

发酵虫草菌粉多糖免疫活性实验研究

蒋洪亮¹ 赵修南² 麻浩² 何丽芳³ 单俊杰² 王海南^{1,4}

(1 贵州大学药学院, 贵阳, 550025; 2 军事科学院军事医学研究院, 北京, 100850; 3 湖南中医药大学, 长沙, 410208; 4 国家食品药品监督管理总局, 北京, 100053)

摘要 目的:探究发酵虫草菌粉多糖的免疫活性。方法:发酵虫草菌粉通过水提醇沉、复溶、透析、浓缩、冷冻干燥得多糖,命名为CSMP-60,其提取条件:60℃水提、提取时间4h、料液比1:15、提取次数2次。以小鼠免疫细胞为材料,检测CSMP-60的免疫活性。结果:CSMP-60能促进脾细胞的增殖($P < 0.05$),明显促进小鼠腹腔巨噬细胞分泌TNF- α ($P < 0.05$),有促进脾淋巴细胞分泌IFN- γ 的趋势。结论:CSMP-60可能是发酵虫草菌粉产生免疫活性的效应物质之一。

关键词 发酵虫草菌粉;多糖;细胞增殖;脾细胞;巨噬细胞;免疫活性;肿瘤坏死因子; γ -干扰素

Experimental Study on Immune Activities of Polysaccharides from Fermented Cordyceps sinensis Powders

Jiang Hongliang¹, Zhao Xiunan², Ma Hao², He Lifang³, Shan Junjie², Wang Hainan^{1,4}

(1 School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2 Institute of Military Medicine, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China; 3 Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 4 China Food and Drug Administration, Beijing 100053, China)

Abstract Objective: To investigate the immunological activity of polysaccharides from fermented Cordyceps sinensis powders. **Methods:** Polysaccharides from fermented Cordyceps sinensis powders were obtained through water extraction and alcohol precipitation, reconstitution, dialysis, concentration and freeze-drying, named after CSMP-60. Its extraction conditions: 60℃ water extraction, extraction time 4h, solid-liquid ratio 1:15, the number of extractions 2 times. The immune activity of CSMP-60 was measured using mouse immune cells. **Results:** CSMP-60 could promote the proliferation of spleen cells ($P < 0.05$), and significantly promote the secretion of TNF- α from mouse peritoneal macrophages ($P < 0.05$). It has a tendency to promote the secretion of IFN- γ by spleen cells. **Conclusion:** CSMP-60 may be one of the immunocompetence substances of fermented Cordyceps sinensis powders.

Key Words Fermented Cordyceps sinensis powders; Polysaccharides; Cell proliferation; Spleen cells; Macrophages; Immune activity; TNF- α ; IFN- γ

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.08.050

发酵虫草菌粉是我国学者运用冬虫夏草无性型深层发酵技术研究获得的发酵虫草菌丝产品,于上世纪80年代被批准作为中药材用于临床^[1]。已往大量研究发现,发酵虫草菌粉具有抗肿瘤、抗氧化、免疫调节、保护肝和肾等药理作用。为进一步研究发酵虫草菌粉发挥免疫调节作用的物质基础,从发酵虫草菌粉中水提获得多糖(CSMP-60),并探究不同浓度CSMP-60对脾细胞增殖、脾细胞分泌IFN- γ 和巨噬细胞分泌TNF- α 的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 Balb/C小鼠(雌性,6~8周龄):军事医学科学院实验动物中心,合格证号为军科院SCXK(军)2012-001。饲养条件:温度22~26℃,湿度40%~60%,标准饲料喂养,自由饮水。

1.1.2 药物 发酵虫草菌粉,产地:江西国药,国药准字Z10890021。

发酵虫草菌粉多糖的制备:称取发酵虫草菌粉1kg,向其中加入15L去离子水,60℃条件下水浴浸提4h,期间不时搅拌,然后用2层纱布滤过,滤过后的残渣在同样条件下进行第2次提取。合并两次提取的滤液,滤液在3000r/min、10min条件下离心,离心后上清液于50~55℃减压浓缩获得水提浓缩液(浓缩约为1L)。缓缓加入浓缩液3倍体积的95%乙醇,边加边搅拌,室温下静置醇沉72h。混合体系在3000r/min、10min条件下离心,分离沉淀部分,向沉淀部分中加入去离子水搅拌溶解,离心(3000r/min、10min),再将沉淀同样操作3次。合并离心后的上清液,装入透析袋,用自来水透析72h(一边透析一边摇晃),去除小分子杂质。将袋内透

