

# Study on Immune Adjuvant Activity of Crude Extract of *Cordyceps Militaris* Polysaccharide

Pengfei Zhan, Jianqin Feng, Senhua Xu, Weihong Qian, Guofang Shi, Jinwei Zhan

Huzhou Academy of Agricultural Sciences, Huzhou Zhejiang  
Email: 312377740@qq.com

Received: Oct. 6<sup>th</sup>, 2019; accepted: Oct. 21<sup>st</sup>, 2019; published: Oct. 28<sup>th</sup>, 2019

## Abstract

[Objective] To study the feasibility and effect of *Cordyceps militaris* polysaccharides as immune adjuvant for prevention. [Method] ICR mice were immunized with OVA model antigen. *Cordyceps militaris* polysaccharides were extracted and analyzed from both humoral and cellular immunity of mice. Forty-eight ICR mice were randomly divided into six groups: saline group, 10 UG antigen group and 10 UG antigen mixed with different doses (low, medium and high). The crude polysaccharide extract, 10 UG antigen and 200 UG aluminium adjuvant were used as positive control group. The mice were subcutaneously immunized twice at 2 weeks interval. The serum specific IgG, IgG subclasses, lymphocyte transformation level, and the expression of cytokines (IFN-gamma, IL-12, IL-4, IL-10) were detected by blood sampling two weeks after immunization. [Result] The medium dose group could significantly increase the levels of serum specific IgG antibodies and subclasses, specific T lymphocyte transformation and Th1/Th2 mixed cell immune response in mice. [Conclusion] This study proved for the first time that the combined use of *Cordyceps militaris* polysaccharides and antigen substances can effectively improve the immune response of organisms to vaccines and provide scientific basis for further development and utilization of *Cordyceps militaris* polysaccharides.

## Keywords

*Cordyceps militaris*, Crude Polysaccharide, Immune Adjuvant, Activity

# 北虫草多糖粗提物免疫佐剂活性研究

占鹏飞, 冯建琴, 徐森华, 钱伟红, 施国方, 张金卫

潮州市农业科学研究院, 浙江 湖州  
Email: 312377740@qq.com

## 摘要

[目的]探讨北虫草多糖作为预防用免疫佐剂的可行性及效果。[方法]以ICR小鼠为模型,经模式抗原OVA免疫后,提取北虫草多糖粗多糖、分别从小鼠体液免疫和细胞免疫两方面进行分析,检测了ICR小鼠48只,随机分成6组,分别为生理盐水组、10 μg抗原组、10 μg抗原混合不同剂量(低、中、高)北虫草粗多糖粗提物以及10 μg抗原加上200 μg铝佐剂作为阳性对照组,小鼠间隔2周皮下免疫2次,二免后2周采血测定血清特异性IgG、IgG亚类、淋巴细胞转化水平检测、细胞因子(IFN-γ, IL-12, IL-4, IL-10) mRNA表达水平。[结果]中剂量组能显著提高血清特异性IgG抗体及亚类水平、特异性T淋巴细胞转化水平、增强小鼠机体Th1/Th2混合型细胞免疫反应( $p < 0.05$ )。[结论]该研究首次证实将北虫草多糖与抗原物质联合使用,能有效提高机体对疫苗的免疫应答反应,将为进一步开发利用北虫草多糖提供科学依据。

## 关键词

北虫草, 粗多糖, 免疫佐剂, 活性

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

北虫草(*Cordyceps militaris*)又名北冬虫夏草、蛹虫草,是虫草属的模式种菌,属于囊菌亚门虫草属,食用价值较高。现代研究发现,北虫草和冬虫夏草的药用价值及保健价值较相近[1]。近年来,由于北虫草具有多种药用价值,受到研究者越来越多的关注[2]。现代医药学从药理及临床疗效方面更进一步验证了虫草的医疗保健功能,阐明了其治病强身的机理。测定结果显示,北虫草中含有虫草素、虫草多糖、虫草酸、多种人体必须的氨基酸、多种微量元素和超氧化物歧化酶(SOD)等多种营养物质和抗癌抗衰老的活性物质[3]。

