

蜜环菌饮料对机体活性的调节作用

刘洪娜¹ 朱伟¹ 谭周进^{1*} 彭运祥² 王春晖² 申可佳¹

(1. 湖南中医药大学 基础医学院 湖南 长沙 410208)

(2. 湖南省食用菌研究所 湖南 长沙 410013)

摘要: 为了研究蜜环菌饮料对小鼠机体功能的影响, 采用环磷酰胺(CY)造模法制作小鼠免疫抑制模型, 通过灌胃不同剂量蜜环菌饮料, 研究对小鼠机体免疫功能的影响, 同时通过测定实验小鼠肠道中细菌总数、大肠杆菌数、乳酸菌和双歧杆菌数等, 分析不同剂量的蜜环菌饮料对肠道菌相的影响, 最后对小鼠进行了急性毒性试验研究, 以检测饮料有无毒副作用。结果表明蜜环菌饮料可明显提高小鼠脾脏和胸腺指数, 促进脾脏及胸腺的发育, 促进巨噬细胞的吞噬活性, 明显增强小鼠的免疫功能, 同时还能促进小鼠肠道有益菌的生长, 改善肠道微生物区系环境, 饮料没有对小鼠产生任何的毒副作用。证明蜜环菌饮料不仅增强机体免疫功能, 同时还增强肠道功能, 保持和促进机体健康。

关键词: 蜜环菌饮料, 多糖, 免疫功能, 肠道微生物

Studied on the regulating action of *Armillaria mellea* beverage on the body

LIU Hong-Na¹ ZHU Wei¹ TAN Zhou-Jin^{1*} PENG Yun-Xiang² WANG Chun-Hui²
SHEN Ke-Jia¹

(1. College of Basic Medicine, TCM University of Hunan, Changsha, Hunan 410208, China)

(2. Edible Mushroom Institute of Hunan, Changsha, Hunan 410013, China)

Abstract: In order to study the effect of *Armillaria mellea* beverage on mice organic function, the model of immunosuppression was produced by cyclophosphamide (CY) modeling method. The immune function was studied by feeding different doses of *Armillaria* drinks. Meanwhile the total number of bacteria, *E. coli*, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* was measured. And the effects of *Armillaria* drinks on intestinal microflora were analyzed. Finally the toxicity test of the drinks was detected. Results showed that *Armillaria* drinks could significantly enhanced immune function, including promoting the development of spleen and thymus, spleen and thymus index, promoting phagocytic activity of macrophages. Meanwhile it could also promote the growth of beneficial flora, improve the intestinal

基金项目: 长沙市科技局项目(No. k0803270-31)

* 通讯作者: Tel: 86-731-85381154; ✉: tanzhjin@sohu.com

收稿日期: 2010-11-22; 接受日期: 2011-02-14

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

microbial flora environment. *Armillaria* drinks did not produce any toxic effects on mice. *Armillaria* drinks enhanced not only immune function but also bowel function, maintaining and promoting the health of the body.

Keywords: *Armillaria* beverages, Polysaccharide, Immune function, Intestinal microbes

蜜环菌(*Armillaria mellea*)又名蜜环蕈、榛蘑,属担子菌亚门(Basidiomycotian)、伞菌目(Agaricales)、白蘑科(Trichlomataceae)、蜜环菌属^[1]。蜜环菌菌体中富含多种生理活性物质,近年来的研究发现,蜜环菌与天麻都具有增智、健脑^[2]和延缓衰老的作用^[3],是一种重要的药食兼用的真菌。国内外对蜜环菌菌丝体化学成分、蜜环菌多糖理化性质及结构和生物学功能等进行了研究^[4],其所含多糖具有抗辐射、促进造血机能^[5]、调节免疫功能、抑制肿瘤生长等药理和保健功能^[6]。Troy EB等^[7]通过研究发现,多糖不仅能够促进机体肠道有益菌群的生长,还能够激活T细胞依赖的免疫反应,调节免疫系统,起到免疫促进的作用。Sun Y等^[8]对蜜环菌胞外多糖的结构及其免疫活性进行了研究,表明蜜环菌多糖能显著促进小鼠淋巴细胞的增殖,对小鼠的免疫系统起到了正向调节作用。本文研究了蜜环菌饮料对机体免疫作用及肠道微生物的影响,进一步阐明蜜环菌的药用价值,为更好地开发研制菌类保健食品和药品提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂:蜜环菌饮料为本实验室制备(饮料中主要成分为多糖 0.049 g/L,蛋白质为 0.053 g/L,氨基酸为 1.226 g/L,还原糖为 0.109 g/L);鸡红细胞(CRBC); 0.1% Na₂CO₃溶液; 5倍稀释的墨汁;丙酮;甲醇; 4%吉姆萨染液;环磷酰胺(CY);营养琼脂培养基;伊红美蓝琼脂(EMB)^[9]。