作者简介:蒋洪亮(1987.08—),男,硕士研究生在读,研究方向:中药多糖的提取与活性研究,E-mail:lll3705@qq.com

通信作者:单俊杰(1966.09—),女,博士,研究员,研究方向:中药多糖的化学及生物活性研究,E-mail:shanjunjie0012@126.com;王海南(1968.12—),男,博士,研究员,研究方向:药物化学,E-mail:md_wanghainan@126.com

析液离心,上清液减压浓缩后,进行冷冻干燥,得到发酵虫草菌粉多糖(CSMP-60)^[2-5]。1 kg 发酵虫草菌粉经水提醇沉、复溶、透析、浓缩、冷冻干燥得 66.53 g 黄色粉末,得率为 6.65%。

1.1.3 试剂与仪器 乙醇:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。刀豆球蛋白(Concanavalin A, ConA)和脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS):美国 Sigma 公司。RPMI 1640 培养基:美国 Hyclone 公司。MTT:Amresco 公司。DMEM 培养液:Gibco 公司。胎牛血清(FBS):浙江天杭生物科技有限公司。胰蛋白酶:Amresco 公司。十二烷基硫酸钠(SDS):Amresco 公司。其余试剂:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。红细胞裂解液(Tris-NH₄Cl 缓冲液):0.17 mol/L Tris 与 0.16 mol/L NH₄Cl 按 1:9 混合,调 pH 为 7.2,经 0.22 μm 滤膜滤过除菌,4 ℃ 存放。ELISA 试剂盒:购自欣博盛生物科技有限公司。DL-I-15 型台式封闭电炉:天津市泰斯特仪器有限公司。旋转蒸发仪:上海亚荣生化仪器厂。分析天平:Ohaus 公司。LGJ-25 C 冷冻干燥机:北京四环冻干机厂。DZF-6020 真空干燥箱:上海一恒科技有限公司。YT-CJ-2ND 超净工作台:北京亚泰公司。DHP-9161 型电热恒温培养箱:上海一恒科学仪器有限公司。流式细胞仪:FACS caliber,美国 BD 公司。MCO-15AC 型 CO₂ 细胞培养箱:日本三洋。CKX41 型生物显微镜:日本 OLYMPUS 公司。YX-280D 型高压蒸汽消毒器:江苏江阴滨江医疗设备有限公司。96 孔 ELISA 板:美国 Costar 公司。CF16RX II 型冷冻离心机:日本 HITACHI 公司。Varioskaut Flash version 2.4.3 酶标仪和 F1-01620 型洗板机:美国 Thermo Scientific 公司。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备

1.2.1.1 分组 分正常组、对照组(ConA 组或 LPS 组)、给药组(低剂量组、中剂量组、高剂量组)。

1.2.1.2 小鼠原代脾细胞悬液的制备 放血处死 Balb/C 小鼠,在超净台无菌条件下将取出的脾脏放在置于盛有 10 mL RPMI 1640 培养基的灭菌玻璃培养皿中的 100 目尼龙网筛上,然后用消毒的玻璃注射器针芯研磨脾脏,使其细胞滤过网筛,制成脾细胞悬液。以 1 000 r/min 离心脾细胞悬液 10 min,弃上清,加入 2 mL Tris-NH₄Cl 缓冲液作用 3~5 min,再加 3 mL 培养基同上离心洗涤 2 次,再次重悬细胞,用含 20% FBS 的 RPMI 1640 培养基调整细胞密度为 5×10^9 /L。

1.2.1.3 小鼠腹腔巨噬细胞悬液的制备 处死小鼠,在超净台无菌条件下腹腔注射含 5% FBS 的 RPMI 1640 培养液,然后抽取腹腔溶液,离心 10 min ($600 \times g$),弃上清,加入红细胞溶胀液后,用细胞培养液洗涤 3 次。用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液重悬细胞,调整细胞密度为 2.5×10^8 /L。

