

人工培育的蝉花子实体对H22荷瘤小鼠免疫功能影响的研究

徐小璐¹, 郝文超², 乔伟伟^{2*}

¹郑州大学第一附属医院, 河南 郑州

²上海睿太莫斯生物科技有限公司, 上海

Email: *13817001707@163.com

收稿日期: 2020年7月15日; 录用日期: 2020年7月30日; 发布日期: 2020年8月7日

摘要

目的: 本试验主要研究人工培育的蝉花虫草子实体对H22荷瘤小鼠免疫功能的影响。方法: 40只ICR小鼠在腋下通过皮下接种H22肝癌小鼠腹水建立荷瘤小鼠的模型, 接瘤24 h后进行随机分组, 模型组、蝉花虫草子实体低、中、高剂量组、环磷酰胺阳性对照组, 每组8只小鼠, 共40只。蝉花虫草子实体低、中、高剂量组的小鼠分别按照75、150、450 mg/kg体重的剂量灌服蝉花虫草子实体生理盐水混悬液, 每天1次; 阳性对照组的小鼠按照20 mg/kg体重的剂量隔天腹腔注射环磷酰胺生理盐水溶液。连续给药14 d后, 测各组小鼠的瘤体积、瘤重、肿瘤抑制率、脾脏指数、胸腺指数、血清免疫球蛋白和细胞因子含量、脾T淋巴细胞增殖能力。结果: 各剂量组小鼠的瘤体积和瘤重均极显著低于模型组($P < 0.01$), 四组小鼠的肿瘤抑制率分别为49.13%、55.72%、56.53%、62.59%; 低、中剂量组小鼠脾脏指数和胸腺指数均高于模型组($P < 0.05$), 高剂量组小鼠胸腺指数高于模型组($P < 0.05$), 低剂量组OD值大于模型组($P < 0.05$); 中、高剂量组和阳性对照组小鼠血清中IgA、IgG、IgM、IL-2、IL-6和TNF- α 含量均高于模型组($P < 0.05$)。结论: 人工培育的蝉花虫草子实体通过调节小鼠的免疫功能抑制肿瘤的生长。

关键词

人工培育的蝉花虫草子实体, 免疫功能, H22荷瘤小鼠

Effects of Artificial Cultivated *Cordyceps cicadae* on Immune Function of H22 Tumor-Bearing Mice

Xiaolu Xu¹, Wenchao Hao², Weiwei Qiao^{2*}

¹The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou Henan

²Shanghai Rat & Mouse Bio-Tech Co., Ltd., Shanghai

*通讯作者。

Email: *13817001707@163.com

Received: Jul. 15th, 2020; accepted: Jul. 30th, 2020; published: Aug. 7th, 2020

Abstract

Objective: To study the effect of artificial cultured *Cordyceps cicadae* on immune function of H22 tumor-bearing mice. **Methods:** 40 ICR mice were randomly divided into groups after 24 h of tumor-bearing mice, 8 mice in each group with low, medium and high dose group and cyclophosphamide positive control group. At 75, 150, 450 mg/kg body weight, the mice in the low, medium and high dose groups were fed with the suspension of physiological saline of *Cordyceps cicadae* fruit, each 1 day; mice in the positive control group were intraperitoneally injected with cyclophosphamide saline solution every other day at a dose of 20 mg/kg body weight. The tumor volume, tumor weight, tumor inhibition rate, spleen index, thymus index, serum immunoglobulin and cytokine content, spleen T lymphocyte proliferation ability of mice in each group were measured after 14 d of continuous administration. **Results:** The tumor volume and tumor weight of mice in each dose group were significantly lower than those in the model group ($P < 0.01$). The tumor inhibition rate in the four groups was 49.13%, 55.72%, 56.53%, 62.59%, respectively. The gland index was higher than that of the model group ($P < 0.05$), the thymus index of the mice in the high dose group was higher than that in the model group ($P < 0.05$), and the OD value in the low dose group was higher than that in the model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Artificially cultivated *Cordyceps cicadae* can inhibit tumor growth by regulating immune function in mice.

