

元蘑菌丝发酵多糖对小鼠免疫损伤的保护作用

冯卫红, 姚 澜, 吕建华, 潘美晨, 范冬雨, 李长田*
(吉林农业大学食药用菌教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118)

摘要: **目的** 研究元蘑菌丝发酵多糖对环磷酰胺造成免疫损伤小鼠的保护作用。**方法** 小鼠随机分为空白组、模型组、阳性组 (0.02 mL/kg 黄芪精口服液) 和元蘑多糖低、中、高剂量组 (50、100、200 mg/kg), 灌胃给药 5 d 后, 通过连续 3 d 腹腔注射环磷酰胺建立免疫抑制小鼠模型, 造模同时继续给药 12 d。记录小鼠体质量、胸腺和脾脏质量, 计算胸腺和脾脏指数, ELISA 法检测血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平, MTT 法检测脾脏淋巴细胞增殖, 靛酚蓝比色法检测粪便氮含量, HE 和 AB-PAS 染色观察小肠组织病理结构。**结果** 与模型组比较, 元蘑多糖组小鼠胸腺和脾脏指数、细胞因子 (IL-6、IL-1 β 、TNF- α) 水平、脾脏淋巴细胞增殖率均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), 粪便氮含量降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 可改善小肠组织病理损伤。**结论** 元蘑菌丝发酵多糖可提高环磷酰胺免疫损伤小鼠的免疫功能。**关键词:** 元蘑; 菌丝发酵多糖; 环磷酰胺; 免疫
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)02-0592-04
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.02.045

元蘑 *Sarcomyxa edulis* (Y. C. Dai, Niem elä & G. F. Qin) T. Saito, T. Tonouchi & T. Harada 隶属于真菌界 *Fungi*, 担子菌门 *Basidiomycota*, 蘑菇纲 *Agaricomycetes*, 蘑菇目 *Agaricales*, 小菇科 *Mycenaceae*, 美味扇菇属 *Sarcomyxa*^[1-5], 又名亚侧耳^[6-7]、冻蘑及黄蘑, 在东北地区也叫冬蘑和美味冬菇, 是东北的重要栽培菇, 地位仅次于猴头菇和黑木耳, 其形态似灵芝, 颜色偏黄, 也叫“黄灵菇”^[8]。元蘑口感好, 含有大量蛋白质、氨基酸、维生素和矿物质等营养元素^[9-11], 此外其还具有预防动脉硬化、提高机体免疫力、抑制肿瘤增殖等作用^[12-14]。酒中放元蘑后直接饮用, 有一定药用价值^[15]。元蘑生物活性高, 国内外对其多糖在抗肿瘤、抗氧化、提高免疫力等方面作用比较关注^[16-18], 对其药用价值也较为重视^[19-20]。因此, 本研究探讨了元蘑菌丝发酵多糖对环磷酰胺造成免疫损伤小鼠的保护作用。

1 材料

- 1.1 实验动物 SPF 级昆明小鼠, 4 周龄, 体质量 18~22 g, 由四平市铁西区爱普隆生物科技经销处提供。
- 1.2 仪器 H2100R 型高速冷冻离心机 (苏州优格曼机械有限公司); YW-SYS-20L 型生化培养箱 (扬州市培英试验仪器有限公司); 352 型酶标仪 (芬兰 Labsystems 公司); Milli-Q 型超纯水机 (美国 Millipore 公司)。
- 1.3 元蘑发酵液多糖 元蘑菌株 SE1 (编号 HJMAU 2016092521), 由吉林农业大食药用菌教育部工程研究中心提供。菌种活化发酵均采用 cPDA 培养基, 将长势好的液体菌种按 10% 左右的接种量接入 cPDA 培养基, 25 ℃、150

r/min 进行发酵培养 12 d。将发酵到多糖含量较高时期的发酵液用旋转蒸发仪浓缩, 温度 60 ℃, 多糖-乙醇比为 1:4, 过滤后加入无水乙醇。将沉淀的多糖放入 50 ℃烘箱进行烘干, 得到粗多糖。