1.1.2 仪器:离心机,高压蒸汽消毒器,恒温培养箱,超净工作台。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及给药方法:昆明小鼠(SCXK湘 2009-0004) 50只, 20±2 g,雌雄各半。上述小鼠随机分为 5组,每组 10只, A-空白对照组; B-模型组

(CY 免疫抑制); C-蜜环菌饮料低剂量组; D-蜜环菌饮料中剂量组; E-蜜环菌饮料高剂量组^[10], 首先进行环磷酰胺造模, B、C、D、E组分别每天腹腔注射 4%环磷酰胺 0.2 mL; 连续注射 3 d^[11]。待小鼠免疫力降低后, 每天 A-空白对照组和 B-模型组(灌胃生理盐水 0.2 mL/d), C组每天灌胃蜜环菌饮料 0.2 mL, D组每天灌胃 2次饮料, 每次 0.2 mL, E组每天灌胃 3次饮料, 每次 0.2 mL, 连续灌胃 7 d。

1.2.2 小鼠碳粒廓清实验^[12]:小鼠尾静脉注入 5倍稀释的墨汁 0.2 mL, 分别于 2 min 和 10 min 后从眼眶后取血 20 μL, 加入到 2 mL 0.1% Na₂CO₃溶液摇匀, 650 nm 波长处测光密度值(OD), 正常小鼠血加 Na₂CO₃溶液作空白对照^[5], 按下式计算廓清指数 k 。

$$k=(\lg A_2-\lg A_{10})/(t_{10}-t_2)$$

1.2.3 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力的影响^[12]:腹腔注入 0.5 mL 5%鸡红细胞悬液, 1 h 后, 颈椎脱臼处死小鼠, 腹腔注入生理盐水 2 mL, 轻柔小鼠腹部, 吸取腹腔冲洗液滴片, 滴片放入垫有湿纱布的平皿 37 °C 温育 30 min, 然后用生理盐水冲洗干燥, 1:1 丙酮:甲醇溶液固定 5 min, 4%吉姆萨染液染 3 min, 油镜观察计数 100 个吞噬细胞中吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数, 计算吞噬百分率, 计算式如下:

$$T=T_1 \times 100\% / 100 (\text{巨噬细胞数})$$

式中: T —巨噬细胞的吞噬率(%);

T_1 —吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数。

1.2.4 对小鼠免疫器官胸腺、脾脏指数的影响^[13-14]:小鼠称重, 取脾脏、胸腺, 称重, 并计算脏器指数, 计算公式如下:

$$\text{脾指数} = \text{脾重量(g)} / \text{小鼠的体重(g)} \times 100\%$$

$$\text{胸腺指数} = \text{胸腺重量(g)} / \text{小鼠的体重(g)} \times 100\%$$

1.2.5 蜜环菌饮料对小鼠肠道微生物的影响:将处死的小鼠立即置于超净工作台上, 无菌采集各组从空肠到直肠的一段肠道, 并尽快按组放入无菌匀浆机内磨碎, 取出后分别放入无菌玻璃小瓶内备

