◇ 药学研究 ◇

芝芪菌质提取物免疫活性研究

阮鸣¹, 喻斌², 霍光明¹, 张李阳¹, 刘维周¹

(1. 南京晓庄学院食品科学学院、江苏省高校“特殊生物质废弃物资源化利用”重点建设实验室, 江苏南京 211171; 2. 南京中医药大学江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 江苏南京 210023)

摘要:目的 探究芝芪菌质及其各部位免疫活性。方法 芝芪菌质为灵芝菌丝-黄芪药渣的固体发酵复合体。通过小鼠碳粒廓清实验, 鸡红细胞吞噬功能实验, 小鼠血清溶血素、免疫球蛋白 M(IgM) 和免疫球蛋白 G(IgG) 的含量检测, 以及小鼠脾淋巴细胞增殖实验, 筛选了芝芪菌质水提液, 芝芪菌质水浸液, 芝芪菌质水提液经大孔树脂分离的部位(水洗脱液、40% 乙醇洗脱液和 95% 乙醇洗脱液)的非特异性和特异性免疫活性。结果 碳粒廓清实验中, K 值最高为水浸液和水提液组的 0.23, α 值最高为水提液组的 2.44。吞噬指数最高为水浸液和水提液组的 0.36, 鸡红细胞吞噬百分率最佳为水浸液组的 47.25%。小鼠溶血素含量最高为水洗脱组的 0.4。IgM 含量最高为水提液组的 34.19 mg · L⁻¹, 而 IgG 最高则是水浸液组的 44.50 mg · L⁻¹。淋巴细胞增殖指数最高为 40% 乙醇洗脱液组的 1.23。结论 芝芪菌质水提液、芝芪菌质水浸液和 40% 乙醇洗脱液具有显著的免疫增强功效, 为芝芪菌质制成增强人体抵抗力的功能性食品及药品提供实验数据和理论参考。

关键词: 灵芝; 中草药; 黄芪; 发酵; 免疫调节; 吞噬作用; 小鼠; 大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2018.10.004

Investigation on immunocompetence of Zhiqi fungal substance and its parts

RUAN Ming¹, YU Bin², HUO Guangming¹, ZHANG Liyang¹, LIU Weizhou¹

- (1. *Jiangsu Provincial Key Construction Laboratory of Special Biomass Waste Resource Utilization, School of Food Science, Nanjing Xiaozhuang University, Nanjing, Jiangsu 211171, China;*
2. *Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210023, China*)

Abstract: **Objective** To investigate immunocompetence of zhiqi fungal substance and its parts. **Methods** Zhiqi fungal substance was the solid fermentation compound from *Ganoderma Lucidum* mycelium and *Radix Astragali* residue. The mouse carbon clearance, phagocytosis of chicken red blood cells, determination of hemolysin, IgM and IgG in mice serum, and mouse spleen lymphocyte proliferation were used to screen water extract, aqueous infusion and separated parts of zhiqi fungal substance. Nonspecific and specific immunity activities of water extract of zhiqi fungal substance were separate by macroporous resin. The separated parts were made up of water eluent, 40% ethanol eluent and 95% ethanol eluent with macroporous resin separating water extract of zhiqi fungal substance. **Results** According to the experiment of carbon clearance, it was showed that the highest K value is 0.23 in aqueous infusion and water extract group, the highest alpha value is 2.44 of water extract group, the highest phagocytic index is 0.36 in aqueous infusion and water extract group, and the best phagocytic percentage of chicken red blood cells is 47.25% of water extract group. In addition, the highest content of hemolysin in mice was 0.4 of water eluent group; the highest content of IgM was 34.19 mg · L⁻¹ from water extract group, while the highest IgG was 44.50 mg · L⁻¹ in aqueous infusion group; the highest lymphocyte proliferation index was 1.23 in the 40% ethanol eluent group. **Conclusions** The water extract, aqueous infusion and 40% ethanol eluent from zhiqi fungal substances have remarkable immunity enhancement effect, and provide experimental data and theoretical reference for making zhiqi fungal substance into functional food and drug with body resistance strengthened.

