

## 研究报告

## 猴头菇多糖对免疫应激小鼠胸腺和脾脏显微结构、免疫功能及细胞增殖和凋亡的影响

王趁芳<sup>1</sup>, 邓娟<sup>1</sup>, 韩玉皎<sup>1</sup>, 顾有方<sup>1,2</sup>, 靳二辉<sup>1,2</sup>, 金光明<sup>1,2</sup>

(1. 安徽科技学院生命与健康科学学院, 安徽滁州 233100;

2. 动物营养调控与健康安徽省重点实验室, 安徽滁州 233100)

**摘要:**目的 研究猴头菇多糖对脂多糖(LPS)诱导免疫应激小鼠胸腺和脾脏显微结构、细胞因子分泌、抗氧化功能及细胞增殖和凋亡的影响,为猴头菇多糖在缓解应激状态中的应用提供参考。方法 选用12周龄雄性昆明小鼠50只,随机分为对照组、模型组和试验I-III组( $n=10$ )。除对照组腹腔注射生理盐水外,其余4组在试验结束前3d腹腔注射0.6 mL/kg/d的LPS(1次/d)。试验I、II、III组分别灌胃80、160、320 mg/kg的猴头菇多糖,持续2周。测定胸腺和脾脏促炎细胞因子水平、抗氧化功能及细胞增殖和凋亡基因表达,并进行显微结构观察分析。结果 与对照组相比,模型组胸腺和脾脏中白细胞介素 $1\beta$ (IL- $1\beta$ )、白细胞介素4(IL-4)和干扰素 $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )水平显著或极显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),总超氧化物歧化酶(T-SOD)和总抗氧化能力(T-AOC)活性显著降低( $P<0.05$ )、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)含量也显著降低( $P<0.05$ ),丙二醛(MDA)含量显著升高( $P<0.05$ ),脾脏增殖细胞核抗原(PCNA)mRNA表达量显著降低( $P<0.05$ ),半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)mRNA表达量显著增加( $P<0.05$ )。与模型组相比,试验III组小鼠胸腺和脾脏IL- $1\beta$ 、IL-4和IFN- $\gamma$ 水平显著或极显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),T-SOD、T-AOC和GSH-Px的活性或含量均显著升高( $P<0.05$ )、MDA含量和Caspase-3 mRNA表达量显著降低( $P<0.05$ )。组织学观测发现,试验III组小鼠胸腺和脾脏显微结构与模型组相比明显改善,胸腺皮质厚度增加( $P<0.01$ ),脾小结和动脉周围淋巴鞘厚度降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结论 补充320 mg/kg猴头菇多糖能够明显改善免疫应激对小鼠胸腺和脾脏显微结构的损伤,抑制免疫应激诱导的促炎细胞因子分泌和细胞凋亡基因表达,增强抗氧化酶活性。

**关键词:**猴头菇多糖;免疫器官;显微结构;免疫功能;抗氧化功能;细胞增殖和凋亡

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2022)03-0482-09

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.03.014

### Effects of *Hericium erinaceu* polysaccharide on microstructure, immune function, cell proliferation and apoptosis of thymus and spleen in LPS induced stressed mice

WANG Chenfang<sup>1</sup>, DENG Juan<sup>1</sup>, HAN Yujiao<sup>1</sup>, GU Youfang<sup>1,2</sup>, JIN Erhui<sup>1,2</sup>, JIN Guangming<sup>1,2</sup>

(1. College School of life and Health Science, Anhui science and technology university, Anhui Chuzhou 233100, China; 2. Anhui Key Laboratory of Animal Nutrition Regulation and Health, Anhui Chuzhou 233100, China)

**Abstract: Objective** To study the effects of *Hericium erinaceus* polysaccharide on the microstructure, cytokine secretion, antioxidant function, cell proliferation and apoptosis of thymus and spleen in mice with immune stress induced by lipopolysaccharide (LPS), so as to provide reference for the application of *Hericium erinaceus* polysaccharide in relieving stress. **Methods** Fifty male Kunming mice of 12-week old were randomly divided into control group, model group and experimental group I - III ( $n = 10$ ). In addition to the control group, the other four groups were intraperitoneally injected with 0.6 mL/kg/d LPS (once a day) three days before the end of the experiment. The experimental groups I, II and III were given 80, 160 and 320 mg/kg *Hericium erinaceus* polysaccharide by gavage for 2 weeks. **Results** Compared

