

本文引用:李如意,林也,魏艳霞,李鑫,邵峰,黄惠勇,秦裕辉,蔡雄,刘平安,宋厚盼.冬虫夏草对免疫抑制模型小鼠免疫功能调节作用的研究[J].湖南中医药大学学报,2017,37(12):1316-1319.

冬虫夏草对免疫抑制模型小鼠免疫功能调节作用的研究

李如意^{1,2},林也¹,魏艳霞¹,李鑫¹,邵峰¹,黄惠勇¹,秦裕辉¹,蔡雄¹,刘平安^{1,2*},宋厚盼^{1*}

(1. 湖南中医药大学中医诊断学湖南省重点实验室,湖南长沙410007;2. 湖南中医药大学药学院,湖南长沙410208)

[摘要] 目的 研究冬虫夏草对免疫抑制模型小鼠的免疫功能调节作用。方法 通过腹腔注射环磷酰胺建立小鼠免疫抑制模型,观察小鼠日常状态、体质量、胸腺指数和脾脏指数变化,全自动血液流变测试仪检测血液免疫细胞改变,ELISA法检测脾脏中IL-2、IL-6、TNF- α 及INF- γ 细胞因子含量变化。结果 冬虫夏草可改善免疫抑制小鼠日常状态,提升体质量、饮食饮水量、胸腺指数和脾脏指数,增多白细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、红细胞、血红蛋白、血小板的数量,提高IL-2、IL-6、TNF- α 及INF- γ 含量,以上指标与模型组比较,差异均具统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 冬虫夏草对免疫抑制模型小鼠的免疫功能有促进作用。

[关键词] 冬虫夏草;环磷酰胺;免疫功能

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.12.005

Effect of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. in Regulating Immune Function of Immunosuppressive Model Mice

LI Ruyi^{1,2}, LIN Ye¹, WEI Yanxia¹, LI Xin¹, SHAO Feng¹, HUANG Huiyong¹, QIN Yuhui¹, CAI Xiong¹,

LIU Pingan^{1,2*}, SONG Houpan^{1*}

(1. Hunan Provincial Key Laboratory of Diagnostic and Therapeutic Research in Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To study the immunological function regulation of *Cordyceps sinensis* in immunosuppressive mice model. **Methods** Immunosuppressive mice model was established by intraperitoneal injection of cyclophosphamide. Mouse daily state, body weight, thymus index and spleen index were observed, blood immune cells was detected by automatic hemorheology tester, the content of IL-2, IL-6, TNF- α and INF- γ in the spleen were analysed by ELISA. **Results** *Cordyceps sinensis* can improve the mice daily state; increase body weight, drinking water, thymus index and spleen index; increase the number of leukocytes, neutrophils, lymphocytes, erythrocytes, hemoglobin and platelets; increase the content of IL-2, IL-6, TNF- α and INF- γ . The above indicators had significant differences, compared with the model group ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** *Cordyceps sinensis* can enhance the immune function in immunosuppressive model mice.

[Keywords] *Cordyceps sinensis*; cyclophosphamide; immune function

冬虫夏草(*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.), 又名夏草冬虫、虫草,是一种麦角菌科虫草属真菌,是寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座和幼虫尸体的干燥复合体^[1-2]。冬虫夏草味甘,性温,归肺、肾经,

具有补肾益肺、止血化痰等功效,主要包含糖类、氨基酸、核苷酸、脂肪酸、无机元素、维生素等化学成分^[3-4]。现代药理学研究表明,冬虫夏草具有显著的降血糖、抗肿瘤、抗氧化、抗纤维化、抗炎等活性^[5-6]。

[收稿日期] 2017-01-14

[基金项目] 湖南省科技重大专项(2014FJ1007);湖南省高层次卫生人才“225”工程医学学科骨干人才培养对象项目;湖南中医药大学中医诊断国家重点学科开放基金项目(2015ZYZD16), (2015ZYZD19);湖南省教育厅优秀青年项目(15B179);湖南省中医药管理局科研计划项目(201780)。

