

# Effects of Artificial Cultured Cicada Flower Fruiting Body on Immune Function in Mice

Guoyin Kai<sup>1</sup>, Wei Zhou<sup>1</sup>, Yanfang Sun<sup>2\*</sup>, Youjiu Tan<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou Zhejiang

<sup>2</sup>Zhejiang University of Technology, Hangzhou Zhejiang

<sup>3</sup>Jiangsu BioAsia Cordyceps Health Farm Co., Ltd., Huai'an Jiangsu

Email: kaiguoyin@163.com, \*katherineyfs@sina.com

Received: Jul. 25<sup>th</sup>, 2020; accepted: Jul. 27<sup>th</sup>, 2020; published: Aug. 4<sup>th</sup>, 2020

## Abstract

**Purpose:** To study the effect of artificial cultured cicada flower fruiting body on immune function of mice. **Methods:** Three dose groups were set up, which were 0.083 g/kg, 0.167 g/kg, 0.5 g/kg, equivalent to 5 times, 10 times and 30 times of the recommended intake of human body. Distilled water was used as negative control group for carbon clearance, mouse peritoneal macrophage phagocytosis of chicken red blood cells and NK cell activity identification. **Results:** Compared with the control group, the middle and high dose groups could increase the phagocytosis index of mice ( $P < 0.05$ ). The NK cell activity in the dose group was improved, and the difference was significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Cicada flower entity could enhance the phagocytosis of macrophages and kill activity of NK cells.

## Keywords

Artificial Culture, *Cordyceps cicadae*, Fruiting Body, Immune Function

# 人工培养的蝉花子实体对小鼠免疫功能影响的研究

开国银<sup>1</sup>, 周伟<sup>1</sup>, 孙延芳<sup>2\*</sup>, 谭悠久<sup>3</sup>

<sup>1</sup>浙江中医药大学, 浙江 杭州

<sup>2</sup>浙江理工大学, 浙江 杭州

<sup>3</sup>江苏泛亚虫草健康农场有限公司, 江苏 淮安

Email: kaiguoyin@163.com, \*katherineyfs@sina.com

收稿日期: 2020年7月25日; 录用日期: 2020年7月27日; 发布日期: 2020年8月4日

\*通讯作者。

## 摘要

目的：研究人工培养的蝉花子实体对小鼠免疫功能的影响。方法：实验设低、中、高3个剂量组，分别为0.083 g/kg、0.167 g/kg、0.5 g/kg，相当于人体推荐摄入量的5倍、10倍和30倍，取蒸馏水作为阴性对照组，进行碳廓清实验，小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验以及NK细胞活性鉴定实验。结果：与对照组相比，中、高剂量组均能提高小鼠的吞噬指数( $P < 0.05$ )；蝉花虫草子实体中剂量组和高剂量组NK细胞活性提高，差异均有显著性差异( $P < 0.05$ )。结论：蝉花子实体能增强巨噬细胞的吞噬能力和NK细胞的杀伤活性。

## 关键词

人工培养，蝉花，子实体，免疫功能

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

蝉花是我国传统名贵的中药材，也是我国重要的食、药用菌，是虫草科真菌蝉棒束孢寄生在蝉上形成的一种虫草菌[1] [2]，可用于散风热、镇惊、明目等。谢飞等研究表明蝉花多糖可以抑制体外培养的 HeLa 细胞，当多糖的质量浓度为 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时，其抑制率最高达到 61%；当多糖给药剂量为 200  $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$  时，对 S180 荷瘤小鼠抑瘤率达到 42.9% [3]；宋捷民等研究表明蝉花提取液能显著提高 ICR 小鼠体液免疫功能，同时明显提高 ICR 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能作用[4]。宋佳敏等研究显示蝉花多糖对因环磷酰胺引起的免疫抑制小鼠有明显的免疫调节功能[5]。天然蝉花在改善人体免疫系统方面发挥着重要的作用，但天然蝉花的资源并不是很充足，应运而生的是人工培养的蝉花。本研究旨在通过动物实验探讨人工培养蝉花对小鼠免疫功能的影响，以期为人工培养的蝉花在食品和保健品的开发利用方面提供一定的科学依据。

## 2. 材料与方方法

### 2.1. 材料

#### 2.1.1. 供试材料

样品：本实验所需蝉花子实体由浙江泛亚生命科学研究院通过液固双向发酵生产培养而得。

实验动物：ICR 小鼠，初始体重 18~22 g，雄性 SPF 级，由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供，实验动物生产许可证号 SCXK(沪) 2017-0005，合格证号：20170005023759，20170005025270。屏障实验室，温度 20℃~25℃，相对湿度 40%~70%。

