

# 人工发酵虫草菌粉复合片急性毒性及对小鼠免疫功能的影响

程华尧

海南省妇女儿童医学中心、药学部 海南海口 570206

**【摘要】目的** 研究人工发酵虫草菌粉复合片的急性毒性反应及对小鼠免疫功能的影响。**方法** 采用最大耐受剂量法，大、小鼠分别经口灌胃给予人工发酵虫草菌粉复合片，观察一周内动物的中毒表现及死亡情况，考察大、小鼠急性毒性反应；以推荐日摄入量的 5、10、20 倍剂量连续灌胃小鼠 30 天，另设人工发酵虫草菌粉组和蒸馏水阴性对照组，测定脏器/体重比值、血清溶血素和 NK 细胞活性，考察增强免疫力作用。**结果** 急性经口毒性实验中，大、小鼠一般表现和行为均未见异常且无死亡；增强免疫力实验中，与阴性对照组相比，人工发酵虫草菌粉复合片中、高剂量组小鼠抗体积数有显著性差异 ( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ )；低、高剂量组小鼠 NK 细胞活性有显著性差异 ( $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ )；小鼠脏器/体重比值无明显变化。人工发酵虫草菌粉组小鼠 NK 细胞活性有明显提高 ( $P < 0.05$ )，小鼠脏器/体重比值、抗体积数均无明显变化。**结论** 人工发酵虫草菌粉复合片无明显的急性毒性反应，属无毒级；对小鼠具有增强免疫力作用。人工发酵虫草菌粉与党参、灰树花组成复方，其增强免疫力功效较单用更加显著。

**【关键词】** 人工发酵虫草菌粉；蝙蝠蛾拟青霉；复方；急性毒性；免疫

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 2095-7165 (2020) 10-107-02

冬虫夏草是我国特有的珍稀药用资源，广泛用于多种疾病的防治，需求量极大。但由于天然虫草的生长条件苛刻，产量十分有限，高昂的价格限制了虫草的临床应用。从冬虫夏草中分离出菌种，通过发酵生产菌丝体作为天然虫草的人工替代品，成为近年来的研究热点。蝙蝠蛾拟青霉是天然冬虫夏草中普遍存在的一种虫草的无性型，目前已实现大规模的工业化发酵生产。广泛的药化、药理学研究表明，蝙蝠蛾拟青霉等人工发酵虫草与天然冬虫夏草的主要成分、药理作用基本相似，具有良好的应用前景<sup>[1]</sup>。党参是我国传统的补益类中药，具有补中益气，健脾益肺之功效。研究表明，党参多糖是党参的主要有效成分，具有较好的免疫调节活性<sup>[4-6]</sup>。灰树花作为一种珍贵的药食两用菌，其良好的益气健脾作用与机体免疫功能密切联系，被广泛应用于脾气虚症的治疗当中<sup>[7]</sup>。本实验以蝙蝠蛾拟青霉菌粉配伍党参、灰树花提取物制成片剂，考察其急性经口毒性与增强免疫力保健功效。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

昆明种小鼠，体重 18-22g；SD 大鼠，体重 180-200g，由海南省药物研究所提供 [SCXK (琼) 2015-0007]。

### 1.2 受试物与试剂

人工发酵虫草菌粉：购自江苏神华药业有限公司，经中国科学院微生物研究所检测鉴定为蝙蝠蛾拟青霉。

人工发酵虫草菌粉复合片：取党参、灰树花各 450g，加入 12 倍量水提取 2 次，每次 2 小时，滤过，合并 2 次提取液减压浓缩至相对密度 1.10-1.15 (60℃)，加 80% 乙醇 (以 95% 乙醇配制) 醇沉 24 小时、滤过、干燥、粉碎、过筛得提取物粉末。另取 120g 人工发酵虫草菌粉 (蝙蝠蛾拟青霉) 及适量辅料，与提取物粉末混合、制粒、压制成 1000 片，0.6g/片，人体每日推荐量为 5400mg/60kg. BW。实验时用蒸馏水配制，冷藏保存。