[作者简介] 李如意,女,在读硕士研究生,研究方向:中药药效物质基础研究。

[通讯作者] * 刘平安,男,副教授,博士, E-mail:liupa@hnctcm.edu.cn; 宋厚盼,男,讲师, E-mail:songhp@hnctcm.edu.cn。

环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)是一种细胞毒性化疗药物,亦属于烷化剂类的免疫抑制剂,是免疫毒理学中制备免疫抑制模型的常用药物^[7-8]。本课题组前期对 CTX 致小鼠免疫功能低下的给药剂量(40、60、80、120、160 mg/kg)进行了筛选,结果表明 80 mg/kg 剂量 CTX 诱导的小鼠免疫功能抑制模型最为理想。本研究采用 80 mg/kg 剂量的 CTX 制备小鼠免疫抑制模型,探讨冬虫夏草对免疫功能的调节作用,旨在为冬虫夏草临床应用于提高机体免疫功能提供可靠的实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 动物 健康的 ICR 小鼠(购自湖南斯莱克景达动物中心),雄性,体质量 15~18 g,合格证号:43004700017174。

1.1.2 试剂 注射用环磷酰胺(批号 14021925,江苏恒瑞医药股份有限公司),氯化钠注射液(湖南科伦制药有限公司),RIPA 裂解液(批号 P0013B,碧云天生物技术公司),IL-2、IL-6、TNF- α 及 INF- γ 细胞因子 ELISA 检测试剂盒(批号 201603,武汉博士德生物工程有限公司)。

1.1.3 受试药物 将匹多莫德分散片(批号 H140309,北京朗依制药有限公司)研磨成粉,蒸馏水充分溶解,配制 5 mg/mL。将冬虫夏草药材(批号 20120121,杭州华东制药有限公司)研成细粉,加蒸馏水加热搅拌,配制成 25 mg/mL 的冬虫夏草混悬液。称取环磷酰胺粉末,加生理盐水充分溶解、混匀配制得 8 mg/mL 的环磷酰胺药液。

1.1.4 仪器 YP4100W 型电子天平,上海海康电子仪器厂;5417R 小型高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;iMark 型酶标仪,BIO-RAD 公司;SA-6600 型全自动血液流变测试仪,湖南蓉申科学仪器有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 分组与造模^[9] 健康雄性 ICR 小鼠 40 只,适应性喂养 4 d 后,随机分成正常组、模型组、阳性药组(匹多莫德组)和冬虫夏草组 4 组,每组 10 只,自由进食、饮水。实验期间每天固定时间点称量小鼠体质量,观察小鼠毛发、行为活动及精神状态等日常体征。除正常组外,其余各组小鼠在第 1、3、5 天进行给药造模,以 80 mg/kg 腹腔注射环磷酰胺药液,

正常对照组则腹腔注射生理盐水。

1.2.2 干预方法 自实验第 1 天,阳性药组灌胃给予匹多莫德药液(100 mg/kg),冬虫夏草组灌胃给予冬虫夏草药液 0.5 g/(kg·d),正常组和模型组则给予等体积的蒸馏水,连续干预 7 d。

1.3 指标检测

1.3.1 一般状态 每天早上于固定时间点测定各组小鼠的饮食量、饮水量、体质量,观察小鼠外观、精神状态等变化情况。

1.3.2 胸腺指数和脾脏指数测定 小鼠末次给药后 12 h,禁食不禁水,称量体质量、眼球采血后,脱颈处死,剖取胸腺和脾脏,滤纸吸取表面残血及多余水分,称取湿重,计算胸腺指数和脾脏指数。