用。3 种微生物均采用平板菌落计数, 求其平均值并计算每克肠道内容物所含的细菌数^[15]。选择合适的稀释度, 采用混菌法计数, 细菌总数及大肠杆菌在 37 °C 培养箱中培养 24 h 后计数菌落, 双歧杆菌及乳酸菌厌氧培养 48 h 后计数菌落, 每一个稀释度做 3 个重复, 求其平均值并计算每克肠道内容物所含的菌数^[16]。

1.2.6 急性毒性实验研究: 因为蜜环菌饮料是毒性很小或者可以说是无毒的受试物, 根据资料采用最大耐受剂量法进行急性毒性试验研究, 20 只昆明小鼠雌雄各半, 随机分为两组: 空白对照组和实验组, 空白对照组灌胃 0.4 mL 生理盐水, 实验组一次灌胃 0.4 mL 蜜环菌饮料, 观察其行为表现、体重、皮毛的色泽及形状、对各种刺激的反应、胃肠道反应、食欲、大小便的状况及颜色、呼吸系统的状况、瞳孔大小、眼睑的状况等, 连续观察 7 d, 判定是否有毒副作用^[17]。

1.2.7 数据处理: 统计学分析采用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 蜜环菌饮料对小鼠吞噬细胞吞噬功能的影响

蜜环菌饮料对实验各组小鼠碳粒廓清指数及吞噬鸡红细胞率的影响见表 1, 从表 1 可以看出, 与空

白对照组相比, 模型组的碳粒廓清指数和鸡红细胞吞噬百分率都有所下降, 且差异显著($P<0.05$), 说明环磷酰胺抑制了小鼠的免疫力造模成功, 同时蜜环菌饮料中剂量组和高剂量组均能显著提高小鼠腹腔巨噬细胞对鸡红细胞的吞噬百分率, 具有极显著性差异($P<0.01$), 蜜环菌低剂量组碳粒廓清指数也增大, 鸡红细胞的吞噬百分率也升高, 且差异显著($P<0.05$), 结果表明蜜环菌饮料提高了小鼠的免疫力, 其中蜜环菌饮料高剂量组作用最优, 表明随着饮料剂量的增大, 小鼠的免疫效果增强, 可能与饮料中含有蜜环菌多糖有关^[18], 说明蜜环菌多糖能显著提高小鼠的免疫力^[19]。

2.2 蜜环菌饮料对小鼠免疫器官的影响

蜜环菌饮料对实验各组小鼠脾脏和胸腺重量的影响见表 2。由表 2 可知, 与空白对照组相比, 模型组的胸腺指数和脾指数分别降低了 12%和 14%, 且差异显著($P<0.05$)。说明环磷酰胺抑制了小鼠免疫器官的生长, 造模成功。蜜环菌饮料低剂量组和中剂量组比模型组分别提高了 13%和 15%及 11%和 13%, 且有显著差异($P<0.05$)。而蜜环菌饮料高剂量组比模型组分别提高了 45%和 30%, 差异极显著($P<0.01$)。由此可以得出, 蜜环菌饮料确实能促进小鼠免疫器官的生长, 提高小鼠免疫力, 尤以高剂量组的作用最佳。

表 1 蜜环菌饮料对小鼠碳粒廓清指数及吞噬细胞吞噬功能的影响
Table 1 Effect of *Armillaria mellea* beverage on the clearance exponent and the phagocyte function of coeliac macrophage of mice

组别 Group	碳粒廓清指数 Carbon granules clearance index	吞噬鸡红细胞百分率 Function of phagocytizing red blood cell (%)
空白对照组 The control group	0.028 7±0.004 0*	18.86±3.19*
模型组 The model group	0.019 6±0.007 2	14.35±4.12
低剂量组 The low dose group	0.029 5±0.006 5*	19.96±5.13*
中剂量组 The middle dose group	0.042 3±0.005 8**	26.32±2.17**
高剂量组 The high dose group	0.045 5±0.005 0**	28.38±4.15**

注: *: 与模型组相比差异显著($P<0.05$); **: 与模型组相比差异极显著($P<0.01$).
Note: *: A markedly compared difference with the model group ($P<0.05$); **: A highly markedly compared difference with the model group ($P<0.01$).