### 1.3 主要仪器和试剂

100 μl 微量注射器、电子分析天平、手术器械、723 分光光度仪、离心机、二氧化碳培养箱、SRBC、Hank's 液、RPMI1640 等。

### 1.4 统计方法

数据采用 SPSS19.0 软件进行处理，数据以 " $\bar{x} \pm s$ " 表示

## 2 实验方法

### 2.1 急性经口毒性实验

采用最大耐受剂量法，设 15000mg/kg. BW 一个剂量组，大、小鼠各 20 只，雌雄各半，均按 20ml/kg. BW 二次经口灌胃，间隔 4h。灌胃前动物禁食 16h，不限饮水。染毒后观察一周内动物的

中毒表现及死亡情况，实验结束称体重后处死动物做大体解剖。

### 2.2 增强免疫力实验

#### 2.2.1 剂量选择

人工发酵虫草菌粉复合片设 450、900、1800mg/kg. BW 三个剂量组 (分别相当于人体推荐摄入量的 5 倍、10 倍、20 倍)，人工发酵虫草菌粉组剂量为 160mg/kg. BW，另设蒸馏水阴性对照组。各组小鼠每日灌胃量均为 0.2ml/10g. BW，连续灌胃 30d。

#### 2.2.2 脏器/体重比值测定

试验结束时称体重后处死动物，取脾脏和胸腺在电子分析天平上称重，并计算脏/体比值。

#### 2.2.3 血清溶血素测定 (血凝法)

每只小鼠腹腔注射 2%SRBC 0.2ml 免疫，5 天后摘除眼球分离血清备用。用生理盐水将血清作倍比稀释于血凝板中，每孔 100 μl，再加入 0.5%SRBC 悬液 100 μl，混匀，置湿盒 37℃ 3 小时后观察抗体凝集程度。

#### 2.2.4 NK 细胞活性测定 (乳酸脱氢酶 LDH 测定法)

颈椎脱臼处死小鼠，制备浓度为  $2 \times 10^7$  个/ml 的脾细胞悬液。将脾细胞和靶细胞 YAC-1 细胞各 100 μl 分置于 96 孔培养板中，参考保健食品检验与评价技术规范 (2003 年版) 操作，在 490nm 处测定 OD 值，计算 NK 细胞活性率。

## 3 实验结果

### 3.1 急性经口毒性实验

给予人工发酵虫草菌粉复合片后，大、小鼠一般表现和行为均未见异常，观察期内未见动物死亡，实验结束时处死动物，大体解剖肉眼未见异常。人工发酵虫草菌粉复合片对大、小鼠急性经口 MTD 值均大于 15000mg/kg. BW，按急性毒性分级属无毒级。

### 3.2 对小鼠脏器/体重比值的影响

表 1: 人工发酵虫草菌粉复合片对小鼠脏器/体重比值的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , n=10)

组别	剂量 (mg/kg. BW)	脾脏/体重 (%)	胸腺/体重 (%)
阴性对照组	0	0.47 ± 0.05	0.37 ± 0.03
虫草菌粉组	160	0.48 ± 0.08	0.35 ± 0.11
复合片低剂量组	450	0.45 ± 0.04	0.35 ± 0.06
复合片中剂量组	900	0.44 ± 0.09	0.34 ± 0.08
复合片高剂量组	1800	0.46 ± 0.08	0.36 ± 0.07

由表 1 可见，连续灌胃 30 天后，人工发酵虫草菌粉复合片三个剂量组、人工发酵虫草菌粉组动物的脾脏/体重比值、胸腺

/ 体重比值与阴性对照组相比, 经统计学处理, 均无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

### 3.3 对小鼠血清溶血素的影响

由表 2 可见, 连续灌胃 30 天后, 人工发酵虫草菌粉复合片三个剂量组动物的抗体积数与阴性对照组相比, 经统计学处理, 中、高剂量组动物有显著性差异 ( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ )。人工发酵虫草菌粉复合片对小鼠体液免疫试验结果阳性。