1.3.3 血细胞检测 小鼠于末次给药后禁食不禁水 12 h,眼球取血,采用 EDTA-K2 抗凝血,全自动生化分析仪检测血细胞。

1.3.4 细胞因子检测 取小鼠脾脏剪碎、研磨,裂解液裂解 30 min 后以 12 000 r/min 于 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,将上清液移入新的 EP 管中,分装冻存入-80 $^{\circ}$ C 冰箱。取上清液置于 37 $^{\circ}$ C 水浴快速融解,严格按照 ELISA 试剂盒说明书方法操作检测 IL-2、IL-6、TNF- α 及 INF- γ 细胞因子含量。

1.4 统计方法

所有数据均采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,应用 SPSS 19.0 统计软件分析,先进行方差齐性检验,组间比较采用单因素方差分析,采用 LSD 法进行,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组小鼠的一般状态

2.1.1 一般表现 与正常组比较,模型组小鼠毛发干枯、色泽暗淡、脱毛,在第 6 天均出现竖毛情况;小鼠扎堆,活动减少,精神倦怠。给予冬虫夏草后,小鼠的毛发干枯、色泽暗淡、脱毛情况均明显改善,无竖毛情况出现,小鼠扎堆减少,活动、精神等状态与正常组小鼠无明显差别。

2.1.2 各组小鼠体质量的变化 与正常组比较,模型组小鼠体质量从第 2 天开始明显下降($P<0.01$),一直延续降至第 6 天;冬虫夏草可使免疫抑制小鼠体质量增加,在给药的第 6 天,冬虫夏草组小鼠体质量明显提升,与模型组比较 $P<0.05$ 。见表 1。

表1 各组小鼠的体质量 (g, $\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	1 d	2 d	4 d	6 d
正常组	25.57±1.07	25.57±1.37	27.67±1.89	29.89±2.00
模型组	23.90±1.22**	23.97±1.19**	24.31±1.46**	24.41±1.69**
匹多莫德组	23.97±1.10	24.29±1.14	25.10±1.16	25.86±1.09 [#]
冬虫夏草组	24.17±0.90	24.55±1.33	25.43±1.37	26.09±1.10 [#]
<i>F</i>	0.29	2.93	9.00	23.11
<i>P</i>	0.83	0.047	0.00	0.00

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

2.1.3 各组小鼠饮食饮水量的改变 与正常组比较,模型组小鼠的平均饮食饮水量均明显减少 ($P<0.01$);冬虫夏草可使模型小鼠饮食饮水量均显著提升(与模型组比较, $P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表2。

2.2 各组小鼠胸腺指数和脾脏指数的比较

与正常组比较,模型组小鼠胸腺指数和脾脏指数均明显降低($P<0.01$);给予冬虫夏草后,与模型组比较($P<0.05$)。小鼠胸腺指数和脾脏指数均显著增

加($P<0.05$),见表2。

2.3 各组小鼠血细胞主要指标的比较

与正常组比较,模型组小鼠的白细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、红细胞、血红蛋白、血小板等血细胞均明显减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,冬虫夏草组小鼠的白细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、红细胞、血红蛋白、血小板数量均明显升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表3。

表2 各组小鼠的饮食饮水量和脏器指数 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	进食量/g	饮水量/g	胸腺指数/mg·g ⁻¹	脾脏指数/mg·g ⁻¹
正常组	5.83±0.34	7.16±0.57	2.36±0.32	3.96±0.54
模型组	3.99±0.41**	4.44±0.48**	0.56±0.14**	2.35±0.59**
匹多莫德组	4.62±0.29 [#]	5.46±0.43 [#]	0.79±0.19 [#]	2.82±0.44 [#]
冬虫夏草组	4.88±0.23 [#]	5.51±0.51 [#]	0.80±0.25 [#]	2.92±0.44 [#]
<i>F</i>	27.78	20.59	116.70	17.49
<i>P</i>	0.00	0.00	0.00	0.00

