虫草多糖调节小鼠 T 淋巴细胞及其亚群数量的机制研究

诸葛定娟，陈爱瑛，程敏，缪云萍，田雪君，郑高利，叶小弟*(浙江省医学科学院，杭州 310013)

摘要：目的 研究冬虫夏草菌丝体多糖(虫草多糖)对正常小鼠 T 淋巴细胞及其亚群数量的影响及可能的机制。**方法** ICR 小鼠，随机分成空白对照组、阳性组(香菇多糖 1 mg·kg^{-1})和虫草多糖高、中、低剂量(200，100，50 mg·kg^{-1})组，连续腹腔注射 10 d 后，流式细胞仪检测外周血 T 淋巴细胞(CD3$^+$细胞)及其亚群细胞 CD4$^+$CD8$^-$和 CD4$^-$CD8$^+$数量、CD3$^+$细胞凋亡率；MTT 法测定小鼠脾淋巴细胞转化功能；实时荧光定量 PCR 检测脾脏组织 Bcl-2 mRNA、Bax mRNA 的转录水平，并测定胸腺和脾脏指数。**结果** 与空白对照组比较，虫草多糖能提高小鼠脾脏质量、促进未经 ConA 诱导的脾淋巴细胞增殖转化能力，并呈现剂量依赖性；虫草多糖高剂量组能明显增加外周血 CD3$^+$细胞和 CD4$^+$CD8$^-$细胞亚群的数量，降低 CD4$^-$CD8$^+$细胞亚群数量，显著提高 CD4$^+$CD8$^-$/CD4$^-$CD8$^+$的比值；高剂量虫草多糖能明显降低小鼠外周血 CD3$^+$细胞凋亡率，显著升高脾组织 Bcl-2 mRNA 转录水平和 Bcl-2/Bax 比值，而对 Bax mRNA 转录水平没有明显影响。**结论** 虫草多糖可刺激小鼠主要免疫器官(胸腺和脾脏)增生，提高 T 淋巴细胞及 CD4$^-$CD8$^+$亚群的数量，其作用机制可能与上调抑制凋亡基因 Bcl-2 mRNA 的转录，提高 Bcl-2/Bax 比值，从而抑制淋巴细胞凋亡有关。

关键词：冬虫夏草菌丝体；虫草多糖；T 淋巴细胞亚群；凋亡；Bcl-2；Bax

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**1007-7693(2017)02-0171-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.02.005

Mechanism in the Regulation of the Number of T Lymphocytes and Its Subsets of Normal Mice by Polysaccharides of *Cordyceps Sinensis* Mycelium

ZHUGE Dingjuan, CHEN Aiying, CHENG Min, MIAO Yunping, TIAN Xuejun, ZHENG Gaoli, YE Xiaodi*
(*Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of polysaccharides of *Cordyceps sinensis* mycelium (cordyceps polysaccharide) on the number of T lymphocytes and its subsets of normal mice and the possible mechanism. **METHODS** The ICR mice were randomly divided into the blank control group, positive group (lentinan 1 mg·kg^{-1}), cordyceps polysaccharide groups in high, medium and low dose (200, 100, 50 mg·kg^{-1}). After continuous celiac injection for 10 d, the number of T lymphocytes (CD3$^+$ cells) and their subgroups (CD4$^+$CD8$^-$ and CD4$^-$CD8$^+$ cells), the apoptosis rate of CD3$^+$ cells in peripheral blood were detected by flow cytometry; the transformation rates of spleen lymphocyte and the expression levels of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax mRNA in spleen tissue were detected by real-time PCR, and the thymus index and the spleen index were measured. **RESULTS** Compared with the blank control group, cordyceps polysaccharide groups significantly increased spleen weight and the transformation of spleen lymphocytes in a dose-dependent manner. High dose of cordyceps polysaccharide group could obviously increase the number of CD3$^+$cells and CD4$^+$CD8$^-$ cell subsets, reduce the number of CD4$^-$CD8$^+$ cell subsets, and significantly increase the ratio of CD4$^+$CD8$^-$/CD4$^-$CD8$^+$ in peripheral blood. High dose of Cordyceps polysaccharide group significantly reduced apoptosis rate of CD3$^+$ cells in peripheral blood, and the transcription levels of apoptosis-related genes Bcl-2 in spleen tissue, while no significant change in the transcription level of Bax, and the Bcl-2/Bax ratio was significantly increased accordingly. **CONCLUSION** Cordyceps polysaccharide stimulates proliferation of mice main immune organs (spleen and thymus) and increases the number of T lymphocytes and CD4$^+$CD8$^-$ subgroup of mice. The protective mechanism suggests that cordyceps polysaccharide upregulates the transcription levels of inhibitory apoptosis gene Bcl-2 and the ratio of Bcl-2/Bax, and then inhibits the apoptosis rate of lymphocytes.