人工发酵虫草菌粉组与阴性对照组相比, 经统计学处理, 无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

### 3.4 对小鼠 NK 细胞活性的影响

由表 2 可见, 连续灌胃 30 天后, 人工发酵虫草菌粉复合片三个剂量组动物的 NK 细胞活性与阴性对照组相比, 经统计学处理, 低、高剂量组与人工发酵虫草菌粉组动物有显著性差异 ( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ )。人工发酵虫草菌粉复合片与人工发酵虫草菌粉均能提高小鼠 NK 细胞活性。

**表 2: 人工发酵虫草菌粉复合片对小鼠血清溶血素的影响**  
( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

组别	剂量 (mg/kg. BW)	抗体积数	NK 细胞活性 (%)
阴性对照组	0	118.10 ± 14.37	11.99 ± 2.03
虫草菌粉组	160	117.50 ± 20.16	14.18 ± 1.19*
复合片低剂量组	450	133.70 ± 16.86	16.22 ± 3.87**
复合片中剂量组	900	138.40 ± 21.82*	12.07 ± 2.29
复合片高剂量组	1800	143.70 ± 18.60**	17.11 ± 3.08**

与阴性对照组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

## 4 结论

(上接第 103 页)

### [参考文献]

- [1] 贝晶晶, 邱敏华, 吴加满. 早期中心型肺癌诊断中 16 排螺旋 CT 的应用价值 [J]. 中国医药, 2018, 13(6):846-848.
- [2] 陈勇. 双源 CT 低剂量扫描显示磨玻璃结节对早期肺癌诊断的价值分析 [J]. 数理医药学杂志, 2019, 32(4):491-492.

(上接第 106 页)

$< 0.05$ )。

**表 1: 姬松茸提取物对脾、胸腺重量的影响** ( $\bar{x} \pm s$ )

剂量 (mg/kg. bw)	脾重 (m/mg)	胸腺重 (m/mg)
0	0.0955 ± 0.004	0.0085 ± 0.0014
83.3	0.145 ± 0.007*	0.0113 ± 0.0064
166.7	0.176 ± 0.010**	0.0122 ± 0.0081*
250	0.185 ± 0.017**	0.0129 ± 0.0077*

注: 与对照组相比, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

### 2.2.2 对细胞及体液免疫功能的影响

见表 2。各剂量组小鼠耳廓肿胀度随剂量增加而逐渐增高, 中、高剂量组与对照组相比差异具有显著性 ( $p < 0.05$ )。各剂量组小鼠溶血空斑数均显著增加, 与阴性对照组相比差异有统计学意义 ( $p < 0.05$ )。

**表 2: 小鼠迟发型变态反应 DTH 和溶血空斑试验结果** ( $\bar{x} \pm s$ )

剂量 (mg/kg. bw)	耳廓肿胀度 mg	溶血空斑数 ( $\times 10^3$ /全脾)
0	7.6 ± 1.8	107.23 ± 14.60
83.3	8.9 ± 1.9	116.57 ± 15.71*
166.7	10.4 ± 2.2*	118.67 ± 16.55*
250	11.7 ± 2.4*	120.45 ± 18.62*

### 2.2.3 对巨噬细胞及 NK 细胞活性的影响

见表 3, 小鼠碳廓清吞噬指数随剂量增加而增加, 中、高剂量组吞噬指数有显著差异 ( $p < 0.05$ ); NK 细胞活性随剂量而增加,

急性毒理试验主要是测定药物的 MTD, 是确认和研究药物对机体毒效的第一步, 为全面毒理学评价打基础。本实验结果表明, 人工发酵虫草菌粉复合片对大、小鼠急性经口毒性试验结果 MTD 值均  $> 15000$ mg/kg. BW, 属无毒级。