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

表3 各组小鼠血液主要指标的比较

($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	白细胞/ $\times 10^9 \cdot L^{-1}$	中性粒细/ $\times 10^9 \cdot L^{-1}$	淋巴细胞/ $\times 10^9 \cdot L^{-1}$	红细胞/ $\times 10^{12} \cdot L^{-1}$	血红蛋白浓度/g·L ⁻¹	血小板/ $\times 10^9 \cdot L^{-1}$
正常组	5.00±0.71	0.57±0.40	4.35±0.76	9.26±0.43	154.33±6.14	1279.11±279.51
模型组	1.26±0.14**	0.02±0.00*	1.08±0.16**	7.10±0.44**	115.53±6.73**	763.75±124.49**
匹多莫德组	1.72±0.39 [#]	0.16±0.05 [#]	1.52±0.19 [#]	8.53±0.45 [#]	123.10±5.63 [#]	972.30±164.83 [#]
冬虫夏草组	1.72±0.42 [#]	0.08±0.02 [#]	1.45±0.14 [#]	7.56±0.42 [#]	122.00±6.82 [#]	949.60±200.00 [#]
<i>F</i>	124.2	10.07	105.6	39.7	69.2	10.6
<i>P</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

2.4 各组小鼠细胞因子含量的比较

与正常组比较,模型组 IL-2、IL-6、TNF- α 及 IFN- γ

含量明显下降($P<0.01$);与模型组比较,冬虫夏草显著提高了这些细胞因子的含量($P<0.05$)。见表4。

表4 各组小鼠细胞因子含量的比较

($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	IL-2/pg·mL ⁻¹	IL-6/pg·mL ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	IFN- γ /ng·L ⁻¹
正常组	2008.90±171.02	81.54±8.13	502.94±38.74	1330.97±116.60
模型组	1665.47±122.74**	59.91±8.18**	403.97±32.73**	1102.22±109.38**
匹多莫德组	1829.54±135.95 [#]	68.34±7.59 [#]	441.00±33.36 [#]	1234.80±115.94 [#]
冬虫夏草组	1803.48±150.88 [#]	67.51±7.03 [#]	436.65±32.19 [#]	1208.01±104.97 [#]
<i>F</i>	9.29	12.99	13.91	6.70
<i>P</i>	0.00	0.00	0.00	0.001

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

3 讨论

胸腺是 T 细胞发育和成熟的重要器官,脾脏是最大的外周淋巴器官,富含 T 细胞、B 细胞、树突状细胞和巨噬细胞。胸腺指数和脾脏指数能比较客观反映免疫器官的发育和免疫细胞的功能状况,是机

体非特异性免疫的一个方面^{[10]~10}。本研究中,模型组小鼠在注射环磷酰胺后的第 6 天出现明显不同于正常小鼠的体征,体质量减轻,饮食饮水量减少,解剖后发现小鼠的脾脏与胸腺明显缩小,这些体征状态的变化可直观反映出小鼠免疫功能下降。而给予冬虫夏草后发现,小鼠的毛发、精神等状态有所恢复,