表 2 蜜环菌饮料对小鼠免疫器官影响
Table 2 Effect of *Armillaria mellea* beverage on the immune organs of mice

组别 Group	胸腺重量 Thymus weight (g)	胸腺指数 Thymus index (%)	脾重 Spleen weight (g)	脾指数 Spleen index (%)
空白对照组 The control group	0.066±0.005*	0.31±0.023*	0.110±0.021*	0.51±0.105*
模型组 The model group	0.038±0.011	0.19±0.021	0.075±0.008	0.37±0.047
低剂量组 The low dose group	0.069±0.007*	0.32±0.019*	0.112±0.004*	0.52±0.038*
中剂量组 The middle dose group	0.065±0.006*	0.30±0.017*	0.108±0.015*	0.50±0.101*
高剂量组 The high dose group	0.083±0.010**	0.42±0.024**	0.135±0.013**	0.67±0.072**

注: *: 与模型组相比差异显著($P<0.05$); **: 与模型组相比差异极显著($P<0.01$).

Note: *: A markedly compared difference with the model group ($P<0.05$); **: A highly markedly compared difference with the model group ($P<0.01$).

2.3 蜜环菌饮料对小鼠肠道微生物的影响

由表 3 可以看出, 模型组与空白对照组的细菌总数相差不大, 且($P>0.05$)差异不显著。低剂量组与空白组相比差异显著($P<0.05$), 中剂量、高剂量组与空白组相比差异极显著($P<0.01$)。蜜环菌饮料高剂量组的细菌总数虽不是最高的, 但其有益菌乳酸菌和双歧杆菌的菌落数是 5 组中最高的。这说明蜜环菌饮料可以促进肠道有益菌的增殖。低剂量组的有益菌数目与空白对照组基本相同, 仅比空白组有少量的增加, 所以当剂量较少时, 饮料对改善肠道微生物菌群的作用并不明显。高剂量组有益菌数目较空白组有增加, 但增加数目低于中剂量组, 实验结果

表明蜜环菌中剂量作用效果最佳。这是因为多糖进入肠道后, 吸附肠道中的病原菌, 如沙门菌和大肠杆菌, 从而降低动物肠道病原微生物数量, 促进肠道菌群中有益的活性菌—乳酸菌及双歧杆菌的繁殖, 使肠道微生物区系得到平衡^[20-21]。

2.4 急性毒性实验结果

给药后连续观察 7 d, 小鼠行为活动正常, 并没有出现不安或躁动等现象, 运动协调, 无强迫性动作出现, 呼吸及心率正常, 皮毛光滑柔顺, 对各种的刺激反应灵敏, 无异常病理性神经反射出现, 进食及排泄物也正常, 未见其它异常表现, 说明蜜环菌饮料安全无毒, 可放心饮用。

表 3 蜜环菌饮料对小鼠肠道微生物的影响
Table 3 Effect of *Armillaria mellea* beverage on intestinal microbes of mice

组别 Group	细菌总数 Total number of bacteria ($\times 10^6$ CFU/g)	大肠杆菌 Total number of <i>E. coli</i> ($\times 10^5$ CFU/g)	乳酸菌 Total number of <i>Lactobacillus</i> ($\times 10^4$ CFU/g)	双歧杆菌 Total number of <i>Bifidobacterium</i> ($\times 10^4$ CFU/g)
空白对照组 The control group	4.5±0.21	2.1±0.09	1.2±0.07	0.8±0.08
模型组 The model group	4.5±0.19	2.2±0.18	1.1±0.12	0.8±0.09
低剂量组 The low dose group	4.2±0.20*	2.0±0.05*	1.3±0.11*	0.9±0.01*
中剂量组 The middle dose group	4.0±0.22**	1.9±0.08**	1.7±0.03**	1.1±0.10**
高剂量组 The high dose group	3.9±0.13**	1.7±0.14**	1.8±0.02**	1.2±0.11**

注: *: 与空白组相比差异显著($P<0.05$); **: 与空白组相比差异极显著($P<0.01$).