人工发酵虫草菌粉复合片连续灌胃小鼠 30 天后, 能极显著提高小鼠的抗体积数和 NK 细胞活性。可初步判定, 人工发酵虫草菌粉与党参、灰树花配伍对动物具有增强免疫力的功能, 且功效较单用更加明显。

### [参考文献]

- [1] 张传开, 袁盛榕. 冬虫夏草及其人工菌丝的免疫药理学研究进展 [J]. 首都医科大学学报, 1997, 18(3): 287-290.
- [2] 仲伟强, 张小强, 浦跃朴, 等. 冬虫夏草与人工虫草菌丝体无机元素含量的比较 [J]. 环境与职业医学, 2004, 21(4): 330-331.
- [3] 姜雪, 王春月, 李兰洲, 等. 蝙蝠蛾拟青霉及蛹虫草与野生冬虫夏草活性比较 [J]. 长春中医药大学学报, 2017, 33(4): 544-547.
- [4] 张雅君, 梁忠岩, 张丽霞. 党参粗多糖的组成及其免疫活性研究 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2012, 40(7): 199-202.
- [5] 晏永新, 张丽, 贾海芳, 等. 党参多糖口服液对小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(3): 18-20.
- [6] 孙雨薇, 朱丽, 李家娣, 等. 党参水煎剂对 D-半乳糖所致衰老模型小鼠免疫功能的影响研究 [J]. 中外女性健康研究, 2017, (1): 41-42.
- [7] 田君琪, 韩晓伟. 灰树花对免疫系统的影响 [J]. 2018, 38(10): 1203-1205.
- [3] 黄建胤. X 线检查在肺癌临床诊断中的应用效果观察 [J]. 影像研究与医学应用, 2019, 3(4):226-227.
- [4] 杨永海. 普通 CT 扫描和低剂量螺旋 CT 扫描应用于早期肺癌诊断的价值比较 [J]. 影像研究与医学应用, 2017, 1(14):21-22.
- [5] 刘爱荣, 寿雅琨. 早期周围型肺癌的 CT 表现及动态观察分析 [J]. 现代医用影像学, 2017, 26(6):1745-1746.

高剂量组活性增加显著 ( $p < 0.05$ )。

**表 3: 小鼠碳廓清实验、NK 细胞活性测定结果** ( $\bar{x} \pm s$ )

剂量 (mg/kg. bw)	碳廓清吞噬指数	NK 细胞活性
0	0.23 ± 0.08	27.23 ± 4.69
83.3	0.39 ± 0.19	29.47 ± 5.74
166.7	0.42 ± 0.12*	31.64 ± 6.57
250	0.57 ± 0.14*	35.95 ± 6.62*

## 3 结论

本实验结果表明, 姬松茸提取物灌胃给药最大耐受剂量  $> 15$ g/kg, 无急性毒性作用; 30d 喂养实验未见明显毒副作用。姬松茸提取物能提高小鼠脾重、胸腺重、溶血空斑数、耳廓肿胀度、碳廓清吞噬指数及 NK 细胞活性, 提示姬松茸安全无毒并具有增强免疫力功能。

### [参考文献]

- [1] 王丽娟, 张彦青, 王勇, 等. 姬松茸多糖增强免疫作用及急性毒性研究 [J]. 食品科学, 2014, 35(13): 258-261.
- [2] 张卉, 刘长江. 姬松茸生理活性物质的研究进展 [J]. 沈阳农业大学学报, 2003(1): 59-62.
- [3] 岳丽玲, 张巍, 刘丹, 等. 姬松茸药用价值研究进展 [J]. 中国药房, 2011, 22(44):4116-4117.
- [4] 张蓉娇, 吴天祥. 姬松茸多糖及其生物活性研究进展 [J]. 贵州农业科学, 2009, 37(6): 108-110.
- [5] 卫生部卫生法制与监督司. 保健食品检验与评价技术规范 (2003 年版) [S]. 北京: 人民卫生出版社, 2003.