

# 人工虫草多糖对小鼠免疫功能的影响<sup>\*</sup>

龚晓健 季 晖 卢顺高 李绍平<sup>1</sup> 李 萍<sup>1</sup>

(中国药科大学药理学教研室, <sup>1</sup>生药学教研室, 南京 210009)

**摘 要** 采用碳粒廓清法、二硝基氟苯诱导小鼠迟发型变态反应试验法及溶血素试验法, 观察人工虫草多糖对非特异性和特异性免疫功能的影响。结果表明人工虫草胞内及胞外多糖能显著地增加碳粒廓清指数 K 及吞噬指数  $\alpha$ , 增强单核巨噬细胞的吞噬功能; 胞内多糖并能显著地增加小鼠耳肿胀度, 增强二硝基氟苯诱导的小鼠迟发型变态反应, 提高溶血素水平, 提示人工虫草胞内多糖具有增强细胞免疫和体液免疫的作用。

**关键词** 冬虫夏草; 多糖; 迟发型变态反应; 溶血素; 碳粒廓清

冬虫夏草[ *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc] 属肉座菌目麦角菌科虫草属植物, 为虫草菌的子座与其寄主蝙蝠蛾科昆虫虫草蝙蝠蛾( *Hepialus armoricana* uss oberthier) 幼虫尸体的复合物, 是一种名贵的强壮滋补中药, 由于有其严格的寄生性及特殊的生长地理条件, 因此产量有限, 近年来不少学者致力于人工培养虫草菌丝体的研究, 经对比研究表明, 人工培养品在化学成分和药理作用上与天然品相类似<sup>[1~3]</sup>。但目前对其有效成分的药理活性研究报道较少, 本文从人工虫草菌丝体中提取多糖(胞内多糖), 研究其药理活性。工业生产人工虫草的培养液一般均弃之不用, 对之研究报道甚少, 但培养液中仍存在着大量有效成分, 我们从培养液中分离提取得到多糖组分(胞外多糖), 将之与胞内多糖同时进行药理活性的研究和比较。

## 1 材 料

**实验动物:** 昆明种及 ICR 小鼠, 体重 18~22 g, 雌雄各半, 由中国药科大学实验动物室提供。

**药品与试剂:** 人工虫草胞内多糖 (poly saccharide from cultural mycelium, PCM) 及胞外多糖 (polysaccharide from cultural fluid, PCF), 采用水提醇沉法提取多糖, 应用苯酚-硫酸法测定总多糖, 含量约为 40%; 云芝多糖 (Poly saccharide from *Coriolus versicolor*, PCV); 南京老山制药厂产品, 批号: 970122; 印度墨汁 (Black Indian Ink); 北京

西中化工厂产品, 使用前用生理盐水稀释 3 倍, 超声处理后离心, 弃去沉淀物; 二硝基氟苯 (Dinitrofluorobenzene, DNFB); 吴江市青云精细化工厂产品, 使用前配成 1% DNFB 溶液, 称取 DNFB 50 mg, 溶于预先配好的丙酮麻油溶液 (丙酮-麻油 1:1) 5 ml 中。羊红细胞购自南京医科大学, 临用前用生理盐水配制成 20% SRBC。都氏试剂: 碳酸氢钠 1.0 g, 高铁氰化钾 0.2 g, 氰化钾 0.05 g, 用蒸馏水溶解至 1000 ml, 均为市售分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 对非特异性免疫功能的影响——碳粒廓清法<sup>[4]</sup>

将昆明种小鼠随机分为 6 组, 每组 10 只, 受试药设两个剂量组, 虫草胞内多糖和胞外多糖剂量均为 140 mg/kg、70 mg/kg; 云芝多糖作为阳性对照药, 剂量为 1000 mg/kg, 阴性对照组给予等量 0.5% CMC-Na 溶液, 上述各组均灌胃给药, 每日 1 次, 连续 7 d。第 7 天给药后 0.5 h, 各鼠尾静脉注射经稀释的印度墨汁 0.05 ml/10 g, 于 1( $t_1$ ) 和 5( $t_5$ ) min 后, 分别从眼眶静脉取血 20  $\mu$ l, 加到 0.1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液 2 ml 中摇匀, 用分光光度计在 680 nm 波长下比色, 测定  $t_1$  和  $t_5$  的光密度 (OD<sub>1</sub> 和 OD<sub>5</sub>), 计算廓清指数 K 和吞噬指数  $\alpha$ 。之后, 将小鼠放血处死, 取肝脏、脾脏及胸腺称重, 计算其脏器系数。廓清指数  $K = (\log OD_1 - \log OD_5) / (t_5 - t_1) = \log (OD_1 / OD_5) / 4$ ; 吞噬指数

