

云南虫草菌粉免疫调节作用的实验动物研究

王 峰, 王 玲, 张才军, 李冰雪

(昆明医科大学微生物学与免疫学教研室, 云南 昆明 650500)

[摘要] **目的** 研究人工培养云南虫草菌粉 (yunnan cordyceps sinensis, YNCS) 的免疫调节作用. **方法** ICR 小鼠随机分组, 每天用不同剂量的 YNCS 灌胃, 用环磷酰胺 (CY) 诱导免疫功能低下模型, 通过观察免疫器官、吞噬细胞功能、淋巴细胞增殖、血清凝集素、T 细胞亚群等指标变化来判断 YNCS 对机体的免疫调节作用. **结果** YNCS 对小鼠的胸腺指数和脾指数有上调作用; YNCS 低剂量对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能有增强作用; 低、中剂量 YNCS 组 ConA、LPS 刺激淋巴细胞增殖比模型对照组显著增高 ($P < 0.01$); YNCS 低、中剂量对小鼠 L3T4⁺ T 淋巴细胞有上调作用, 并使 L3T4⁺ 淋巴细胞和 L3T4⁺/Lyt2⁺ 比值恢复接近正常水平. YNCS 低、中、高剂量组对小鼠凝集素有明显提高作用 ($P < 0.01$). **结论** YNCS 可以上调免疫功能抑制小鼠胸腺指数和脾指数, 促进 T 淋巴细胞的增殖, 调节小鼠 T 细胞亚群, 增加血清凝集素水平, 从而调节小鼠免疫功能. 同时, 高剂量的 YNCS 对免疫有一定的抑制作用.

[关键词] 云南; 冬虫夏草; 免疫调节

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 07 - 0045 - 04

Immunoregulation Effect of Yunnan Cordyceps Sinensison in Animal Experiment

WANG Feng, WANG Ling, ZHANG Cai - jun, LI Bing - xue

(Dept. of Microbiology and Immunology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To study the immunoregulation effects of culture Yunnan Cordyceps sinensis (YNCS) in ICR mouse. **Methods** Different dosages of YNCS were intragastriced to ICR mice daily which were randomly divided into several groups. The low-immunity ICR mouse model was established by cyclophosphamide (CY), and then we observed the effect of YNCS on the thymus weight index, spleen weight index, the function of MΦ phagocytosis, lymphocyte proliferation, T lymphocyte subpopulation and serum agglutinin of the mouse, in order to judge immunoregulation effects of YNCS. **Results** YNCS increased the thymus weight index and spleen weight index. The low dose of YNCS enhanced the function of MΦ phagocytosis; the low and mid-dose of YNCS obviously increased the proliferation of ConA and LPS stimulated T lymphocytes compared with blank control group ($P < 0.01$); the low and mid-dose of YNCS increased the effect of L3T4⁺ T lymphocyte and promoted L3T4⁺/Lyt-2⁺ ratio to recover to normal level. YNCS at low, middle and high dose significantly improved the serum level of agglutinin in mice ($P < 0.01$). **Conclusions** YNCS could increase the thymus weight index and spleen weight index. YNCS could promote proliferating of T lymphocyte and regulate the T lymphocyte subpopulation of the mouse, and improve the serum level of agglutinin. High dose of YNCS could inhibit the immune function to some extent.

[Key words] Yunnan; Cordyceps Sinensison (YNCS); Immunoregulation

我国传统医学认为, 冬虫夏草性味甘、平, 入肺经, 功能益肺肾、止咳嗽、补虚损、益精气^[1], 是一味滋补强壮的名贵中药材. 现代医药学研

究表明, 冬虫夏草化学成分复杂, 含有虫草多糖 (cordyceps polysacchrude, CP)、氨基酸、甘露醇及多种微量元素等成分^[2], 能发挥抗肿瘤、抗衰老、

[基金项目] 云南省教育厅科研基金资助项目 (07C41064)

[作者简介] 王峰 (1978~), 女, 云南文山市人, 医学硕士, 讲师, 主要从事医学免疫学和微生物学教学和科研工作.

