

• 实验研究 •

冬虫夏草及人工培养菌丝体对小鼠内脏 单核—巨噬细胞系统免疫功能影响的研究

海军医学研究所

陈道明 张淑兰 李政年 程振球 刘晓平

内容提要 本实验用免疫组织学方法表明天然冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*) 及人工培养菌丝体制剂对小鼠免疫器官具有明显影响, 可使肝、脾增大, 胸腺缩小, 能使 Kupffer 细胞吞噬功能增强, 并使脾巨噬细胞增殖, 证实其对单核—巨噬细胞系统功能有激活作用, 而天然与人工菌丝体制剂组间互比, 无显著差异, 提示两者作用基本一致, 为临床应用提供实验依据。

祖国医学文献记载冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*, 简称虫草) 是传统的强壮药品, 其效果已为长期临床实践所验证。近年来国内外对虫草生态、繁殖及其真菌的人工培养、药理、药化等研究已较为深入, 提示人工培养菌丝体能代替天然产品供药用^(1~3)。我们在从青海当地采集新鲜虫草分离真菌获得培养及发酵菌丝体成功基础上, 进一步研究了对机体免疫功能的影响。本文报道天然虫草及人工培养菌丝体对小鼠内脏单核—巨噬细胞系统功能及形态的变化, 并提供了直接观察肝Kupffer细胞吞噬功能的实验方法。

材料与方法

一、实验制剂: 市售正品天然青海虫草水提物 (Qc), 浓度50%; 人工培养虫草菌丝体水提物 (Qc-M₁), 浓度50%; 人工发酵虫草菌丝体水提物 (Qc-M₂), 浓度100%; 云南虫草人工培养菌丝体水提物 (YeM), 浓度50%。以上制剂由本课题组提供。

二、实验动物: 采用18~22g近交系小鼠 (LacA⁺1cR), 雌雄兼用。

三、试剂: 1.1%鸡红细胞悬液: 自公鸡静脉取血, 于阿氏液内保存备用。实验前用 PBS (pH7.2) 洗涤1~2次, 配成1%悬液供鼠尾静脉注射用。

2. 环磷酸胺 (CP): 用 0.5% 水解乳蛋白稀释配成 250mg/2ml, 实验时临时配制。

四、给药方法及剂量: 随机分组, 试验组为各制

剂给药组, 对照组为生理盐水组, 保护试验分组为环磷酸胺 (CP) + 给药组, 对照组则只给CP。各制剂组剂量均按小鼠每日5g/kg计算, 生理盐水对照组剂量为等容积, 肌注, 每日1次, 连续7天, 保护试验为腹腔给药, 时间为4天。

五、试验方法: 1. 脏器湿重及肝Kupffer细胞吞噬功能试验: 于给药结束次日, 每只小鼠尾静脉注射1%鸡红细胞悬液0.3ml/g, 60分钟后拉颈脱臼处死, 解剖取肝、脾、肺、胸腺, 用1/1000电光天平称湿重记录, 以脏器系数表示; 同时将标本用10%福尔马林液固定, 作组织切片, HE染色, 镜检观察。所得结果以下列方式表示:

$$\text{脏器系数 (mg/g)} = \frac{\text{脏器湿重 (mg)}}{\text{小鼠体重 (g)}}$$

肝Kupffer细胞吞噬率 =

$$\frac{12\text{个视野已吞噬鸡红细胞的Kupffer细胞数}}{12\text{个视野}(10 \times 100\text{倍})\text{Kupffer细胞总数}} \times$$

脾巨噬细胞每个视野 (10 × 40倍) 平均数 (共计20视野)

2. 保护试验: 于用药第3天两组小鼠均腹腔注射CP 1次剂量 (按250mg/kg计), 第5天将小鼠拉颈脱臼处死, 取脾、胸腺称重, 计算系数。

结 果

一、冬虫夏草各制剂对小鼠肝、脾、肺、胸腺的影响 (见表1)。

表1 冬虫夏草各种制剂对小鼠脏器湿重的影响

组 别	动物只数	鼠 种	肝 系 数		脾系数		胸腺系数	
			M±SD	P 值	M±SD	P 值	M±SD	P 值
Qc 组	12	LAcA	58.18±4.12*	<0.01	10.83±1.008*	<0.01	1.026±0.30*	<0.01
QcM ₁ 组	11		57.54±5.03*	<0.01	10.05±1.478*	<0.01	1.017±0.23*	<0.01
YcM 组	12		54.58±3.46*	<0.01	6.38±1.47	<0.01	1.278±0.37*	<0.01
对 照 组	12		48.37±3.35		3.85±0.82		2.041±0.34	
QcM ₂ 组	6	IcR	62.02±5.07*	<0.1>0.05	7.37±0.36*	<0.01	2.48±0.25*	<0.05
YcM 组	6		67.64±5.71	<0.01	7.92±0.53*	<0.01	2.10±0.67*	<0.05
对 照 组	6		58.35±3.63		5.99±0.85		3.09±0.46	