$\alpha = \text{体重} / \text{肝脾重} \times K^{1/3}$ ; 脏器系数 = 器官重量 / 体重。结果显示虫草胞内及胞外多糖在 140 mg/kg 的剂量下均具有显著地提高碳粒廓清指数和吞噬指数的作用, 胞内多糖 70 mg/kg 剂量组可显著地增加吞噬指数, 说明虫草多糖能够增强单核巨噬细胞的吞噬功能(见表 1)。虫草胞内及胞外多糖在 140 mg/kg 剂量下均能显著增加脾脏及胸腺的重量, 胞内多糖 70 mg/kg 剂量组可显著增加脾脏的重量, 与对照组比较  $P < 0.05$ ; 胞外多糖 70 mg/kg 剂量组也可增加脾脏重量, 但与对照组比较无明显差异(见表 2)。

Tab 1. Effects of polysaccharides from cultured *Cordyceps sinensis* on carbon clearance test in mice ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

| Group   | Dose(mg/kg) | K                 | $\alpha$       |
|---------|-------------|-------------------|----------------|
| Control |             | 0.0289±0.00709    | 4.794±0.370    |
| PCM     | 70          | 0.0358±0.01190    | 5.389±0.933 *  |
| PCM     | 140         | 0.0412±0.01060 ** | 5.413±0.626 *  |
| PCF     | 70          | 0.0301±0.01040    | 4.590±0.649    |
| PCF     | 140         | 0.0384±0.00849 *  | 5.384±0.617 *  |
| PCV     | 1000        | 0.0451±0.01210 ** | 5.422±0.511 ** |

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control

Tab 2. Effects of polysaccharides from cultured *Cordyceps sinensis* on weight of spleen and thymus in mice ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

| Group   | Dose(mg/kg) | Viscus index of spleen(mg/10g) | Viscus index of thymus(mg/10g) |
|---------|-------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Control |             | 42.60±6.63                     | 23.20±3.42                     |
| PCM     | 70          | 50.30±5.39 *                   | 24.60±5.02                     |
| PCM     | 140         | 51.70±9.59 *                   | 33.00±6.93 **                  |
| PCF     | 70          | 50.20±11.50                    | 25.50±3.41                     |
| PCF     | 140         | 63.10±16.90 **                 | 28.80±5.34 *                   |
| PCV     | 1000        | 54.80±9.56 **                  | 25.30±6.05                     |

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control

2.2 对特异性细胞免疫功能的影响

采用二硝基氟苯诱导小鼠迟发型变态反应试验法(DTH)<sup>[3]</sup>, 将 ICR 小鼠分组及剂量设置同前, 上述各组均灌胃给药, 每日 1 次, 连续 7 d。每鼠腹部去毛, 范围为 3 cm×3 cm, 将 1%DNFB 均匀涂抹于上, DNFB 为一种半抗原, 与皮肤蛋白结合成全抗原后可刺激 T 淋巴细胞增殖成致敏淋巴细胞。末次给药后 0.5 h, 将 1%DNFB 均匀涂抹于小鼠右耳, 使局部产生迟发型变态反应(水肿), 24 h 后, 脱颈椎处死小鼠, 剪下左右耳壳, 用打孔器取下直径 8 mm 的耳片, 称重, 以左右耳片重量之差作为肿胀度, 比较各组的差别。结果显示虫草胞内多糖 140 mg/kg 剂量组具有显著地

增加小鼠耳肿胀度作用( $P < 0.01$ ), 未见胞外多糖增强作用, 说明虫草胞内多糖具有一定的增强二硝基氟苯诱导的小鼠迟发性变态反应作用(见表 3)。

Tab 3. Effects of polysaccharides from cultured *Cordyceps sinensis* on murine ear swelling ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

| Group   | Dose(mg/kg) | M urine ear swelling(mg) |
|---------|-------------|--------------------------|
| Control |             | 4.20±1.61                |
| PCM     | 70          | 4.20±1.88                |
| PCM     | 140         | 7.44±2.26 **             |
| PCF     | 70          | 4.38±2.00                |
| PCF     | 140         | 4.69±2.32                |
| PCV     | 1000        | 8.80±3.08 **             |

\*\*  $P < 0.01$  vs control

2.3 对特异性体液免疫功能的影响——血清溶血素测定法<sup>[6]</sup>

ICR 小鼠分组及剂量设置同前, 上述各组均灌胃给药, 每日 1 次, 连续 4 d。给药第 1 天小鼠 ip 20%SRBC 0.2 ml/只, 免疫后第 4 天摘眼球取血, 分离血清, 将血清稀释 500 倍后供测定。反应管内依次加入经稀释的血清 1 ml, 5%SRBC 0.5 ml, 10%补体 1 ml, 置于 37℃恒温水浴中保温 30 min, 然后移至冰浴中终止反应, 1500 r/min 离心 5 min, 取上清液 1 ml 加都氏试剂 3 ml, 摇匀放置 10 min, 于 540 nm 波长处比色读取吸光度。测定 SRBC 半数溶血值: 取 5%SRBC0.25 ml 加都氏试剂至 4 ml, 比色读取吸光度值。计算血清 HC<sub>50</sub> = 样品的吸光度值/ SRBC 半数溶血值×稀释倍数。结果可见虫草胞内多糖 70 mg/kg 与 140 mg/kg 剂量组可显著地提高小鼠溶血素水平( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 并呈剂量依赖性; 未见胞外多糖的提高作用, 说明虫草胞内多糖具有一定的增强特异性体液免疫的作用(见表 4)。