收稿日期:2021-08-02

基金项目:国家自然科学基金(32172816, 31402154);安徽省自然科学基金(2108085MC117);安徽省高校优秀青年人才基金(gxyqZD2019061);安徽省协同创新项目(GXXT-2019-035);滁州市科技计划(2019ZN003);国家大学生创新创业培训计划(202010879042)

作者简介:王趁芳 女 实验师 研究方向为食品生物生化 E-mail: wangchenfang5@163.com

通信作者:金光明 男 教授 研究方向为中药营养与健康 E-mail: jingm@ahstu.edu.cn

with the control group, the levels of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-4 (IL-4) and interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) in thymus and spleen of mice in the model group were significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), the activities of total superoxide dismutase (T-SOD) and total antioxidant capacity (T-AOC) were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), the content of glutathione peroxidase (GSH-Px) was also significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and the content of malondialdehyde (MDA) was significantly increased ( $P < 0.05$ ). The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) mRNA in spleen of mice was significantly decreased ( $P < 0.05$ ), while the expression of cysteine protease-3 (caspase-3) mRNA was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, IL-1 $\beta$ , IL-4 and IFN- $\gamma$  in thymus and spleen of mice in experimental group III was significantly higher, the activity or content of T-SOD, T-AOC and GSH Px were increased significantly ( $P < 0.05$ ), and the content of MDA and the expression of caspase-3 mRNA were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). By histological observation, compared with the model group, the microstructure of thymus and spleen in experimental group III was significantly improved, the thickness of thymic cortex was increased ( $P < 0.01$ ), and the thickness of splenic nodule and periarterial lymphatic sheath was decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion** Supplementation of 320 mg/kg *Hericium erinaceus* polysaccharide can significantly improve the damage of thymus and spleen microstructure, inhibit the secretion of pro-inflammatory cytokines and the expression of apoptosis genes induced by immune stress, and enhance the activity of antioxidant enzymes.

**Key words:** *Hericium erinaceus* polysaccharide; immune organs; microstructure; immune function; antioxidant function; cell proliferation and apoptosis

应激是人和动物有机体对体内外刺激因素产生的一种非特异性应答反应。适当的应激能够增强机体的免疫功能,提高机体的环境适应能力,但过度或高强度的应激则对机体的免疫系统、消化系统等多种系统的功能产生损伤,导致细胞免疫和体液免疫功能降低,胃肠道消化吸收功能减弱,机体发生肿瘤、感染、消化道炎症或者慢性消耗性疾病的几率增加。免疫应激是一种主要由免疫系统激发的应激反应,其应激原常常为能够诱发免疫反应的病原或抗原。免疫应激主要影响动物机体的免疫系统,同时对消化系统、抗氧化功能、物质代谢等也可产生损害<sup>[1]</sup>。在当前畜禽养殖生产中,随着动物强制免疫的实施和免疫次数的增加,产生免疫应激的数量也在增加,免疫应激对畜禽生长发育及生产性能的影响日益明显,逐渐引起人们对免疫应激的关注<sup>[2-4]</sup>。细菌脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)作为革兰氏阴性菌的一种内毒素,能够模拟病原诱发动物感染并产生炎症反应,常被用于制备动物免疫应激模型<sup>[5-7]</sup>。

猴头菇是一种名贵的药食两用菌,具有丰富的营养价值和药用价值。猴头菇多糖是从猴头菇的菌丝体、发酵液与子实体中提取的一种真菌多糖<sup>[7]</sup>,对动物机体有着广泛的生物学功能。研究发现,腹腔注射猴头菇子实体和菌丝体多糖均能增加免疫抑制小鼠胸腺指数,增强迟发型变态反应,提高脾脏淋巴细胞的增殖能力<sup>[8]</sup>。灌胃给予 300 mg/kg 猴头菇多糖,能够显著降低肾缺血再灌注小鼠血清中丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量,增加谷胱甘肽(Glutathione, GSH)水平,增强机体抗氧化功

