

# Study on the Effect of Solid Cultured Pure Powder of Cicada Flower on Immune Function of Mice

Rong Zhu<sup>1</sup>, Qing Xu<sup>1</sup>, Rong Zheng<sup>1\*</sup>, Wei Ji<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai

<sup>2</sup>Jiangsu Bio Asia Cordyceps Health Farm Co., Ltd., Huai'an Jiangsu

Email: 64385700@126.com, \*zrong\_md@126.com

Received: Jul. 17<sup>th</sup>, 2020; accepted: Jul. 29<sup>th</sup>, 2020; published: Aug. 6<sup>th</sup>, 2020

## Abstract

To investigate the effect of solid cultured cicada flower pure powder on humoral immunity in mice, ICR mice were randomly divided into high, middle and low dose groups and control groups. Dose groups were given different doses of cicada flower pure powder; control group was given the same volume of distilled water. The effect of solid cultured pure powder of cicada flower on humoral immunity of mice was evaluated by detection of antibody producing cells and serum hemolysin test. The results showed that the pure powder had no significant effect on the organ/weight ratio of mice (including thymus and spleen) ( $P > 0.05$ ), but it could significantly increase the number of hemolytic plaque and the number of antibody in mice by concentration-dependent manner ( $P < 0.01$ ).

## Keywords

*Cordyceps cicadae*, Fruiting Body, Immune Function

# 固体培养的蝉花子实体纯粉对小鼠免疫功能影响的评价研究

朱戎<sup>1</sup>, 徐晴<sup>1</sup>, 郑蓉<sup>1\*</sup>, 纪伟<sup>2</sup>

<sup>1</sup>上海中医药大学附属龙华医院, 上海

<sup>2</sup>江苏泛亚虫草健康农场有限公司, 江苏 淮安

Email: 64385700@126.com, \*zrong\_md@126.com

\*通讯作者。

收稿日期：2020年7月17日；录用日期：2020年7月29日；发布日期：2020年8月6日

## 摘要

探讨固体培养的蝉花子实体纯粉对小鼠体液免疫功能的影响。将ICR小鼠随机分为高、中、低剂量组及对照组，分别灌胃不同剂量的蝉花子实体纯粉，对照组灌胃同体积的蒸馏水。通过抗体生成细胞检测及血清溶血素实验评估固体培养的蝉花子实体纯粉对小鼠体液免疫的影响。蝉花子实体纯粉对小鼠脏器/体重比值无显著的影响(包括胸腺和脾脏) ( $P > 0.05$ ), 但能以浓度依赖的方式显著提高小鼠的溶血空斑数及抗体积数( $P < 0.01$ ), 说明人工固体培养的蝉花子实体纯粉具有显著增强体液免疫力的功能。

## 关键词

蝉花, 子实体, 免疫功能

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

蝉花是一种传统名贵的药食同源中药材之一，系由蝉棒束孢寄生于山蝉幼虫形成的复合体[1]。尽管蝉花在中医药中有着悠久的历史，其很多药理活性缺乏明确的证据。据推测，其活性功能包括：治疗疟疾、减轻心悸、增强凝血、抗肿瘤以及改善健康等[2]，此类状况均与免疫反应有关[3]。据报道，野生蝉花提取物能明显增强小鼠的体液免疫功能，并能显著提高巨噬细胞的吞噬作用[4]。由于天然野生蝉花资源较为短缺，其人工培养受到越来越多的关注。本文拟考察固体培养的蝉花子实体纯粉对小鼠体液免疫功能的影响，以期为人工培养蝉花的应用提供理论支持。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料

#### 2.1.1. 供试材料

样品：蝉花子实体纯粉由浙江泛亚生命科学研究院提供。

实验动物：雄性 SPF 级 ICR 小鼠(实验动物生产许可证号为 SCXK(沪)2017-0005, 合格证号：20170005023759, 初始体重 18~22 g)购买自上海斯莱克实验动物有限责任公司。40 只 ICR 小鼠随机分为 4 组：高、中、低剂量组及对照组，每组 10 只。