Tab 4. Effects of polysaccharides from cultured *Cordyceps sinensis* on murine hemolysin level ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

| Group   | Dose(mg/kg) | HC <sub>50</sub> |
|---------|-------------|------------------|
| Control |             | 243.36±57.36     |
| PCM     | 70          | 296.07±39.64 *   |
| PCM     | 140         | 337.14±36.31 **△ |
| PCF     | 70          | 240.43±38.10     |
| PCF     | 140         | 256.36±30.33     |
| PCV     | 1000        | 355.50±52.61 **  |

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control; △  $P < 0.05$  vs PCM 70 mg/kg

### 3 讨 论

本文观察了人工虫草胞内与胞外多糖对非特异性和特异性免疫功能的影响。结果表明人工虫草胞内及胞外多糖均有增强单核巨噬细胞吞噬功能的作用, 胞内多糖并有显著地增强特异性细胞免疫及体液免疫的作用, 云芝多糖对非特异性和特异性免疫功能均有显著的提高作用, 与受试药比较未见显著性差别。结果提示增强免疫功能的有效成分主要存在于虫草的菌丝体中。

虫草对免疫功能具有促进和调节作用, 给临床应用虫草防治免疫失调/低下及肿瘤等疾病提供了科学依据, 其作用机理尚未完全阐明, 多数作者认为虫草是一种良好的生物反应调节剂, 赵学敏《本草纲目拾遗》载“冬虫夏草味甘, 性温”, 主要作用为“保肺气, 实腠理”, “益肾, 补精髓”, 通过机体的神经-体液调节, 在提高整体能量与物质代谢基础上进而改善各系统、组织器官的功能, 发挥其扶正祛邪的作用。抗癌作用可能主要是通过增强免疫, 抑制肿瘤细胞生长扩散, 而促进机体康

复<sup>[7,8]</sup>。目前, 天然虫草药源不足, 开拓人工培育品, 人工合成其有效成分, 具有广阔的应用前景。

### 参 考 文 献

- 1 张传开, 袁盛榕, 刘进学. 冬虫夏草和中国拟青霉对细胞免疫功能的影响. 中药药理与临床, 1998, 14(3): 21
- 2 黄银妹, 孙云汉, 陈万彬等. 冬虫夏草及其培养菌丝体中的成分分析. 中成药研究, 1983, (5): 25
- 3 包天桐, 杨甲禄, 王桂芬. 冬虫夏草与发酵虫草菌的药理作用比较. 中西医结合杂志, 1988, 8(6): 352
- 4 徐叔云主编. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 1233
- 5 陈勤主编. 抗衰老研究实验方法. 北京: 中国医药科技出版社, 1996. 383
- 6 陈奇主编. 中药药理研究方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 750
- 7 Yu-Jen Chen, Ming-Shi Shiao, Shiuh-Sheng Lee, *et al.* Effect of *Cordyceps sinensis* on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells. *Life Sci*, 1997, 60 (25): 2349
- 8 Junko YOSHIDA, Shozo TAKAMURA, Nobuo YAMAGUCHI, *et al.* Antitumor activity of an extract of *Cordyceps sinensis*(Berk.) Sacc. against tumor cell lines. *Jpn J Exp Med*, 1989, 59(4): 157

## Effects of Polysaccharides from Cultured *Cordyceps sinensis* on Murine Immunologic Function

GONG Xiao-Jian, JI Hui, LU Shun-Gao, LI Shao-Ping<sup>1</sup>, LI Ping<sup>1</sup>

Department of Pharmacology, <sup>1</sup>Department of Pharmacognosy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

**Abstract** Carbon clearance test, hemolysin test and dinitrofluorobenzene-induced delayed type hypersensitivity test (DTH) were used to evaluate the immunomodulating effects of polysaccharides from cultural mycelium and fluid of *Cordyceps sinensis* on non-specific and specific immunologic function. Results showed that both PCM and PCF could increase the index of K,  $\alpha$  and the viscus index of spleen and thymus in carbon clearance test. It was also found that PCM enhanced murine ear swelling and hemolysin level, suggesting that PCM could improve the cellular and humoral immunologic function.

**Key words** *Cordyceps sinensis*; Polysaccharides; DTH; Hemolysin; Carbon clearance test