

Study on the Immune Activity of Combined *Cordyceps* Wine of *Cordyceps cicadae* and *Paecilomyces hepiali*

Yingying Zhang^{1,2}, Yiqian Zhou², Zhixiang Xu², Shijun Yu^{1,2*}, Guojie Peng³, Jianfeng Hu³, Changsheng Sun^{3*}

¹Anhui Agricultural University, Hefei Anhui

²Chuzhou University, Chuzhou Anhui

³Zhejiang Bioasia Institute of Life Science, Pinghu Zhejiang

Email: *yushijun@outlook.com, *davidsun@bioasia.com.cn

Received: May 29th, 2020; accepted: Jun. 17th, 2020; published: Jun. 24th, 2020

Abstract

In the present study, combined *Cordyceps* wine of the two dose groups of 0.45 g/kg·BW/d (low dose) and 0.9 g/kg·BW/d (high dose) were administered orally to mice for 1 month. Coefficients of immune organs, humoral immune function and mononuclear macrophage activities were determined to study the immune function of combined *Cordyceps* wine. The results indicated that the combined *Cordyceps* wine in the high-dose group could significantly increase the numbers of antibody of mice, which was 62.94% higher than that in the blank control group. The high-dose and low-dose groups could significantly increase phagocytic index of the chicken's erythrocyte, accounting for 44% and 40% higher than that of the control group. The percentages of phagocytosis increased by 21.57% and 19.61%, respectively, compared with the control group. The high-dose group of combined *Cordyceps* wine had an effect on increasing numbers of antibodies and enhancing the phagocytic activity of mononuclear macrophages of mice.

Keywords

Combined *Cordyceps* Wine, *Cordyceps cicadae*, *Paecilomyces hepiali*, Immune Regulation

蝉花和蝙蝠蛾拟青霉复合浸泡虫草酒免疫活性研究

张莹莹^{1,2}, 周怡倩², 徐志香², 于士军^{1,2*}, 彭国杰³, 胡建峰³, 孙长胜^{3*}

¹安徽农业大学, 安徽 合肥

*通讯作者。

文章引用: 张莹莹, 周怡倩, 徐志香, 于士军, 彭国杰, 胡建峰, 孙长胜. 蝉花和蝙蝠蛾拟青霉复合浸泡虫草酒免疫活性研究[J]. 微生物前沿, 2020, 9(2): 60-65. DOI: 10.12677/amb.2020.92010

²滁州学院, 安徽 滁州

³浙江泛亚生命科学研究院, 浙江 平湖

Email: yushijun@outlook.com, daidsun@bioasia.com.cn

收稿日期: 2020年5月29日; 录用日期: 2020年6月17日; 发布日期: 2020年6月24日

摘要

本文通过0.45 g/kg·BW/d (低剂量)和0.9 g/kg·BW/d (高剂量)两个剂量组的复合虫草酒经口给予小鼠饲喂1个月实验, 进行小鼠免疫器官系数、体液免疫功能和单核巨噬细胞活性的测定, 研究复合虫草酒的免疫调节作用。结果表明, 高剂量组复合虫草酒能够显著提高小鼠抗体积数, 较空白对照组提高了62.94%; 高、低剂量组均能明显提高小鼠的鸡红细胞吞噬指数, 较对照组分别提高了44%和40%, 吞噬百分率分别较对照组分别提高了21.57%和19.61%。高剂量组复合虫草酒具有提高小鼠抗体积数和增强小鼠单核巨噬细胞吞噬活性的作用。

关键词

复合虫草酒, 蝉花, 蝙蝠蛾拟青霉, 免疫调节

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

蝉花是蝉棒束孢寄生在蝉幼虫上形成的虫菌复合体, 是我国传统名贵中药材之一。在我国云南、浙江、安徽、广东、四川和福建等省有长期食用蝉花虫草的习惯。早在公元五世纪的南北朝时期雷敦在其著作《雷公炮炙论》中便有关于蝉花加工方法的记载, 隋唐时期甄权、宋代苏颂、明代李时珍均对其有所研究[1]。《本草纲目》记载蝉花寒性、味甘、无毒, 具有散风热、定惊镇痉、明目等功效。现代药理学研究表明蝉花具有免疫调节[2] [3] [4] [5] [6]、抗应激[7]、抗肿瘤[8] [9] [10]、镇静催眠[4] [11]和调节脂类代谢[2] [12]等作用。