2 方法

- 2.1 造模及分组给药 60 只小鼠适应性饲养 1 周, 随机分为空白组、模型组、阳性组 (0.02 mL/kg 黄芪精口服液) 和元蘑多糖低、中、高剂量组 (50、100、200 mg/kg), 给药组灌胃给予相应剂量药物, 空白组和模型组灌胃给予等体积生理盐水, 第 5 天灌胃结束后, 连续 3 d 腹腔注射 80 mg/kg 环磷酰胺以建立免疫抑制小鼠模型, 空白组腹腔注射等体积生理盐水, 并继续灌胃给药 12 d。
- 2.2 ELISA 法检测血清细胞因子水平 灌胃结束后, 小鼠称定体质量, 眼球取血, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离得上层血清, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平, 用酶标仪于 492 nm 波长处测定吸光度, 根据标准曲线计算 IL-6、IL- β 、TNF- α 水平。
- 2.3 小鼠胸腺和脾脏指数计算 小鼠处死后用 75% 酒精消毒 5 min, 沿腹部正中线剖腹并取出胸腺和脾脏, 去除筋膜组织, 漂洗后吸干水分称重, 以胸腺或脾脏质量和体质量的比值表示胸腺和脾脏指数。
- 2.4 小鼠脾脏淋巴细胞增殖检测 各组小鼠脾脏放入有 200 目筛网的平板内, 用 1.5 mL RPMI-1640 培养基冲洗研磨, 细胞悬液装入 1.5 mL 离心管, 1 500 r/min 离心 5 min, 红细胞裂解液重复裂解 2 次, 离心后用培养基洗涤, 沉淀

收稿日期: 2021-09-10

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFD0601002)

作者简介: 冯卫红 (1994—), 女 (蒙古族), 硕士生, 研究方向为菌物药活性。Tel: 17390928537, E-mail: 2268522724@qq.com
* 通信作者: 李长田 (1970—), 男, 教授, 博士生导师, 从事新化合物分离及药物活性筛选研究。Tel: 13604366406, E-mail: lct@jlau.edu.cn

重悬于 2 mL 含 10% 胎牛血清的培养基中，台盼蓝染色后调整各组细胞密度至 $1 \times 10^6/\text{mL}$ ，接种于 96 孔板，每孔 100 μL ，再加 100 μL ConA 溶液；另设对照孔，仅加 200 μL 培养基，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 48 h，MTT 法检测 OD_{570} 值，计算各组脾脏淋巴细胞增殖率。

2.5 粪便氨含量检测 参考文献 [21-22] 报道，用靛酚蓝比色法测定粪便氨含量。取约 50 mg 结肠粪便样品，加 NH_4^+ 溶解液和蛋白沉淀液各 500 μL ，混匀，5 000 r/min 离心 2 min，取 200 μL 上清液加入含 3.8 mL 超纯水的试管中，即样品溶液。96 孔板每孔加入 200 μL 样品溶液，每组设 3 个复孔，对照液（仅无粪便，其他添加溶液同样品液）调零，用酶标仪测定样品液吸光度值，根据粪便质量、稀释倍数等换算关系计算粪便样品中的氨含量，以 $\mu\text{mol/g}$ 粪便表示。

表 1 各组小鼠胸腺、脾脏指数比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

分组	剂量/ $(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	胸腺指数/ $(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	脾脏指数/ $(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$
空白组	—	1.80±0.14	3.50±0.40
模型组	—	0.99±0.01 ^{△△}	2.20±0.30 [△]
阳性组	—	1.80±0.06	7.00±0.31 ^{**}
元蘑多糖高剂量组	200	1.30±0.06	3.20±0.12
元蘑多糖中剂量组	100	1.65±0.06	3.80±0.13
元蘑多糖低剂量组	50	2.31±0.11	5.30± 0.20 [*]