KEY WORDS: *Cordyceps sinensis* mycelium; cordyceps polysaccharide; T lymphocyte subgroup; apoptosis; Bcl-2; Bax

虫草发酵菌丝体是冬虫夏草[*Cordyceps sinensis*(BerK.) Sacc.]无性世代——中华束丝孢(*Synnematum sinense* Yin et Shen sp.now)经液体发酵而成，和天然虫草在化学成分和药理功能上非常相似[1-3]，已成为冬虫夏草的替代品。虫草及其菌丝体活性成分包括核苷类物质、麦角甾醇、多

基金项目：浙江省自然科学基金(Y2090286)

作者简介：诸葛定娟，女，硕士生 Tel: (0571)88215620 E-mail: 770692046@qq.com *通信作者：叶小弟，女，硕士，副研究员 Tel: (0571)88215620 E-mail: ye_xiaodi@hotmail.com

糖、氨基酸及微量元素等，其中多糖是其免疫调节和抗肿瘤作用的关键成分[4-6]。实验研究表明，虫草菌丝体多糖能增强单核巨噬细胞功能，提高脾脏指数[7-11]，增加胸腺质量，缓解迟发型变态反应[12]。对环磷酰胺造成的免疫功能低下小鼠，虫草菌丝体多糖可使其免疫力恢复到接近正常水平，具有良好的免疫调节作用[13]。然而，虫草菌丝体多糖免疫调节作用机制尚不明了，本实验观察虫草菌丝体多糖(虫草多糖)对小鼠外周血 T 淋巴细胞($CD3^+$细胞)及其亚群数量的影响，并从细胞凋亡途径研究其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

冬虫夏草菌丝体粉(杭州中美华东制药有限公司)；注射用香菇多糖(南京绿叶思科药业有限公司，规格：每瓶 1 mg，批号：120101108)。

清洁级 ICR 小鼠，♂，体质量：18~22 g，购自浙江省实验动物中心，实验动物生产许可证号：SCXK(浙)2008-0033，实验动物使用许可证号：SYXK(浙)2011-0166。

RPMI1640 完全培养液(南京凯基生物科技发展有限公司，批号：20120509)；胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司，批号：120115)；单克隆抗体 Anti-Mouse CD3-PerCP(批号：2111680)、CD4-FITC(批号：2237793)、CD8-PE(批号：2195781)、APC Hamster Anti-mouse CD3e(批号：29414)、FITC Annexin V Apoptpsis Detection Kit I 细胞凋亡试剂盒(批号：2195781)和 Lysing Buffer(批号：07877)均购自 BD Pharmingen 公司；RNAprep Pure 动物组织总 RNA 提取试剂盒(包含 RNase-Free DNase I)(批号：L0615)，FastQunat cDNA 第一链合成试剂盒(批号：L0823)，Super Real PreMix(SYBER Green)(批号：L0727)，购自天根生化科技北京有限公司；GAPDH、Bcl-2 和 Bax 基因引物由 Invitrogen 公司合成。

NUAIR-NU-5510E 气套式 CO_2 培养箱(美国 NUAIR 公司)；Biotek Synergy 2 多功能酶标仪(美国佰腾仪器有限公司)；FACS Calibar 流式细胞仪(美国 BD 公司)；7500 FAST 实时定量 PCR 仪(Applied Biosystem 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 虫草多糖的制备与总糖含量测定　冬虫夏草菌丝体粉经索氏提取器石油醚(80 ℃回流 6 h)脱脂脱色素、95%乙醇去除小分子物质，25 ℃干燥后，残渣于沸水提取 3 次，每次 4 h，合并上清液，减压浓缩后，在不断搅拌下，缓缓加入 3 倍体积的 95%乙醇，4 ℃静置 24 h，4 ℃、7 200 $r\cdot min^{-1}$ 离心 20 min，沉淀物以丙酮洗涤 5 次，得多糖粗提物；经中性酶+Sevag 方法除蛋白 8 次，再经截留分子量 3 500 Da 的透析袋透析，经冷冻干燥得到虫草多糖；采用苯酚-硫酸法测定总糖含量，虫草多糖水溶液于波长 200~400 nm 内进行紫外光谱扫描，以蒸馏水为对照。

