

灵芝孢子粉增强免疫功能的研究

王瑛^{1,2}, 金捷³, 金祖汉³, 李建淼^{1,2}, 毛培江³, 杨毅³, 黄晶晶³, 李明焱^{1,2*} (1.金华寿仙谷药业有限公司, 浙江 武义 321200; 2.浙江省珍稀植物药工程技术研究中心, 浙江 武义 321200; 3.浙江省中药研究所有限公司, 杭州 310023)

摘要: 目的 研究灵芝孢子粉(破壁)的增强免疫作用。方法 通过 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验、绵羊红细胞诱导的小鼠迟发型变态反应实验(足跖容积法)、抗体生成细胞检测实验(Jerne 改良玻片法)、血清溶血素测定(血凝法)、小鼠碳廓清实验、小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验(半体内法)、NK 细胞活性实验(乳酸脱氢酶测定法)评价灵芝孢子粉增强免疫功效。结果 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验、迟发型变态反应实验、抗体生成细胞检测实验、腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验 4 项实验结果均为阳性。结论 灵芝孢子粉(破壁)样品具有增强免疫作用。

关键词: 灵芝孢子粉; 增强免疫功能

中图分类号: R965.4

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)05-0544-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.05.006

Study on Immune-enhancing Effects of *Ganoderma Lucidum* Spore Powder

WANG Ying^{1,2}, JIN Jie³, JIN Zuhan³, LI Jianmiao^{1,2}, MAO Peijiang³, YANG Yi³, HUANG Jingjing³, LI Mingyan^{1,2*} (1.Jinhua Shouxianqu Pharmaceutical Co., Ltd., Wuyi 321200, China; 2.Zhejiang Engineering Research Center of Rare Plant Medicine, Wuyi 321200, China; 3.Zhengjiang Rearch Institute of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the immune-enhancing effects of shell-broken *Ganoderma lucidum* spore powder. **METHODS** The immune-enhancing effects were evaluated by ConA-induced mice lymphocyte transformation test, sheep red blood cell-induced delayed-type hypersensitivity (DTH) test (foot volume method), antibodies formation in spleens (modified Jerne's method), serum hemolysin (blood agglutination method), carbon clearance test, phagocytic function of mice macrophages against cock erythrocytes (in-half body method), NK cell activity test (lactate dehydrogenase method). **RESULTS** The ConA-induced mice lymphocyte transformation test, DTH test, antibodies formation in spleens test and phagocytic function of mice macrophages against cock erythrocytes test showed positive results. **CONCLUSION** The *Ganoderma lucidum* spore powder shows good immune-enhancing effects.

KEY WORDS: ganoderma spore powder; immune-enhancing effects

灵芝(*Ganoderma lucidum*)是我国传统中药,具有补气安神,止咳平喘之功效,已有上千年的药用历史。灵芝孢子是灵芝在生长成熟期,从灵芝菌褶中弹射出来的卵形生殖细胞,其直径为 6~10 μm 。灵芝孢子主要有效成分包括多糖、三萜、生物碱和甾醇等,具有抗肿瘤、抗氧化、调节血糖血脂等作用^[1-2]。灵芝孢子具有由几丁质和葡萄糖构成的双层细胞壁,为提高孢子粉中有效成分的吸收和利用,绝大多数产品都采用了破壁粉碎技术。

目前市场上灵芝孢子粉产品众多,质量良莠不齐,为考察其增强免疫功效,本实验对寿仙谷牌灵芝孢子粉(破壁)进行了增强免疫功能的动物试验。

1 材料

1.1 仪器与试剂

灵芝孢子粉(破壁,武义寿仙谷中药饮片有限公司,批号:20141213-3);红参水提液(红参购自安徽新兴中药饮片有限公司,批号:20141125,水煎提取,浓缩至 0.05 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$);脱纤维羊血(杭州新锐生物工程有限公司);印度墨汁(WALDECK 公司)。

M200 Pro 酶标仪(意大利 Tencan);ZH-ZZY 足趾容积测量仪(安徽正华)。

1.2 动物

ICR 小鼠,清洁级,♀♂兼用(每项试验均使用单性别小鼠),由浙江省实验动物中心提供。实验动物生产许可证号:SCXK(浙)2014-0001。

基金项目:浙江省珍稀植物药工程技术研究中心(2012E10029)

作者简介:王瑛,女,工程师 Tel: (0579)87988503 E-mail: 387709426@qq.com *通信作者:李明焱,男,研究员 Tel: 18368665559 E-mail: zhenhao6@126.com

2 方法与结果

按卫生部《保健食品检验与评价技术规范》实验方法进行^[3]。每项实验按体质量将动物随机分为对照组(给予生理盐水)、阳性对照组(给予红参提取液 $1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和孢子粉高、中、低剂量组($1.5, 0.75, 0.375 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。给受试物灌胃体积为 $20 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，每天 1 次，连续 30 d。

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间对比采用 LSD 检验。原始数据不符合方差齐性要求时，需对数据转换后再进行比较检验。经数据转换后仍不能符合方差齐性要求的，各试验组与对照组间比较采用 2 个独立样本间的秩和检验(NPar 检验)。