蛹虫草多糖具有耐热、盐,调节pH的作用[4][5],除此之外还有如降血糖、抗肿瘤、抗菌活性、抗氧化活性、增强单核巨噬细胞系统的功能,强化巨噬细胞吞噬能力[6][7]。俞丽霞等研究发现,虫草多糖的不同多糖组分均有免疫增强作用,可提高脾脏指数和胸腺指数,增强单核-巨噬细胞的吞噬能力[8]。大多数研究说明,使用虫草多糖的小鼠,其血清IgM和IgG的含量显著增高。另外,虫草多糖也可明显增强荷瘤小鼠的迟发型变态反应,显著提高外周血淋巴细胞酸性非特异性酯酶阳性细胞百分率。

免疫佐剂是通过富集免疫原(如铝胶)、缓释免疫原(如油乳剂)、激活抗原提呈细胞单核吞噬细胞系统递呈抗原(如卡介苗、细菌脂多糖)以及多种综合作用(如不完全弗氏佐剂和完全弗氏佐剂)来实现对免疫原的免疫增强作用[9][10]。目前唯一被FDA批准用于人用疫苗的佐剂有铝胶佐剂,当然也有越来越多的新型佐剂被开发并逐渐应用到生成实践中,如MF59等。我国的中药有着毒副作用小,对机体免疫提升效果好,目前研究的比较多的是人参皂甙的佐剂活性[11]。北虫草多糖是否也能作为疫苗佐剂来使用,有待进一步研究。本研究旨在探索北虫草多糖作为疫苗佐剂的效果,并为进一步开发其它具有免疫佐剂活性的真菌类提供参考。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料

#### 2.1.1. 试验动物

雌性 ICR 小鼠, 18~22 g, 购自上海实验动物中心。小鼠饲养于 22℃ 清洁环境, 自由采食和饮水, 自然光照, 适应 3 d 后分组。

#### 2.1.2. 试剂

卵清白蛋白(OVA, grade V), 美国 sigma 公司; 羊抗小鼠 IgG 抗体, CHEMICON International Inc.; TMB, SIG2MA-ALDRICH 公司; IgG2a, Santa Cruz Biotechnology Inc.; 硅胶 G 200~300 目, 青岛洋化工有限公司; D101 中性大孔树脂, 天津市海光化工有限公司产品。

#### 2.1.3. 北虫草多糖粗提物制备

木鳖子 3000 g, 用石油醚脱脂 3 次, 每次 10.5 L, 共去掉脂质 601.5 g。残渣用 70% 乙醇 60℃ 回流提取 5 次, 每次 12 L, 合并提取液, 减压浓缩至 1.25 g/ml。

### 2.2. 方法

#### 2.2.1. 实验动物及其免疫

ICR 小鼠 35 只随机分成 7 组, 每组 5 只。每只小鼠颈部皮下注射含 OVA (10 μg) 和组分 A、B、C、D、E 或者 ECMS (50 μg) 的生理盐水溶液, 对照组小鼠注射含 OVA 的生理盐水溶液。2 周后进行二免, 二免后 3 周采血, 制备血清。

#### 2.2.2. IgG 效价的测定

在 96 孔酶标板每孔加入 100 μL 包被液(含 5 μg OVA/mL 的 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液), 置 4℃ 孵育 18 h 后, 洗涤液(pH 7.4 磷酸盐缓冲液 PBS)洗涤 3 次, 每次 3 min。每孔加入 300 μL 含 1% 小牛血清的 PBS 封闭液(0.01 mol/L, pH 7.4), 于 37℃ 孵育 1 h 后, 再用洗涤液洗涤 3 次, 每次 3 min。用稀释液将待测血清在酶标板上作二倍稀释, 使血清稀释度为 1:50~1:3 200。于 37℃ 孵育 2 h 后, 用洗涤液洗涤 3 次, 每次 3 min。加入经 1:500 稀释的羊抗小鼠 IgG 抗体 100 μL/孔, 37℃ 孵育 2 h, 再用洗涤液洗涤 3 次, 每次 3 min。加入 TMB 底物溶液显色, 100 μL/孔, 37℃ 孵育 15 min 加 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 μL/孔终止反应。用酶标仪在 450 nm 波长测定 OD 值。