1.2.2 动物分组及给药方法　ICR 小鼠 40 只，♂，按体质量随机分成 5 组，分别为空白对照组、阳性组(香菇多糖组)、虫草多糖高、中和低剂量组。每天分别腹腔注射虫草多糖 200，100，50 $mg\cdot kg^{-1}$ 和香菇多糖 1 $mg\cdot kg^{-1}$，注射体积均为 20 $mL\cdot kg^{-1}$；空白对照组腹腔注射等体积的生理盐水，连续给药 10 d，于第 11 天眼眶采血，肝素抗凝，流式细胞仪检测外周血总 T 淋巴细胞($CD3^+$)数量和 $CD4^+CD8^-$、$CD4^-CD8^+$亚群淋巴细胞数量及其比例；Annexin V-FITC 测定外周血的总 T 淋巴细胞($CD3^+$)凋亡率。最后小鼠颈椎脱臼致死，无菌条件下取脾脏，称重后用于 ConA 诱导小鼠脾淋巴细胞转化实验和脾组织凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax mRNA 转录水平测定，然后取胸腺，计算胸腺指数和脾脏指数。

1.2.3 外周血 T 淋巴细胞($CD3^+$细胞)及其亚群 $CD4^+CD8^-$、$CD4^-CD8^+$细胞数量的测定　取 100 μL 全血置于流式管中，加 CD3-PerCP-Cy、CD4-FITC、CD8-PE 抗体复合物，置于 4 ℃冰箱避光孵育 30 min，各管加 2 mL 的 10 倍稀释的红细胞裂解液，置于 4 ℃冰箱避光孵育 10 min，4 ℃，1 500 $r\cdot min^{-1}$ 离心 5 min，弃上清液，冷 PBS 洗涤 2 次，4 ℃，1 500 $r\cdot min^{-1}$ 离心 5 min，弃上清液，用 400 μL PBS 重悬细胞，待测。

1.2.4 外周血 T 淋巴细胞($CD3^+$细胞)凋亡测定　取 100 μL 全血置于流式管中，加 CD3-APC，置于 4 ℃避光孵育 20 min，各管加 2 mL 的 10 倍稀释的红细胞裂解液，置于 4 ℃避光孵育 10 min，4 ℃，1 500 $r\cdot min^{-1}$ 离心 5 min，弃上清液，冷 PBS 洗涤 2 次，4 ℃，1 500 $r\cdot min^{-1}$ 离心 5 min，弃上清液，用 100 μL binding 缓冲液混悬，再加 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL 碘化丙啶(PI)，混匀，室温孵育 15 min；每份样品加入 1×binding 缓冲液

300 μL 后流式细胞仪检测。

1.2.5 ConA 诱导小鼠脾淋巴细胞转化试验(MTT 法) 将脾脏置于盛有适量 RPMI-1640 的培养皿中，用一次性 5 mL 注射器的针芯研磨，制成单细胞悬液，200 目筛网过滤，洗涤，计数，最后用 RPMI-1640 完全培养液调整细胞浓度为 5×10^{-6} mL^{-1}。将每个标本的细胞悬液分 8 孔加入 96 孔培养板中，每孔 100 μL：4 孔加 100 μL ConA 液(终浓度：3 $\mu g\cdot mL^{-1}$)，另 4 孔作为对照，再加 100 μL RPMI-1640 完全培养液，总体积 200 μL，置于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养 72 h。培养结束前 4 h，每孔加入 50 μL MTT(1 $mg\cdot mL^{-1}$)，继续培养 4 h。培养结束后，去除培养液，每孔加入 150 μL 酸性异丙醇，吹打混匀，使紫色结晶完全溶解。490 nm 波长测定光密度值(OD 值)。最后用加 ConA 孔的光密度值减去不加 ConA 孔的光密度值代表淋巴细胞的增殖能力。