[通讯作者] 王玲. E-mail:kywl2006@163.com

降血糖、降血压、免疫调节等多种功能。但由于天然虫草产量有限，价格昂贵。目前人工研发冬虫夏草有效成分主要途径是液态发酵法，经人工培养虫草菌丝易于得到，价格低廉，其有效成分及药效接近于天然虫草^[1]。人工发酵培养虫草的首要问题就是菌株（虫草无性型）的分离，由于生长环境受食物、植被、气候、土壤温度、湿度、含氧量、酸碱度和含盐量等多种因素的影响，加之冬虫夏草寄生昆虫来自蝠蛾昆虫 30 余种，分离于不同产地的天然冬虫夏草菌株，所发酵生产的虫草菌丝有效成分各不一样，导致其所发挥药效也不尽相同。目前，人工培养冬虫夏草的免疫药理学研究主要集中在青藏一带所产的北虫草，国内外对于云南虫草菌株的免疫调节效果实验研究未见报道。

为了解人工培养云南虫草菌对小鼠免疫功能的调节作用，本研究选取云南大学微生物研究所云微科贸公司研发培养的云南本土蝙蝠蛾拟青霉菌株冬虫夏草菌粉（yunnan cordyceps sinensis, YNCS）进行多项免疫功能实验研究，观察 YNCS 对 ICR 小鼠的免疫调节作用，探讨了解其可能的机制

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 ICR 小鼠，体重（20±2）g，雌雄各半，购自昆明医科大学实验动物中心，共 96 只，随机分 6 组即生理盐水（NS）对照组、模型 NS 对照组、YNCS 高剂量组 3.0 g/(kg·d)、中剂量组 1.5 g/(kg·d)、低剂量组 0.75g/(kg·d)，阳性药物百令胶囊对照组 1.5 g/(kg·d)。每组均正常饮食及给水。

1.2 药品及试剂

YNCS 由云南大学微生物研究所云微科贸公司提供，药物为粉状，以 NS 溶解配成高剂量组 1.2 g/mL、中剂量组 0.6 g/mL、低剂量组 0.3 g/mL，均为现配现用。阳性对照药：百令胶囊，杭州中美华东制药有限公司产品，批准文号：国药准字 Z10910036，产品批号：061131，每粒胶囊含 0.2 g 发酵虫草菌不粉，包装 0.2 g×60 粒，临床用量 9 g/(60 kg·d)；每只小鼠用药量按公斤体重计算为人体用药量 10 倍，实验用药中剂量为 0.03 g/(20 g·d)，用 NS 稀释，按 0.03 g/0.5 mL 灌胃（ig）即可。环磷酰胺注射剂（cyclophosphamide for injection, CY）：江苏恒瑞医药股份有限公司产品；NS、

MTT、ConA、LPS、中性红(Neutral red)、三联细胞裂解液（10% SDS-5% 异丁醇-0.012 mol/L HCL (W/V/V)）。

1.3 主要试验仪器

ELISA 仪：日本产，BIO-RAD 550 型；荧光显微镜：日本产 Olympus；96 孔塑料细胞培养板：美国 Sigma 产品。722 型光栅分光光度计：上海第三分析仪器厂出品（Q/YXLH4-92 型）。

1.4 模型制作及试验方法

环磷酰胺（CY）造成免疫功能低下模型：CY 80 mg/kg，一次性腹腔注射（ip），并于当天开始 ig 给药。正常对照组和 CY 动物模型 NS 对照组：每只鼠给 NS 0.5 mL/20 g；YNCS 3 个剂量给药组和阳性药物对照百令胶囊组，ig 给药 0.5 mL/20 g 体重，每天同一时间给药 1 次，连续用药 10 d，第 11 天脱颈处死，检测小鼠胸腺指数、脾指数、腹腔巨噬细胞（M ϕ ）吞噬功能、淋巴细胞增殖、T 淋巴细胞亚群（L3T4⁺、Lyt2⁺）、血清凝集素等免疫学指标。

小鼠胸腺指数、脾指数检测：ICR 小鼠处死后，称体重及胸腺、脾脏重量，计算胸腺指数和脾指数。腹腔巨噬细胞（PM ϕ ）吞噬功能检测按文献^[4,5]进行，淋巴细胞增殖实验（MTT 法）按文献^[6-8]进行，T 淋巴细胞亚群（L3T4⁺、Lyt2⁺）按文献^[8,9]进行，血清凝集素按文献^[10]进行。

1.5 统计学方法

实验数据以均数±标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，采用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析，各组间两两比较采用 *t* 检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对小鼠胸腺指数和脾指数的影响

模型对照组的小鼠胸腺指数和脾指数低于正常对照组（ $P<0.05$ ），YNCS 低剂量组小鼠和百令胶囊组的胸腺指数高于模型对照组（ $P<0.05$ ）且与正常对照组无统计学差异（ $P>0.05$ ）。YNCS 各组 and 百令胶囊组的脾指数明显高于模型对照组（ $P<0.01$ ），甚至高于正常对照组（ $P<0.05$ ）。