蝙蝠蛾拟青霉是从天然冬虫夏草中分离得到的与冬虫夏草具有相似化学成分的真菌, 其液体发酵菌丝体含有多糖、虫草酸、核苷类物质等功效成分[13] [14], 具有免疫调节[15] [16] [17]、抗肿瘤[18]、抗病毒[19]、及抗疲劳[20] [21]等多种功效。

本文研究了由人工培养蝉花孢梗束和蝙蝠蛾拟青霉液体发酵菌丝体按照比例混合后, 经基酒浸泡 60 天制成的复合虫草酒的免疫活性。本研究根据国家保健食品相关法规要求, 在指定单位对蝉花孢梗束和蝙蝠蛾拟青霉菌丝体复合虫草酒的免疫功能进行评价研究[22]。

2. 材料和方法

2.1. 样品

浙江泛亚保健食品有限公司提供。按照每升添加 13.3 g 蝉花子实体干品和 1.4 g 蝙蝠蛾拟青霉菌丝体, 用 42°基酒浸泡 60 天, 用纯水调配至 38°; 同样用 26.6 g 蝉花子实体干品和 2.8 g 蝙蝠蛾拟青霉菌丝体,

用 42°基酒浸泡 60 天,用纯水调配至 38°;分别得到低剂量和高剂量成品酒。然后通过蒸馏浓缩和调配使低剂量和高剂量含药量分别为 18.18 g/L 和 36.36 g/mL,酒精度为 15%。4℃冷藏。按照人体推荐量为 2.66 g/日·60 kg BW 进行试验[23]。

2.2. 实验动物

ICR 小鼠 60 只,SPF 级,初始体重 18~22 g,雄性,合格证号:201808403,由南京医科大学提供。实验鼠粮,规格:20 kg/袋,江苏省协同医药生物工程有限公司提供。饲养环境:屏障实验室,温度 18℃~24℃,相对湿度 40%~70%。动物实验符合安徽省医学科学研究所实验动物伦理和福利要求。

2.3. 试剂与仪器

2.3.1. 主要试剂

绵羊红细胞(SRBC),南京茂捷微生物科技有限公司,批号:20170904001;2%绵羊红细胞(SRBC),平睿生物科技(北京)有限公司,批号:170911;1%鸡红细胞悬液,平睿生物科技(北京)有限公司,批号:170918;氧化性辅酶 I,Amresco 提供;Triton,天津市光复精细化工研究所等。

2.3.2. 主要仪器

XDS-1B 显微镜,重庆光电仪器有限公司;HERA cell 150i CO₂ 培养箱,美国 Thermo Electron 公司;NU-430-400E 超净工作台,美国 NUAIRE;DS-671 电子秤,上海寺冈电子有限公司;AL104 电子天平,梅特勒-托利多(上海)有限公司;鼠静脉注射固定架;JS-306 电子秒表,深圳市君斯达实业有限公司;550 型酶标仪,Biorad 公司等。

2.4. 剂量选择、受试样品给药方式和时间

人用剂量为 2.66 g/日,以人体 60 kg 计,即为 0.045 g/kg。以人体推荐量的 10 倍设为低剂量组(0.45 g/kg),以 20 倍设为高剂量组(0.9 g/kg)。灌胃容积均为 0.25 mL/10g。蒸馏水作为空白对照组,灌胃给药,每组 10 只。各组小鼠经口灌胃给予相应的受试样品,每天 1 次,连续 30 天。

2.5. 实验方法

2.5.1. 免疫器官指数的测定

称重小鼠,断髓处死取胸腺、脾脏,用电子天平称重,计算脏器指数,即胸腺(或脾脏)质量占小鼠体质量的百分比[24]。

2.5.2. 抗体生成细胞检测(Jerne 改良玻片法)

参照李志成等人的方法进行[25]。

2.5.3. 血清溶血素的测定实验(血凝法)

参照黎奔和杨志明等人的方法进行[26] [27]。

2.5.4. 小鼠碳廓清实验

参照黎奔等人的方法进行,以吞噬指数表示小鼠碳廓清的能力,按下式计算吞噬指数 a [26]。

$$K = \frac{\lg OD_1 - \lg OD_2}{t_2 - t_1} \quad (\text{公式 1})$$

$$\text{吞噬指数 } a = \frac{\text{体重}}{\text{肝重} + \text{脾重}} \times \sqrt[3]{K} \quad (\text{公式 2})$$