#### 2.2.3. IgG 亚类测定

在已包被抗原 OVA 的 96 孔酶标板上加入 1:800 倍稀释的待检血清(100 μL/孔), 37℃ 孵育 1 h, 用洗涤液洗涤 3 次, 每次 3 min。加入经 1:600 稀释的生物素标记的山羊抗小鼠 IgG1 或 IgG2a 100 μL/孔, 37℃ 孵育 1 h, 用洗涤液洗涤 3 次, 每次 3 min。加入 1:4000 稀释的辣根过氧化物酶标记的抗生物素 100 μL/孔, 37℃ 孵育 1 h, 用洗涤液洗涤 3 次, 每次 3 min。加入 TMB 底物溶液显色, 100 μL/孔, 37℃ 孵育 15 min 加 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 μL/孔终止反应。用酶标仪在 450 nm 波长测定 OD 值。

#### 2.2.4. 淋巴细胞转化试验

将小鼠脱颈椎处死, 75% 酒精液浸泡 5~10 min, 无菌操作取小鼠脾脏, 加入 1 mL Hank's 研磨, 研磨均匀后将脾细胞吹悬入平皿, 过 200 目铜网后转移入 10 mL 离心管; 25℃ 下 1500 rpm 离心 10 min; PBS 洗涤 2 次; 细胞计数后, 调整细胞浓度至  $2.5 \times 10^6$ /mL, 按 100 μl/孔的量加入 96 孔细胞培养板中。用细胞培养液配制各种刺激物, 向各孔中加入刺激物(LPS 终浓度为 5 μg/mL, ConA 终浓度为 7.5 μg/mL, 设

阴性对照和空白对照)。37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养 48 h。在培养结束前 4 h, 每孔加入 50 μl MTT (2 mg/mL)。然后将培养板取出, 离心(1500 rpm, 10 min)沉淀细胞, 轻轻倾去培养液上清, 纸巾吸干。每孔加入 150 μl 二甲基亚砜, 避光充分振荡, 直至蓝色颗粒完全溶解, 570 nm 波长酶标仪检测 OD 值。计算淋巴细胞刺激指数(Stimulation index, SI):

$$SI = (\text{刺激孔 OD} - \text{空白孔 OD}) / (\text{未刺激孔 OD} - \text{空白孔 OD})。$$

### 2.2.5. 细胞因子 mRNA 检测

1) 脾淋巴细胞体外刺激。将分离到的脾淋巴细胞悬液调整细胞浓度至  $1 \times 10^7$  cell/ml, 铺板培养于 24 孔板, 每孔 2 ml。向培养板内加入刺激物(H1N1 流感抗原), 至 HA 终浓度为 2 μg/ml, 将细胞培养于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 的环境中, 抗原刺激 15 h 后离心收集细胞, 加入 RNA 提取试剂溶解后保存细胞裂解液于 -80℃。

2) Total RNA 提取。RNAiso<sup>TM</sup>Plus (TaKaRa Co., Ltd.)提取细胞总 RNA, 方法参照厂家说明书。RNA 提取效果电泳鉴定: 使用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳分析。

3) 反转录。采用 iScript cDNA Synthesis Kit 将总 RNA 反转录成 cDNA, 方法见说明书; 获得的 cDNA 样品置于 -20℃ 保存备用。

4) 引物及探针设计。采用实时荧光定量双重 PCR 方法检测目的基因的相对表达量, 以小鼠  $\beta$ -actin 为内参基因, 使用 ABI 7300 荧光定量 PCR 仪; 目的基因探针 5'端以 FAM 标记,  $\beta$ -actin 探针 5'端 HEX 标记, 目的基因和内参基因 3'端均采用 BHQ-1 标记。引物和探针序列设计采用软件 Primer Express 3.0; 基因产物均经过 DNA 测序鉴定。

5) Real-time PCR 反应体系及条件。采用总体积为 25 μl 的反应体系, 依次加入  $1 \times$  Taq-Man 通用反应预混液、目的基因引物和探针、 $\beta$ -actin 引物和探针(见表 1)、cDNA 模板(2 μl)。PCR 反应程序采用标准 TaqMan 条件: 95℃ (15 sec), 60℃ (30 sec), 45 个 PCR 循环。