注：与空白组比较，[△] $P < 0.05$ ，^{△△} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

3.2 元蘑菌丝发酵多糖对免疫抑制小鼠细胞因子水平的影响 细胞因子一般可分为 Th1、Th2、Th17、Treg4 种类型，Th2 型主要协助合成抗体^[27]，IL-1 β 可以诱发炎症反应及调节多种免疫功能^[27-28]。表 2 显示，与空白组比较，模型

2.6 HE 和 AB-PAS 染色观察小肠组织病理结构 取小鼠小肠组织，经固定、脱水、包埋、切片后，行常规 HE 和 AB-PAS 染色，观察小肠组织病理形态及杯状细胞数量^[23-24]。

2.7 统计学分析 通过 SPSS 26 软件进行处理，数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 元蘑菌丝发酵多糖对免疫抑制小鼠胸腺和脾脏指数的影响 胸腺调节免疫器官、免疫细胞^[25]；脾脏产生免疫应答，合成活性物质^[26]。表 1 显示，与空白组比较，模型组小鼠胸腺和脾脏指数均降低 ($P < 0.05$ ， $P < 0.01$)；与模型组比较，元蘑多糖低剂量组小鼠脾脏指数升高 ($P < 0.05$)。

组小鼠血清 IL-6 水平降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，元蘑多糖高剂量组小鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平均升高 ($P < 0.05$ ， $P < 0.01$)，中剂量组 IL-6 水平升高 ($P < 0.01$)。

表 2 各组小鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

分组	剂量/ $(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	TNF- α / $(\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1})$	IL-1 β / $(\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1})$	IL-6/ $(\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1})$
空白组	—	330±15	350±21	200±58
模型组	—	310±15	330±21	150±44 ^{△△}
阳性组	—	360±38 [*]	380±36	200±56
元蘑多糖高剂量组	200	360±58 [*]	430±46 ^{**}	220±10 ^{**}
元蘑多糖中剂量组	100	350±57	360±40	210±10 ^{**}
元蘑多糖低剂量组	50	320±25	350±36	150±21

注：与空白组比较，^{△△} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

3.3 元蘑菌丝发酵多糖对免疫抑制小鼠脾脏淋巴细胞增殖的影响 表 3 显示，与模型组比较，元蘑多糖各剂量组和阳性组对 ConA 诱导小鼠脾脏淋巴细胞增殖能力有一定促进作用 ($P < 0.05$)，且呈剂量依赖性。

表 3 各组小鼠脾脏淋巴细胞增殖率比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

分组	剂量/ $(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	增殖率
空白组	—	1.60±0.09
模型组	—	1.21±0.26 [△]
阳性组	—	1.76±0.36 [*]
元蘑多糖高剂量组	200	1.83±0.31 [*]
元蘑多糖中剂量组	100	1.74±0.26 [*]
元蘑多糖低剂量组	50	1.38±0.15 [*]

注：与空白组比较，[△] $P < 0.05$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ 。

3.4 元蘑菌丝发酵多糖对免疫抑制小鼠粪便氨含量的影响 表4 显示，模型组小鼠粪便氨含量高于空白组

($P < 0.05$)；元蘑多糖高、中剂量组小鼠粪便氨含量低于模型组 ($P < 0.05$ ， $P < 0.01$)。

表 4 各组小鼠粪便氨含量比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

分组	剂量/ $(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	氨含量/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1})$
空白组	—	4.0±0.200
模型组	—	5.2±0.047 [△]
阳性组	—	4.6±0.013
元蘑多糖高剂量组	200	3.8±0.006 ^{**}
元蘑多糖中剂量组	100	4.0±0.032 [*]
元蘑多糖低剂量组	50	4.6±0.013

注：与空白组比较，[△] $P < 0.05$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

3.5 元蘑菌丝发酵多糖对免疫抑制小鼠小肠组织病理结构的影响 HE 染色结果如图 1 所示，空白组小鼠小肠绒毛排列整齐，上皮细胞柱形，组织结构清晰；模型组小肠组织