Keywords

Artificially Cultivated *Cordyceps cicadae*, Immune Function, H22 Tumor-Bearing Mice

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

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



Open Access

1. 引言

蝉花虫草(*Cordyceps cicadae*)是我国一种名贵的传统中药材,在我国其应用的记载比冬虫夏草的还要早 200 年,至少已有 1500 多年的应用历史[1] [2]。有研究表明蝉花虫草具有改善肾功能、滋补强壮、免疫调节、抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、抗疲劳、抗应激及解热镇痛、镇静、降血糖、降血压等多种功效和药理作用[3]。蝉花虫草在抗肿瘤和改善人体免疫方面也有着重要的作用。但是由于蝉花虫草野生资源匮乏,野生蝉花虫草已经不能满足市场的需求。而人工培育的蝉花虫草解决了野生蝉花虫草资源紧缺的问题。陈安徽等[4]发现人工培育的蝉花虫草和基质的甲醇相均具有很强的抗肿瘤活性。目前人工培育的蝉花虫草对 H22 荷瘤小鼠免疫和抗肿瘤方面的研究尚未报道,本研究就人工培育的蝉花虫草进行对 H22 荷瘤小鼠免疫功能调节作用和抗肿瘤活性的初步研究。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 供试材料

样品: 人工培育的蝉花虫草子实体由浙江泛亚生命科学研究院提供。

实验动物:雌性 SPF 级 ICR 小鼠(实验动物生产许可证号为 SCXK(沪) 2017-0012,合格证号:0002012,初始体重 18~22 g)购买自上海吉辉实验动物饲养有限公司。实验操作完全按照实验动物护理指南进行,并由实验动物伦理委员会审查通过。H22 小鼠肝癌瘤株购于中国科学院。

2.1.2. 仪器与试剂

IgA、IgG、IgM、IL-2、IL-6 和 TNF- α 小鼠 ELISA 试剂盒购于上海博湖生物科技有限公司;环磷酰胺购于浙江省平湖市医药有限公司,批号 19120225;酶标仪(TECAN Infinite M200 Pro)购于瑞士帝肯公司。

2.2. 方法

2.2.1. H22 荷瘤小鼠模型的建立、分组

按照常规复苏方法复苏 H22 小鼠肝癌细胞,然后取 0.2 mL 的细胞悬液注射到雌性 ICR 小鼠腹腔内,连续传代 2 次获 H22 腹水瘤小鼠;再参考文献[5]的方法,在超净工作台中,取 H22 腹水瘤小鼠腹水,用生理盐水清洗后稀释成浓度为 1×10^6 /mL 细胞悬液,按照每只 0.2 mL 的接种剂量接种于经适应喂养 5 天后的 ICR 雌性小鼠的左侧腹部皮下。

40 只 ICR 雌性小鼠在接种瘤株 24 h 后进行随机分为 5 个组:模型组(Modle)、蝉花虫草子实体低、中、高剂量组、环磷酰胺阳性对照组(CTX),每组 8 只小鼠。

2.2.2. 给药

蝉花虫草子实体样品制备:分别取蝉花虫草子实体样品 1.5、3.0 和 9.0 g,分别用 1%的羧甲基纤维素钠配至 200 mL,分别配置成浓度为 0.0075 g/mL、0.015 g/mL 和 0.045 g/mL 的样品。

环磷腺苷注射液制备:精确称取注射用环磷酰胺 0.02 g,加生理盐水 10 ml 溶解稀释后,配置成浓度为 0.002 g/mL 的注射液。

给药方式及剂量:各组小鼠接种瘤株 24 h 后开始给药。模型组不给药,按照 0.10 ml/10g 的量仅给予蒸馏水,每天 1 次,连续 14 天。蝉花低剂量组给药量为 0.075 g/kg;蝉花中剂量组给药量为 0.15 g/kg;蝉花高剂量组给药量为 0.45 g/kg;灌胃容积为 0.10 ml/10g,每天 1 次,连续 14 天。阳性对照组腹腔注射环磷酰胺,按 20 mg/kg 体重的剂量,注射容积为 0.10 ml/10g,每 2 天注射 1 次,连续 14 天(分别第 1 d、3 d、5 d、7 d、9 d、11 d、13 d 注射)。