Note: *: A markedly compared difference with the control group ($P<0.05$); **: A highly markedly compared difference with the control group ($P<0.01$).

3 讨论

真菌中的多糖类物质具有多方面的机体调节功能,目前已证实真菌多糖可以通过激活淋巴细胞、活化巨噬细胞和NK细胞、激活补体、调节细胞因子分泌等对免疫系统发挥多方面的调节作用^[4],同时多糖进入肠道后能被肠道有益菌利用,促进有益微生物的生长,从而改善肠道微生物区系^[22]。吴媛媛等^[23]研究发现,木寡糖可以增加回肠内乳酸菌数,同时减少了盲肠内大肠杆菌数。蜜环菌是中国传统滋补防病保健药材之一,随着对其生理活性成分和药理作用的不断深入研究,蜜环菌滋补防病的药效越来越受关注,需求量也在不断扩大。已研发出了蜜环菌糖浆、蜜环菌浸膏、蜜环菌片、健脑露、蜜环菌酒和蜜环菌饮料等,这些产品的开发对促进蜜环菌资源深入开发和满足市场需求有着重要的作用^[24]。

本研究分析了蜜环菌饮料对小鼠免疫功能及肠道微生物菌相的影响,胸腺和脾脏是机体重要的淋巴器官,对机体的细胞免疫力有重要的影响,碳粒廓清和腹腔吞噬功能实验同样反应了小鼠的免疫功能好坏,通过环磷酸腺苷造模后,小鼠免疫器官脾脏和胸腺均有所萎缩,脾脏和胸腺指数明显降低($P<0.05$),经灌胃蜜环菌饮料后,小鼠的胸腺和脾脏明显增大,腹腔吞噬率也明显提高($P<0.05$),表明饮料可以提高小鼠的免疫作用。同时灌胃饮料后的小鼠肠道内有益菌乳酸菌和双歧杆菌的数量增加,改善了肠道菌相,且研究表明蜜环菌饮料对小鼠无任何的毒副作用,所以蜜环菌饮料完全可以作为一种保健产品推向市场,为更好的开发利用真菌资源提供一定的理论基础。