Key words: *Ganoderma lucidum*; Drugs, chinese herbal; *Astragalus membranaceus*; Immunomodulation; Fermentation; Phagocytosis; Mice; Rats

将灵芝菌种接种于黄芪药渣中进行固体发酵

得到的灵芝菌丝体与黄芪药渣的发酵复合体谓之芝芪菌质。其中的黄芪药渣的化学成分为灵芝真菌的生长提供营养, 而灵芝真菌的酶又可改变黄芪药渣的组织成分, 因这种双向性而被称为双向性固体发酵技术。双向性固体发酵技术是将药用真

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81573713); 江苏省自然科学基金项目(BK20150088, BK20151564); 江苏省高校重点建设实验室(苏教高[2016]8)

菌发酵菌种(例如灵芝、槐耳、姬松茸等)和发酵基质(具有一定活性成分的中药材或药渣)构成发酵组合,双方相适应则在一定条件下进行固体发酵。

中药药材加工为中成药后剩留大量尚含有各种残余成分的药渣,但它大多被废弃。目前我国药渣的资源化利用可分为3类,即有效成分的富集提取利用、生态经济化利用和高附加值化利用^[1]。双向固体发酵技术是目前开发药渣最有希望的途径之一,可被用来开发药渣,以产生各种有用的药性菌质(药渣与真菌菌丝发酵复合体),它作为一种新资源可继续研发成新药或保健品、功能性食品等。

本课题组的前期实验研究已证实芝芪菌质对肉鸡、日本沼虾、中华绒螯蟹、黄颡鱼具有显著的免疫促进作用^[2-5]。本实验目的是为了探究芝芪菌质对人体的免疫促进作用,筛选其免疫活性部位,为黄芪药渣的二次利用提供理论依据,为将芝芪菌质继续研发成新药或保健食品、功能性食品提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物 体质量18~22 g的雄性小鼠384只,180~220 g的雄性大鼠8只,均为上海杰思捷实验动物有限公司提供(许可证号码:SCXK沪2013-0006)。本研究符合一般实验动物伦理学原则。本研究起止时间为2016年2~8月。

1.2 试剂和药品 灵芝菌购于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(菌种编号5.0616);芝芪菌质由南京晓庄学院药用菌物研究所制备;江苏南星药业有限责任公司收集黄芪药渣;注射用环磷酰胺(江苏盛迪医药有限公司,批号15102825);匹多莫德片(赛诺菲,批号140811);印度墨汁(Solarbio LIFE SCIENCES, No. 1221F021);甲醇、无水乙醇、 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 Na_2CO_3 (分析纯,国药集团化学试剂有限公司);0.9~1.1 mm玻璃熔点毛细管(上海曼贤实验仪器商行);刀豆素A(Con A)(美国AMRESCO公司,批号20151217);D101大孔树脂(上海蓝季科技发展有限公司,批号121020);瑞氏染液、20%绵羊红细胞悬液、RPMI-1640培养基和台盼蓝(均购于南京建成生物技术研究所);小鼠IgG ELISA试剂盒(欣博盛生物科技有限公司, Lot. M160809-116b);小鼠IgM ELISA试剂盒(欣博盛生物科技有限公司, Lot. M160914-129a)。

1.3 仪器 SynergyH1型美国BIOTEK全功能微孔板检测仪(酶标仪), IX71型奥林巴斯显微镜。MCO-5AC型三洋 CO_2 培养箱。

2 方法

2.1 芝芪菌质各样品的制备

2.1.1 芝芪菌质水提液的制备 取芝芪菌质20 g,加10倍量的水加热回流提取1 h,冷却,过滤,滤液备用;滤渣再加10倍量的水加热回流提取1 h,冷却,过滤。两次滤液合并,减压浓缩至50 mL,制成芝芪菌质含量为 $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芝芪菌质水提液。

2.1.2 芝芪菌质水浸液的制备^[6] 取芝芪菌质20 g,置研钵中研细(研钵置于冰袋中),再加适量水研磨1 h,水浸液过滤,转移置50 mL容量瓶中,加水定容,制成芝芪菌质含量为 $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芝芪菌质水浸液。

2.1.3 芝芪菌质各部位的分离制备 将处理好的新购大孔树脂D101用蒸馏水装柱,将2.1.1项下的 $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芝芪菌质水提液加入大孔树脂分离柱中,分别用4BV量(4倍树脂体积量)的水、40%乙醇、95%乙醇洗脱,各洗脱部位经减压浓缩回收溶剂后,加水溶解,分别制成芝芪菌质含量为 $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的水洗脱液、40%乙醇洗脱液和95%乙醇洗脱液。