1.2.2 给药方法 将 CSMP-60 溶解于细胞培养液中,配制成各种所需浓度的药物溶液添加于孔板中。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 MTT 法测定 CSMP-60 对小鼠原代脾细胞增殖的影响 将上述调整细胞密度后的脾细胞悬液加入无菌 96 孔细胞培养板中,100 μL/孔。正常对照孔只加等体积的 RPMI 1640 培养液,其余各孔再分别加入 100 μL 不同浓度 CSMP-60(终浓度分别为 10、50 和 250 mg/L)、ConA(终浓度 2 mg/L)、LPS(终浓度 15 mg/L)。每组设 3 复孔。将培养板置于 5% CO₂ 培养箱 37 ℃ 孵育 48 h。取出培养板,无菌条件下每孔取出 100 μL 上清弃去,加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μL,将培养板置于 5% CO₂ 培养箱 37 ℃ 孵育 4 h。取出培养板,在每孔中加 DMSO 150 μL,用酶标仪检测 570 nm 吸光度(A₅₇₀),计算细胞增殖百分率^[6-8]。

1.2.3.2 MTT 法测定 CSMP-60 协同丝裂原对小鼠原代脾淋巴细胞增殖的影响 将上述调整细胞密度后的脾细胞悬液加入无菌 96 孔细胞培养板中。设正常对照、ConA(终浓度 2 mg/L)或 LPS(终浓度 15 mg/L)对照。正常对照孔只加 RPMI 1640 培养液,丝裂原对照孔加入 ConA(终浓度 2 mg/L)或 LPS(终浓度 15 mg/L)。其余各孔加入 CSMP-60(终浓度分别为 10、50 和 250 mg/L),同时加入 ConA(终浓度 2 mg/L)或 LPS(终浓度 15 mg/L)。每组设 3 复孔。将培养板置于 5% CO₂ 培养箱 37 ℃ 孵育 48 h。取出培养板,无菌条件下每孔取出 100 μL 上清弃去,加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μL,将培养板置于 5% CO₂ 培养箱 37 ℃ 孵育 4 h。取出培养板,在每孔中加 DMSO 150 μL,用酶标仪检测 570 nm 吸光度(A₅₇₀),计算细胞增殖百分率。

1.2.3.3 测定 CSMP-60 对小鼠腹腔巨噬细胞分泌 TNF-α 的影响 将上述调整细胞密度后的巨噬细胞悬液加入 24 孔培养板,0.5 mL/孔,置于 5% CO₂ 培养箱 37 ℃ 孵育 2 h。吸去上清,用 0.9% NaCl 去除未贴附的细胞,然后每孔分别加入 1 mL 细胞培养液、LPS(终浓度 15 mg/L)及 CSMP-60(终浓度分别为 10、50 和 250 mg/L)。每组设 3 复孔,然后置于

5% CO₂ 培养箱 37 ℃ 孵育 48 h。离心,收集培养液上清,采用 ELISA 试剂盒测定细胞上清液中的 TNF-α 含量^[9]。

1.2.3.4 测定 CSMP-60 对小鼠脾淋巴细胞分泌 IFN-γ 的影响 将上述调整细胞密度后的脾细胞悬液加入 24 孔细胞培养板中,每孔各加入 0.5 mL。再加入 0.5 mL CSMP-60 溶液,终浓度分别为 10、50、250 mg/L。另设 ConA (2 mg/L) 和正常对照。每组设 3 复孔。然后将培养板置于 5% CO₂ 培养箱 37 ℃ 孵育 72 h,取出细胞培养液,离心 10 min (600 × g),收集上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书测定脾细胞培养上清 IFN-γ 含量^[10]。按照 ELISA 试剂盒说明书测定脾细胞培养上清 IFN-γ 含量^[10]。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行分析,实验结果数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,进行 one-way ANOVA 方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CSMP-60 对小鼠原代脾细胞增殖的影响 结果表明,在无丝裂原刺激的情况下,CSMF-60 能促进小鼠原代脾细胞的增殖,且呈现量效关系。中剂量 CSMF-60 能协同 LPS 促进小鼠原代脾淋巴细胞增殖 ($P < 0.05$),CSMF-60 对 ConA 促进小鼠原代脾淋巴细胞增殖有协同作用的趋势。

表 1 CSMP-60 对小鼠原代脾细胞增殖的影响

组别	剂量 (mg/L)	光密度值 (OD570 nm)
正常组	—	0.466 ± 0.014
低剂量组	10	0.491 ± 0.035
中剂量组	50	0.523 ± 0.032 *
高剂量组	250	0.538 ± 0.010 *

注:与正常组比较, * $P < 0.05$

表 2 CSMP-60 协同丝裂原对 Balb/c 小鼠原代脾淋巴细胞增殖的影响

组别	剂量 (mg/L)	光密度值 (OD570 nm)	
		ConA	LPS
正常组	—	0.476 ± 0.010	0.492 ± 0.024
ConA 组	2	0.7822 ± 0.052 *	—
LPS 组	15	—	0.604 ± 0.08 *
低剂量组	10	0.812 ± 0.029	0.621 ± 0.011
中剂量组	50	0.793 ± 0.045	0.627 ± 0.006 [△]
高剂量组	250	0.779 ± 0.026	0.621 ± 0.014