2.5.5. 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验(半体内法)

参照金龙哲等人的实验方法进行操作, 在 40×显微镜下计数吞噬率和吞噬指数。每张片计数 100 个巨噬细胞, 吞噬率为每 100 个巨噬细胞中, 吞噬鸡红细胞的巨噬细胞所占的百分率; 吞噬指数为平均每个巨噬细胞吞噬鸡红细胞的个数[28]。

$$\text{吞噬百分率}(\%) = \frac{\text{吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数}}{\text{计数的巨噬细胞数}} \times 100 \quad (\text{公式 3})$$

$$\text{吞噬指数} = \frac{\text{被吞噬的鸡红细胞总数}}{\text{计数的巨噬细胞数}} \quad (\text{公式 4})$$

2.6. 数据统计处理

实验数据用平均值 ± 标准差表示, 采用 SPSS19.0 统计软件进行方差齐性检验和单因素方差分析, 使用 Duncan 新复极差法对不同组间数据进行差异显著性比较, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

3. 结果与讨论

3.1. 对免疫器官系数的影响

实验小鼠经口给予不同剂量的培养蝉花孢梗束和蝙蝠蛾拟青霉液体发酵菌丝体复合虫草酒 30 天。观察复合虫草酒对小鼠胸腺系数、脾脏系数的影响。结果如表 1 所示, 不同剂量复合虫草酒小鼠的胸腺系数和脾脏系数与对照组的差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

Table 1. Effect of combined *Cordyceps* wine on coefficients of immune organs of mice ($\bar{X} \pm S$, $n = 10$)

表 1. 复合虫草酒对小鼠免疫脏器系数的影响($\bar{X} \pm S$, $n = 10$)

组别	剂量(g/kg)	胸腺系数(mg/g)	脾脏系数(mg/g)
空白对照组	蒸馏水	15.19 ± 3.30	54.82 ± 5.89
低剂量组	0.45	15.26 ± 3.82	59.73 ± 10.63
高剂量组	0.90	14.27 ± 3.78	55.54 ± 10.81

3.2. 复合虫草酒对小鼠体液免疫功能的影响

实验小鼠经口给予不同剂量复合虫草酒 30 天, 通过小鼠抗体生成细胞实验和血清溶血素实验研究复合虫草酒的体液免疫活性, 结果如表 2 所示。复合虫草酒低剂量组和高剂量组溶血空斑数与对照组相比无显著性差异($P > 0.05$), 表明高低剂量复合虫草酒无促进小鼠的抗体生成细胞增殖的作用。高剂量组复合虫草酒抗体积数较对照组提高了 62.94%, 显著高于对照组和低剂量组($P < 0.01$); 低剂量组抗体积数较对照组提高了 12.59%, 但是差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明高剂量组复合虫草酒具有显著提高小鼠的抗体积数的作用, 与宋捷民等人对蝉花免疫功能的研究结果一致[4]。

3.3. 复合虫草酒对小鼠单核巨噬细胞免疫功能的影响

通过小鼠碳廓清实验和腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验研究了复合虫草酒对小鼠单核巨噬细胞功能的影响, 结果见表 3。复合虫草酒低剂量组和高剂量组小鼠碳廓清吞噬指数与对照组比较均无显著性差异($P > 0.05$)。复合虫草酒低剂量组和高剂量组小鼠单核巨噬细胞鸡红细胞吞噬指数相对对照组分别提高了 44% 和 40%, 均与空白对照组有极显著差异($P < 0.01$), 表明低剂量和高剂量复合虫草酒均可以提高小

鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞的能力。复合虫草酒低剂量组和高剂量组的吞噬百分率分别提高了 21.57% 和 19.61%，均显著高于空白对照组($P < 0.01$)。根据单核巨噬细胞功能测定结果中的两个实验结果均为阳性，或任一个实验的两个剂量组结果阳性，可判定复合虫草酒的单核巨噬细胞功能测定结果阳性。表明复合虫草酒具有提高小鼠单核巨噬细胞吞噬活性，具有促进免疫功能的作用。

Table 2. Effect of combined *Cordyceps* wine on numbers of hemolytic plaques and antibodies of mice ($X \pm S$, $n = 10$)