2.2 非特异性免疫功能实验

2.2.1 小鼠碳粒廓清实验^[7-9] 分组方法:取昆明雄性小鼠96只(18~22 g),采用随机数字表法分成8组:对照组(正常组)、模型(环磷酰胺)组、阳性(匹多莫德, $0.32 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组、样品组(再分5亚组:芝芪菌质水提液、水浸液、水洗液、40%乙醇洗脱液和95%乙醇洗脱液),每组12只。除对照组外,其他各组均采用环磷酰胺复制免疫缺陷小鼠模型。

造模方法:实验d1~d3,鼠腹腔注射环磷酰胺($80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),1次/天,连续3 d。d6再以相同剂量再次腹腔注射一次。

给药方法:d1灌胃给药,每天 $0.1 \text{ mL}/10 \text{ g}$, $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,1次/天,连续给药7 d,d6晚禁食12 h后,d7上午最后1次给药后立即检测。

检测方法:5倍稀释的印度墨汁按 $0.05 \text{ mL}/10 \text{ g}$ 体质量,每只鼠尾静脉注射,分别于第2、12分钟在小鼠眼眶后静脉丛用毛细采血管取血 $20 \mu\text{L}$ 溶于2 mL 0.1% Na_2CO_3 溶液中,摇匀。以0.1% Na_2CO_3 溶液作空白,测定600 nm处吸光度。

检测指标:取小鼠肝、脾脏,称量其质量。计算廓清指数K、校正廓清指数 α 。

$$K = (\log OD_1 - \log OD_2) / (t_2 - t_1)$$

$$\alpha = K^{1/3} \times \text{体质量} / (\text{肝重} + \text{脾重})$$

2.2.2 鸡红细胞吞噬功能实验^[10-11] 分组、造模、

给药方法:同2.2.1。

检测方法:最后一次给药后1 h,每只小鼠腹腔注射1%鸡红细胞悬液1 mL。间隔30 min 颈椎脱臼处死,仰位固定于鼠板上,腹腔注入生理盐水1 mL,转动鼠板1 min。然后吸出腹腔液0.5 mL,平均分滴于2片玻片上,用生理盐水漂洗,自然干燥后以甲醇溶液固定,瑞氏染液染色,干燥后镜下观察计数:

吞噬百分率/% = 吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数/计数的巨噬细胞数 × 100% ;

吞噬指数 = 被吞噬的鸡红细胞总数/计数的巨噬细胞数 × 100%

2.3 特异性免疫功能实验

2.3.1 对免疫缺陷小鼠血清溶血素的影响^[12-14]

分组、造模、给药方法:同2.2.1。检测方法:给药7 d后,每鼠腹腔注射20%绵羊红细胞(SRBC)悬液0.2 mL致敏,给药14 d后眼眶取血制备血清。将收集好的血清做系列稀释,确定最佳稀释度。吸取稀释的血清0.5 mL,依次加入20% SRBC、10 稀释补体、0.9%生理盐水各0.5 mL,空白管用生理盐水代替血清,混匀,置37℃温箱1 h,再置冰浴中5 min,离心,取上清液于540 nm处测定OD值,并计算:溶血素含量 = 样本血清的OD值 × 稀释倍数。

2.3.2 对免疫缺陷小鼠血清IgM、IgG含量影响^[15]

分组、造模、给药方法:同2.2.1。检测方法:采用ELISA法,按照说明书要求测定血清中IgG、IgM含量。

2.3.3 对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响^[16-18] 含药血清的制备:实验各组大鼠连续灌胃7 d后,颈动脉取血,制备含药血清。对照组和ConA组采用的是3只空白大鼠血清(对照组2只,ConA组1只),其他5组给药组分别每组1只大鼠制备含药血清,给药剂量为400 mg · kg⁻¹。

脾细胞原代培养:小鼠用75%乙醇浸泡5 min,无菌操作取脾脏,用完全RPMI-1640培养基制备2.0 × 10⁹ · L⁻¹的脾细胞悬液,台盼蓝染料检测细胞活力 > 95%以上,备用。

实验方法:将各组100 μL脾细胞悬液分别加入96孔培养板中,再分别加入Con A(终浓度为5 mg · L⁻¹)及含药血清,总体积200 μL。设置只加200 μL RPMI-1640培养基为空白对照。每实验组设10个复孔。加液后把培养板置于微量振荡器上振荡2 min混匀,于37℃含5% CO₂培养箱中温育72 h,变色后用MTT法于酶标仪测吸光值A(λ = 490 nm)。增殖指数SI = 样品组A/ConA组A。