2.2.3. 瘤体积、瘤重和肿瘤抑制率测定

最后一次给药后的第二日,称体重后处死小鼠解剖取出瘤体,用游标卡尺测量瘤的体积并称取瘤重,计算肿瘤抑制率:

$$\text{肿瘤抑制率} = (\text{模型组平均瘤重} - \text{给药组平均瘤重}) / \text{模型组平均瘤重} \times 100\% \quad (1)$$

2.2.4. 脾脏指数、胸腺指数测定

在超净工作台中无菌取出小鼠脾脏和胸腺,电子天平称重并记录,计算脾脏和胸腺指数。

$$\text{脾脏指数(mg/g)} = \text{脾脏质量(mg)} / \text{小鼠体重(g)} \quad (2)$$

$$\text{胸腺指数(mg/g)} = \text{胸腺质量(mg)} / \text{小鼠体重(g)} \quad (3)$$

2.2.5. ELISA 法检测小鼠血清免疫球蛋白和细胞因子含量

小鼠摘眼球取血 0.5~1.0 ml, 4℃下 3000 r/min 离心 15 min,用移液枪仔细吸出血清置于-20℃保存备用,参照试剂盒说明书,利用酶联免疫(ELISA)法测定小鼠血清中 IgA、IgG、IgM、IL-2、IL-6 和 TNF α 的含量。

2.2.6. MTT 法检测小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖能力

无菌取出小鼠脾脏放入盛有预冷的 5 ml PBS 液的培养皿中, 再将脾脏置于不锈钢网(200 目)上, 低温用 5 ml 注射器针芯研压脾脏, 获脾细胞悬液后 4℃ 下 1500 r/min 离心 10 min, 弃上清; 加入 2~3 ml 冰预冷的红细胞裂解液充分打匀, 37℃ 破红细胞 5 min 后 1500 r/min 离心 7 min, 弃上清; 最后用 PBS 清洗细胞两次, 加入含 10% 小牛血清的 1640 培养液配成 1×10^6 /ml 脾细胞悬液。

ConA 诱导的 T 淋巴细胞增殖实验: 将脾细胞悬液分两孔加入 24 孔培养板中, 每孔 1 ml, 一孔加 75 μ l ConA 液, 另一孔作为对照, 置二氧化碳培养箱中培养 72 h。培养结束前 4 h, 每孔轻轻吸去上清液 0.7 ml, 加入 0.7 ml 不含小牛血清的 1640 培养液, 同时加入 MTT (5 mg/ml) 50 μ l/孔, 继续培养 4 h。培养结束后, 每孔加入 1ml 酸性异丙醇, 吹打混匀, 使紫色结晶完全溶解。然后分装到 96 孔培养板中, 每个孔做 3 个平行, 用酶标仪, 以 570 nm 波长测定光密度值。

2.2.7. 数据统计分析

结果用平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 所有数据均用 spss 统计软件进行单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3. 结果与分析

3.1. 瘤体积、瘤重和肿瘤抑制率的比较

在实验期间, 各个剂量组的小鼠活动均未出现异常。各剂量组小鼠的瘤体积和瘤重均极显著低于模型组($P < 0.01$); 蝉花虫草子实体低、中、高剂量组和阳性对照组的肿瘤抑制率分别为 49.13%、55.72%、56.53%、62.59%。见表 1。

Table 1. Comparison of tumor volume and tumor weight ($X \pm S$, $n = 8$)

表 1. 瘤体积、瘤重的比较($X \pm S$, $n = 8$)

组别	瘤体积(mm ³)	瘤重(g)
模型组	250.3 \pm 35.37	1.3860 \pm 0.2399
低剂量组	163.52 \pm 44.37**	0.8460 \pm 0.2938**
中剂量组	141.28 \pm 33.01**	0.8250 \pm 0.1836**
高剂量组	158.60 \pm 54.89**	0.8425 \pm 0.3418**
阳性对照组	151.39 \pm 33.63**	0.7260 \pm 0.2167**
F 值	5.895	5.028
P 值	0.0019	0.0067

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3.2. 脾脏指数、胸腺指数、ConA 诱导状态下的脾 T 淋巴细胞增殖反应的 OD 值比较