注:与正常组比较, * $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, [△] $P < 0.05$

2.2 CSMP-60 对小鼠腹腔巨噬细胞分泌 TNF-α 的影响 结果表明,LPS 及 CSMP-60 各剂量均能刺激小鼠腹腔巨噬细胞分泌 TNF-α。

2.3 CSMP-60 对小鼠脾细胞分泌 FIN-γ 的影响

结果表明,ConA 与 CSMP-60 均有促进小鼠脾淋巴细胞分泌 IFN-γ 的趋势。

表 3 CSMP-60 对 Balb/c 小鼠巨噬细胞分泌 TNF-α 的影响

组别	剂量 (mg/L)	TNF-α	
		光密度值 (OD450 nm)	含量 (ng/L)
正常组	—	0.300 ± 0.000	414.6 ± 0.7
LPS 组	15	0.497 ± 0.015 *	776.7 ± 27.1 *
低剂量组	10	0.625 ± 0.016 *	1011.1 ± 29.4 *
中剂量组	50	0.825 ± 0.023 *	1380.4 ± 42.5 *
高剂量组	250	0.789 ± 0.007 *	1313.7 ± 12.7 *

注:与正常组比较, * $P < 0.05$

表 4 CSMP-60 对 Balb/c 小鼠脾淋巴细胞分泌 IFN-γ 的影响

组别	剂量 (mg/L)	FIN-γ	
		光密度值 (OD450 nm)	含量 (ng/L)
正常组	—	0.350 ± 0.009	679.6 ± 229.3
ConA 组	2	0.372 ± 0.007	749.2 ± 23.5
低剂量组	10	0.400 ± 0.026	840.6 ± 83.8
中剂量组	50	0.368 ± 0.102	738.9 ± 329.3
高剂量组	250	0.426 ± 0.1	925.0 ± 361.2

3 讨论

CSMP-60 是发酵虫草菌粉经水提而得的多糖,虽多糖已被公认是一类具有免疫活性的物质,但不同来源多糖的免疫活性往往不尽相同。目前对 CSMP-60 如何发挥免疫调节作用,具体涉及到哪些效应细胞及细胞因子等问题还不是十分清楚,需要相应的实验研究作出回答。

脾脏含有大量的淋巴细胞和巨噬细胞,实验结果表明,CSMP-60 能促进脾细胞增殖,而在协同丝裂原促进脾淋巴细胞增殖方面却未见到 CSMP-60 有明显的作用,这提示,巨噬细胞可能是 CSMP-60 直接作用的主要免疫效应细胞。

CSMP-60 能促进巨噬细胞分泌 TNF-α,但对脾淋巴细胞分泌 IFN-γ 的影响仅呈现出促进的趋势。TNF-α 主要是由活化单核巨噬细胞产生的细胞因子,是参与非特异性和特异性免疫的重要递质,它不仅能增强 T、B 淋巴细胞、单核巨噬细胞的活性,而且还具有抗肿瘤、抗病毒、调节机体代谢等多种生物学作用^[11]。

综上所述,CSMP-60 是发酵虫草菌粉产生免疫活性的效应物质之一,可能主要通过非特异性免疫途径发挥作用,而通过 TNF-α 这一“桥梁”,CSMP-60 对特异性免疫或许也有作用。对 CSMP-60 免疫活性的进一步了解以及相关机制的探讨,还需进行深入的研究。

