

灵芝冻干粉的增强免疫力功能研究

陈晓红¹, 沈建¹, 冯鹏¹, 周亚杰^{1*}, 王玉邦²

1. 南京中科药业有限公司, 江苏南京 210000

2. 南京医科大学, 江苏南京 210000

【摘要】为探究灵芝冻干粉的功能性, 对其进行了毒理评价试验确认其安全性的基础上, 采用增强免疫力功能试验对其进行功能评价。试验中, 按人体推荐剂量 (1.5g/人/日) 的 5, 10 和 30 倍经口喂食小鼠一个月, 结果表明: 0.75g/kg·BW/d 剂量可显著增强小鼠细胞免疫功能, 各剂量组对小鼠体液免疫功能无显著影响, 0.75g/kg·BW/d 能显著增强小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能, 0.25g/kg·BW/d 和 0.75g/kg·BW/d 剂量可显著增强小鼠 NK 细胞活性。根据卫生部《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版) 评判标准, 灵芝冻干粉在推荐剂量下具有增强免疫力功能。

【关键词】灵芝冻干粉; 功能评价; 推荐剂量; 增强免疫力

【中图分类号】R285.5 **【文献标识码】**A **【DOI】**10.12325/j.issn.1672-5336.2023.24.036

引言

灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 是灵芝科、灵芝属真菌的干燥子实体, 在我国有着悠久的历史, 自古就被当作珍贵的中草药加以利用, 其味甘、性平, 具有功效, 临床多用于心神不宁、肺虚咳嗽、虚劳短气、不思饮食等证, 长期服用还可以增强身体免疫力^[1-3]。现代医学试验也证明灵芝含有多种具有增强免疫力、防癌抗癌、调节脂质代谢等功能的矿质营养元素和多种生物活性成分, 包含多糖类、三萜类、蛋白质、甾醇类、核苷类、微量元素^[4]。然而灵芝等中药材的活性成分主要存在于细胞质和细胞核内, 因此难以被人体消化分解和吸收, 灵芝本身属于菌株干燥子实体的特性更是加剧了这一现象。为了在保证其生理活性的基础上, 促进人体对灵芝的吸收, 可以利用冻干技术和超微粉碎技术对灵芝进行粉碎处理。相对正常形态的灵芝, 冻干粉经过了冻干和粉碎等工序, 此前已对其安全性进行了严格认证, 确认其安全无毒性^[5-6]。本研究根据卫生部《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版) 开展功能评价实验对灵芝冻干粉的增强免疫力功能进行初步探究, 为其在免疫增强功能方面保健产品开发提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 受试物

中科牌灵芝冻干粉胶囊 (规格: 0.25g/粒 × 100 粒/瓶), 内容物为淡棕色粉末, 由南京中科药业有限公司

提供, 人体推荐剂量为 1.5g/人/日。密封干燥处保存, 保质期: 24 个月, 取胶囊内容物。

受试物灵芝冻干粉生产工艺: 取新鲜嫩灵芝, 放入 -18℃ 以下的冷冻环境中迅速冷冻, 粉碎; 真空冷冻干燥设备提前制冷, 投入物料, 使物料温度达到 -45℃ 以下, 维持 30min, 抽真空, 真空度为 60-100Pa, 缓慢升温使物料中水分升华, 最终物料温度不超过 30℃, 冻干时间约 40 小时, 粉碎, 灭菌。

1.2 实验动物及菌株

使用 SPF 级 CI/F1 代健康雌性大鼠进行增强免疫力功能试验, 提供于上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 生产许可证号: SCXK (沪) 2013-0016; 所有动物试验在南京医科大学卫生分析检测中心进行, 使用许可证号 SYXK (苏) 2015-0009。

大鼠肝 S-9 购自江苏齐氏生物科技有限公司。

1.3 主要仪器及试剂

1.3.1 主要仪器

全自动生化分析仪 (日立 7100 型), 电子天平 (T-1000 型), 电子天平 (AL-104 型), 电子天平 (JJ-100 型), 血液分析仪 (SIEMENS ADVIA 2120i), 显微镜 (OLYMPUS), 恒温摇床 (THZ312 型), 生物安全柜 (BAKER SG603), 多功能酶标仪, 二氧化碳培养箱, 离心机。

1.3.2 主要试剂

SA 缓冲液, ConA, 绵羊红细胞 (SRBC), 标准豚鼠血清, 印度墨汁, 2,4-二硝基氟苯 (DNFB), RPMI1640

作者简介: 陈晓红 (1976—), 女, 汉族, 江苏省宿迁市, 本科, 工程师, 主要从事研究灵芝及灵芝孢子的药学有效部位研究工作。

***通讯作者:** 周亚杰 (1984—), 男, 汉族, 江苏省南通市, 硕士研究生, 正高级工程师, 研究方向: 中药现代化。

培养基, MTT, 异丙醇(分析纯), 都氏试剂, YAC-1 细胞, LDH 基质液体。

1.4 试验方法

1.4.1 增强免疫力功能试验

按照体重将小鼠分为 5 个大组, 每组按剂量分为 4 个组, 除了阴性对照组, 按人体推荐剂量 (1.5g/人/日) 的 5, 10 和 30 倍, 设 0.13g/kg·BW/d, 0.25g/kg·BW/d 和 0.75g/kg·BW/d 三个剂量组经口给予小鼠一个月后对小鼠进行细胞免疫功能 (ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验、DNFB 诱导小鼠迟发型变态反应 (DTH))、体液免疫功能 (抗体生成细胞检测、血清溶血素测定)、单核巨噬细胞功能 (小鼠碳廓清试验、小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验) 和 NK 细胞活性进行测定^[7]。