参 考 文 献

- [1] 徐锦堂. 中国药用真菌学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997: 74-582.
- [2] 谢学强. 天麻共生菌简易培养技术[J]. 现代农业科技, 2009(21): 104-105.
- [3] 周连玉. 黄绿蜜环菌的研究概述[J]. 安徽农学通报, 2010, 16(3): 52-58.
- [4] 张长青, 章松柏, 鲁红学, 等. 猪苓菌培养特性研究进展[J]. 现代农业科技, 2009(20): 105-107.
- [5] 孔小卫, 沈业寿, 王满朝, 等. 蜜环菌多糖 Am-I 的部分理化性质及结构研究[J]. 食品科学, 2003, 24(7): 23-26.
- [6] 袁媛, 刘景圣, 蔡丹. 蜜环菌化学成分与药理作用的研究进展[J]. 农产品加工·学刊, 2008, 136(5): 46-49.
- [7] Troy EB, Kasper DL. Beneficial effects of *Bacteroides fragilis* polysaccharides on the immune system[J]. Frontiers in Bioscience, 2009, 15(1): 25-34.
- [8] Sun YX, Liang HT, Zhang XT, et al. Structural elucidation and immunological activity of a polysaccharide from the fruiting body of *Armillaria mellea*[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(5): 1860-1863.
- [9] 邵建宁, 龚伟中, 麻和平, 等. 功能性双歧杆菌培养基的筛选与优化[J]. 食品科学, 2008, 29(3): 318-321.
- [10] 王惠国, 冯宝民. 蜜环菌多糖免疫调节活性的实验研究[J]. 陕西科技大学学报: 自然科学版, 2009, 27(2): 62-64.
- [11] 张松莲. 仙人掌多糖免疫调节作用的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士毕业论文, 2007.
- [12] 扈瑞平, 张兴夫, 杜玲, 等. 沙葱多糖对 S180 腹水瘤小鼠抗肿瘤和免疫作用的实验研究[J]. 饲料工业, 2010, 31(10): 34-36.
- [13] 傅晓雪. 黄芪的香菇发酵及发酵液免疫效果的研究[D]. 重庆: 西南大学硕士毕业论文, 2009.
- [14] 贾磊, 聂秀娟, 肖雯. 黄参多糖干预运动小鼠免疫功能的实验研究[J]. 成都体育学院学报, 2010, 36(7): 72-76.
- [15] 张利娟, 王志祥. 中草药制剂对蛋鸡肠道酶活和肠道微生物的影响[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(6): 94-97.
- [16] 袁钟宇, 张石蕊, 贺喜, 等. 茶籽多糖及茶皂素对肉鸡生长性能和肠道微生物的影响[J]. 营养饲料, 2010, 46(7): 28-31.
- [17] 中华人民共和国卫生部和中国国家标准化委员会. GB 15193.3-2003 急性毒性试验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [18] 戴玲, 王华, 沈业寿. 蜜环菌多糖对小鼠腹腔巨噬细胞免疫功能的影响[J]. 生物学杂志, 2000, 17(5): 20-21.
- [19] 孔小卫, 江力. 蜜环菌胞外多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 安徽大学学报: 自然科学版, 2007, 31(1): 87-90.

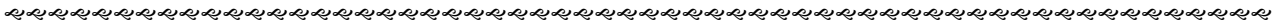
[20] 何晓丽,周蓉,蒋晶. 中药添加剂对鸡肠道消化酶及微生物数量影响的研究[J]. 天津农业科学, 2008, 14(1): 25-28.

[21] 文贵辉,李丽立,张彬,等. 白术粗多糖对樱桃谷鸭肠道微生物的影响饲料研究[J]. 2010(7): 55-58.

[22] Kohmoto T, Fukui F, Takaku H, et al. Dose-response test of isomaltooligosaccharides for increasing fecal bifidobacteria[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1991, 55(8): 2157-2159.

[23] 吴媛媛, 吕于明, 王忠. 木寡糖对肉仔鸡生长性能、肠道生理学和形态学指标的影响[J]. 中国农业大学学报, 2006, 11(4): 42-46.

[24] 杨淑云, 林远崇, 羿红, 等. 珍稀食药菌-蜜环菌的开发与应用[J]. 生物学杂志, 2007, 24(3): 52-54.



2011 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-2)

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
10	第九届全国病毒学学术研讨会	中国微生物学会病毒学专业委员会	9 月	150	陕西西安	梁华 010-58900644
11	第三届微生物资源学术研讨会	中国微生物学会微生物资源专业委员会	9 月	150	甘肃兰州	阮志勇 13301101231
12	病原菌与宿主相互作用研讨会	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	9-10 月	100	湖北武汉	陈铁 tiechen2005@yahoo.com
13	第十九届全国生物固氮学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	9-10 月	100	四川雅安	张忠明 zmzhang@mail.hzau.edu.cn
14	2011 年中国微生物学会学术年会暨第十次全国会员代表大会	中国微生物学会	10 月	500	福建福州	王旭 010-64807200
15	第十四次全国环境微生物学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	11 月	500	福建厦门	朱建春 microb@njau.edu.cn
16	CBS-中国医学真菌学高级培训班	中国微生物学会真菌学专业委员会	11 月	80	江苏南京	刘维达 13605178767
17	全国酶工程学术研讨会	中国微生物学会酶工程专业委员会	11 月	150	广东广州	金城 010-64807425
18	第五届芽胞杆菌青年工作者学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	12 月	50	湖北武汉	孙明 027-87283455