结果表明蝉花虫草子实体低、中剂量组小鼠脾脏指数显著高于模型组($P < 0.05$)。各个剂量组小鼠的胸腺指数和模型组的均有统计学意义($P < 0.05$), 其中蝉花虫草子实体低、中剂量组小鼠胸腺指数极显著高于模型组($P < 0.01$), 蝉花虫草子实体高剂量组小鼠胸腺指数显著高于模型组($P < 0.05$)。ConA 诱导状态下的脾 T 淋巴细胞增殖反应: 蝉花虫草子实体低剂量组和阳性对照组 OD 值显著大于模型组($P < 0.05$)。见表 2。

Table 2. Comparison of spleen index and thymus index ($X \pm S$, $n = 8$)**表 2.** 脾脏指数、胸腺指数的比较($X \pm S$, $n = 8$)

组别	脾脏指数(mg/g)	胸腺指数(mg/g)	OD 值
模型组	6.07 ± 0.60	1.36 ± 0.07	2.4650 ± 0.3220
低剂量组	14.55 ± 8.05*	1.81 ± 0.40**	2.8706 ± 0.2450*
中剂量组	13.87 ± 7.62*	1.86 ± 0.19**	2.7512 ± 0.2721
高剂量组	9.94 ± 1.61	1.71 ± 0.24*	2.7712 ± 0.1816
阳性对照组	5.64 ± 0.09	1.29 ± 0.023	2.8986 ± 0.2619*
F 值	3.612	5.627	2.615
P 值	0.0237	0.0031	0.0594

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3.3. 血清免疫球蛋白和细胞因子含量

各个剂量组小鼠血清中 IgA、IgG、IgM、IL-2、IL-6 和 TNF- α 含量与模型组的比较均有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中, 高剂量组和阳性对照组小鼠血清中 IgA、IgG、IgM、IL-2、IL-6 和 TNF- α 含量均极显著高于模型组 ($P < 0.01$), 中剂量组小鼠血清中 IgA、IL-2、IL-6 和 TNF- α 含量均极显著高于模型组 ($P < 0.01$); 中剂量组小鼠血清 IgG、IgM 含量显著高于模型组 ($P < 0.05$); 低剂量组小鼠血清 IgG 含量显著高于模型组 ($P < 0.05$)。见表 3。

Table 3. Contents of serum immunoglobulin and cytokines ($X \pm S$, $n = 8$)**表 3.** 血清免疫球蛋白和细胞因子含量($X \pm S$, $n = 8$)

组别	IgA ($\mu\text{g/ml}$)	IgG (mg/ml)	IgM ($\mu\text{g/ml}$)	IL-2 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
模型组	18.95 ± 2.37	1.65 ± 0.12	286.46 ± 9.52	22.61 ± 1.18	9.78 ± 0.55	3.48 ± 0.16
低剂量组	21.14 ± 2.87	2.21 ± 0.74*	347.80 ± 62.51	22.11 ± 4.69	10.25 ± 0.87	3.47 ± 0.19
中剂量组	28.05 ± 3.26**	2.56 ± 0.86*	419.00 ± 18.46*	32.96 ± 2.32**	14.07 ± 0.81**	4.71 ± 0.43**
高剂量组	36.87 ± 7.79**	3.11 ± 0.62**	523.52 ± 63.08**	35.75 ± 3.69**	17.18 ± 1.85**	5.58 ± 0.76**
阳性对照组	44.59 ± 6.61**	2.99 ± 0.97**	574.69 ± 66.54**	39.11 ± 1.25**	17.56 ± 3.54**	5.65 ± 1.03**
F 值	25.9090	3.741	9.718	34.451	21.727	16.852
P 值	0.0001	0.0138	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

4. 结论与讨论

免疫球蛋白是反映机体体液免疫功能的重要指标, 研究表明多种天然中药对免疫球蛋白 IgA、IgG、IgM 有着正向调节作用[6]。本研究中, 人工培育的蝉花虫草子实体能明显提高 H22 荷瘤小鼠血清中 IgA、IgG 和 IgM 含量, 说明人工培育的蝉花虫草子实体能通过调节免疫球蛋白的含量起到免疫保护作用; IL-2、IL-6 和 TNF- α 等细胞因子可通过结合相应受体调节细胞生长、分化, 调控免疫应答[7]。本研究中, 人工培育的蝉花虫草子实体可促进淋巴细胞的增殖, 增强巨噬细胞的吞噬能力, 并可刺激淋巴细胞 IL-2、IL-4 和巨噬细胞 TNF- α 的分泌效果, 间接提高 B 细胞、T 细胞、NK 细胞的免疫功能, 在抑制肿瘤生长的特异性免疫反应中起到重要作用[8]。