1.4.1.1 小鼠细胞免疫功能测定

细胞免疫功能测定通过测定 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化和 DNFB 诱导小鼠迟发型变态反应进行。小鼠喂养后用颈椎脱臼法处死, 无菌取脾后制成细胞悬浮液, 通过测定加或不加 ConA 情况下的吸光度差值, 以此表示 ConA 诱导下的小鼠脾淋巴细胞转化; 通过测定喂养后小鼠左右耳重量来测定小鼠迟发型变态反应。

1.4.1.2 小鼠体液免疫功能测定

体液免疫功能测定通过测定抗体生成细胞和血清溶血素进行。小鼠喂养后注射 SRBC 进行免疫, 4 天后将小鼠颈椎脱臼处死, 脾脏制成悬浮液然后倾倒入培养皿中, 一段时间后计算溶血空斑数以测定抗体生成细胞; 小鼠眼球取血离心, 收集血清并进行孵育, 通过计算半数溶血值 (HC₅₀) 测定血清溶血素。

1.4.1.3 小鼠单核-巨噬细胞功能测定

单核-巨噬细胞功能测定通过碳廓清试验和腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验进行。碳廓清试验中, 小鼠尾静脉注射印度墨汁后从内眦静脉丛取血并加入 Na₂CO₃ 溶液中。以纯 Na₂CO₃ 溶液作为对照测定含血液的吸光度, 并通过小鼠肝脏和脾脏的比重来测定吞噬指数; 吞噬试验中, 将注射鸡红细胞悬液的小鼠处死, 取腹腔巨噬细胞洗液孵箱温育后计算吞噬率和吞噬指数^[8]。

1.4.1.4 小鼠 NK 细胞活性测定

小鼠喂养后用颈椎脱臼法处死, 无菌取脾后制成细胞悬浮液, 将悬浮液加入肿瘤细胞共培养 4h 后加入 LDH 基质液测定吸光度以表示 NK 细胞活性。

1.5 数据处理

表 1 灵芝冻干粉对小鼠细胞免疫功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

剂量/(g/kg·BW/d)	动物指数	淋巴细胞转化		DNFB 诱导小鼠 DTH	
		吸光度差值	p	耳壳增重 (mg)	p
0	10	0.106 ± 0.042		11.3 ± 1.9	
0.13	10	0.118 ± 0.044	0.880	10.8 ± 1.5	0.888
0.25	10	0.123 ± 0.047	0.751	11.6 ± 1.7	0.972
0.75	10	0.161 ± 0.048	0.032	13.9 ± 2.4	0.026

表 2 灵芝冻干粉对小鼠体液免疫功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

剂量/(g/kg·BW/d)	动物指数	抗体生成细胞检测试验		血清半数溶血值试验	
		溶血空斑数 (10 ³ /全脾细胞)	p	HC ₅₀	p
0	10	13.2 ± 2.7		86 ± 13	
0.13	10	14.7 ± 2.9	0.630	82 ± 12	0.894
0.25	10	14.9 ± 3.5	0.513	97 ± 18	0.211
0.75	10	15.2 ± 4.0	0.393	109 ± 14	0.003

表 3 灵芝冻干粉对小鼠单核-巨噬细胞功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

剂量/(g/kg·BW/d)	动物指数	碳廓清试验		吞噬试验	
		吞噬指数	p	吞噬指数	p
0	10	4.83 ± 0.69		0.30 ± 0.06	
0.13	10	5.35 ± 0.69	0.250	0.30 ± 0.03	0.999
0.25	10	5.18 ± 0.68	0.547	0.31 ± 0.04	0.803
0.75	10	5.78 ± 0.75	0.012	0.35 ± 0.02	0.037

表 4 灵芝冻干粉对小鼠 NK 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

剂量/(g/kg·BW/d)	动物指数	NK 细胞活性	p
0	10	18.9 ± 2.0	
0.13	10	19.3 ± 2.5	0.951
0.25	10	21.3 ± 1.6	0.043
0.75	10	25.1 ± 2.7	0.000

所有试验至少 3 次平行试验。以 SPSS 软件对实验数据进行单因素方差分析, 当概率值 ≤ 0.05 时, 判定为统计学显著。

2 结果与分析

2.1 增强免疫功能试验

2.1.1 细胞免疫功能

细胞免疫试验分别做了 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化试验及 DNFB 诱导小鼠 DTH 试验, 发现低中量组与阴性对照组比较, 无论是小鼠脾淋巴细胞中加 ConA 孔与不加 ConA 孔吸光度的差值还是 DNFB 诱导小鼠 DTH 试验中耳壳增重, 差异皆无统计学意义 ($P > 0.05$); 高剂量组与阴性对照组比较, 差异存在统计学意义 ($P < 0.05$); 由此可以认为灵芝冻干粉有增强小鼠细胞免疫功能。具体见表 1。