1.2.6 Real-time PCR 检测 小鼠脾脏按试剂盒提供的步骤提取 RNA，按试剂盒说明逆转录得 cDNA。Bcl-2、Bax 基因及内参 Gapdh 基因 PCR 引物序列见表 1，引物由 Invitrogen 公司合成。Real-time PCR 循环参数设定：95 ℃ 15 min；95 ℃ 10 s，62 ℃ 45 s，经 40 个循环。应用荧光定量 PCR 技术检测 Bcl-2、Bax mRNA 表达。PCR 扩增完毕后，进行溶解曲线分析检测产物的特异性。以 Gapdh 转录水平位内参，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对实时荧光定量 PCR 试验结果进行分析，基因转录水平相对量=$2^{-\Delta\Delta CT}$。空白对照组 Bcl-2、Bax 及 Gapdh mRNA 的转录水平分别为 1，虫草多糖各剂量组 Bcl-2、Bax 及 Gapdh mRNA 相对转录水平与相应的对照组比较进行计算。

1.3 统计学分析

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 Microsoft Excel 软件进行处理，组间比较采用 *t* 检验。

表 1 Bcl-2、Bax 基因及内参基因 PCR 引物的序列信息

Tab. 1 Primer sequences of Bcl-2, Bax and Gapdh for RT-PCR

基因	引物	序列(5'-3')	引物大小/bp
Gapdh	正义	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	150
	反义	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG	
Bcl-2	正义	TGAAGCGGTCCGGTGGATA	104
	反义	CAGCATTTGCAGAAGTCCTGTGA	
Bax	正义	CAGGATGCGTCCACCAAGAA	102
	反义	CGTGTCCACGTCAGCAATCA	

2 结果

2.1 虫草多糖的制备及总糖含量测定

本法获得的虫草多糖水分为 6.75%，苯酚-硫酸法测得总糖含量为 71.21%(以干品计)，200~400 nm 紫外扫描图谱在 200 nm 显示为末端吸收，260，280 nm 处无紫外吸收，表明多糖中无蛋白、多肽及核酸。

2.2 虫草多糖对小鼠的免疫器官质量及指数的影响

与空白对照组相比，虫草多糖各剂量组均能明显增加小鼠脾脏质量及其脏器指数，剂量关系明显；高剂量组小鼠胸腺质量及脏器指数也有增大趋势。结果见表 2。

2.3 虫草多糖对小鼠外周血 T 淋巴细胞及其亚群的影响

与空白对照组比较，虫草多糖高剂量组能明显增加外周血 T 淋巴细胞($CD3^+$细胞)和 $CD4^+CD8^-$ 细胞亚群的数量，降低 $CD4^-CD8^+$细胞亚群数量，增加 $CD4^+CD8^-/CD4^-CD8^+$的比值，中剂量组有相同的变化趋势，呈现一定的剂量关系。结果见表 3。

2.4 虫草多糖对小鼠外周血 T 淋巴细胞($CD3^+$细胞)凋亡的影响

与空白对照组比较，虫草多糖各组的小鼠外周血中 $CD3^+$淋巴细胞凋亡率均有下降趋势，尤以高剂量组最为明显($P<0.05$)。结果见图 1~2。

表 2 虫草多糖对小鼠免疫器官质量的影响(n=7，$\bar{x}\pm s$)

Tab. 2 Effects of cordyceps polysaccharide on the immune organ weight of normal mice(n=7, $\bar{x}\pm s$)

组 别	剂量/$mg\cdot kg^{-1}$	体质量/g	脾脏质量/mg	脾脏指数/$mg\cdot kg^{-1}$	胸腺质量/mg	胸腺指数/$mg\cdot kg^{-1}$
空白对照组	–	33.2±1.9	141±18	4.23±0.42	65±9	1.95±0.25
香菇多糖组	1	34.3±2.3	251±36[1)]	7.38±1.36[1)]	68±9	1.97±0.21
虫草多糖组	50	34.1±2.8	235±51[1)]	6.82±0.98[1)]	64±14	1.87±0.39
	100	35.3±1.5	277±45[1)]	7.80±110[1)]	72±10	2.05±0.32
	200	34.0±1.8	289±41[1)]	8.52±1.13[1)]	85±18	2.51±0.46

注：与空白对照组比较，[1)]$P<0.01$。

Note: Compared with blank control group，[1)]$P<0.01$.