#### 2.1.2. 仪器与试剂

仪器：离心机，酶标仪，手术器械，血色素吸管，显微镜，培养箱，200 目筛网，超净工作台，U 型 96 孔培养板，平底 96 孔培养板。

试剂：印度墨汁， $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液，1%羧甲基纤维素钠溶液，20%鸡红细胞悬液，生理盐水，丙酮，甲醇，Giemsa 染液，Hank's 液，RPMI1640 完全培养液，小牛血清，冰醋酸，台酚兰染液，2.5% Triton。

## 2.2. 方法

按照《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版)的规定检测指标。

### 2.2.1. 剂量选择、受试样品给药方式和时间

蝉花子实体的人体推荐摄入量 1.0 g/d, 按人体平均 60 kg 计, 剂量为 0.0166 g/kg。以人体推荐量的 5 倍为低剂量组(0.083 g/kg), 10 倍为中剂量组(0.167 g/kg), 30 倍为高剂量组(0.5 g/kg), 以蒸馏水作为阴性对照组。分别取样品 1.67 g、3.33 g 及 10.0 g 以 1%羧甲基纤维素钠溶液定容至 200 mL, 灌胃给药, 灌胃体积为 0.10 mL/10g。连续 30 天每天给药 1 次。

### 2.2.2. 小鼠碳廓清实验

将不同剂量样品每天一次通过灌胃方式给予小鼠, 连续进行 30 d, 灌胃结束后第二天, 将印度墨汁用生理盐水稀释 3~4 倍, 然后从小鼠尾静脉按 0.1 ml/g 的剂量注入, 并马上开始计时。

在计时至 2 min (t1)时, 从小鼠眼眶静脉丛采集血液 20  $\mu$ L, 加到 2 mL 0.1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液中, 以 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液为空白对照, 在 600 nm 波长处进行光密度值(OD)检测, 以 OD1 表示。在计时至 10 min (t2)时, 重复上述操作, 光密度值(OD)结果以 OD2 表示。

10 分钟采血结束后断颈处死小鼠, 剪开小鼠腹腔, 取出肝脏和脾脏, 将两者用吸水纸吸拭干净, 分别称重。按如下式计算吞噬指数 a, 其能代表小鼠碳廓清的能力, 反应巨噬细胞的吞噬功能[6]。

$$K = \frac{\lg OD1 - \lg OD2}{t2 - t1} \quad (1)$$

$$\text{吞噬指数} a = \frac{\text{体重}}{\text{肝重} + \text{脾重}} \times \sqrt[3]{K} \quad (2)$$

### 2.2.3. 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验(半体内法)

小鼠以 2.2.1 的方式给药, 给药结束后第二天往小鼠腹腔注射 1 ml 20%的鸡红细胞悬液, 等待 30 min 后, 将小鼠颈椎脱臼处死并仰面固定在鼠板上, 腹壁剪一小口, 向其中注射 2 ml 生理盐水, 匀速转动鼠板 1 min, 吸出 1 ml 腹腔液, 平均滴于 2 片载玻片上。

搪瓷盒内垫上润湿的纱布, 将载玻片放于其中, 然后将搪瓷盒置于 37℃培养箱 30 min, 之后取出载玻片用生理盐水漂洗, 漂洗次数尽量保持一致, 漂洗好后静置等待自然晾干, 然后置于丙酮: 甲醇 1:1 液中固定 5 min, 再用 4% Giemsa 磷酸缓冲液染色 3 min, 染色完后用蒸馏水漂洗, 漂洗次数仍尽量保持一致, 然后静置晾干。

将晾干后的玻片置于高倍镜下, 观察巨噬细胞吞噬情况, 并计数, 每张玻片计数 100 个, 每个视野计数完整, 视野不重复。以所得数据计算吞噬指数和吞噬百分率, 计算公式如下:

$$\text{吞噬指数} = \frac{\text{被吞噬的鸡红细胞总数}}{\text{计数的巨噬细胞数}} \quad (3)$$

$$\text{吞噬百分率}(\%) = \frac{\text{吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数}}{\text{计数的巨噬细胞数}} \times 100\% \quad (4)$$

### 2.2.4. NK 细胞活性测定-乳酸脱氢酶(LDH)测定法

YAC-1 靶细胞传代培养。24 h 后, 无菌条件下取小鼠脾脏, 在盛有无菌 Hank's 液的小平皿中磨碎, 得到单细胞悬液, 后用 200 目筛网过滤, 用 Hank's 液洗并 1000 r/min 离心 10 分钟 2 次, 弃上清, 弹起余下的细胞浆, 以 0.5 mL 灭菌水裂解红细胞 20 s; 之后加入 0.5 mL 2 倍 Hank's 液及 8 ml Hank's 液, 离心 10 min (1000 r/min);