能<sup>[9]</sup>。饮水添加猴头菇多糖,能够显著增加番鸭呼肠孤病毒(Muscovy duck reovirus, MDRV)感染番鸭血清细胞因子白细胞介素-1(Interleukin-1, IL-1)、白细胞介素-2(Interleukin-2, IL-2)和白细胞介素-4(Interleukin-4, IL-4)及生长激素和促肾上腺皮质激素水平,增强机体免疫功能<sup>[10]</sup>。日粮中添加 0.4% 和 0.6% 的猴头菇多糖能够显著增加氧化应激仔猪回肠绒毛高度、隐窝深度和绒毛高度/隐窝深度(Villus height/Crypt depth, V/C)比值,促进紧密连接蛋白如咬合蛋白(Occludin)、连接蛋白(Claudin)和闭锁连接蛋白 1(Zonula Occludens-1, ZO-1)的基因转录,改善回肠的形态结构及通透性<sup>[11]</sup>。培养基中添加适量的猴头菇多糖,能够显著促进保加利亚乳杆菌、青春双歧杆菌和嗜热链球菌的生长,提高上述益生菌对胃肠道消化液的耐受力<sup>[12]</sup>。饮水补充适量的猴头菇多糖,能够显著降低 MDRV 感染中后期番鸭脾脏、胸腺和法氏囊器官的凋亡细胞数量,提高血清免疫球蛋白(Ig)IgA、IgM 和 IgG 以及补体 C3 和 C4 含量,减少组织器官损伤,提高免疫功能,有效缓解 MDRV 感染导致的免疫抑制<sup>[13]</sup>。

以上研究结果充分表明,猴头菇多糖对免疫抑制、氧化应激及病原感染动物抗氧化功能、免疫功能和消化功能均可产生明显改善作用,并降低病毒感染导致的淋巴细胞凋亡率,但其对 LPS 诱导的免疫应激动物免疫器官显微结构、免疫功能及细胞增殖和凋亡的影响报道比较鲜少。因此,本研究利用 LPS 建立免疫应激模型,研究灌胃补充猴头菇多糖对免疫器官显微结构、抗氧化功能、免疫功能及细

胞增殖和凋亡的影响,以期为猴头菇多糖用于预防和动物免疫应激性疾病预防提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

高通量组织研磨仪(TissueLyser II,德国 QIAGEN);核酸蛋白分析仪(NanoDrop One,美国 Thermo);ABI QuantStudio 5(ABI,美国 Thermo)。

选用健康无特定病原体(SPF)级 12 周龄雄性昆明小鼠 50 只,购自南京市江宁区青龙山实验动物繁殖场(生产许可证号为 SCXK(苏)2017-001);猴头菇多糖(多糖含量为 50%,西安圣青生物科技有限公司),LPS(*Escherichia coli* 055:B5,北京索莱宝科技有限公司),IL-1 $\beta$ 、IL-4、干扰素- $\gamma$ (Interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )酶联免疫吸附测定(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(Cat: SMK5699A、SMK3400A、SMK2918A,北京达科美科技有限公司);动物组织总 RNA 提取试剂盒(Cat: DP431,天根生化科技(北京)有限公司),反转录试剂盒(Cat: K1622,美国热电公司),实时荧光定量 PCR 试剂盒(Cat: RR420e,宝生物工程(大连)有限公司),总超氧化物歧化酶(Total superoxide dismutase, T-SOD, Cat: A001-3-2)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px, Cat: A005-1-2)、总抗氧化能力(Total antioxidant capacity, T-AOC, Cat: A015-3-1)和 MDA(Cat: A003-1-1)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);引物合成由上海生物工程有限公司提供,其中,细胞核增殖抗原(Nuclear proliferation antigen, PCNA)引物序列为:上游 5'-CACCTTAGCACTAGTATTCGA AGCAC-3',下游 5'-CACCCGACGGCATCTTTAT TAC-3';半胱天冬酶-3(Caspase-3)引物序列为:上游 5'-CTGCCGGAGTCTGACTGGAA-3',下游 5'-ATCAGTCCCCTGTCTCTGTCTCAATG-3';甘油三磷酸脱氢酶(Glycerol triphosphate dehydrogenase, GAPDH)引物序列为:上游 5'-TGTTTCCTCGTCCGTC-3',下游 5'-CAATCTCCACTTTGCCACT-3'。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 免疫应激模型的建立及试验分组