2.1.2 体液免疫功能

抗体生成细胞检测试验中, 试验组小鼠溶血空斑数与阴性对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 小鼠血清半数溶血值试验中, 仅高剂量组小鼠血清半数溶血值 (HC_{50}) 高于阴性对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。尚不能认为灵芝冻干粉有增强小鼠体液免疫功能能力。具体见表 2。

2.1.3 单核-巨噬细胞功能

碳廓清试验中, 高剂量组小鼠碳廓清吞噬指数 a 高于阴性对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 鸡红细胞吞噬试验中, 高剂量组小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的吞噬百分率及吞噬指数均高于阴性组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 认为灵芝冻干粉有增强小鼠单核-巨噬细胞免疫功能。具体见表 3。

2.1.4 NK 细胞活性

小鼠 NK 细胞活性测定试验中, 中、高剂量组小鼠 NK 细胞活性高于阴性组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示灵芝冻干粉有提高小鼠 NK 细胞活性的能力。具体见表 4。

3 结论与展望

在对灵芝冻干粉进行的急性经口毒性试验中, 根据急性毒性分级标准, 表明灵芝冻干粉属无毒级; 在 30 天喂养试验中, 也未观察到灵芝冻干粉的致突变作用, 结果为阴性, 表明无遗传毒性。可以判定灵芝冻干粉具有较好的食用安全性。本次免疫增强试验中, 经口给予小鼠不同剂量的灵芝冻干粉, 其中 $0.75\text{g/kg}\cdot\text{BW/d}$ 剂量显著增强小鼠细胞免疫功能、能显著增强小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能; 0.25 和 $0.75\text{g/kg}\cdot\text{BW/d}$ 剂量显著增强小鼠 NK 细胞活性, 根据《保健食品检验与评价技术规范》

(2003 版) 对增强免疫保健食品的判断标准, 其可以增强小鼠免疫功能, 具有调节免疫力功能^[9]。

灵芝作为我国中药宝库中的瑰宝, 其富含多种有效成分, 包括三萜类, 多糖类, 甾醇类, 生物碱类, 还含有丰富的氨基酸、SOD、维生素等。灵芝的药理活性主要表现为抗肿瘤作用, 免疫调节作用, 抗氧化抗自由基作用, 抗衰老作用, 降血糖作用, 保肝护肝等等; 临床应用广泛, 主要用于治疗急慢性气管炎、冠心病、白细胞减少、神经衰弱、肝炎、肌营养征等等。传统食用灵芝都是采收后的成熟灵芝, 采用多种加工方式如热水提取、乙醇提取、微波提取等等加工方式, 这样在利用灵芝本身的同时, 是否又存在因成熟以及加工方式的原因造成的灵芝本身的营养成分的流失问题。本实验所使用的一种新型的加工方式即采用新鲜嫩灵芝在零下 18 度的环境下冷冻后真空冷冻干燥后得的灵芝经粉碎而得的产品几乎完全保留了灵芝中的有活性物质, 其中含有丰富的活性多糖、氨基酸、SOD 等活性成分, 而本法也提供食用灵芝的一种途径, 为灵芝研究方向提供更多的思路。

参考文献:

- [1] HUANG S, NING Z. Extraction of polysaccharide from *Ganoderma lucidum* and its immune enhancement activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 47(3): 336-341.
- [2] 江和栋, 牛仙, 万仁口, 等. 灵芝孢子多糖的提取工艺优化及单糖组成、抗氧化活性分析[J]. 中国食品学报, 2021, 21(04): 159-167.
- [3] 李志强, 何玉霞. 灵芝多糖对人肺癌 A549 细胞增殖凋亡的作用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(05): 38-42.
- [4] 闫征, 郝利民, 张黎明, 等. 3 种不同产地灵芝子实体主要化学成分比较[J]. 食品科学, 2019, 40(06): 240-246.
- [5] 陈明容, 李晓明, 李卿, 等. 灵芝超微粉对大鼠血液学和血液生化学的影响[J]. 中国药业, 2021, 30(02): 41-46.
- [6] 罗玲, 贺宗毅, 韦祎, 等. 灵芝超微粉对大鼠的长期毒性研究[J]. 中国药业, 2021, 30(18): 51-54.
- [7] 谢玲, 蒋莎林, 钟晓红, 等. 灵芝菌丝体冻干粉对脂多糖诱导的小鼠巨噬细胞相关因子分泌及蛋白表达的影响[J]. 菌物学报, 2017, 36(10): 1406-1414.
- [8] 辛成龙. 富硒酵母破壁灵芝孢子粉的功能及安全性研究[J]. 生物化工, 2020, 6(06): 1-5.
- [9] 冯新玲, 陈科力, 李娟. 龙蔓藤茶增强免疫力功能的实验研究[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2016, 35(01): 67-69.