**Table 1.** Sequences of primer and probe for quantitative RT-PCR of cytokine and transcription factor

**表 1.** 细胞因子及转录因子 RT-PCR 用引物和探针序列

Gene	Sequences
$\beta$ -Actin	Forward: 5'-AGCGGTTCGATGCCCT-3' Reverse: 5'-AGAGGTCTTTACGGATGTCAACG-3' Probe: 5'-HEX-TCCTTCTTGGGTATGGAATCCTGTGGC-BHQ-13'
IL-4	Forward: 5'-GAGACTCTTTCGGGCTTTTCG-3' Reverse: 5'-CAGGAAGTCTTTCAGTGATGTGG-3/ Probe: 5'-FAM-CCTGGATTCATCGATAAGCTGCACC-BHQ-13'
IL-10	Forward: 5'-CCAGTTTTACCTGGTAGAAGTGATG-3/ Reverse: 5'-CTGCTCTTATTTTCACAGGGGAG-3/ Probe: 5'-FAM-CAGGCAGAGAAGCATGGCCAGAAA-BHQ-13'
IL-12p40	IL-12p40 Forward: 5'-TTGCTGGTGTCTCCACTCATG-3/ Reverse: 5'-GTCACAGGTGAGGTTCACTGTTTC-3/ Probe: 5'-FAM-CTGGACTCCCGATGCCCTGG-BHQ-13/
IFN- $\gamma$	Forward: 5'-GCTTTGCAGCTCTTCTCATG-3/ Reverse: 5'-CTCCACATCTATGCCACTTGAG-3/ Probe: 5'-FAM-CTGTTTCTGGCTGTACTGCCACGGC-BHQ-13/

6) 相对定量计算方法。设定荧光阈值(处于基因扩增信号的对数增长期(logarithmic phase)内的某个阈值(thresholds)被指定为 Ct 值), 根据不同管内扩增曲线中对应荧光阈值确定样品 Ct 值。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法(29)进行相对定量分析。

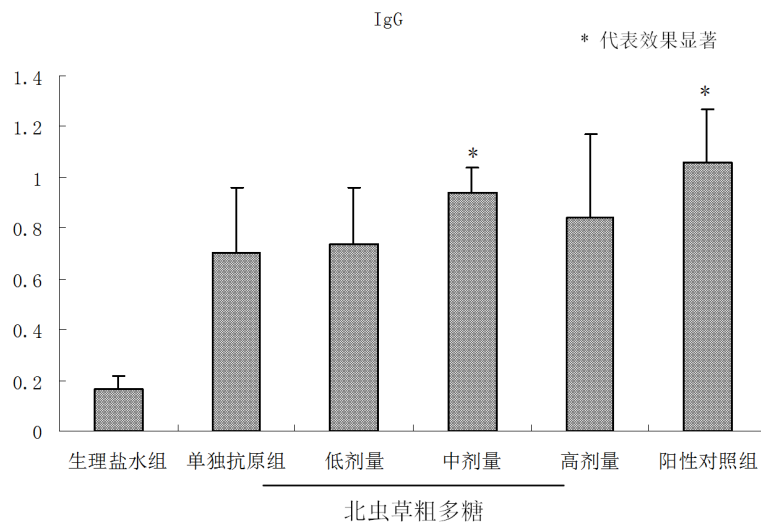
### 2.2.6. 统计学分析

采用 SPSS 12.0 单因素方差分析方法比较组间均数差异, 显著性水平设  $P < 0.05$ 。

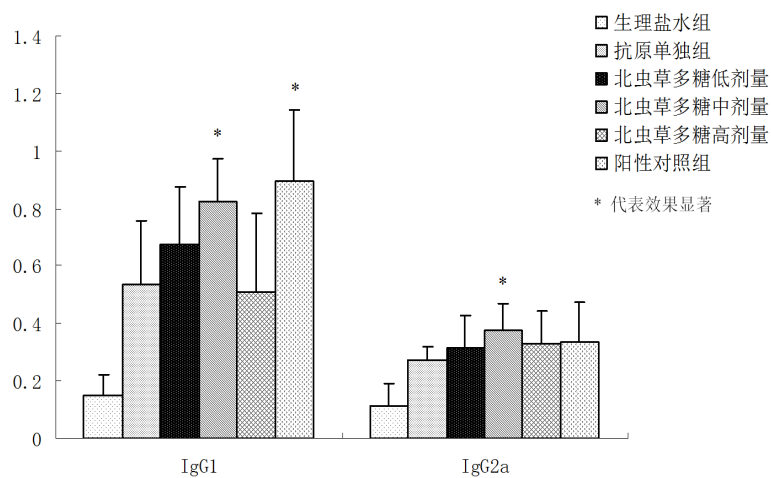
### 3. 结果与分析

#### 3.1. 北虫草多糖佐剂对血清特异性 IgG, IgG1 及 IgG2a 的影响

由图 1 可知, 北虫草多糖佐剂组均高于抗原单独免疫组, 而中剂量虫草多糖佐剂组与阳性对照组小鼠血清 IgG 抗体水平要显著高于抗原单独免疫组。由图 2 可知, 北虫草多糖低剂量组小鼠血清中 IgG1 和 IgG2a 水均显著高于抗原单独免疫组小鼠, 其它剂量多糖组在两种抗体亚类水平上均略高于抗原单独免疫组小鼠, 铝胶仅能诱导 Th2 型免疫反应, 而抗体亚类检测结果也反应出铝佐剂组小鼠仅有 IgG1 水平显著升高。