明显肿状，绒毛变短萎缩甚至断裂脱落；与模型组比较，元蘑多糖组小肠组织在形态结构上有一定的改善，绒毛长度及数量均高于模型组；另外，环磷酸胺及元蘑多糖对肠壁厚度均无明显影响。

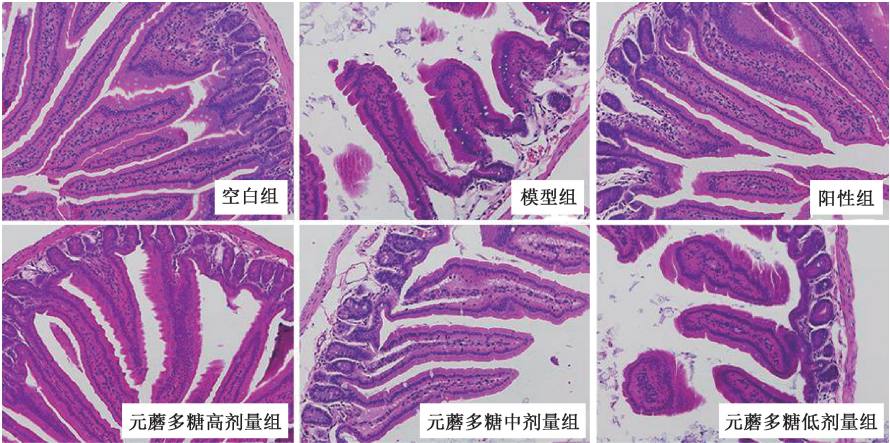


图 1 各组小肠组织 HE 染色图

AB-PAS 染色结果如图 2 所示，小肠组织结构形态与 HE 染色结果大致相同，空白与阳性组小肠绒毛相对更完整，数量更多，排列整齐，组织结构也更清晰；与空白组比较，模型组杯状细胞数（蓝染）减少；与模型组比较，元蘑多糖组杯状细胞数增多。