#### 2.1.2. 仪器与试剂

主要实验仪器：恒温水浴锅(DK-S22, 上海精宏)、离心机(5804R, Eppendorf, 德国)、二氧化碳培养箱(150i, Thermo, 美国)。

主要试剂及耗材：绵羊红细胞(SRBC)(索莱宝, 北京索莱宝科技有限公司)、补体(豚鼠血清)(索莱宝, 北京索莱宝科技有限公司)、Hank's 平衡盐溶液液(索莱宝, 北京索莱宝科技有限公司)、RPMI1640 细胞培养液(索莱宝, 北京索莱宝科技有限公司)、SA 缓冲液(AMEKO, 上海联硕生物科技有限公司)、琼脂糖

(Thermo Fisher, 美国)、羧甲基纤维素钠(Sigma-Aldrich, 美国)及无菌生理盐水(索莱宝, 北京索莱宝科技有限公司)、200 目滤网、微量血凝实验板(索莱宝, 北京索莱宝科技有限公司)。

## 2.2. 方法

按照《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版)的规定检测指标, 并参照白巍、吴小丽等的方法进行[5] [6]。

### 2.2.1. 剂量选择、受试样品给药方式和时间

蝉花子实体纯粉的人体推荐摄入剂量为 0.9 g/d, 按人体平均 60 kg 计, 剂量为 0.015 g/kg。参考《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版)的规定及相关文献, 以人体推荐量的 5 倍设为低剂量组(0.075 g/kg), 10 倍设为中剂量组(0.15 g/kg), 30 倍设为高剂量组(0.45 g/kg), 蒸馏水作为阴性对照组。分别取样品 1.5、3.0 及 9.0 g 以 1%羧甲基纤维素钠溶液定容至 200 mL, 灌胃给药, 灌胃体积为 0.10 mL/10g。每天 1 次, 连续 30 天。

### 2.2.2. 抗体生成细胞检测

将 0.5 g 琼脂糖加去离子水至 100 mL, 加热溶解后在清洁玻片上刷一薄层备用。向每只 ICR 小鼠腹腔注射 0.2 mL 压积 SRBC 细胞悬液(2% (v/v), 以生理盐水为溶剂), 4~5 天后将小鼠脱臼处死, 分离脾脏后以 Hank's 液清洗并用 RPMI1640 培养基制成悬液, 将细胞计数后调整其浓度为  $5 \times 10^6$  个/mL。1 g 琼脂糖加去离子水 100 mL 加热溶解后 45℃水浴保温, 并与等体积 2×的 Hank's 液混匀后分装于小试管中, 每管体积 0.5 mL。分别向每只小试管内加入 50  $\mu$ L 10% SRBC 及 20  $\mu$ L 脾细胞悬液, 迅速混匀后倒于上述预处理的玻片上, 每组三个平行样品。琼脂糖凝固后将玻片水平扣于玻片架上, CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 1 h, 然后加入稀释后的补体(以 SA 缓冲液 1:8 稀释)至玻片架凹槽, 继续于 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 1 h 后计算溶血空斑数。

### 2.2.3. 血清溶血素的测定实验(血凝法)

以 2.2.2 中方法免疫小鼠, 4 天后眼眶取血, 静置 1 h 后 2000 r/min 离心 10 min, 取上层血清备用。将血清以生理盐水按不同倍比稀释后转移至 96 孔微量血凝实验板内, 加样体积为每孔 100  $\mu$ L, 并加入等体积的 SRBC 的悬液(0.5% (v/v)), 小心混匀后于 CO<sub>2</sub> 培养箱中加盖孵育 3 h, 观察血球凝集程度, 按下面公式计算小鼠抗体积数。

$$\text{抗体积数} = (S_1 + 2S_2 + 3S_3, \dots, nS_n)$$

式中 1、2、3...*n* 代表对倍稀释的指数, *S* 代表凝集程度的级别, 抗体积数越大, 表示血清抗体越高。

0 级红细胞全部下沉, 集中在孔底部形成致密的圆点状, 四周液体清晰。

I 级红细胞大部分沉集在孔底成园点状, 四周有少量凝集的红细胞。

II 级凝集的红细胞在孔底形成薄层, 中心可以明显见到一个疏松的红点。

III 级凝集的红细胞均匀地铺散在孔底成一薄层, 中心隐约可见一个小红点。

IV 级凝集的红细胞均匀地铺散在孔底成一薄层, 凝块有时成卷折状。

### 2.2.4. 数据统计分析

实验数据以均值±标准差表示, 采用 SPSS 统计软件(版本 19.0, IBM, 美国)进行方差齐性检验和单因素方差分析。 $P < 0.05$  认为具有统计学上显著差异,  $P < 0.01$  表示具有统计学上极显著差异。

### 2.2.5. 动物伦理

本动物实验获得上海睿太莫斯生物科技有限公司实验动物福利与伦理委员会批准。

### 3. 结果与分析

#### 3.1. 蝉花子实体纯粉对小鼠脏器/体重比值的影响作用

如表 1 所示, 与阴性对照组比较, 蝉花子实体纯粉各剂量组对小鼠脏器/体重比值的影响不具有显著差异( $P > 0.05$ )。

**Table 1.** Effect of pure powder of *Cordyceps cicadae* fruit body on organ/weight ratio of mice (mean  $\pm$  SD,  $n = 10$ )

**表 1.** 蝉花子实体纯粉对小鼠脏器/体重比值的影响(均值 $\pm$ 标准差,  $n = 10$ )

| 组别    | 剂量(g/kg) | 胸腺系数(mg/g)      | 脾脏系数(mg/g)      |
|-------|----------|-----------------|-----------------|
| 阴性对照组 | 蒸馏水      | 1.63 $\pm$ 0.14 | 3.18 $\pm$ 0.72 |
| 低剂量组  | 0.075    | 1.98 $\pm$ 0.45 | 3.04 $\pm$ 0.35 |
| 中剂量组  | 0.15     | 1.79 $\pm$ 0.40 | 3.59 $\pm$ 0.45 |
| 高剂量组  | 0.45     | 2.05 $\pm$ 0.31 | 3.13 $\pm$ 0.58 |

#### 3.2. 蝉花子实体纯粉的体液免疫功能研究

##### 3.2.1. 蝉花子实体纯粉对小鼠抗体生成细胞的影响

与阴性对照组比较, 蝉花子实体纯粉低、中、高剂量组均能显著提高小鼠的溶血空斑数, 差异具有极显著性意义( $P < 0.01$ ), 结果见表 2。

**Table 2.** Effect of pure powder of *Cordyceps cicadae* fruit body on the number of hemolytic plaque in mice

**表 2.** 蝉花子实体纯粉对小鼠溶血空斑数的影响

| 组别    | 剂量(g/kg) | 溶血空斑数(空斑数/全脾细胞数)   |
|-------|----------|--------------------|
| 阴性对照组 | 蒸馏水      | 30.75 $\pm$ 2.71   |
| 低剂量组  | 0.075    | 34.50 $\pm$ 2.51** |
| 中剂量组  | 0.15     | 44.75 $\pm$ 4.30** |
| 高剂量组  | 0.45     | 56.75 $\pm$ 4.59** |

注: 与阴性对照组比较, \*\* $P < 0.01$ 。

##### 3.2.2. 蝉花子实体纯粉对小鼠血清溶血素(抗体积数)的影响

与阴性对照组比较, 蝉花子实体纯粉中剂量组及高剂量组可以显著提高抗体积数, 差异有显著性意义( $P < 0.01$ ), 结果见表 3。而低剂量蝉花子实体纯粉摄入则未对小鼠的抗体积数产生显著影响。

**Table 3.** Effect of cicada flower fruiting body on antibody product in mice

**表 3.** 蝉花子实体对小鼠抗体积数的影响

| 组别    | 剂量(g/kg) | 抗体积数              |
|-------|----------|-------------------|
| 阴性对照组 | 蒸馏水      | 133.5 $\pm$ 2.8   |
| 低剂量组  | 0.075    | 137.7 $\pm$ 6.1   |
| 中剂量组  | 0.15     | 147.0 $\pm$ 4.4** |
| 高剂量组  | 0.45     | 160.3 $\pm$ 7.9** |