* 组间互比, $P>0.05$

1. 肝系数: 从表1可见天然虫草及培养菌丝体制剂可促使小鼠肝脏增大, 与对照组比, 具有显著意义, 发酵菌丝组稍差 $0.1>P>0.05$ 。而天然虫草制剂与人工菌丝制剂组间相比, 无显著差异($P>0.05$)。

2. 脾系数: (1) 从表1可见各种制剂均可促使小鼠脾脏明显增大 ($P<0.01$), 而天然虫草制剂与人工培养、发酵菌丝体制剂相比, 对脾脏的影响相似, 无显著差异($P>0.05$)。(2) 保护试验表明CP组脾系数下降($M\pm SD$ 为 2.28 ± 0.22)而CP+QcM₂组脾系数($M\pm SD$ 为 2.79 ± 0.72), $P<0.05$ 。说明QcM₂制剂能减少由CP对脾脏的抑制, 起到一定的保护作用。

3. 胸腺系数: 从表1可见各种制剂均可使小鼠胸腺缩小, 具有显著意义; 而组间相比无显著意义 ($P>0.05$)。保护试验表明: CP组使胸腺系数下降($M\pm SD$ 为 0.63 ± 0.23)而CP+QcM₂组胸腺系数 ($M\pm SD$ 为 0.86 ± 0.08), $P<0.01$, 可见发酵菌丝制剂能保护CP所致对胸腺的抑制作用。

4. 肺脏系数: 冬虫夏草各制剂对肺脏湿重均无明显影响($P>0.05$)。

二、冬虫夏草各制剂对肝Kupffer细胞吞噬功能及形态变化的影响(见表2)。

从表2可见冬虫夏草各制剂能明显增加小鼠肝

表2 冬虫夏草各种制剂对小鼠肝 Kupffer 细胞吞噬率的影响

组 别	动物只数	鼠 种	吞噬率 M±SD	P 值
Qc 组	6	LAcA	0.1947±0.0104*	<0.01
QcM ₁ 组	6		0.1877±0.0275*	<0.01
YcM 组	6		0.1518±0.0289	<0.01
对 照 组	6		0.1135±0.0059	
QcM ₂ 组	6	IcR	0.135±0.022*	<0.01
YcM 组	6		0.09±0.055*	<0.05
对 照 组	6		0.033±0.025	

* 组间互比, $P>0.05$

Kupffer细胞吞噬功能, 具有显著意义, 而天然与人工培养菌丝组相比, 则无显著意义 ($P>0.05$)。镜下可观察到用药组Kupffer细胞体积较对照组增大, 细胞浆增多, 边缘不规则呈伪足状突出, 有的呈树枝状延伸较远, 有的可见胞浆延伸呈捕获、摄取状态, 细胞核亦较对照组增大, 呈椭圆形, 核质疏松。以上形态变化, 显示了Kupffer细胞的激活状态。

三、冬虫夏草各制剂对脾巨噬细胞的影响(见表3)。

从表3可见冬虫夏草各种制剂能明显促进小鼠脾巨噬细胞增殖, 并可见到发育成熟不同形态, 显示了激活状态。而天然虫草与人工菌丝体制剂相比则无显著差异 ($P>0.05$)。与此同时发现用药组脾脏巨核细胞Megakaryocyte比对照组明显增多, 有的体积较大,

表3 冬虫夏草各制剂对小鼠脾巨噬细胞的影响

组别	动物只数	鼠种	M $\pm$ SD/视野	P 值
Qc 组	6	LAcA	4.20 $\pm$ 0.40*	<0.01
QcM ₁ 组	6		4.58 $\pm$ 0.98*	<0.01
对照组	6		1.67 $\pm$ 0.34	
QcM ₂ 组	6	IcR	4.39 $\pm$ 0.619*	<0.01
YcM 组	6		4.55 $\pm$ 0.65*	<0.01
对照组	6		2.40 $\pm$ 0.54	