表 3 虫草多糖对小鼠外周血 T 淋巴细胞及其亚群数量的影响(n=7，$\bar{x}\pm s$)

Tab. 3 Effects of cordyceps polysaccharide on the number of T lymphocytes and its subsets in peripheral blood of normal mice(n=7，$\bar{x}\pm s$)

组 别	剂量/mg·kg^{-1}	CD3$^+$/%	CD4$^+$CD8$^-$/%	CD4$^-$CD8$^+$/%	CD4$^+$CD8$^-$/CD4$^-$CD8$^+$
空白对照组	–	51.78±8.41	35.99±6.65	15.79±5.15	2.45±0.72
香菇多糖组	1	63.80±8.01$^{1)}$	48.73±6.46$^{2)}$	15.07±3.88	3.38±0.78$^{1)}$
虫草多糖组	50	54.52±9.20	39.62±7.33	14.90±2.86	2.70±0.47
	100	58.43±7.90	44.44±7.32$^{1)}$	13.98±1.94	3.22±0.64
	200	65.79±9.31$^{1)}$	52.71±8.13$^{2)}$	13.08±1.58	4.03±0.43$^{2)}$

注：与空白对照组比较，$^{1)}P$<0.05，$^{2)}P$<0.01。

Note: compared with blank control group，$^{1)}P$<0.05, $^{2)}P$<0.01.

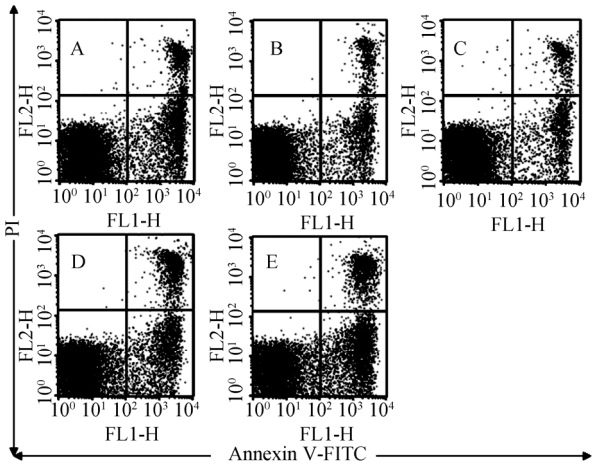

图 1 虫草多糖对小鼠外周血 CD3$^+$细胞凋亡的影响

A–空白对照组；B–香菇多糖组；C–虫草多糖 200 mg·kg^{-1} 组；D–虫草多糖 100 mg·kg^{-1} 组；E–虫草多糖 50 mg·kg^{-1} 组。

Fig. 1 Effects of cordyceps polysaccharide on apoptosis rate of CD3$^+$ lymphocytes in peripheral blood of normal mice

A–blank control group; B–lentinan group; C–cordyceps polysaccharide 200 mg·kg^{-1} group; D–cordyceps polysaccharide 100 mg·kg^{-1} group; E–cordyceps polysaccharide 50 mg·kg^{-1} group.

2.5 虫草多糖对小鼠脾淋巴细胞转化功能的影响

与空白对照组比较，虫草多糖各剂量组对未经 ConA 诱导的 T 淋巴细胞增殖转化能力具有明显促进作用，随剂量的增加而逐渐增高(P<0.01 或 P<0.05)，表明虫草多糖能增强小鼠的细胞免疫功能；而对经 ConA 诱导的 T 淋巴细胞增殖转化能力却没有促进作用。结果见表 4。

2.6 虫草多糖对小鼠脾脏组织凋亡相关基因表达的影响

与空白对照组比较，虫草多糖能不同程度的上调 Bcl-2 mRNA 相对转录水平，高剂量组具有统计学差异(P<0.05)，而对 Bax mRNA 转录水平没有明显变化，Bcl-2/Bax 比值明显升高(P<0.05)。结果见图 3~4。

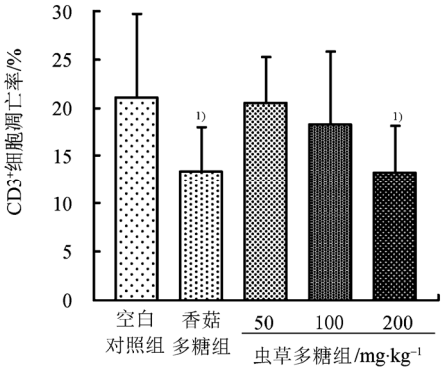

图 2 虫草多糖对小鼠外周血 CD3$^+$细胞凋亡的影响(n=7，$\bar{x}\pm s$)

与空白对照组比较，$^{1)}P$<0.05。

Fig. 2 Effects of cordyceps polysaccharide on apoptosis rate of CD3$^+$ lymphocytes in peripheral blood of normal mice (n=7，$\bar{x}\pm s$)

Compared with blank control group, $^{1)}P$<0.05.