2.4 统计学方法 数据符合正态分布,采用Excel软件处理,对组间方差齐者进行t检验,方差不齐者进行t'检验,结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 非特异性免疫功能实验 模型组各检测指标与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$),见表1。表明造模成功,即除对照组外其余各组都是免疫功能低下的小鼠。阳性组各检测指标与模型组相比差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01),表明匹多莫德片可有效提高免疫功能低下小鼠的机体免疫力。水浸液、水提液和40%乙醇洗脱液组均可显著提高免疫缺陷小鼠K值、α值、鸡红细胞的吞噬指数和吞噬百分率(与模型组比较, $P < 0.05$ 或 0.01),提示它们可显著提高免疫缺陷小鼠的非特异免疫吞噬功能。但水洗脱液和95%乙醇洗脱液组的各检测指标却未见显著增强(与模型组比较, $P > 0.05$)。

3.2 特异性免疫功能实验 水浸液、水提液和40%乙醇洗脱液组均可显著提高免疫缺陷小鼠血清中的溶血素水平和IgM、IgG含量(与模型组比

表1 小鼠碳粒廓清和鸡红细胞吞噬功能实验结果/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	给药剂量/mg · kg ⁻¹	K值	α值	吞噬指数	吞噬百分率/%
对照组	10	0.00	0.025 ± 0.008 ^a	2.54 ± 0.76 ^a	0.40 ± 0.10 ^a	49.85 ± 7.91 ^a
模型(环磷酰胺)组	10	0.00	0.011 ± 0.004	1.77 ± 0.34	0.29 ± 0.06	39.80 ± 6.72
阳性(匹多莫德片)组	10	0.32	0.025 ± 0.011 ^a	2.44 ± 0.71 ^b	0.35 ± 0.06 ^b	46.80 ± 7.03 ^b
水浸液组	10	400.00	0.023 ± 0.010 ^b	2.21 ± 0.49 ^b	0.36 ± 0.06 ^b	46.85 ± 6.53 ^b
水提液组	10	400.00	0.023 ± 0.006 ^a	2.44 ± 0.59 ^a	0.36 ± 0.07 ^b	47.25 ± 4.18 ^a
水洗脱液组	10	400.00	0.016 ± 0.007	2.14 ± 0.33	0.32 ± 0.06	43.55 ± 4.93
40%乙醇洗脱液组	10	400.00	0.024 ± 0.011 ^a	2.33 ± 0.29 ^a	0.34 ± 0.05 ^b	47.20 ± 6.21 ^b
95%乙醇洗脱液组	10	400.00	0.016 ± 0.004	1.72 ± 0.64	0.34 ± 0.10	43.65 ± 10.91

注:与模型组比较,^a $P < 0.05$;^b $P < 0.01$

表2 小鼠血清溶血素和 IgM、IgG 的含量检测

组别	鼠数	给药剂量/mg · kg ⁻¹	溶血素含量/ $\bar{x} \pm s$	IgM 含量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}, \bar{x} \pm s$)	IgG 含量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}, \bar{x} \pm s$)
对照组	10	0.00	0.28 ± 0.04 ^a	34.72 ± 2.54 ^a	45.15 ± 1.22 ^a
模型(环磷酰胺)组	10	0.00	0.16 ± 0.06	31.46 ± 2.19	43.18 ± 0.76
阳性(匹多莫德片)组	10	0.32	0.22 ± 0.07 ^b	33.72 ± 1.61 ^b	44.63 ± 1.69 ^b
水浸液组	10	400.00	0.22 ± 0.06 ^b	33.65 ± 2.20 ^b	44.50 ± 1.69 ^b
水提液组	10	400.00	0.22 ± 0.05 ^b	34.19 ± 1.50 ^a	44.21 ± 1.12 ^b
水洗脱液组	10	400.00	0.40 ± 0.60	33.05 ± 2.05	44.14 ± 0.97 ^b
40%乙醇洗脱液组	10	400.00	0.22 ± 0.06 ^b	34.17 ± 1.64 ^a	44.19 ± 1.05 ^b
95%乙醇洗脱液组	10	400.00	0.20 ± 0.06	33.66 ± 1.99 ^b	43.29 ± 1.04

注:与模型组比较,^a $P < 0.05$;^b $P < 0.01$

较, $P < 0.05, 0.01$);此外,水洗脱液组也可显著提高免疫缺陷小鼠血清中的 IgG 含量(与模型组比较, $P < 0.05$),95%乙醇洗脱液组可显著提高免疫缺陷小鼠血清中的 IgM 含量(与模型组比较, $P < 0.05$)。提示它们均可显著提高免疫缺陷小鼠的特异性体液免疫功能。见表2。