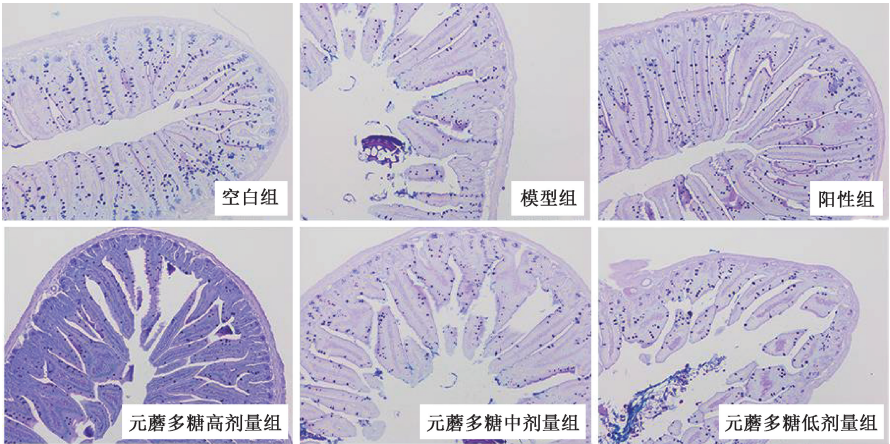


图 2 各组小肠组织 AB-PAS 染色图

4 讨论

元蘑是珍贵的食药两用菌，生物活性较高，其中具有生物活性化合物主要是多糖类，多糖的生物活性范围较广，是生命活动所需的基本物质，主要存在于元蘑子实体及菌丝体发酵液中。据报道，食用菌多糖能提高巨噬细胞的吞噬能力，具有调节免疫能力。除多糖类化合物外还有三萜类化合物、麦角甾醇、矿物质元素、黄酮类化合物等。食药两用菌的三萜类化合物在自然界中大量存在，在纯天然物质中占比较大，可以用于保肝、镇痛、消炎、抑菌以及防治心脑血管疾病等^[29]。食用菌对金属元素有富集的能力，吴英等^[30]研究发现，食用菌中含有很多对人体有益的矿物质，且富集大量的锗和硒。食用菌黄酮类化合物具有神经保护、抗病毒、抗氧化以及抗癌等多种活性。缪钱江等^[31]针对 4 种食用菌进行实验研究，发现食用菌子实体中的总黄酮含量较高，平菇黄酮含量最高，且抗肿瘤活性最强，能够直接杀伤 MCF7 细胞，秀珍菇抗氧化能力最强。

免疫抑制模型有 3 种制备方式，一是使用免疫抑制剂致使免疫力低下，二是辐射诱导免疫低下，三是强电流刺激引起免疫低下^[32]。本研究采用环磷酸胺注射诱导免疫低下模型，该模型稳定，免疫抑制效果明显，且不会危及小鼠生命。本文就元蘑多糖的药理活性进行了初步研究探讨，发现元蘑多糖可提高免疫抑制小鼠的细胞因子水平，尤其是对 IL-6 的提高更为明显，可改善脾脏指数，促进脾脏淋巴细胞增殖，其中多糖高剂量组粪便氮含量低于模型组，对受损小鼠小肠组织形态结构具有改善作用。

综上所述，元蘑菌丝发酵多糖可提高环磷酸胺免疫损伤小鼠的免疫功能。

参考文献：

[1] Dai Y C, Niemela T, Qin G F. Changbai wood-rotting fungi. A new pleurotoid species *Panellus edulis* [J]. *Ann Bot Fennici*, 2003, 40: 107-112.

[2] Jin J, Hughes K W, Petersen R H. Phylogenetic relationships of *Panellus* (*Agaricales*) and related species based on morphology and ribosomal large subunit DNA sequences [J]. *Mycotaxon*, 2001, 79: 7-21.

[3] Saito T, Tonouchi A, Harada Y. Biological characteristics and molecular phylogeny of *Sarcomyxa edulis* comb. nov. and *Sarcomyxa serotina* [J]. *JPN J Mycol*, 2014, 55: 19-28.

[4] 李 玉, 李泰辉, 杨祝良, 等. 中国大型菌物资源图鉴 [M]. 郑州: 中原农民出版社, 2015: 965.

[5] 田风华. 中国东北元蘑种质资源评价及其三萜合成途径相关基因研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2019.

[6] 图力古尔, 李 玉. 东北野生食用菌资源 [C] // 第九届全国食用菌学术研讨会论文集. 上海: 中国菌物学会, 2010: 167-170.

[7] 王术荣, 汤昕明, 常明昌, 等. 吉林省龙湾国家级自然保护区食 (药) 用真菌名录 [J]. 中国食用菌, 2016, 35 (1): 16-20.

[8] 李 玉, 王大为, 王相刚. 食用菌一级菌种商品化保藏技术: 中国, CN1732760 [P]. 2006-02-15.

[9] Inafuku M, Nagao K, Nomura S, et al. Protective effects of fractional extracts from *Panellus serotinus* on non-alcoholic fatty liver disease in obese, diabetic db/db mice [J]. *Br J Nutr*, 2012, 107 (5): 639-646.

[10] Inoue N, Inafuku M, Shirouchi B, et al. Effect of Mukitake mushroom (*Panellus serotinus*) on the pathogenesis of lipid abnormalities in obese, diabetic ob/ob mice [J]. *Lipids Health Dis*, 2013, 12: 18.

[11] Kim J H, Lee J S, Lee K R, et al. Immunomodulating and antitumor activities of *Panellus serotinus* polysaccharides [J]. *Mycobiology*, 2012, 40 (3): 181-188.

[12] Li X Y, Wang L, Wang Y, et al. Effect of drying method on physicochemical properties and antioxidant activities of *Hohenbuehelia serotina* polysaccharides [J]. *Process Biochem*, 2016, 51 (8): 1100-1108.