* 组间互比, $P>0.05$

核呈绞链状,有的可清晰见到胞浆边缘有血小板形成的碎片脱落,经用PAS特殊染色为阳性,证实确系生成血小板系统的巨核细胞,用药后呈激活状态。

四、对肺泡巨噬细胞的观察:油镜下可见到肺泡巨噬细胞粘附及吞噬鸡红细胞现象。

五、对胸腺细胞的影响:见胸腺细胞除髓质中细胞稍大,见有核分裂、质疏松外与对照组比,未发现组织萎缩或细胞破坏等抑制现象。

讨 论

检测小鼠肝、脾巨噬细胞吞噬活性,一般采用炭粒廓清试验,但此仅系公式间接推算。鉴于单核—巨噬细胞系统的活性细胞存在于脏器中,Kupffer细胞系固定在肝血窦壁上,为直接观察其体内吞噬功能,本实验用鸡红细胞悬液从小鼠尾静脉注入,可使Kupffer细胞吞噬功能在组织形态学上确切地呈现,鸡红细胞有核,可以使吞噬它们的Kupffer细胞容易辨认,在组织切片上直接观察到这种吞噬现象以及吞噬细胞的激活状态,此种方法文献上尚未见报道。实验结果表明冬虫夏草各制剂对肝脏的重要免疫活性细胞—Kupffer细胞具有激活作用。

根据脏器湿重系数分析,发现冬虫夏草制剂能使小鼠肝、脾增大,胸腺缩小,后二者尤为明显,表明对机体免疫活性器官具有影响,这与近年来对黄芪多糖、人参多糖⁽⁴⁾、猪苓多糖⁽⁵⁾等一些免疫激活剂的研究相似。丁瑞等提出此药抗小鼠艾氏腹水癌有效成份可能是一种冬虫夏草多糖;Jagger⁽⁷⁾, Müller⁽⁸⁾则认为是冬虫夏草素(Cordycepin)为3'-脱氧腺苷,至今未见有对免疫功能影响的有关成份的报道。冬虫夏草制剂使肝、脾增大可能与肝脾中免疫活性细胞激活增殖及趋化有关。关于胸腺缩小问题,孙云汉等⁽⁹⁾实验表明同样制剂对正常小鼠胸腺T细胞的SPA花环百分

率均在正常值范围内,未有损伤及抑制现象,与本实验从形态观察相符,可能系趋化或释放 αD 作用有关。

本实验直接从组织形态学变化见到肝、脾巨噬细胞激活过程。单核巨噬细胞的激活表现在细胞体积增大、胞浆丰富、细胞内溶酶体中酶类增多,还表现在线粒体中细胞色素氧化酶及细胞呼吸率提高,由于结构成份的逐步完善,其免疫功能则明显增强,本实验从功能、形态观察所见进一步证实冬虫夏草各制剂对小鼠单核—巨噬细胞系统的免疫激活作用。

近年来由于肿瘤免疫的研究进展,巨噬细胞对癌细胞的吞噬杀伤以及对肿瘤生成、转移的调节作用日益引起重视。对内脏巨噬细胞的研究亦较深入⁽¹⁰⁾,如Kupffer细胞在免疫反应中的重要作用;在净化肝门脉血液起的关键性作用⁽¹²⁾;在一些慢性肝炎、肝硬化患者Kupffer细胞功能及代谢均有可能降低;胡世真报道巨噬细胞表面存在 αFP 受体,提示与肝癌有密切联系。其他如肺泡巨噬细胞在肺组织中亦为具有独特功能的巨噬细胞,其表面有IgG Fc段和C₃补体的受体,可因病原体袭击而激活,表现了强大的异物清除作用,并在体液和细胞免疫中起到特殊作用,加强了肺部抗感染、抗肿瘤的能力。本实验中的保护试验亦提示冬虫夏草各种制剂与抗癌药物合并使用,有可能有改善化疗所致免疫抑制现象。

综上所述,本实验结果为冬虫夏草制剂的临床应用提供依据。

(本实验病理部分承上海第一医学院病理教研室副教授陈长春、本所辛佩珠医师指导。本文承天津医学院吴威中院长审阅,特此致谢)。

参 考 文 献

1. 张士善,等.冬虫夏草和人工培养虫草菌丝的药理作用比较.药学通报1981;16(3):11.
2. 矢萩信夫.冬虫夏草の人工培养と抗肿瘤性.医学中央杂志(日)1979;3:335.
3. 包天桐,等.冬虫夏草的药理作用研究.中草药1983;14(5):32.
4. 王本祥.人参根多糖对免疫机能的影响.药学通报1981;16(6):23.
5. 中医研究院中药研究所微生物室免疫组.猪苓多糖治疗肿瘤的研究.中药研究资料1979:3.
6. 丁瑞,等.冬虫夏草抗小鼠艾氏腹水癌的研究.北京医学1981;3(6):364.
7. Jagger DV, et al. Inhibition of ehrlich mouse ascites tumor growth by cordycepin. Cancer Research 1961;

(下转第50页)