表 2. 复合虫草酒对小鼠溶血空斑数和抗体积数的影响($X \pm S$, $n = 10$)

组别	剂量(g/kg)	溶血空斑数(空斑数/全脾细胞数)	抗体积数
空白对照组	蒸馏水	57.7 ± 17.82	14.3 ± 4.14
低剂量组	0.45	51.7 ± 16.61	16.1 ± 4.61
高剂量组	0.90	54.0 ± 13.83	23.3 ± 5.32**

注：与阴性对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，下同。

Table 3. Effects of combined *Cordyceps* wine on carbon clearance and peritoneal macrophages of chicken erythrocytes of mice ($X \pm S$, $n = 10$)

表 3. 复合虫草酒对小鼠碳廓清和腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的影响($X \pm S$, $n = 10$)

组别	剂量(g/kg)	碳廓清吞噬指数	鸡红细胞吞噬指数	吞噬百分率(%)
空白对照组	蒸馏水	3.71 ± 0.47	0.25 ± 0.04	0.51 ± 0.04
低剂量组	0.45	3.82 ± 0.42	0.36 ± 0.05**	0.62 ± 0.05**
高剂量组	0.90	3.37 ± 0.65	0.35 ± 0.03**	0.61 ± 0.03**

4. 结论

现代免疫学认为，免疫力是机体自身的一种防御机制，是机体识别和消灭外来异物，识别和处理衰老、损伤、死亡、变性的自身细胞和病毒感染细胞的能力。人体的免疫力受遗传基因和环境因素的影响，如饮食、睡眠、运动、压力等。其中，饮食对免疫力具有决定性的影响，有些食物或药物的成分能刺激免疫系统，增强机体免疫能力[29]。

本实验以复合虫草酒 0.45 g/kg·BW/d (低剂量)和 0.9 g/kg·BW/d (高剂量)两个剂量经口给予小鼠 1 个月，进行小鼠免疫器官系数、体液免疫功能、单核巨噬细胞活性的测定。结果表明，复合虫草酒高剂量组能够显著提高小鼠抗体积数，较空白对照组提高了 62.94%；高、低剂量组能明显提高小鼠的鸡红细胞吞噬指数，较对照组分别提高了 44% 和 40%，吞噬百分率较空白对照组分别提高了 21.57% 和 19.61%。综上可判断，高剂量组复合虫草酒具有一定增强小鼠体液免疫和单核巨噬细胞吞噬活性的作用。

基金项目

科技部星火计划项目(2015GA710033)；滁州学院科研项目(2017PY04)；国家级大学生创新创业训练计划项目(201910377026)。

参考文献

- [1] 陈祝安, 李增智, 陈以平. 金蝉花[M]. 北京: 中医古籍出版社, 2014.
- [2] 金丽琴, 吕建新, 袁谦, 等. 蝉拟青霉对大鼠免疫功能和血液生化指标的影响[J]. 温州医学院学报, 2001, 31(6): 344-346.
- [3] 李成, 彭国杰, 金雷, 等. 蝉花宝牌蝉花片免疫功能评价[J]. 安徽农业大学学报, 2018, 45(1): 161-165.