[13] Li X Y, Wang Z Y, Wang L. Polysaccharide of *Hohenbuehelia serotina* as a defense against damage by whole-body gamma irradiation of mice [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 94 (2): 829-835.

[14] Ma Y, Mizino T, Ito H. Antitumor activity of some polysaccharides isolated from a Chinese mushroom, “huangmo”, the fruiting body of *Hohenbuehelia serotina* [J]. *Agric Biol Chem*, 1991, 55 (11): 2701-2710.

[15] Zhang R, Zhao L Y, Wang H X, et al. A novel ribonuclease with antiproliferative activity toward leukemia and lymphoma cells and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the mushroom, *Hohenbuehelia serotina* [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33 (1): 209-214.

[16] 马 岩, 张 锐, 于小风, 等. 黄蘑多糖对荷瘤小鼠化疗的减毒增效作用 [J]. 中草药, 2006, 37 (8): 1199-1202.

[17] 马 岩, 马颖哲, 张家颖, 等. 黄蘑多糖 Fb 对小鼠免疫功能的调节作用 [J]. 吉林大学学报 (医学版), 2005, 31 (5): 692-695.

[18] 田 杰, 张大方. 亚侧耳的药理作用研究进展 [J]. 长春中医药大学学报, 2004, 20 (4): 63-64.

[19] 陈 湘, 林炳昌. 黄蘑子实体总糖的提取 [J]. 食用菌学报, 2007, 14 (1): 50-51.

[20] 刘 宇, 王建瑞, 鲁 铁, 等. 元蘑不同菌株的菌丝发酵液多糖含量比较 [J]. 北方园艺, 2013 (19): 155-158.

[21] 朱秀高. 乳真蛋白和尿素与铵态氮检测方法研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2010.

[22] 谢俊华. 植物乳杆菌 NCU116 对肠道健康的影响 [D]. 南昌: 南昌大学, 2016.

[23] 刘丹凤, 聂少平, 刘 昕, 等. 膳食摄入染料木素对 ICR 小鼠血脂及肝脏的影响 [J]. 食品科学, 2014, 35 (23): 292-296.

[24] Chen W Q, Zhang S W, Zou X N, et al. Cancer incidence and mortality in china, 2006 [J]. *Chin J Cancer Res*, 2011, 23 (1): 3-9.

[25] 王长山, 李 丽, 朱喜科. 胸腺增龄性萎缩分子机制研究进展 [J]. 国际免疫学杂志, 2011, 34 (4): 257-261.

[26] 金光明, 余世春, 苏 德, 等. 优生素对草杂鸡生长性能及淋巴器官发育的影响 [J]. 中国农学通报, 2006, 22 (3): 16-19.

[27] 曹丽萍, 丁炜东, 张 柳, 等. 香菇多糖和黄芪多糖对鲤免疫细胞的活性和 IL-1 β 体外诱导表达的影响 [J]. 水产学报, 2008, 32 (4): 628-635.

[28] Yu Q, Nie S P, Wang J Q, et al. Chemoprotective effects of *Ganoderma atrum* polysaccharide in cyclophosphamide-induced mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, 64: 395-401.

[29] 谭世强, 谢敬宇, 郭 帅, 等. 三萜类物质的生理活性研究概况 [J]. 中国农学通报, 2012, 28 (36): 23-27.

[30] 吴 英, 王 莹, 赵 丹, 等. ICP-AES 测定食用菌中微量元素 [J]. 光谱实验室, 2009, 26 (2): 284-287.

[31] 缪钱江, 刘 宇, 许 峰, 等. 4 种食用菌总黄酮生物功能的研究 [J]. 食品科技, 2014, 39 (7): 206-209.

[32] 马 玲, 姚小曼. 免疫失衡动物模型的复制及应用 (综述) [J]. 中国食品卫生杂志, 2000, 12 (2): 44-46.