体质量增加,饮食饮水增多,脾脏与胸腺均增大,说明冬虫夏草可改善小鼠免疫功能低下的情况。

白细胞(包括中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、淋巴细胞及单核细胞等)为固有免疫细胞,在免疫系统中具有重要作用,可直接反映机体免疫功能的水平^{[10]59-62};红细胞参与机体免疫调控,1953年有学者已发现红细胞有促进白细胞吞噬作用,具有黏附免疫复合物的功能,是机体对病原体防御的重要部分^[11];血小板是血液中数量最多的具有免疫功能的细胞,研究表明,血小板参与炎性病变。此外,血小板触发补体级联反应,促进吞噬细胞的清除作用,亦可通过直接或间接地趋化吸引吞噬细胞,进而实现对病原体的清除^[12]。IL-2除了能刺激T淋巴细胞生长外,也可使NK细胞激活、分化及增殖,亦可促进B细胞增殖及分泌抗体。IL-6在多种细胞功能调节方面具有重要的作用,其作用表现为促进B、T淋巴细胞增殖分化。TNF- α 可使白细胞在炎症局部聚集,刺激单核细胞、血管内皮细胞等产生细胞因子,被公认为是一种促炎细胞因子,参与免疫调节。IFN- γ 具有干扰病毒感染和复制、激活巨噬细胞、活化T细胞和NK细胞,调节免疫、抗病毒等功能^{[10]32-37}。本实验通过检测这些免疫细胞数量和细胞因子的含量,探讨冬虫夏草对小鼠的免疫功能的影响。实验结果显示,冬虫夏草可使这些免疫细胞数量增多,细胞因子含量提升,与模型组存在明显差别,表明冬虫夏草具有增强机体特异性与非特异性免疫的功能的作用。

近年来研究发现,疾病的发生通常伴随着免疫功能低下情况。免疫功能低下是由于免疫系统功能失调而导致机体对于病原微生物及其毒素的侵袭不能发挥正常的保护作用,致使机体易感染而患病。目前对免疫低下患者主要采用一些细胞因子、T细胞调节剂等治疗,但因副作用大而在临床上使用受限。本实验研究了冬虫夏草对免疫抑制模型小鼠免疫功能的影响,结果提示冬虫夏草能改善小鼠的免疫功能抑制情况,促进机体的非特异性和特异性免

疫功能,其发挥免疫调节作用可能与其含有多糖和虫草素等有效活性成分有关,其机制尚待进一步研究。本研究可为冬虫夏草应用于临床防治免疫系统疾病提供科学依据。

参考文献:

- [1] 于帮红,徐慧,张博.一株冬虫夏草来源真菌的鉴定及抑菌活性检测[J].中国实验方剂杂志,2016,22(8):36-40.
- [2] 汤万全.冬虫夏草类似品—亚香棒虫草[J].中药材科技,1980(1):31-32.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].北京:中国医药科技出版社,2015:115.
- [4] Zhang H, Li Y, Mi J, et al. GC-MS Profiling of Volatile Components in Different Fermentation Products of *Cordyceps Sinensis* Mycelia[J]. *Molecules*, 2017, 22(10):1800.doi:10.3390/molecules22101800.
- [5] Liu JY, Feng CP, Li X, et al. Immunomodulatory and antioxidative activity of *Cordyceps militaris* polysaccharides in mice[J]. *Int J Biol Macromol*. 2016, 86: 594-598.
- [6] Hwang S, Cho GS, Ryu S, et al. Post-ischemic treatment of WIB801C, standardized *Cordyceps* extract, reduces cerebral ischemic injury via inhibition of inflammatory cell migration[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 186: 169-180.
- [7] Wang Y, Qi Q, Li A, et al. Immuno-enhancement effects of YifeiTongluo Granules on cyclophosphamide-induced immunosuppression in Balb/c mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 194: 72-82.
- [8] 单增天,田岳凤,李雷勇,等.不同灸法对免疫抑制兔脾脏指数及细胞因子的影响[J].湖南中医药大学学报,2016,36(11):83-86.
- [9] 赵弋清,罗霞,陈东辉,等.不同剂量环磷酰胺诱导正常小鼠免疫抑制的对比研究[J].免疫学杂志,2005,21(3):122-124.
- [10] 杨黎青.免疫学基础与病原生物学[M].北京:中国中医药出版社,2007.
- [11] Nelson RA. The immune phenomenon: An immunologically specific reaction between microorganisms and erythrocyte leading to enhanced phagocytosis[J]. *Science*, 1953, 118:773.
- [12] Speth C, Loffler J, Krappmann S, et al. Platelets as immune cells in infectious diseases[J]. *Future Microbiol*, 2013, 8(11): 1431-1451.

(本文编辑 杨 瑛)