- [4] 宋捷民, 陈玲, 陈玮, 等. 蝉花对免疫功能影响的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2007(1): 37-38.
- [5] 徐红娟. 蝉花免疫抑制活性成分的分离纯化工艺研究[D]: [硕士学位论文]. 重庆: 重庆大学, 2009.
- [6] Xu, Z., Yan, X., Song, Z., *et al.* (2018) Two Heteropolysaccharides from *Isaria cicadae* Miquel Differ in Composition and Potentially Immunomodulatory Activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, **117**, 610-616. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.164>
- [7] 刘广玉. 天然蝉花和人工培养品镇静镇痛作用的比较[J]. 现代应用药学, 1991, 8(2): 5.
- [8] 陈安徽, 邵颖, 李继武, 等. 人工培育蝉花虫草的抗肿瘤活性[J]. 食品科学, 2015, 36(9): 194-197.
- [9] 芦柏震, 姜志明, 牟翰舟, 等. 蝉花粗提物对肺癌细胞作用的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2006, 13(5): 328-329.
- [10] 王琪, 刘作易. 药用真菌蝉花的研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(4): 469-471.
- [11] 陈祝安, 刘广玉, 胡菽英. 蝉花的人工培养及其药理作用研究[J]. 真菌学报, 1993, 12(2): 138-144.
- [12] 杨介钻, 金丽琴, 吕建新, 等. 蝉拟青霉多糖抗衰老作用的实验研究[J]. 中国老年学杂志, 2004, 24(4): 343-344.
- [13] 周毓麟, 李兰洲, 胡文继, 等. 蝙蝠蛾拟青霉质量标准及免疫活性研究[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2017, 36(1): 24-27.
- [14] 许春燕, 李恒, 陆震鸣. 蝙蝠蛾拟青霉发酵菌粉的主要成分分析[J]. 食用菌, 2016, 38(3): 64-66.
- [15] Chae, S.W., Mitsunaga, F., Jung, S.J., *et al.* (2014) Nutrigenomic Study on Immunomodulatory Function of Cordyceps Mycelium Extract (*Paecilomyces hepiali*) in Mitomycin C-Treated Mice. *Food and Nutrition Sciences*, **5**, 2217-2224. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.522235>
- [16] Jung, S.J., Jung, E.S., Choi, E.K., *et al.* (2019) Immunomodulatory Effects of a Mycelium Extract of Cordyceps (*Paecilomyces hepiali*; CBG-CS-2): A Randomized and Double-Blind Clinical Trial. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **19**, 77. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2483-y>
- [17] Xiang, M., Tang, J., Zou, X.L., *et al.* (2009) β Cell Protecting and Immunomodulatory Activities of *Paecilomyces hepiali* Chen Mycelium in STZ Induced T1DM Mice. *The American Journal of Chinese Medicine*, **37**, 361-372. <https://doi.org/10.1142/S0192415X09006825>
- [18] Wu, Z.W., Lu, J.W., Wang, X.Q., *et al.* (2014) Optimization for Production of Exopolysaccharides with Antitumor Activity *In Vitro* from *Paecilomyces hepiali*. *Carbohydrate Polymers*, **99**, 226-234. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.010>
- [19] 汪家春, 张阵阵, 徐军, 等. 蝙蝠蛾拟青霉和中国弯颈霉蛋白质氨基酸分析及质量评价[J]. 第二军医大学学报, 2017, 38(11): 1462-1466.
- [20] Chae, S.W., Mitsunaga, F., Jung, S.J., *et al.* (2015) Mechanisms Underlying the Antifatigue Effects of the Mycelium Extract of Cordyceps (*Paecilomyces hepiali*, CBG-CS-2) in Mice in the Forced Swimming Test. *Food and Nutrition Sciences*, **6**, 287-298. <https://doi.org/10.4236/fns.2015.62029>
- [21] Wang, J., Li, L.Z. and Liu, Y.G. (2016) Investigations on the Antifatigue and Antihypoxic Effects of *Paecilomyces hepiali* Extract. *Molecular Medicine Reports*, **13**, 1861-1868. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4734>
- [22] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[M]. 北京: 卫生部卫生法制与监督司, 2003.
- [23] 国家食品安全风险评估中心. 新食品原料铁皮石斛原球茎和蝉花子实体(人工培植)公开征求意见[R]. 2019.
- [24] 白巍, 苏豹, 杨永红. 七灵宝软胶囊对小鼠免疫功能的影响[J]. 中药材, 2014, 37(1): 121-125.
- [25] 李志成, 蒋爱民, 咎林森, 等. 复合多糖免疫乳对小鼠细胞和体液免疫功能的影响[J]. 营养学报, 2010, 32(2): 157-161.
- [26] 黎奔, 廖康生, 徐方方, 等. 宝乐果多糖的体内免疫活性研究[J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(10): 1342-1346.
- [27] 杨志明, 成俊芬, 陈鸣娣, 等. 探讨雷公藤甲素对 BALB/c 哮喘小鼠 IL-23/Th17(IL-17)炎症轴的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(10): 1347-1351 + 1356.
- [28] 金龙哲, 车成来, 王霞, 等. 有机灵芝破壁孢子粉增强免疫力功能的实验研究[J]. 中国林副特产, 2016, 31(6): 14-17 + 20.
- [29] 贺天珍. 桑枝皮多糖的制备、结构鉴定及其抗氧化活性分析[D]: [硕士学位论文]. 苏州: 苏州大学, 2011.