实验小鼠饲养于安徽科技学院无特定病原体(Specific pathogen free, SPF)实验动物中心的全膜终端独立通气笼盒(Individual ventilated cages, IVC)内,每笼 5 只。温度 25 °C~27 °C,相对湿度 40%~60%,光照 12 h。小鼠垫料经 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min,60 °C 鼓风干燥后备用。

小鼠适应性饲料 1 周后随机分为 5 组,依次为

空白对照组,LPS 模型组,试验 I、II、III 组,每组 10 只。试验 I、II、III 组依次灌胃 80、160、320 mg/kg 的猴头菇多糖,每天灌胃 1 次,持续 2 周。LPS 模型组和试验 I、II、III 组在试验结束前 3 天腹腔注射 0.6 mL/kg/d 的 LPS(生理盐水稀释为 1 mg/mL),连续注射 3 d,对照组腹腔注射生理盐水,最后 1 次 LPS 注射后 3 h 采集胸腺和脾组织样本。

#### 1.2.2 样品采集与处理

试验结束后,每组随机选择 6 只小鼠乙醚麻醉,颈椎脱臼致死,迅速分离胸腺和脾脏。胸腺和脾脏组织被分成 3 份,一份固定在 4% 多聚甲醛磷酸缓冲固定液中,用于苏木精-伊红(HE)染色;一份液氮冷冻后保存于-80 °C,用于细胞因子含量及抗氧化功能测定;另一份液氮冷冻后保存于-80 °C,用于 RNA 提取及细胞增殖和凋亡基因表达测定。

#### 1.2.3 石蜡切片和苏木精伊红(Hematoxylin eosin, HE)染色

胸腺和脾脏组织经 4% 多聚甲醛磷酸缓冲固定液固定充分后,经梯度酒精脱水,水杨酸甲酯透明、石蜡包埋,石蜡轮转切片切片(厚 6  $\mu$ m),每 10 张蜡片取 1 片用于 HE 染色。染色结果采用全自动显微数码切片扫描和应用系统(VM1,中国麦克奥迪公司)进行观察和拍照。每张组织切片选择上、下、左、右和中 5 个视野,借助 IPP 6.0 版软件测量胸腺皮质厚度、脾动脉周围淋巴鞘厚度及脾小结面积。

#### 1.2.4 细胞因子含量测定

胸腺和脾脏组织室温解冻后,在冰浴中匀浆,制备 10% 组织匀浆,3 000 r/min 离心 15 min,取上清弃沉淀,上清一部分用于细胞因子含量测定,一部分用于抗氧化功能测定。胸腺和脾脏组织匀浆室温解冻后,按照 ELISA 检测试剂盒说明书测定胸腺和脾脏中 IL-1 $\beta$ 、IL-4 和 IFN- $\gamma$  含量,操作步骤依据试剂盒说明书进行,并采用全波长酶标仪(Multiskan GO,美国)测定吸光度。IL-1 $\beta$ 、IL-4 和 IFN- $\gamma$  测定的标准曲线相关系数分别为 0.995 5、0.990 9 和 0.996 2。

#### 1.2.5 抗氧化功能测定

胸腺和脾脏组织匀浆室温解冻后,根据抗氧化功能试剂盒说明书要求,首先测定胸腺和脾脏匀浆中总蛋白含量,然后测定胸腺和脾脏组织抗氧化酶 T-SOD 活性和 GSH-Px 含量,以及 T-AOC 活性及 MDA 含量。