用 1 mL 含 10% 小牛血清的 RPMI1640 完全培养液重悬; 1% 冰醋酸稀释, 台盼兰染色, 同时计数活细胞数, 确保活细胞数大于 95%; 然后用 RPMI1640 完全培养液将细胞稀释为  $2 \times 10^7$  个/ml。

靶细胞以 Hank's 液洗 3 次, RPMI1640 完全培养液稀释至  $4 \times 10^5$  个/ml。

取 U 型 96 孔培养板, 设置 3 个反应孔、3 个靶细胞自然释放孔、3 个靶细胞最大释放孔; 分别加靶细胞和效应细胞各 100ul、靶细胞和培养液各 100  $\mu$ L、靶细胞和 2.5% Triton 各 100  $\mu$ L, 后在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 4 h。

培养完毕后离心 5 min (1500 r/min), 每孔吸取上清 100  $\mu$ L 于平底 96 孔培养板中, 加入 100  $\mu$ L LDH 基质液, 反应 8 min, 再加 30  $\mu$ L 1 mol/L 的稀盐酸, 在 490 nm 处测定光密度值(OD), 计算 NK 细胞活性, 公式如下:

$$NK\text{细胞活性}(\%) = \frac{\text{反应孔}OD - \text{自然释放孔}OD}{\text{最大释放孔}OD - \text{自然释放孔}OD} \times 100\% \quad (5)$$

### 2.2.5. 数据统计分析

实验数据用 Excel 统计, 并以均值 $\pm$ 标准差表示, 实验结果用 SPSS 统计分析软件进行方差齐性检验和数据分析,  $P < 0.05$  则认为具有统计学上显著差异,  $P < 0.01$  则认为具有统计学上极显著差异。

### 2.2.6. 动物伦理

本动物实验获得上海睿太莫斯生物科技有限公司实验动物福利与伦理委员会批准。

## 3. 结果与分析

研究表明, 人工培养的蝉花子实体可明显提高小鼠机体免疫力。

### 3.1. 蝉花子实体不同剂量样品对小鼠碳廓清实验吞噬指数影响

原始数据符合方差齐性要求( $P > 0.05$ ), 数据处理结果如下表 1 所示, 从表 1 可知, 人工培养的蝉花虫草子实体无论是低剂量组、中剂量组、还是高剂量组的吞噬指数, 均与阴性对照组具有显著差异( $P < 0.05$ ), 能显著提高小鼠的碳廓清吞噬指数, 表明人工培养的蝉花子实体能明显促进小鼠的碳廓清功能。

**Table 1.** Effect of cicada fruit body on carbon clearance in mice (mean  $\pm$  SD,  $n = 10$ )

**表 1.** 蝉花子实体对小鼠碳廓清的影响(均值 $\pm$ 标准差,  $n = 10$ )

组别	剂量(g/kg)	吞噬指数
阴性对照组	蒸馏水	1.88 $\pm$ 0.50
低剂量组	0.083	3.00 $\pm$ 0.51*
中剂量组	0.167	2.61 $\pm$ 0.44*
高剂量组	0.5	2.51 $\pm$ 0.16*

注: 与阴性对照组比较, \* $P < 0.05$ 。

### 3.2. 蝉花子实体对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的影响

吞噬百分率通过  $X = \sin^{-1} P/2$  进行数据转换, 转换后的数据符合方差齐性要求( $P > 0.05$ ), 吞噬指数原始数据符合方差齐性要求( $P > 0.05$ ), 数据处理结果如下表 2 所示。由表 2 可知, 人工培养的蝉花虫草子实体的中剂量组和高剂量组的吞噬百分率和吞噬指数与阴性对照组相比较均存在极显著的差异( $P < 0.01$ ), 而低剂量组差异不大。说明人工培养的蝉花虫草子实体在中高剂量情况下能显著增强小鼠巨噬细胞的吞噬能力, 从而增强免疫。

**Table 2.** Effect of cicada flower fruiting body on phagocytosis of chicken red blood cells by mouse macrophages  
**表 2.** 蝉花子实体对小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞的吞噬能力的影响

组别	剂量(g/kg)	吞噬百分率(已进行数据转换)	吞噬指数
阴性对照组	蒸馏水	0.20 ± 0.02	0.32 ± 0.01
低剂量组	0.083	0.23 ± 0.02	0.33 ± 0.01
中剂量组	0.167	0.31 ± 0.03**	0.35 ± 0.01**
高剂量组	0.5	0.36 ± 0.03**	0.40 ± 0.02**