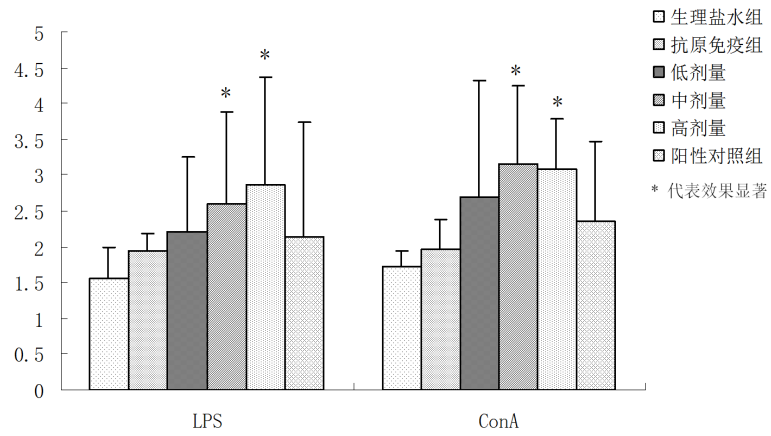
**Figure 1.** Effect of *Cordyceps militaris* Polysaccharide adjuvant on IgG antibody  
**图 1.** 北虫草多糖佐剂对 IgG 抗体的影响



**Figure 2.** Effect of *Cordyceps militaris* Polysaccharide adjuvant on IgG antibody  
**图 2.** 北虫草多糖佐剂对 IgG 抗体的影响

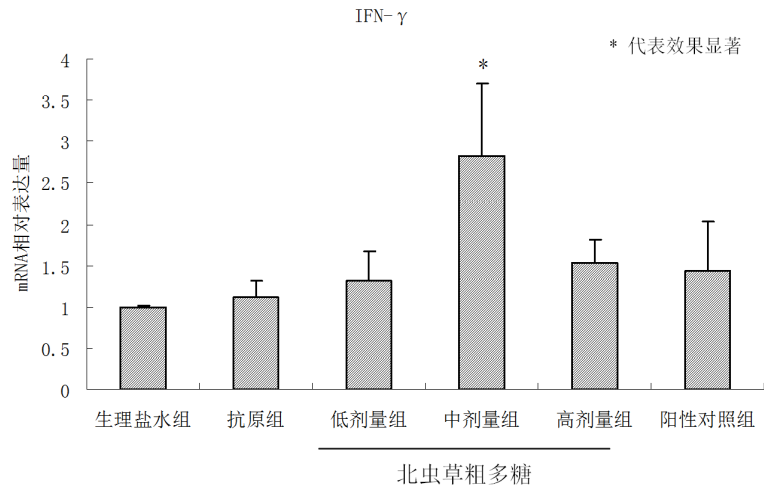
#### 3.2. 淋巴细胞转化试验结果

由图 3 可知, 北虫草多糖佐剂组小鼠 T/B 淋巴细胞均被激活, 尤其是中剂量组, 对淋巴细胞的刺激指数显著高于抗原单独免疫组。本结果提示, 北虫草多糖能有效激活机体免疫细胞, 对机体细胞免疫反应有促进作用。