表 4 虫草多糖对小鼠脾淋巴细胞增殖转化功能的影响($\bar{x}\pm s$，n=7)

Tab. 4 Effects of cordyceps polysaccharide on the spleen lymphocyte transformation rate of normal mice ($\bar{x}\pm s$, n=7)

组 别	剂量/mg·kg^{-1}	空白处理 OD 值	ConA 处理 OD 值	增值指数
空白对照组	–	0.341±0.102	0.640±0.167	0.299±0.91
香菇多糖组	1	0.585±0.105$^{2)}$	0.958±0.123$^{2)}$	0.373±0.105
虫草多糖组	50	0.332±0.095	0.476±0.075$^{1)}$	0.145±0.048$^{2)}$
	100	0.480±0.101$^{1)}$	0.684±0.156	0.204±0.099
	200	0.528±0.112$^{2)}$	0.736±0.079	0.208±0.068

注：与空白对照组比较，$^{1)}P$<0.05，$^{2)}P$<0.01。

Note: Compared with blank control group, $^{1)}P$<0.05, $^{2)}P$<0.01.

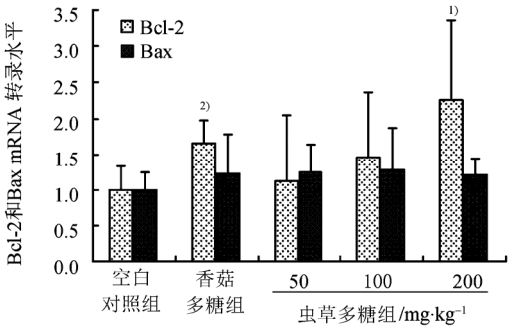

图 3 虫草多糖对小鼠脾脏组织 Bcl-2 和 Bax mRNA 相对转录水平的影响(n=7，$\bar{x}\pm s$)

与空白对照组比较，$^{1)}P$<0.05，$^{2)}P$<0.01。

Fig. 3 Effects of cordyceps polysaccharide on expression levels of Bcl-2 and Bax genes in spleens of normal mice (n=7, $\bar{x}\pm s$)

Compared with blank control group, $^{1)}P$<0.05, $^{2)}P$<0.01.

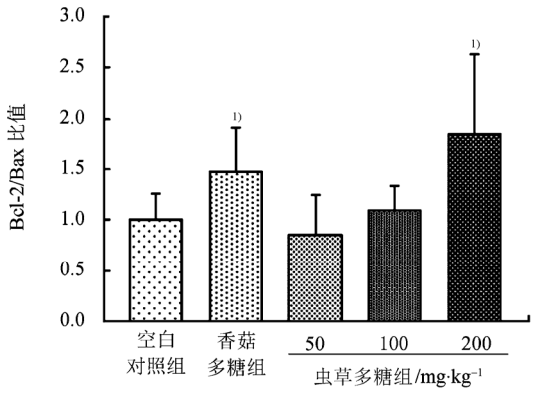

图 4 虫草多糖对小鼠脾脏组织 Bcl-2/Bax 比值变化的影响(n=7，$\bar{x} \pm s$)

与空白对照组比较，$^{1)}P$<0.05。

Fig. 4 Effects of cordyceps polysaccharide on the spleen Bcl-2/Bax ratio changes of normal mice(n=7, $\bar{x} \pm s$)

Compared with blank control group, $^{1)}P$<0.05.