注：与阴性对照组比较，\*\* $P < 0.01$ 。

### 3.3. 蝉花子实体对小鼠 NK 细胞活性的影响

NK 细胞活性通过  $X = \sin^{-1}P/2$  进行数据转换，转换后的数据符合方差齐性要求( $P > 0.05$ )，数据处理结果如下表 3。从表 3 我们可以看到人工培养的蝉花虫草子实体其中剂量组的 NK 细胞活性与阴性对照组比较有显著性差异( $P < 0.05$ )，高剂量组有极显著差异( $P < 0.01$ )，而低剂量组没有显著差异。说明在一定范围内，NK 细胞活性随蝉花子实体剂量的提高而上升，从而提高机体免疫能力。

**Table 3.** Effect of cicada fruit body on NK cell activity in mice  
**表 3.** 蝉花子实体对小鼠 NK 细胞活性的影响

组别	剂量(g/kg)	NK 细胞活性(%)
阴性对照组	蒸馏水	35.27 ± 4.85
低剂量组	0.083	39.58 ± 6.55
中剂量组	0.167	43.58 ± 3.97*
高剂量组	0.5	54.66 ± 3.11**

注：与阴性对照组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ 。

## 4. 结论与讨论

蝉花在免疫方面已有不少的研究，但是多数局限于实验室的初步研究。杜金莎等研究表明人工培养的蝉花子实体能促进小鼠脏器指数提高，明显提高 NK 细胞活性和巨噬细胞吞噬能力，进一步说明对机体免疫功能有明显的提高[7]。李思迪等研究发现蝉花水提物以及复方均能明显增加小鼠免疫器官脾脏、胸腺指数，促进淋巴细胞增殖反应，提高巨噬细胞吞噬功能[8]。李成等的研究表明蝉花片可明显提高小鼠细胞免疫功能、体液免疫功能、单核巨噬细胞功能及 NK 细胞活性，证明蝉花片对小鼠具有显著的免疫调节作用[9]。本实验结果显示人工培养的蝉花子实体无论低剂量组、中剂量组、高剂量组均能显著促进小鼠的碳廓清功能( $P < 0.05$ )；与阴性对照组比较，人工培养的蝉花子实体中剂量组和高剂量组均能提高小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞的吞噬率、吞噬指数，且均有极显著差异( $P < 0.01$ )；在增强 NK 细胞活性方面，人工培养的蝉花虫草子实体中剂量组和高剂量能显著和极显著( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )地提高 NK 细胞活性，其结果与李成等的研究结果相似，本实验进一步说明了蝉花子实体可能在增强机体免疫功能方面发挥着重要的作用，为蝉花的进一步开发奠定了坚实的基础。

通过小鼠单核巨噬细胞功能测定的两个试验表明人工培养的蝉花子实体可以提高巨噬细胞的吞噬能力；NK 细胞活性测定则说明人工培养的蝉花子实体可以促进 NK 细胞杀伤活性。实验结果显示蝉花子实体可能对小鼠免疫调节方面发挥促进的作用，从而进一步增强机体免疫功能。

上述实验说明,人工固体培养的蝉花子实体在增强免疫力方面具有广阔的应用前景,本文为人工培养蝉花在食品和保健品的开发利用方面提供了一定的科学依据。

## 基金项目

浙江省基础公益研究计划项目(No. LGN20H280004),浙江省一流学科(中药学)科研开放基金项目(No. ZYAOX2018005)。

## 参考文献

- [1] 蒋宁,高大伟,林金盛,等. 蝉花的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(8): 11-14.
- [2] Chen, W.C. and Chen, G.L. (1994) Study of *Cordyceps cicadae*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, **25**, 269-271.
- [3] 谢飞,李伟,陈美珍,等. 野生蝉花多糖抗肿瘤活性及其作用机制[J]. 食品科学, 2016, 37(13): 209-213.
- [4] 宋捷民,陈玲,陈玮,等. 蝉花对免疫功能影响的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2007(1): 37-38.
- [5] 宋佳敏,王鸿飞,罗洁,等. 金蝉花多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 核农学报, 2018, 32(10): 1977-1983.
- [6] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[M]. 北京: 卫生部卫生法制与监督司, 2003.
- [7] 杜金莎,吕中明,王民生,等. 蝉花子实体对小鼠免疫功能的影响[J]. 江苏医药, 2013, 39(18): 2117-2119.
- [8] 李思迪,盛益华,张忠亮,等. 蝉花水提物及蝉花复方对小鼠免疫功能影响的实验研究[J]. 药物评价研究, 2020, 43(4): 636-641.
- [9] 李成,彭国杰,金雷,等. 蝉花宝牌蝉花片免疫功能评价[J]. 安徽农业大学学报, 2018, 45(1): 161-165.