2.2 对小鼠 M ϕ 吞噬功能的影响

模型 NS 对照组的小鼠 PM ϕ 吞噬功能明显低于正常对照组（ $P<0.01$ ），百令胶囊组小鼠 PM ϕ 吞噬功能明显高于正常对照组和模型 NS 对照组（ $P<0.01$ ），YNCS 低剂量对小鼠 PM ϕ 吞噬功能有增强作用，与百令胶囊作用相近。但 YNCS 中、高

剂量组小鼠 PM ϕ 吞噬功能与模型 NS 对照组比较 无显著性差异 ($P > 0.05$), 见表1.

表1 YNCS 对小鼠 PM ϕ 吞噬功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Tab. 1 Effect of YNCS on the function of M Φ phagocytosis in mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药量 g/(kg.d)	OD _{550nm}
正常对照组	13	-	0.197 \pm 0.039
模型 NS 对照组	16	-	0.149 \pm 0.010*
YNCS 低剂量组	11	0.75	0.244 \pm 0.062 Δ
YNCS 中剂量组	14	1.50	0.145 \pm 0.013
YNCS 高剂量组	11	3.00	0.141 \pm 0.016
百令胶囊组	13	1.50	0.232 \pm 0.021 Δ

与正常对照组比较, * $P < 0.05$, 与模型 NS 对照组比较, $\Delta P < 0.05$.

2.3 对小鼠淋巴细胞增殖的影响 (MTT 法)

模型对照组小鼠 ConA 刺激淋巴细胞增殖明显低于正常对照组 ($P < 0.01$), YNCS 低、中剂量组淋巴细胞增殖比模型对照组显著增高 ($P < 0.01$), 以低剂量组效果为最佳, 中剂量组与百令胶囊组作用相近, 高剂量组则与模型对照组无显著差异 ($P > 0.05$). 实验表明 YNCS 对小鼠 ConA 刺激淋巴细胞增殖呈剂量依赖性递减作用.

模型 NS 对照组小鼠 LPS 刺激淋巴细胞增殖低于正常对照组 ($P < 0.05$), YNCS 低、中剂量能增强 LPS 刺激淋巴细胞增殖, 与百令胶囊效果相当 ($P > 0.05$), 以低剂量效果为最佳. YNCS 高剂量组对 LPS 刺激淋巴细胞增殖反应无明显作用. 实验表明 YNCS 低、中剂量组对小鼠 LPS 刺激 T 淋

巴细胞增殖具有增强作用.

2.4 对小鼠 T 淋巴细胞亚群 (L3T4⁺、Lyt2⁺) 的影响

模型 NS 对照组 L3T4⁺ 淋巴细胞及 L3T4⁺/Lyt2⁺ 比值与正常对照组相比明显降低 ($P < 0.01$), Lyt2⁺ T 淋巴细胞无明显变化, YNCS 低、中剂量对 L3T4⁺ T 淋巴细胞具有上调作用, 可使降低的 L3T4⁺ 淋巴细胞, 使之恢复接近正常水平, 其中以中剂量为最佳, 与百令胶囊及正常对照组比较无明显差异 ($P > 0.01$). YNCS 高剂量组能明显增高 Lyt2⁺ 淋巴细胞水平, 同时使 L3T4⁺ 淋巴细胞降低, 对 CY 致免疫低下小鼠的 L3T4⁺/Lyt2⁺ 有显著降低作用, 提示高剂量虫草菌粉对细胞免疫具有抑制作用, 见表 2.

表2 YNCS 对小鼠 T 淋巴细胞亚群 (L3T4⁺、Lyt2⁺) 的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Tab. 2 Effect of YNCS on T lymphocytes subpopulation(L3T4⁺ and Lyt2⁺) in mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药量 g/(kg.d)	阳性细胞 (%)		
			L3T4 ⁺	Lyt-2 ⁺	L3T4 ⁺ /Lyt-2 ⁺
正常对照组	16	-	46.12 \pm 1.83	38.09 \pm 3.03	1.19 \pm 0.12
模型 NS 对照组	16	-	31.29 \pm 3.20*	38.76 \pm 1.88	0.81 \pm 0.10*
YNCS 低剂量组	13	0.75	39.49 \pm 2.93 Δ	37.54 \pm 1.79	1.05 \pm 0.86 Δ
YNCS 中剂量组	16	1.50	44.96 \pm 3.63 Δ	37.68 \pm 2.88	1.21 \pm 0.14 Δ
YNCS 高剂量组	15	3.00	28.04 \pm 2.93 Δ	44.59 \pm 2.27	0.63 \pm 0.66 Δ
百令胶囊组	10	1.50	46.09 \pm 1.80 Δ	39.43 \pm 2.32	1.17 \pm 0.11 Δ

与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型 NS 对照组比较, $\Delta P < 0.05$.

