulbert G J, Mount J R. Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2001, 1(3):211-218.
- [43] Vercet A, Oria R, Marquina P, et al. Rheological properties of yoghurt made with milk submitted to manothermosonication[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(21):6165-6171.
- [44] Vercet A, Lopez P, Burgos J. Inactivation of heat resistant lipase and protease from pseudomonas fluorescens by manothermosonication[J]. Journal of Dairy Science, 1997, 80(1):29-36.
- [45] 高奇瑞,夏金兰,单杨,等. 超声波空化效应对纤维素酶降解秸秆影响的研究[J]. 山东农业大学学报:自然科学版,2014,45(2):237-242.
- [46] 李冰,王文宗,林鸿佳,等. 超声波对过氧化氢酶活影响的机理[J]. 华南理工大学学报:自然科学版,2010,38(12):129-134.
- [47] 黄卓烈,梁欣欣,陈小丽,等. 超声波对酵母过氧化氢酶活性的影响机理研究[J]. 国际生物医学工程杂志,2009,32(1):13-17.
- [48] 徐娟,张梁,石贵阳. 离子交换树脂固定化 α -淀粉酶的研究[J]. 食品工业科技,2008,29(4):75-77.
- [49] 杨宏伟,洒荣波. 超声波对固定化 α -淀粉酶催化活性的影响[J]. 中国酿造,2009,28(10):76-78.
- [50] 陈小丽,黄卓烈,巫光宏,等. 超声波对淀粉酶催化活性的影响[J]. 华南农业大学学报,2005,26(1):76-79.
- [51] 吴葛洋,曹雁平,王蓓,等. 超声场对固定化木瓜蛋白酶的影响研究[J]. 食品工业科技,2011,32(10):142-145.
- [52] Ilaria B, Katia L, Anna M V G, et al. Bromelain from pineapple stem in alcoholic-acidic buffers for wine application[J]. Food Chemistry, 2011, 124(4):1349-1353.
- [53] 陈小丽,黄卓烈. 菠萝茎蛋白酶的纯化及酶活力受超声处理影响的机理[J]. 食品与生物技术学报,2012,31(5):173-178.

(上接第346页)

增加,胸腺退化对实验结果的影响^[8,13]。本实验结果表明,桑黄多糖能显著性提高小鼠胸腺指数和脾脏指数,增强小鼠碳廓清率,增加IL-2和IFN- γ 的含量,降低IL-1、IL-6、TNF- α 的含量,具有免疫增强剂的功效,能够同时影响非特异性免疫和特异性免疫,显著增强机体免疫力,并且具备一定的抗炎作用。

真菌多糖具有调节免疫力的作用,已有多种真菌多糖类保健品药品上市。但大多数真菌多糖都以子实体提取物入药,成本高,有些珍贵物种难获得,制约了其广泛应用。相关研究表明,桑黄发酵菌丝体提取物同桑黄子实体提取物的作用成分差别不大,甚至更多^[14]。本实验的桑黄多糖通过桑黄发酵分离纯化制得,实验表明,它能提高机体免疫。桑黄发酵菌丝体可替代现有的桑黄入药成分,可降低成本,并且效果更显著,为其扩大生产应用奠定了基础。

参考文献

- [1] 黄年来. 中国最有开发前景的主要药用真菌[J]. 食用菌, 2005(1):3-4.
- [2] Li You-Gui, Ji Dong-Feng, Shi Zhong, et al. Anti-tumor effects of proteoglycan from *Phellinus linteus* by immunomodulating and inhibiting Reg IV/EGFR/Akt signaling pathway in colorectal carcinoma[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 48(3):511-517.
- [3] 张林芳,邹莉. 桑黄多糖的研究进展[J]. 中国食用菌, 2012, 31(4):1-4.
- [4] 张问. 桑黄子实体提取物抗肿瘤作用及其机制的初步研究[D]. 长春:吉林大学,2012.
- [5] 宋柳微,张佩. 桑黄多糖对免疫细胞调节作用研究进展[J]. 中国现代医生,2010(12):23-24.
- [6] 郭霞. 桑黄发酵过程优化及其多糖代谢调控研究[D]. 重庆:西南大学,2010.
- [7] 田雪梅. 桑黄类群真菌系统学及桑黄纤孔菌液体发酵研究[D]. 北京:北京林业大学,2014.
- [8] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[S]. 北京:人民卫生出版社,2003,77:22-34.
- [9] Lin Xi, Fu Haiqing, Li Ming, et al. Effect of compound *Phellinus igniarius* oral liquid's polysaccharide on mouse's immunity function[J]. Agricultural Science & Technology, 2015, 16(6):1290-1294.
- [10] Kim GY, Kim SH, Hwang SY, et al. Oral administration of proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* in the prevention and treatment of collagen-induced arthritis in mice[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2003, 26(6):823-831.
- [11] Suabjakyong P, Nishimura K, Toida T, et al. Structural characterization and immunomodulatory effects of polysaccharides from *Phellinus linteus* and *Phellinus igniarius* on the IL-6/IL-10 cytokine balance of the mouse macrophage cell lines (RAW 264.7)[J]. Food Funct, 2015, 6(8):2834-2844.
- [12] Woo-Young Jeon, In-Sik Shin, Hyeun-Kyoo Shin, et al. Samsoum water extract attenuates allergic airway inflammation via modulation of Th1/Th2 cytokines and decrease of iNOS expression in asthmatic mice[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2015, 15:47.
- [13] 罗碧如. 不同日龄健康昆明种小鼠胸腺重量变化的观察[J]. 上海实验动物科学, 1987, 1:10-11.
- [14] 雷萍,张文隽,吴亚召,等. 桑树桑黄子实体和发酵菌粉有效成分分析[J]. 中国食用菌, 2010, 29(4):40-42.