脾脏、胸腺是机体两个重要的免疫器官, 是淋巴细胞分化和成熟的重要场所, 其指数的大小一定程度上可以反映器官中免疫细胞的数量、体现免疫水平的高低, 反映机体免疫功能的强弱[9] [10] [11]; 同

时机体内淋巴细胞数量的增加及转化率的提高亦可促进淋巴因子的产生, 是反映机体细胞免疫功能的重要指标。本研究发现人工培育的蝉花虫草子实体能显著提高 H22 荷瘤小鼠的脾脏和胸腺指数, 促进小鼠免疫器官的发育, 增强免疫功能; 人工培育的蝉花虫草子实体能在 ConA 诱导状态下提高脾 T 淋巴细胞增殖能力, 进而激活和促进脾淋巴细胞的增殖分化从而增强细胞免疫功能。

人工培育的蝉花虫草子实体极显著的降低了 H22 荷瘤小鼠的瘤体积和瘤重, 其中低、中、高剂量组的肿瘤抑制率分别为 49.13%、55.72%、56.53%, 已非常接近阳性对照组 62.59%的抑瘤率, 具有良好的抗肿瘤效果。综上所述, 推断人工培育的蝉花虫草子实体抗肿瘤机制可能与其能促进机体的免疫系统活性有关, 可促进肿瘤细胞的凋亡达到抗肿瘤的效果, 并对免疫系统有着一定程度的保护和修复作用。人工培育的蝉花虫草子实体在体内的抗肿瘤作用也可能还存在其他的作用机制, 需要做进一步的研究。

参考文献

- [1] 郑依玲, 梅全喜, 李文佳, 等. 冬虫夏草的药用历史及现代服用方法探讨[J]. 中药材, 2017, 40(11): 2722-2725.
- [2] 雷教. 雷公炮炙论[M]. 淮海: 江苏科学技术出版社, 1985.
- [3] 陈祝安, 李增智, 陈以平. 金蝉花[M]. 北京: 北京中医古籍出版社, 2014.
- [4] 陈安徽, 邵颖, 等. 人工培育蝉花虫草的抗肿瘤活性[J]. 食品科学, 2015, 36(9): 194-196.
- [5] 张园园, 方肇勤, 王艳明. 不同治疗方案对 H22 肝癌荷瘤小鼠的疗效比较 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(3): 67-77.
- [6] Tong, C.Y., Sun, Y.C., Qin, X.G., *et al.* (2013) Immunomodulatory Effects of Asparagus Polysaccharides on Cyclophosphamide-Induced Immunosuppressive Mice. *Natural Product Research and Development*, **25**, 1112-1114.
- [7] Lin, W.W. and Kari, M. (2007) A Cytokine-Mediated Link between Innate Immunity, Inflammation, and Cancer. *Journal of Clinical Investigation*, **117**, 1175-1181. <https://doi.org/10.1172/JC131537>
- [8] Wang, G., Zhao, J., Liu, J., *et al.* (2007) Enhancement of IL-2 and IFN- γ Expression and NK Cells Activity Involved in the Anti-Tumor Effect of Ganoderic Acid Me *in Vivo*. *International Immunopharmacology*, **7**, 864-870. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.02.006>
- [9] Chen, X.M., Nie, W.J., Yu, G.Q., *et al.* (2012) Antitumor and Immunomodulatory Activity of Polysaccharides from *Sargassum fusiforme*. *Food and Chemical Toxicology*, **50**, 695-700. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.11.015>
- [10] 梁永林, 吴玉泓, 殷银霞, 等. 久泻灵对小鼠胸腺、脾脏重量及单核细胞吞噬功能影响的实验研究[J]. 中国老年学杂志, 2006, 26(1): 85-86.
- [11] 王朝兰, 刘向国, 方正清. 等. 补肺汤对 COPD 肺气虚证模型大鼠胸腺指数和脾脏指数的影响[J]. 甘肃中医学院学报, 2011(3): 1-4.