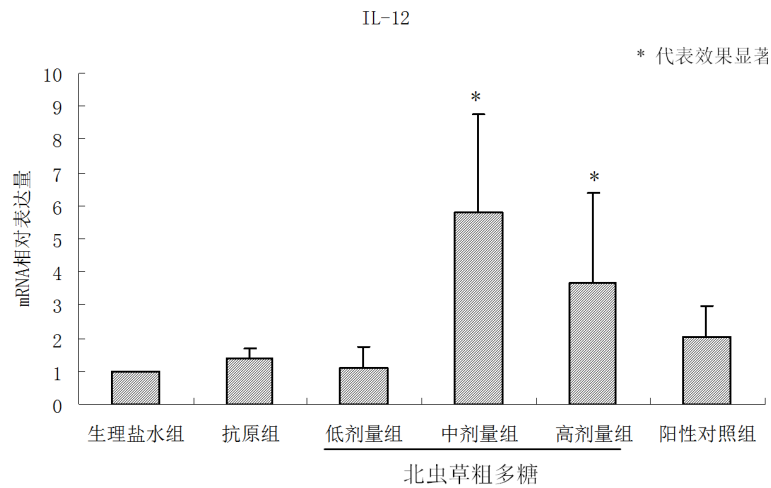
**Figure 3.** Effect of *Cordyceps militaris* Polysaccharide adjuvant on lymphocyte transformation

**图 3.** 北虫草多糖佐剂对淋巴细胞转化的影响



**Figure 4.** Effects of *Cordyceps militaris* Polysaccharide adjuvant on cytokines

**图 4.** 北虫草多糖佐剂对细胞因子的影响

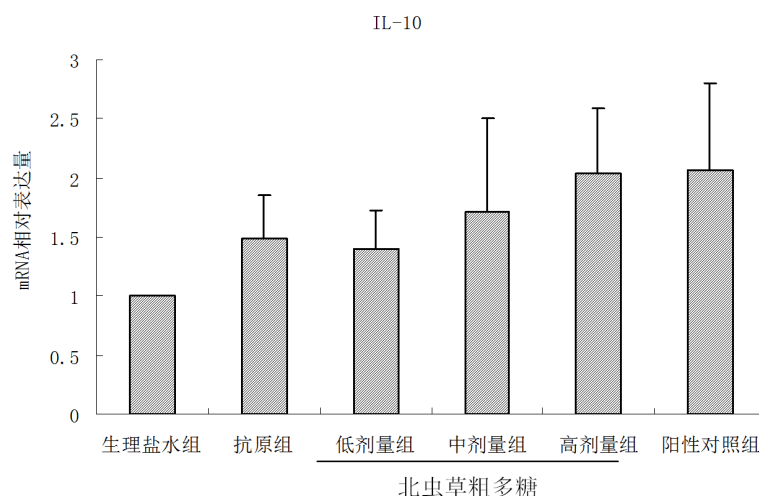


**Figure 5.** Effects of *Cordyceps militaris* Polysaccharide adjuvant on cytokine IL-12

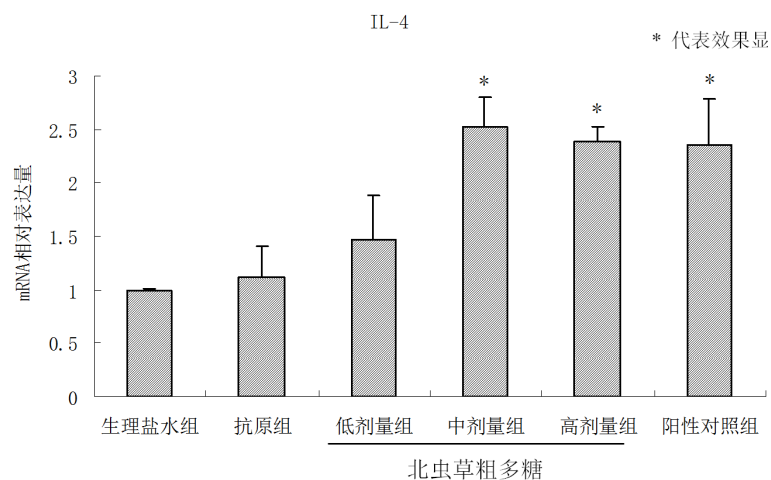
**图 5.** 北虫草多糖佐剂对细胞因子 IL-12 的影响

### 3.3. 北虫草多糖佐剂对各类细胞因子的影响

由图4、图5、图6及图7可知,北虫草多糖粗提物佐剂组能有效诱导IFN- $\gamma$ 、IL-12、IL-4,尤其是中剂量多糖佐剂组,所诱导的各种细胞因子mRNA表达水平要显著高于抗原单独免疫组。铝佐剂仅能诱导Th2类细胞因子IL-4和IL-10 mRNA的表达。