钠利尿作用,似乎有利于降压。有报告一肾一夹型高血压大鼠Ka低于正常大鼠,而二肾一夹型高血压大鼠Ka排出与假手术组无明显差异⁽¹⁰⁾。关于肾性高血压UKa的排出报告尚不一致。本实验二肾一夹型高血压大鼠的UKa排出与正常血压大鼠无明显差异。没有看到UKa在高血压和几种药物作用下的明显意义。

尿醛固酮的测定表明,高血压大鼠比正常血压大鼠明显为高($P < 0.01$)。虽然滋阴六味地黄方对高血压大鼠的UA排出未见明显作用,但助阳药附子却使它

的排出显著升高($P < 0.001$)。这提示单味附子使高血压大鼠的血压明显升高可能与醛固酮的增高有一定联系。助阳药附子对二肾一夹型高血压大鼠没有治疗作用,而使血压进一步升高,又使与高血压的维持机制密切相关的醛固酮也明显升高。从药物验证的观点看,这进一步增加了此型高血压为中医阴虚模型的可能性,有必要作进一步探索。

(本文由茅守玉、张照英、韦炳寅同志协作部分技术工作,特此致谢)

附表 附子等各组 PRA、ACE、UKa和 UA 的变化($M \pm SE$)

项目 组别	PRA ng/ml/h	ACE nmol/10 μ l/10min	UKa μ mol/min	UA ng/24h
正 常	5.28 $\pm$ 0.70(9)	80.42 $\pm$ 6.00 (9)	22.41 $\pm$ 2.73 (14)	119.33 $\pm$ 30.24 (15)
高血压对照	16.12 $\pm$ 4.28(17)	86.26 $\pm$ 4.11 (17)	23.80 $\pm$ 2.85 (17)	264.12 $\pm$ 23.13** (17)
附 子	10.84 $\pm$ 3.43(12)	68.19 $\pm$ 4.92* (14)	32.42 $\pm$ 3.30 (14)	472.14 $\pm$ 38.03*** (14)
附 桂	9.99 $\pm$ 2.53(13)	65.64 $\pm$ 5.67* (14)	25.30 $\pm$ 2.69 (16)	305.00 $\pm$ 20.02 (16)
六味地黄	10.79 $\pm$ 2.87(13)	62.82 $\pm$ 4.25** (13)	21.43 $\pm$ 2.63 (14)	279.29 $\pm$ 25.72 (14)

注:正—高 } * $P < 0.05$ ()动物数量
 高一给药组 } * * $P < 0.01$
 * * * $P < 0.001$

参 考 文 献

1. 邱安堃,等。中医阴阳的实验性研究(I)·附子、肉桂和六味地黄方对实验性高血压大鼠血压的影响。中西医结合杂志1984; 4(12):780。
2. 丁 钰,等。尿醛固酮放射免疫测定。上海医学1979; 2(6):47。
3. Roberts PS. Measurement of the rate plasmin action on synthetic substrates. *J Biol Chem* 1958; 232: 285。
4. 陆以信,等。兔血浆肾素活性与血管紧张素II的放射免疫测定。动物学杂志1983; 4:39。
5. 顾天华,等。血清内血管紧张素I转换酶的直接测定。上海市生化学会论文摘要, 1979:30—31。
6. Morton JJ, et al. The importance of the renin-angiotensin system in the development and maintenance of hypertension in the two-kidney one-clip hypertensive rat. *Clinical Science* 1983; 64(4):359。
7. 王 洪,等。甲硫丙脯酸对不同类型高血压大鼠血压的作用。药学学报1982; 17(9):688。
8. Suzanne Oparil. Angiotensin I converting enzyme and inhibitors, in *Hypertension*, edited by Genest J et al. McGraw-Hill Book Company, New York, 1977: 156—167。
9. Carretero OA, et al. The renal kallikrein-kinin system in human and in experimental hypertension. *Klin Wochenschr* 1978; 56(Suppl. I):113—125。
10. Croxatto HR, et al. Kallikrein and kinins in hypertension, edited by Genest J, et al. McGraw-Hill Book Company, New York, 1977:364—373。

(上接第44页)

21:216。

8. Muller WG, et al. Effect of cordycepin on nucleic acid metabolism in 15178y cells and on nucleic acid-synthesizing enzyme systems. *Cancer Research* 1977; 37(11):3824。
9. 孙云汉,等。冬虫夏草及深层培养产物对小鼠T细胞的作用。中成药研究1984; 2:22。
10. 吕宝璋,等。柴胡和猪苓多糖的生化作用及抗辐射伤原理的研究。解放军医学杂志1984; 9(1):9。
11. Seljelid R. Properties of kupffer cell in mononuclear phagocytes aspects part(Ralph van fourth edition)1980:186。
12. Hassner A, et al. *Br Med J* 1981; 282(6272):1262。