参考文献

[1] 李连德,李增智,樊美珍. 虫草多糖研究进展[J]. 安徽农业大学

- 学报:自然科学版,2000,27(4):413-416.
- [2]刘鹏,程显好,刘亚丽,等.虫草菌丝体多糖的提取方法[J].食品与发酵工业,2007,33(3):140-142.
- [3]刘华晶,许修宏,马怀良,等.蛹虫草菌丝体粗多糖提取方法初探[J].东北农业大学学报,2008,39(1):58-61.
- [4]韩永萍,林强,何绪文.虫草菌丝体多糖的提取研究[J].食用菌,2007,29(6):53-55.
- [5]刘金花,李福奎,贾得儒,等.中国被毛孢发酵虫草菌丝体多糖的提取、纯化及其理化性质[J].食品与发酵工业,2014,40(3):222-226.
- [6]陈清华,刘祝英,贺建华.牛膝多糖对仔猪淋巴细胞增殖作用和细胞因子分泌量的影响[J].动物营养学报,2008,20(6):712-717.
- [7]王君巧,聂少平,余强,等.黑灵芝多糖对免疫抑制小鼠的免疫调节和抗氧化作用[J].食品科学,2012,33(23):274-277.
- [8]文松.板蓝根多糖佐剂理化性质及作用机制研究[D].贵阳:贵州大学,2015.
- [9]张莘莘,李文娟,聂少平,等.黑灵芝多糖对体外培养的小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响[J].中国药理学通报,2010,26(9):1139-1142.
- [10]陶根金,向全丹,余强,等.发酵虫草菌粉对免疫抑制小鼠的免疫调节和抗氧化作用[J].南昌大学学报:理科版,2016,40(2):156-160.
- [11]龚晓健,季晖,卢顺高,等.人工虫草多糖对小鼠免疫功能的影响[J].中国药科大学学报,2000,31(1):56.
- (2018-03-31 收稿 责任编辑:王明)

首届世界中医药科技大会暨第六届世界中医药国际贡献奖颁奖大会 (2018.12 中国杭州)

中医药蕴含着深厚的科学内涵,具有引领生命科学未来发展的巨大潜力,为更好地推动中医药科技事业在全世界发展,世界中医药学会联合会将主办首届世界中医药科技大会暨第六届世界中医药国际贡献奖颁奖大会,同期召开世界中联科技发展委员会成立大会、真实世界研究专业委员会成立大会,会议由浙江中医药大学承办。

一、时间地点

2018 年 12 月 8-9 日,中国·浙江杭州。

二、会议安排

12 月 7 日白天:全天报到;

12 月 7 日晚上:世界中联科技发展委员会、真实世界研究专业委员会第一届理事会第一次会议;

12 月 8 日上午:首届世界中医药科技大会暨第六届世界中医药国际贡献奖颁奖大会主会场;

12 月 8 日下午:分会场学术会议;

12 月 9 日:学术参观。

三、参会人员

本次大会热忱邀请世界各国科研机构、高等学校、医疗机构和药品生产企业的官员、科学家、企业家等参加此次盛会,共商中医药科技创新大业。

四、会议主要议题、征文内容

1. 中医药国际科技发展形势与政策研究;

2. 中医药临床疗效评价、真实世界等科研方法学研究及国际科技合作模式研究;

3. 中医、中药、针灸基础与临床研究;

4. 中医药科技成果转化研究。

五、征文要求

1. 提交作品截止日期:2018 年 11 月 15 日,本次会议来稿请发送到指定邮箱(zyz973@126.com),同时“注册并登录《世界中医药》杂志采编系统(www.sjzyyz.com),完成作者在线投稿”。发送邮件的主题格式为“姓名-世界中医药科技大会”;

2. 论文要求主题鲜明,学术观点明确,学术规范严谨,逻辑推理清晰,文字表达流畅,无学术不端及知识产权争议,有较高的理论价值或实践意义;

3. 论文全文一般在 5000 字以上;

4. 未公开发表过的研究;

5. 论文审核:“大会学术委员会”有权删改和取舍论文,大会收录的论文将编辑成大会论文集光盘和论文摘要汇编;

6. 经评审优秀论文可在会上颁奖,获奖稿件将择优在《世界中医药杂志》英文刊上发表,免费发表并付稿酬。

六、会议费用

会议收费	2018 年 10 月 31 日前	2018 年 10 月 31 日后及现场
注册费(人民币)	1400	1600
在校学生(凭学生证)	900	1000

* 报到时,在校研究生需出具学生证件。* 会议注册以交费时间为准,报名优惠截止日期为 10 月 31 日。

注册费包含:

1. 会务费:会议手册、代表证、大会论文集等会议材料,代表证;
2. 12.7 日晚餐、12.8 日午餐、晚餐、12.9 日午餐;
3. 理事会费用另见理事会通知。

注册费不包含:往返交通,住宿及住宿期间房间内消费,自选考察等。

七、报名注册、交费

大会网上报名入口:请登录会议网站 <http://tcmscitech.medmeeting.org/cn>

在线填写注册并进行网上交费。

八、大会联系人信息

科技管理部:顾晓静、陶有青、周亚男

电话:010-58650015/0017,传真:010-58650043

电子邮箱:tcctraining@163.com

报名请扫描以下二维码:

