

文章编号:1673-1689(2007)06-0036-04

## 茶树菇多糖免疫调节作用的研究

徐静娟, 邬敏辰, 朱劼, 陈屏

(江南大学医药学院, 江苏无锡 214122)

**摘要:**以实验小鼠的溶血空斑数、T细胞刺激指数、自然杀伤细胞活性、巨噬细胞的吞噬指数等为指标,检测茶树菇多糖对实验小鼠免疫功能的影响。研究结果表明:茶树菇多糖可提高空斑形成细胞的数量、促进ConA诱导的T细胞增殖反应、增强T细胞介导的迟发型超敏反应、促进巨噬细胞的功能。茶树菇多糖能同时促进实验小鼠的非特异性免疫应答和特异性免疫应答,可提高实验小鼠的免疫功能。

**关键词:**茶树菇;多糖;免疫调节作用

**中图分类号:**R 392.1

**文献标识码:**A

### Study on Immunoregulatory Function of *Agrocybe cylindracea* Polysaccharide(ACP)

XU Jing-juan, WU Min-chen, ZHU Jie, CHEN Ping

(School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** Aim To study the effect of in this manuscript, in order to elucidate the immunological function of ACP. the influence of the ACE on immunological function in the experimental mouse was detected. and the quantity of PFC, stimulate index, NK cell activity, and phagocytic index as indexes. It was found that ACP could increase the quantity of PFC, promote the differentiation and hyperplasia of T cell and strengthen the DTH in which T cell participated, promote the swallowing ability of mφ cell. All results demonstrated that ACP could enhance the immunological function.

**Key words:** *Agrocybe cylindracea*; polysaccharide; immunoregulatory function

茶树菇(*Agrocybe cylindracea*)又名杨树菇,是温带至亚热带地区从春季至秋季生长的一种木生食用菌,具有很高的食用和营养价值。现代研究表明:许多食用真菌所含成分(如多糖等)具有免疫调节活性。茶树菇多糖的主要成分为蛋白多糖,相对分子质量为710 000,构成茶树菇多糖的单糖为

葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、甘露糖、鼠李糖、木糖等单糖,基本结构以 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-支链(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡聚糖为主链<sup>[1-6]</sup>。中医理论认为,茶树菇具有清热、平肝、明目、利尿、健脾之功效<sup>[7-9]</sup>。作者以溶血空斑数、T细胞刺激指数、NK细胞活性、巨噬细胞的吞噬指数等为指标,探讨了茶树菇多糖的免疫调节作用。

收稿日期:2006-10-26.

基金项目:江南大学科研基金项目.

作者简介:徐静娟(1963-),女,江苏无锡人,工学硕士,讲师,主要从事食品营养与保健研究. Email: xjwuxi@126.com

## 1 材料

### 1.1 实验动物

普通级昆明种小鼠(4周龄,体重(20±2)g),豚鼠;均由东南大学丁家桥校区实验动物中心提供。

### 1.2 茶树菇多糖

浙江金元真菌多糖制品有限公司提供粗制品,经作者所在实验室再次提取。

### 1.3 其它材料和试剂

YAC-1细胞株;上海实生细胞生物技术总公司产品;SRBC(绵羊红细胞):上海市卫生防疫站产品;ConA(刀豆球蛋白):上海思吉生物制品有限公司产品;DNFB(二硝基氟苯):中国医药集团上海化学试剂公司产品;MTT(噻唑兰):美国GIBCO公司产品;印度墨汁:北京恒业中远化工有限公司产品。

## 2 剂量设定与分组

本实验设400、800、1600 mg/kg 3个剂量组(剂量设定以临床推荐剂量的10倍为基准,并上、下各浮动一个水平)和对照组,每组10只小鼠。受试组按设定剂量分次定时灌胃给药,给药时间为2周;对照组以生理盐水灌胃,实验期间一组一笼,自由摄食与饮水。

## 3 方法

### 3.1 溶血空斑试验:直接空斑试验法

每只小鼠腹腔注射 $4 \times 10^8$ 个/mL的SRBC 1 mL。4 d后将小鼠颈椎脱臼处死,取出脾脏剪碎,制成脾细胞悬液,置4℃冰箱备用。将1.4 g/dL琼脂(用pH 7.4 PBS液配制)加热融化后倾倒入60 mm×15 mm平皿内,每个平皿5~6 mL,冷却后置湿盒37℃备用。融化0.7 g/dL的琼脂,置于45℃水浴箱内保湿,并按下列比例配合:0.7 g/dL琼脂 0.8 mL +  $1 \times 10^7$ /mL脾细胞悬液 0.1 mL +  $2 \times 10^9$ /mL SRBC 0.1 mL,在水浴箱中混匀,快速倾倒入已铺好底层琼脂的平皿内,静置10 min。置37℃,5%CO<sub>2</sub>温箱内1 h。每皿加入1:20稀释(用pH 7.4 PBS液稀释)的补体1 mL,使其均匀覆盖表面,再次置37℃温育30 min,于室温下放置1 h,计数空斑<sup>[9]</sup>。

注:补体需经预处理,预处理方法:1 mL压积SRBC + 20 mL新鲜豚鼠血清混匀,4℃冰箱保存20 min,2000 r/min离心10 min,收集上清液,分装后置-20℃冰箱保存备用。

### 3.2 ConA诱导的T细胞增殖试验:MTT比色分析法

将900 μL含质量分数20%NCS(胎牛血清)的RPMI-1640完全培养液、10 μL肝素钠(250 U/mL)、10 μL ConA(0.5 mg/mL)加入样品瓶备用。小鼠颈椎脱臼处死,立即取血,每鼠取100 μL新鲜血液加入上述准备好的样品瓶,混匀为约1 mL体系。用40孔细胞培养板,多孔板加样量为100 μL/孔,每一样本设3复孔,置5%CO<sub>2</sub>培养箱37℃培养。培养66~70 h后,每孔加入10 μL MTT(5 mg/mL),混匀后继续培养4~6 h,加酸化异丙醇0.1 mL终止培养,充分混匀,静置数分钟后,按MTT比色法测A值并计算刺激指数SI值<sup>[10]</sup>。

### 3.3 巨噬细胞功能测定:鸡红细胞吞噬试验

选择体重20~25 g小鼠,第1、2天以质量分数6%淀粉肉汤1 mL作小鼠腹腔注射,第3天将小鼠颈椎脱臼处死。打开腹腔,用毛细管吸取少量的Hanks液反复冲洗,收集冲洗液,细胞调整到 $10^7$ /mL备用。将1 mL上述巨噬细胞与0.04 mL 5%的鸡红细胞悬液置于离心管中混合均匀。37℃温育30 min,每隔10 min摇动一次。1000 r/min离心10 min,弃上清。用少量生理盐水重悬细胞沉淀,制成薄推片晾干,Giemsa-Wright染色,油镜下计数并计算吞噬百分率和吞噬指数<sup>[11]</sup>。

### 3.4 统计分析方法

所有数据均采用Excel先行单因素方差分析,在方差分析拒绝H<sub>0</sub>假设(即H<sub>0</sub>:u<sub>1</sub>=u<sub>2</sub>=...=u<sub>k</sub>)时,再行SNK-q检验与对照组进行两两比较。

## 4 结果与分析

### 4.1 溶血空斑细胞数测定

经统计学分析,茶树菇提取物各剂量组的溶血空斑数与对照组相比,低、中剂量组无显著性差异,高剂量组具有显著性差异。结果见表1。

表1 溶血空斑试验结果

组别	动物数/只	剂量/(mg/kg)	溶血空斑数(±SD)/(个/10 <sup>6</sup> 脾细胞)
对照组	10	-	136.1±17.804
低剂量组	10	400	161.9±25.115
中剂量组	10	800	148.1±27.217
高剂量组	10	1600	309.2±85.388*

注:方差分析,F=29.183,P<0.001,与对照组比较,经q检验,\*P<0.01

溶血空斑试验显示,高剂量的茶树菇多糖具有与其它真菌多糖类似的功效,能显著增强实验小鼠对SRBC的体液免疫反应性,表现为脾抗体分泌细胞(溶血空斑形成细胞PFC)数明显升高。茶树菇多糖试验组(高剂量组)小鼠的溶血空斑数增加了127.2%,提示大剂量(1 600 mg/(kg·d))的茶树菇可增加空斑细胞(PFC)的数量。其可能的机理是:茶树菇提取物可促进已受抗原刺激的B淋巴细胞增殖分化为浆细胞,提高血清总IgG及特异性抗体溶血素IgM的含量,并激活补体,使溶血空斑试验呈阳性反应。

#### 4.2 ConA 诱导的 T 细胞增殖试验

经统计学分析,茶树菇多糖各剂量组小鼠的 $A_{570}$ 均值与对照组相比较,均有显著性差异。结果见表2。

表2 T 细胞增殖试验结果

Tab. 2 Test result of T cell cell proliferation

组别	动物数/只	剂量/(mg/kg)	$A_{570}$ ( $\bar{x} \pm SD$ )	刺激指数 SI
对照组	10	-	0.293 $\pm$ 0.059	-
低剂量组	10	400	1.021 $\pm$ 0.229*	3.485
中剂量组	10	800	1.062 $\pm$ 0.164*	3.625
高剂量组	10	1600	0.894 $\pm$ 0.110*	3.051

注:方差分析, $F=53.766, P<0.001$ ;与对照组比较,经 $q$ 检验,\* $P<0.01$

茶树菇多糖各剂量组小鼠的 $A_{570}$ 均值与对照组比较均有显著提高,刺激指数最高达3.625。T细胞转化试验结果显示:各种剂量的茶树菇多糖均能促进刀豆球蛋白(ConA)诱导的淋巴细胞增殖反应,茶树菇多糖可协同ConA促进T细胞的分化、增殖。这与其它许多真菌多糖的作用相类似,可能是植物多糖的普遍现象<sup>[10]</sup>。

#### 4.3 巨噬细胞功能测定

经统计学分析,茶树菇多糖高剂量组小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的吞噬百分率与对照组比较有显著差异,中、低剂量组与对照组比较差异不显著;茶树菇多糖各剂量组腹腔巨噬细胞吞噬鸡红

细胞的吞噬指数与对照组比较均有显著性差异。结果见表3。

表3 巨噬细胞吞噬试验(吞噬百分率/吞噬指数)

Tab. 3 Phagocytic test of macrophage (phagocytic rate/phagocytic index)

组别	动物数/只	剂量/(mg/kg)	$A_{570}$ ( $\bar{x} \pm SD$ )	刺激指数 SI
对照组	10	-	20.1 $\pm$ 23.3	0.228 $\pm$ 0.0437
低剂量组	10	400	23.9 $\pm$ 6.17	0.288 $\pm$ 0.0620*
中剂量组	10	800	23.7 $\pm$ 3.95	0.322 $\pm$ 0.0459*
高剂量组	10	1600	27.2 $\pm$ 5.22*	0.331 $\pm$ 0.0791**

注:吞噬百分率方差分析, $F=3.897, P<0.05$ ;与对照组比较,经 $q$ 检验,\* $P<0.01$ ;吞噬指数方差分析, $F=6.174, P<0.01$ ;与对照组比较,经 $q$ 检验,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

茶树菇多糖提高腹腔巨噬细胞的吞噬百分率达24%,吞噬系数提高37.6%,提示茶树菇多糖可从两个途径促进巨噬细胞的功能:(1)高剂量的茶树菇多糖可增加实验动物体内具有吞噬活性的巨噬细胞数量;(2)低、中、高各剂量的茶树菇多糖均可提高实验动物腹腔巨噬细胞的吞噬活力。这种生物活性与已知的灵芝多糖、银耳多糖、牛肝菌多糖、香菇多糖等可提高小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的百分率和吞噬指数的功能相类似<sup>[12-14]</sup>。

## 5 结 语

实验结果显示:茶树菇提取物可提高实验小鼠的免疫功能。这种免疫调节作用主要通过增强B淋巴细胞、T淋巴细胞、巨噬细胞等机体细胞的功能而实现。茶树菇提取物对NK细胞的活性无显著影响。

免疫应答涉及非特异性免疫应答(即巨噬细胞的吞噬功能)和抗原诱导的特异性免疫应答(由淋巴细胞介导的细胞免疫和体液免疫)。因茶树菇多糖可同时促进机体的特异性免疫和非特异性免疫功能,是一种具有潜在应用前景的食、药两用真菌。

## 参考文献(References):

- [1] Murcia M A, Martinez-Tome M, Jimenez. Antioxidant activity of edible fungi (truffles and mushrooms): losses during industrial processing[J]. *Journal of Food Protection*, 2002, 65(10): 1614-1522.
- [2] Jeng-Leun Mau, Yu-Hsiu Tseng. Nonvolatile taste components of three strains of *Agrocybe cylindracea* [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 1998, 46(6): 2071-2074.
- [3] Tabata T, Yamasaki Y. Changes in constituents during fruit body formation of yanagimatsutake mushroom (*Agrocybe cylindracea* (Fr.) Maire)[J]. *Journal of Japanese Society of Food Science & Technology*, 1995, 42(8): 607-610.

- [4] Yoshida H, Fujimoto S, Hayashi J. Studies on food uses of the vegetative mycelia of Basidiomycotina. I. Carbohydrate and organic acid contents in the vegetative mycelia of *Agrocybe cylindracea* (yanagimatsutake mushroom)[J]. *Journal of Japanese Society of Food Science & Technology*, 1992,39(7): 601-607.
- [5] 诸葛健,赵振锋,方慧英. 功能性多糖的构效关系[J]. 无锡轻工大学学报:食品与生物技术,2002,21(2):209-212.  
ZHUGE Jian, ZHAO Zhen feng, FANG hui ying. The relationship between structure and function of Polysaccharide[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry: Food Science and Biotechnology*, 2002,21(2):209-212. (in Chinese)
- [6] 陈真,郭青龙,钱之玉. 海洋真菌多糖 YCP 对荷瘤小鼠的抗肿瘤作用[J]. 食品与生物技术学报,2005,24(5):1-5.  
CHEN Zhen, GUO Qing-long, QIAN Zhi-yu. Study on the Tumor Inhibitory Effect of YCP(a Marine Fungal Polysaccharide) [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005,24(5):1-5. (in Chinese)
- [7] 刘国芬. 珍稀食用菌高产栽培[M]. 北京:金盾出版社,2001.
- [8] 李小定,荣建华,吴谋成. 真菌多糖生物活性研究进展[J]. 食用菌学报,2002,9(4):50-58.  
LI Xiao-ding, RONG Jian-hua, WU Mou-cheng. Recent Advances in the Studies on Bio-Activities of Fungus Polysaccharides [J]. *Acta Edulis Fungi*, 2002,9(4):50-58. (in Chinese)
- [9] 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:中华人民共和国卫生部,2003.
- [10] 沈关心,周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉:湖北科学技术出版社,2002.
- [11] 于丽萍,邹碧珍,李新玉,等. 真菌多糖对小鼠腹腔巨噬细胞免疫功能的影响[J]. 生物技术,1998,8(2):38-40.  
YU Li-ping, ZOU Bi-zhen, LI Xin-yu, et al. The effects of fungus polysaccharide to mouse peritoneal macrophage immunologic function [J]. *Biotechnology*, 1998,8(2):38-40.
- [12] Mizuno M, Morimoto M, Minato K, et al. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998,62:434-437.
- [13] 姚金凤,吴亮,吴希哲. 海洋真菌多糖 YCP 对巨噬细胞免疫功能的影响[J]. 中国药科大学学报,2004,35(6):573-575.  
YAO Jin-Feng, WU Liang, WU Xi-Zhe. Immuno-enhancing effect of YCP obtained from a marine filamentous fungus *keissleriella* sp. YS 4108 on mice peritoneal macrophage[J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, 2004,35(6):573-575. (in Chinese)
- [14] 李明春,雷林生,梁东升,等. 灵芝多糖对小鼠腹腔巨噬细胞蛋白激酶 C 活性的影响[J]. 中国药理学通报,2000,16(1):361-362.  
LI Ming-Chun, LEI Lin-Sheng, LIANG Dong-Sheng, et al. Effect of ganoderma polysaccharides on PKC activity in murine peritoneal macrophages[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2000,16(1):361-362. (in Chinese)

(责任编辑:杨萌)