3 讨论

胸腺和脾脏是机体的主要免疫器官。胸腺除了作为一个中枢免疫器官与 T 细胞成熟相关外，还具有外周淋巴器官的成分，即还能产生抗体。脾脏是后天淋巴细胞定居增生及发生免疫反应的场所，其质量的大小在一定程度上反映机体免疫系统的状态。这些免疫器官的发育状态及机能强弱，直接决定机体全身免疫水平。本试验显示，虫草多糖 50，100 和 200 mg·kg^{-1} 剂量可剂量依赖性刺激小鼠脾脏质量及其指数显著增加，对胸腺质量及其指数也有一定程度的刺激作用，提示虫草多糖可促进小鼠的免疫功能。

T 淋巴细胞在体外培养时，受到有丝分裂原 ConA 刺激后，可出现细胞体积增大，代谢旺盛，蛋白和核酸合成增加的现象，即向淋巴母细胞转化和增殖[14]。T 淋巴细胞调节机体的细胞应答，是适应性免疫系统的主要效应细胞[15]。淋巴细胞转化率的高低可以反映机体的细胞免疫水平，因此可作为测定机体免疫功能的指标之一。本试验结果显示，与空白对照组比较，虫草多糖高、中剂量连续给药 10 d 后，对未经 ConA 刺激的脾 T 淋巴细胞增殖转化能力具有明显的促进作用(P<0.01 或 P<0.05)，提示虫草多糖能提高正常小鼠的细胞免疫功能；但脾淋巴细胞在 ConA 刺激后，虫草多糖高、中剂量虽进一步促进 T 淋巴细胞增殖转化，但与正常组比较，差异不明显。

免疫细胞通过凋亡机制，使大量未成熟的细胞，包括自身反应性淋巴细胞得以清除，从而保证了免疫系统处于正常功能状态。本研究通过 Annexin-V/PI 双染法测定小鼠外周血中 T 淋巴细胞(CD3$^+$细胞)的凋亡率。本试验显示，虫草多糖明显提高外周血 CD3$^+$细胞数量，降低 CD3$^+$细胞凋亡率。

细胞凋亡的信号传导途径极其复杂，其中 Bcl-2 通过稳定线粒体膜，防止线粒体内促凋亡相关蛋白泄漏至胞质及阻断 Ca^{2+}从内质网释放，使依赖 Ca^{2+}的核酸内切酶活性降低等途径阻断细胞凋亡[16-18]。Bax 为 Bcl-2 相关蛋白，可与抗凋亡蛋白 Bcl-2 形成异源二聚体，抑制 Bcl-2 的作用，从而能促进细胞凋亡[19-21]。Bcl-2/Bax 比值决定细胞受诱导刺激后是凋亡还是存活，Bax 过量时，形成 Bax-Bax 同二聚体，诱导细胞凋亡；Bcl-2 过量时，形成 Bcl-2-Bax 异二聚体，抑制细胞凋亡[22-23]。本研究显示，虫草多糖可诱导小鼠脾脏组织 Bcl-2 mRNA 转录水平显著升高(P<0.05)，而 Bax mRNA 转录水平则没有明显变化，而 Bcl-2/Bax 比值明显升高(P<0.05)，提示虫草多糖可能通过上调 Bcl-2 基因表达、抑制细胞凋亡，从而提高外周血 CD3$^+$淋巴细胞数量。

本研究结果显示，冬虫夏草菌丝体多糖可刺激小鼠主要免疫器官增生，提高 T 淋巴细胞及 CD4$^-$CD8$^+$亚群的数量，其作用机制可能与上调抑制凋亡基因 Bcl-2 mRNA 的转录，提高 Bcl-2/Bax 比值，从而抑制淋巴细胞凋亡有关。但本研究中样品的多糖含量仅 71.21%，而且不是单一分子量多糖，虫草多糖中免疫刺激的活性分子及具体的信号通路需要进一步研究。

REFERENCES

[1] TAN Z L, YIN H S, HUANG H, et al. Chemical ingredients of submerged cultivation mycelium of *Cordyceps sinensis* [J]. Food Sci(食品科学), 2008, 29(3): 328-321.

[2] 高俊德, 马紫亮, 张喜财, 等. 冬虫夏草菌丝体分离培养及其与生药冬虫夏草化学成分的对比[J]. 中国中药杂志, 1988, 12(1): 3-5.

[3] XU F Y. Clinical application of Aweto and its fermentation mycelium [J]. Drug Eval (药品评价), 2005, 2(4): 255-265.

[4] HU X, HUANG X, WANG B, et al. Progress in studies on antitumor and immunomodulatory effect of *Cordyceps sinensis* [J]. Drug Eval Res(药物评价研究), 2015, 38(4): 448-452.