2.1 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验(MTT 法)

小鼠给药 30 d 后处死，每鼠取脾脏制成脾细胞悬液，分 2 份，一份加入 ConA，另一份作为对照组，培养后进行实验。经 LSD 检验，结果显示，与对照组比较，灵芝孢子粉 $1.5, 0.75 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组能显著提高吸光度差值，结果见图 1。

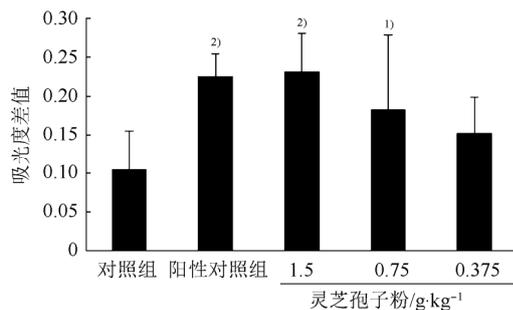


图 1 灵芝孢子粉对 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)与对照组相比，¹⁾ $P<0.05$ ，²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 1 The effect of spore powder on ConA-induced mice lymphocyte transformation($n=10, \bar{x} \pm s$) Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

2.2 抗体生成细胞检测实验(Jerne 改良玻片法)

小鼠给药 26 d 时腹腔注射 2% 绵羊红细胞 (sheep red blood cell, SRBC) 0.2 mL 进行免疫。4 d 后处死小鼠，取脾进行实验，计数溶血空斑数，结果见图 2。经 NPar 检验，结果显示，与对照组比较，灵芝孢子粉 $1.5, 0.75 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组能显著提高溶血空斑数。

2.3 迟发型变态反应(delayed-type hypersensitivity, DTH)实验(足跖容积法)

小鼠于给药 25 d 时，每鼠腹腔注射 2% SRBC 0.2 mL 进行免疫。4 d 后，用 ZH-ZZY 足趾容积测

量仪测量左后足跖容积，同一部位测量 3 次，取平均值，结果见图 3。然后在测量部位皮下注射 20% SRBC 进行攻击，每只鼠 $20 \mu\text{L}$ ，注射后于 24 h 同法测量左后足跖容积，以攻击前后足跖容积的差值来表示 DTH 的程度。经 LSD 检验，结果显示，与对照组比较，灵芝孢子粉 $1.5, 0.75 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组能显著提高足跖容积差值，结果见表 1。

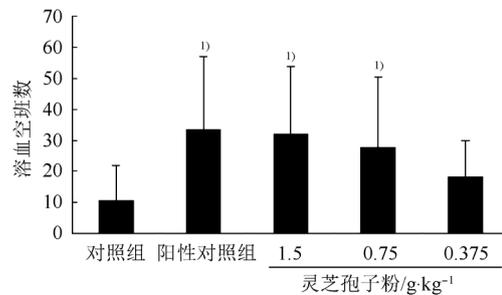


图 2 灵芝孢子粉对小鼠溶血空斑数的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)与对照组相比，¹⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 2 The effect of spore powder on hemolytic plaque ($n=10, \bar{x} \pm s$) Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$.

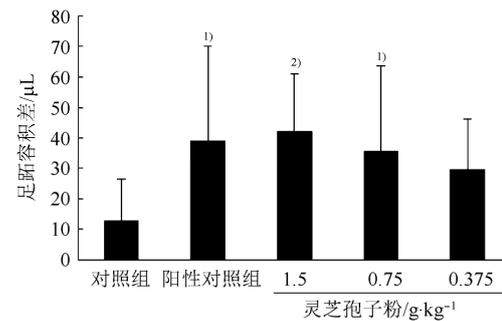


图 3 灵芝孢子粉对小鼠足跖容积的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)与对照组相比，¹⁾ $P<0.05$ ，²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 The effect of spore powder on foot volume($n=10, \bar{x} \pm s$) Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

2.4 血清溶血素测定(血凝法)

小鼠于给药 25 d，每鼠腹腔注射 2% SRBC 0.2 mL 进行免疫，5 d 后取血，分离血清，以生理盐水倍比稀释，于微量血凝板中与 SRBC 进行血凝实验，观察血球凝集程度。结果显示，与对照组比较，经 LSD 检验，灵芝孢子粉对小鼠血清溶血素均无显著影响。结果见表 1。

2.5 小鼠碳廓清实验

末次给药后 30 min，每鼠尾静脉注入稀释的印度墨汁($10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)，待墨汁注入立即计时。注入墨汁后 2, 10 min 分别从内眦静脉丛取血 $20 \mu\text{L}$ ，并立即将其加到 2 mL 0.1% Na_2CO_3 溶液中。用酶

标仪在 600 nm 处测光密度值(OD), 以 Na₂CO₃ 溶液作为空白对照。经 LSD 检验, 结果显示, 与对照组比较, 灵芝孢子粉对小鼠碳廓清能力均无显著影响, 结果见表 1。

2.6 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验(半体内法)