与对照组吸光值相比可见,ConA 组可显著增加小鼠脾淋巴细胞增殖($P < 0.05$)。水浸液、水提液和40%乙醇洗脱液组的吸光值均显著增加(与模型组比较, $P < 0.05$),提示它们可显著促进小鼠脾淋巴细胞增殖,从而提高免疫缺陷小鼠的特异性细胞免疫功能。见表3。

表3 小鼠脾淋巴细胞增殖实验的结果

组别	复孔数	吸光值/ ($A, \bar{x} \pm s$)	淋巴细胞 增殖指数/SI
对照组	10	0.16 ± 0.02 ^a	0.82
ConA ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	10	0.19 ± 0.03	1.00
水浸液组	10	0.23 ± 0.04 ^a	1.22
水提液组	10	0.22 ± 0.03 ^a	1.17
水洗脱液组	10	0.20 ± 0.03	1.07
40%乙醇洗脱液组	10	0.23 ± 0.04 ^a	1.23
95%乙醇洗脱液组	10	0.21 ± 0.04	1.12

注:与 ConA 组比较,^a $P < 0.01$

4 讨论

本实验结果提示:芝芪菌质与芝芪菌质40%乙醇洗脱部位均具有显著的促进特异性和非特异性免疫功效;芝芪菌质的免疫活性来自其水洗脱液、40%乙醇洗脱液和95%乙醇洗脱液三部位的效应综合,但免疫功效部位主要集中在40%乙醇洗脱液段,而另两个部位分别仅对一个指标有效(IgG, IgM),提示芝芪菌质40%乙醇洗脱部位的免疫促进作用可代表其整体功效;芝芪菌质水提液为加热回流提取,芝芪菌质水浸液则在低温下制备(防止破坏蛋白成分),但前者的免疫增强功效优于后者(多个指标 $P < 0.01$),表明加热提取并不影响芝芪菌质

的免疫活性。

参考文献

- [1] 王明威,周林,刘顺会,等.中药渣资源化利用探讨[J].广东药科大学学报,2017,33(1):140-143.
- [2] 张李阳,周业飞,刘维周.日粮添加“芝芪菌素”对蛋鸡产蛋性能和免疫功能的影响[J].安徽农业科学,2012,40(8):4579-4581.
- [3] 霍光明,韩建,张李阳.芝芪菌质对黄颡鱼生长及免疫的影响[J].江苏农业学报,2013,29(2):379-382.
- [4] 茆健强,霍光明,张李阳,等.新型青虾饲料添加剂对日本沼虾消化酶和生长的影响[J].江苏农业科学,2012,40(9):220-222.
- [5] 霍光明,王科,王建玉,等.芝芪菌质对中华绒螯蟹肌苷酸含量的影响[J].南京晓庄学院学报,2014,6:57-60.
- [6] MOHAMAD AN, ABDULLAH N, AMINUDIN N. Anti-angiotensin converting enzyme (ACE) proteins from mycelia of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst [J]. BMC Complement Altern Med, 2013,13:256.
- [7] SHEN HM, CHEN C, JIANG JY, et al. The N-butyl alcohol extract from *Hibiscus rosa-sinensis* L. flowers enhances healing potential on rat excisional wounds[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2017, 198:291-301.
- [8] LABED A, FERHAT M, LABED-ZOUAD I, et al. Compounds from the pods of *Astragalus armatus* with antioxidant, anticholinesterase, antibacterial and phagocytic activities [J]. Pharmaceutical Biology, 2016, 54(12):3026-3032.
- [9] FANG L, ZHANG Y, XIE J, et al. Royal Sun Medicinal Mushroom, *Agaricus brasiliensis* (Agaricomycetidae), Derived Polysaccharides Exert Immunomodulatory Activities In Vitro and In Vivo [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2016, 18(2):123-132.
- [10] WANG Z, ZHOU S, SUN C, et al. Interferon- γ inhibits nonopsonized phagocytosis of macrophages via an mTORC1-c/EBP β pathway [J]. Journal of Innate Immunity, 2015, 7(2):165-176.
- [11] HU XI, LIU G, HOU Y, et al. Induction of M2-like macrophages in recipient NOD-scid mice by allogeneic donor CD4(+)CD25(+) regulatory T cells [J]. Cellular & Molecular Immunology, 2012, 9(6):464-472.
- [12] JIANG C, ZHAO L, LI S, et al. Preliminary characterization and immunostimulatory activity of polysaccharides from *Glossaulax didyma* [J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 62:226-230.