[5] JAYAKUMAR T, CHIU C C, WANG S H, et al. Anti-cancer effects of CME-1, a novel polysaccharide, purified from the mycelia of Cordyceps sinensis against B16-F10 melanoma cells [J]. J Cancer Res Ther, 2014, 10(1): 43-49.

[6] MEI Y X, YANG W, ZHU P X, et al. Isolation, characterization, and antitumor activity of a novel heteroglycan

from cultured mycelia of *Cordyceps sinensis* [J]. Planta Med, 2014, 80(13): 1107-1112.

[7] REN J, ZHANG Q L, ZHENG L. Effects of polysaccharides from cultured *Cordyceps sinensis* on immune function of immunosuppressed mice [J]. J Fourth Mil Med Univ (第四军医大学学报), 2007, 28(21): 1967-1969.

[8] GONG X J, JI H, LU S G, et al. Effects of polysaccharides from *Cordyceps sinensis* on murine immunologic fuction [J]. J Chin Pharm Univ(中国药科大学学报), 2000, 31(1): 53-55.

[9] YUAN J G, CHENG X H, HOU Y Q, et al. Study on polysaccharide from *Cordecps* as functional factor [J]. China Food Add(中国食品添加剂), 1999, 10(2): 18-22.

[10] CHEN L, AN L G. Studies on the anti-tumour activity and immunomodulatory function of polysaccharide of carceps sinensis (csp) [J]. J Shandong Norm Univ (Nat Sci)(山东师范大学学报: 自然科学版), 2009, 24(4): 109-112.

[11] CHEN W, ZHANG W, SHEN W, et a1. Effects of the acid polysaccharride fraction isolated from a cultivated Cordyeeps sinensis on m acrophages *in vitro* [J]. Cell Immunol, 2010, 262(1): 69-74.

[12] ZHONG J C, ZHANG Y, DING Z T, et al. Effect of polysaccharide extract from artificial *Cordyceps sinenisis* on immune function of mouse [J]. J Sun Yat-sen Univ (Nat Sci)(中山大学学报 自然科学版), 2011, 50(6): 99-l02.

[13] YAN W J, LI T H, XIE Y Z. Immunoregulatory activity of hot aqueous extracts of *Ophiocordyceps sinensis* myceliun evaluated using a immune-deficient mouse model [J]. Acta Edulis Fungi(食用菌学报), 2013, 20(1): 75-79.

[14] HUANG H, JIANG J M, FU H Y. Effects of *Hirsutella sinensis* strain fermentation on the proliferation of T and B lymphocyte in mouse [J]. J Zhejiang Univ Tradit Chin Med (浙江中医药大学学报), 2010, 34(4): 604-605.

[15] CHEN W, MA X Q, FAN W X, et a1. Major efficacy component of rhodiola stimulate proliferation and transformation on mouse immune cells [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(1): 38-42.

[16] ORRENIUS S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death [J]. Toxicol Lett, 2004, 149(1-3): 19-23.

[17] HALESTRAP A P, DORAN E, GILLESPIE J P, et a1. Mitochondria and cell death [J]. Biochem Soc Trans, 2000, 28(2): 170-177.

[18] MIKHAILOV V, MIKHAILOVA M, PULKRABEK D J, et a1. Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane [J]. J Biol Chem, 2001, 276(21): 18361-18374.

[19] MERTENS H J, HEINEMAN M J, EVERS J L. The expression of apoptosis-related proteins Bcl-2 and Ki67 in endometrium of ovulatorymenstrual cycles [J]. Gynecol Obstet Invest, 2002, 53(4): 224-230.

[20] NESS J M, HAREY C A, STRASSER A, et a1. Selective involvement of BH3-only Bcl-2 family members Bim and Bad in neonatal hypoxia-ischemia [J]. Brain Res, 2006, 1099(1): 150-159.

[21] NIQUET J, WASTERLAIN C G. Bim, Bad and Bax: a deadly combination in epileptic seizures [J]. J Clin Invest, 2004, 113(7): 960-962.

[22] WANG W D, CHEN Z T. Bcl-2/Bax ratio and the "life or death fate" of cells [J]. Chin J Cancer Biother(中国肿瘤生物治疗学杂志), 2007, 14(4): 393-396.

[23] LE B M, ROUYL I, BRENNER C. The modulation of inter-organelle cross-talk to control apoptosis [J]. Med Chem, 2006, 2(1): 1-12.

收稿日期：2016-05-23

http://www.chinjmap.com