末次给药后 30 min, 每鼠腹腔注射 20%鸡红细胞悬液 1 mL, 30 min 后处死小鼠, 取腹腔液制

作玻片, 计数巨噬细胞, 计算吞噬百分率和吞噬指数。经 LSD 检验, 结果显示, 与对照组比较, 灵芝孢子粉(破壁)1.5 g·kg⁻¹ 能提高小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的能力($P<0.05$), 结果见表 1。

2.7 NK 细胞活性测定(乳酸脱氢酶测定法)

末次给药后无菌取脾进行实验, 经 LSD 检验, 结果显示, 与对照组比较, 灵芝孢子粉(破壁)各剂量组均无显著差异, 结果见表 1。

表 1 灵芝孢子粉对小鼠血清溶血素、碳廓清能力、腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力以及 NK 细胞活性的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The effect of spore powder on serum hemolysin, carbon clearance, phagocytic function of mice macrophages against cock erythrocytes and NK cell activity($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	抗体积数 (血清溶血素)	吞噬指数 (碳廓清能力)	腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力		NK 细胞活性/%
				吞噬百分率/%	吞噬指数	
对照组	-	65.5±15.2	4.88±0.72	10.4±1.4	0.150±0.085	69.1±11.4
阳性对照组	1.5	66.7±17.6	5.11±0.32	14.6±4.5 ¹⁾	0.208±0.090	83.5±9.4 ¹⁾
灵芝孢子粉(破壁)	1.5	73.5±10.1	5.12±0.73	16.3±6.1 ²⁾	0.258±0.121 ¹⁾	79.2±9.6
	0.75	64.5±13.2	4.60±0.75	14.8±2.5 ¹⁾	0.216±0.053	64.9±13.1
	0.375	57.0±8.4	4.79±0.38	11.0±2.4	0.139±0.052	76.9±10.5

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.001$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.001$.

3 讨论

根据灵芝孢子粉的用法用量进行了小鼠的增强免疫功能试验, 从免疫试验结果可以看出, 灵芝孢子粉以 1.5, 0.75, 0.375 g·kg⁻¹ 3 个剂量连续灌胃给予 30 d, 在细胞免疫功能方面, 1.5, 0.75 g·kg⁻¹ 剂量可以提高 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化能力, 并增强 SRBC 诱导的小鼠足肿胀; 在体液免疫功能方面, 1.5, 0.75, 0.375 g·kg⁻¹ 均可增加溶血空斑数, 提示可以增加抗体生成细胞数, 对血清溶血素则没有明显影响; 在单核-巨噬细胞功能方面, 1.5, 0.75 g·kg⁻¹ 可以增加小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的能力, 对碳廓清能力没有明显影响; 在 NK 细胞活性方面没有明显影响。根据卫生部《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版)“增强免疫力功能检验方法”中的结果判定标准, 寿仙谷牌灵芝孢子粉(破壁)具有明显的增强免疫功能。实验结果提示, 灵芝孢子粉可能主要通过作用于免疫细胞增强其活性, 从而直接或间接调节机体免疫功能。根据文献[4-6]报道, 可能的作用机制为灵芝孢子粉提高了巨噬细胞产生肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素(IL)和促分裂原活化蛋白激酶(MAPKs)的水平调节免疫, 促进干扰素生成, 从而调节免疫功能。

寿仙谷牌灵芝孢子粉(破壁)人用量为 2~6 g·d⁻¹, 以人体质量 60 kg 计, 每天服用 3 g, 则为 0.05 g·kg⁻¹。本实验提示灵芝孢子粉(破壁)以人用量的 30 倍对小鼠灌胃给药, 在细胞免疫、体液免疫、单核-巨噬细胞功能 3 个方面都具有增强免疫能力的作用, 故此验证了炮制规范中的用法用量切实可行。

REFERENCES

- [1] SANODIYA B S, THAKUR G S, BAGHEL R K, et al. Ganoderma lucidum: a potent pharmacological macrofungus [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2009, 10(8): 717-742.
- [2] CHEN Y L, PANG Z R, ZHANG W, et al. Antioxidant activities of extracts of by-products of Ganoderma lucidum spores [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2014, 26(8): 1303-1307.
- [3] Technical Standards for Testing & Assessment of Health Food(保健食品检验与评价技术规范)[S]. 2003: 22-34.
- [4] HABIJANIC J, BEROVIC M, BOH B, et al. Submerged cultivation of Ganoderma lucidum and the effects of its polysaccharides on the production of human cytokines TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 and IL-17 [J]. N Biotechnol, 2015, 32(1): 85-95.
- [5] YUE G G, CHAN B C, HAN X Q, et al. Immunomodulatory activities of Ganoderma sinense polysaccharides in human immune cells [J]. Nutr Cancer, 2013, 65(5): 765-774.
- [6] ZHANG S, NIE S, HUANG D, et al. Polysaccharide from Ganoderma atrum evokes antitumor activity via Toll-like receptor 4-mediated NF- κ B and mitogen-activated protein kinase signaling pathways [J]. J Agric Food Chem, 2013, 61(15): 3676-3682.

收稿日期: 2015-09-18