注: 与阴性对照组比较, \*\* $P < 0.01$ 。

## 4. 结论与讨论

免疫力是机体自身的一种防御机制,能协助机体识别并清除外来异物及自身衰老或受损细胞,受饮食、睡眠、运动及压力等多种因素影响。其中,饮食对免疫力影响较为显著,有些食物或药物组分能对其产生显著影响。通常认为蝉花中的多糖成分具有免疫调节功能。Weng 等发现水-甲醇(50%)提取的蝉花部分 CC-1-2 能增强植物凝集素激活的人单核细胞的增殖,而其 100%甲醇提取部分 CC-2-1 所发挥作用正与之相反,可能通过增强或抑制 IL-2 及 IFN- $\gamma$  的生成发挥作用[7]。何晓波等发现蝉花多糖能有效促进细胞免疫及体液免疫[8]。蝉花多糖能促进树突状细胞向成熟期转化,从而提高免疫力[9]。宋佳敏等证明蝉花多糖能显著提高小鼠的脾脏、胸腺以及肝脏指数[10]。而本研究中固体培养的蝉花子实体纯粉低、中、高剂量灌胃对小鼠的胸腺和脾脏指数则未产生显著影响,可能的原因是本实验的受试物为子实体纯粉而非分离纯化后的蝉花多糖或其他具有免疫调节功能的活性组分,活性成分浓度相对较低所致。然而,该子实体纯粉能显著提高小鼠的体液免疫功能,说明人工固体培养的蝉花子实体纯粉在增强免疫力方面具有广阔的应用前景。

本实验以固体培养的蝉花子实体纯粉 0.075 g/kg (低剂量)、0.15 g/kg (中剂量)及 0.45 g/kg (高剂量)三个剂量经口灌胃小鼠一个月,考察其对小鼠体液免疫功能的影响。结果表明,固体培养的蝉花子实体纯粉能显著影响小鼠的抗体生成细胞及抗体数,说明固体培养的蝉花子实体纯粉具有增强体液免疫功能,能有效增强机体免疫力。而具体发挥免疫调节作用的活性成分及其作用机理则需进一步深入研究。

## 基金项目

国家自然科学基金资助项目(81873245);上海市高级中西医结合人才计划(NO. ZY(2018-2020)-RCPY-2002)。

## 参考文献

- [1] Ukai, S., Matsuura, S., Hara, C., Kiho, T. and Hirose, K. (1982) Structure of a New Galactomannan from the Ascocarps of *Cordyceps cicadae* Shing. *Carbohydrate Research*, **101**, 109-116.  
[https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)80799-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)80799-5)
- [2] Chen, W.C. and Chen, G.L. (1994) Study of *Cordyceps cicadae*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, **25**, 269-271.
- [3] Janeway, C.A., Travers, P., Hunt, S. and Walport, M. (1997) *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. Garland Publishing, New York, p. 1.
- [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, 14(1): 37-38.
- [5] 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.
- [6] 吴小丽. 蒲公英提取物抗肿瘤作用的初步研究[D]: [硕士学位论文]. 南京: 南京医科大学, 2005.
- [7] Weng, S.C., Chou, C.J., Lin, L.C., et al. (2002) Immunomodulatory Functions of Extracts from the Chinese Medicinal Fungus *Cordyceps cicadae*. *Journal of Ethnopharmacology*, **83**, 79-85.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00212-X](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00212-X)
- [8] 何晓波, 芦柏震, 周俐斐, 等. 蝉花总多糖对细胞免疫和体液免疫反应的促进作用[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(7): 1465-1468.
- [9] 封燕. 金蝉花多糖的结构特征及免疫活性初步研究[D]: [硕士学位论文]. 镇江: 江苏大学, 2016.
- [10] 宋佳敏, 王鸿飞, 罗洁, 等. 金蝉花多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 核农学报, 2018, 32(10): 1977-1983.