2.5 对小鼠血清凝集素的影响

模型对照组小鼠凝集素低于正常对照组 ($P < 0.05$), YNCS 低、中、高剂量组小鼠凝集素抗体积

数与模型对照组比较有显著差异 ($P < 0.01$), 实验表明 YNCS 与百令胶囊一样, 可促进小鼠凝集素的恢复作用, 并呈剂量依赖性递增现象, 见表 3.

表 3 YNCS 对小鼠血清凝集素的影响 ($\bar{x} \pm s$)
 Tab. 3 Effect of YNCS on the serum level of agglutinin in mice ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	给药量 g/(kg.d)	凝集素抗体积数
正常对照组	14	-	58.29 ± 9.27
模型 NS 对照组	12	-	45.92 ± 15.23*
YNCS 低剂量组	16	0.75	56.67 ± 16.96 [△]
YNCS 中剂量组	15	1.50	65.87 ± 13.34 [△]
YNCS 高剂量组	10	3.00	68.10 ± 10.63 [△]
百令胶囊组	14	1.50	63.21 ± 12.22 [△]

与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型 NS 对照组比较, [△] $P < 0.05$.

3 讨论

国内多项动物实验研究表明, 人工培养冬虫夏草对免疫功能具有促进和调节作用, 为临床应用虫草防治免疫失调及肿瘤等疾病提供了科学依据, 虽其作用机理尚未完全阐明, 但多数实验研究认为虫草是一种良好的生物反应调节剂。

本研究发现 YNCS 具有良好的免疫调节作用。YNCS 对模型小鼠的胸腺指数和脾指数具有上调作用, 可使免疫功能受抑制的小鼠胸腺和脾重量恢复至正常水平; YNCS 能增强小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬作用, 提示 YNCS 对机体非特异性免疫有一定上调作用; 研究 YNCS 对机体特异性细胞免疫应答作用发现, YNCS 可增强淋巴细胞增殖作用, 并调节失衡的 T 细胞亚群比例。同时, YNCS 也能通过增加机体血清凝集素抗体水平来影响体液免疫应答。在部分实验结果中发现, 高剂量 YNCS 对机体免疫功能有一定的抑制作用。本研究表明 YNCS 对机体免疫功能有双向调节作用, 为 YNCS 的临床应用提供了重要的实验研究依据。

京: 化学工业出版社, 2000: 86.

- [2] 刘彦威, 刘娜, 刘利强. 冬虫夏草有效成分的研究进展 [J]. 动物医学进展, 2004, 25(3): 51 - 53.
- [3] 沈晓云, 李兆兰, 田军. 冬虫夏草与虫草菌丝有效成分分析比较 [J]. 山西大学学报 (自然科学版), 1998, 21(1): 80 - 85.
- [4] 徐叔云, 卞如濂, 陈修主编. 药理学实验方法 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社出版, 2002: 1 455 - 1 457.
- [5] 顾立刚, 龚树生. 漏芦脱皮甾酮对小鼠 PM ϕ 的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 1993, 6(9): 381 - 382.
- [6] 徐叔云, 卞如濂, 陈修主编. 药理学实验方法 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社出版, 2002: 1 426 - 1 428.
- [7] 周道宏, 沈元珊, 赵曼瑞. 测定淋巴细胞转化和鼠白细胞介素 2 活性的新方法 - MTT 比色分析法 [J]. 中国免疫学杂志, 1986, 2(1): 39.
- [8] 王玲, 李维波, 邓学端, 等. 枸杞多糖对糖尿病小鼠模型免疫功能的影响 [J]. 上海免疫学杂志, 2000, 20(3): 159 - 162.
- [9] SPRENT J. Function of purified L3T4⁺ and Lyt-2⁺ cell in vitro and vivo [J]. Immunol Res, 1986, 117: 243 - 249.
- [10] 徐叔云, 卞如濂, 陈修主编. 药理实验方法学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 1 437 - 1 438.

(2012 - 03 - 14 收稿)

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典. 一部 [M]. 北