**Figure 6.** Effects of *Cordyceps militaris* Polysaccharide adjuvant on cytokine IL-10  
**图 6.** 北虫草多糖佐剂对细胞因子 IL-10 的影响



**Figure 7.** Effects of *Cordyceps militaris* Polysaccharide adjuvant on cytokine IL-4  
**图 7.** 北虫草多糖佐剂对细胞因子 IL-4 的影响

## 4. 小结与讨论

北虫草多糖可与红细胞膜上的受体结合,促进巨噬细胞的吞噬功能。虫草多糖脂质体对体外培养的外周血淋巴细胞,可单独或协同PHA(植物血凝素)诱导IL-2受体的表达,促进可溶性IL-2的生成,但对PHA诱生的IL-2有选择性抑制作用,提示其有双向调节作用。沈敏等研究表明,虫草多糖能使胸腺中不成熟CD4、CD8双阳性细胞发育为成熟的单阳性细胞,从而增加胸腺中CD<sup>4+</sup>和CD<sup>8+</sup>的数量[12]。

由本实验结果可以推测北虫草多糖能有效提高机体的体液免疫应答和细胞免疫应答反应,北虫草多糖对Th1和Th2类细胞因子均有明显的提升左右,表明机体的免疫应答机制可能被激活,另外北虫草多

糖可能对体液免疫和细胞免疫反应的平衡上具有一定的调节作用,能有效提高机体对疫苗的免疫应答反应。本实验结果与陈孜等关于人工虫草多糖对免疫抑制小鼠免疫调节作用的研究[13],证实人工虫草多糖能够拮抗环磷酰胺的免疫抑制作用,进而有效提高机体免疫功能结果相一致,将进一步开发利用北虫草多糖提供科学依据。

## 基金项目

国家蚕桑产业技术体系湖州综合试验站(CARS-18-SYZ06)。

## 参考文献

- [1] 吴畏,高新华,崔星明,等.北冬虫夏草(*Cordyceps militaris*)的研究应用概况(综述)[J].上海农业学报,2000,16(S1):99-104.
- [2] 盖国忠,金顺姬,王波,等.蛹虫草菌粉胶囊和金水宝胶囊对照治疗慢性支气管炎[J].中国新药杂志,2004,13(2):169-171.
- [3] 刘晓红,宋洁,栾宏伟,等.鲜蛹虫草与干蛹虫草抗氧化活性和活性物质差异研究[J].中国食用菌,2018,37(6):56-63.
- [4] 柴建萍,白兴荣,谢道燕.蛹虫草主要有效成分及其药理功效[J].云南农业科技,2003(4):22-23.
- [5] 刘华晶,许修宏,马怀良,等.蛹虫草菌丝体粗多糖提取方法初探[J].东北农业大学学报,2008,39(1):58-61.
- [6] 刘红锦,蒋宁,李建军,等.蛹虫草多糖提取及纯化工艺研究[J].江西农业学报,2009,19(12):80-82.
- [7] 吴光昊,王文.蛹虫草多糖的分离及免疫活性的研究[J].中国天然药物,2007,5(1):73-76.
- [8] 俞丽霞,张冰冰,阮叶萍,等.虫草多糖不同组分的免疫活性研究[J].浙江中医学院学报,2004,28(1):49-50.
- [9] Abd El Rahman, S., Winter, C., El-Kenawy, A., et al. (2010) Differential Sensitivity of Well-Differentiated Avian Respiratory Epithelial Cells to Infection by Different Strains of Infectious Bronchitis Virus. *Journal of Virology*, **84**, 8949-8952. <https://doi.org/10.1128/JVI.00463-10>
- [10] Autran, B., Carcelain, G., Combadiere, B., et al. (2004) Therapeutic Vaccines for Chronic Infections. *Science*, **305**, 205-208. <https://doi.org/10.1126/science.1100600>
- [11] 陈宇,郑纯威,陈国江,等.人参皂苷 Rg1 免疫佐剂作用的研究[J].军事医学科学院院刊,2009,33(3):251-253.
- [12] 沈敏,黄少翠,邱德凯,等.冬虫夏草多糖及脂质体包埋冬虫夏草多糖对大鼠淋巴细胞表面分子的影响[J].上海免疫学杂志,1991,11(4):200-203.
- [13] 陈孜,胡剑卓,邱细敏,等.人工虫草多糖对免疫抑制小鼠免疫调节作用的研究[J].湖南中医杂志,2017,33(12):134-136.