#### 1.2.6 细胞增殖和凋亡基因表达测定

胸腺和脾脏分别加入裂解液后,采用高通量组织研磨仪研磨,按照动物组织总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,核酸蛋白分析仪测定总 RNA 浓度和

质量。使用反转录试剂盒合成 cDNA,之后按照实时荧光定量 PCR 说明书在 ABI QuantStudio 5 上进行实时荧光定量 PCR 扩增。以 *GAPDH* 基因作为内参基因,基因的相对表达使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  的方式进行计算与分析。

### 1.3 数据处理与统计分析

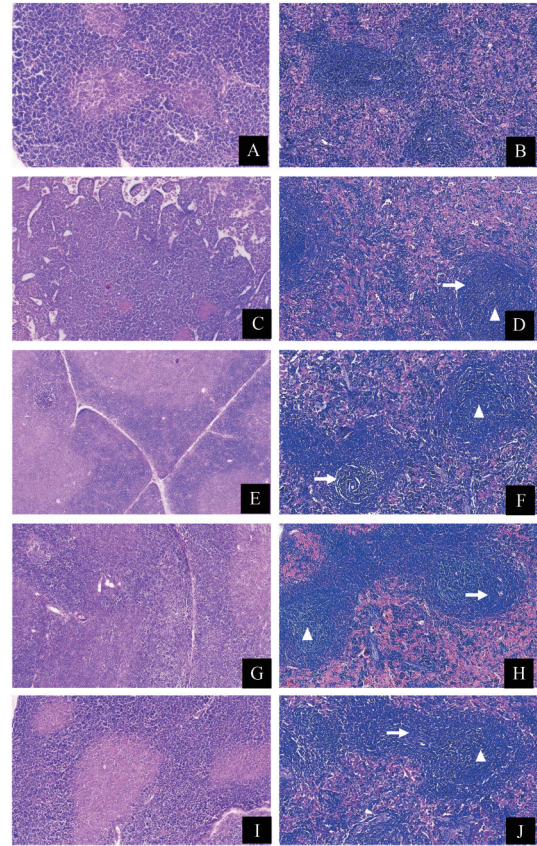
试验数据使用 Excel 进行处理,用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,以均值 $\pm$ 标准差(M $\pm$ S)表示。所有数据均采用 One-way ANOVA 中的 Donnett 进行差异性比较,其中  $P<0.05$  为差异显著, $P<0.01$  为差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 猴头菇多糖对免疫应激小鼠胸腺和脾脏显微结构的影响

由图 1 可知,对照组小鼠胸腺显微结构正常,胸腺小叶轮廓清晰,皮质和髓质分界明显,皮质较厚,皮质和髓质内淋巴细胞排列紧密,髓质内胸腺小体较少(图 1A)。与对照组相比,模型组小鼠胸腺显微结构呈现明显病理变化,胸腺小叶轮廓不清,皮质和髓质分界模糊,皮质厚度较小,其内淋巴细胞排列稀疏,并出现较多的腔隙和空泡,腔隙和空泡内可见大量的血细胞浸润,髓质较大,其内淋巴细胞排列稀疏,胸腺小体数量增多(图 1C)。与模型组相比,试验 I 组小鼠胸腺显微结构基本正常,胸腺小叶轮廓清晰,皮质和髓质分界明显,但皮质明显较薄,髓质明显较大,皮质内空泡数量减少,髓质内胸腺小体数量仍然较多(图 1E)。试验 II 组小鼠胸腺显微结构也基本正常,胸腺小叶排列紧密,其间结缔组织较少,皮质厚度明显增加,其内空泡数量进一步减少(图 1G)。试验 III 组小鼠胸腺显微结构正常,胸腺小叶轮廓清晰,皮质较厚,无空泡样结构,髓质内淋巴细胞排列紧密,胸腺小体数量较少(图 1I)。

对照组小鼠脾脏显微结构正常,白髓和红髓结构清晰,白髓内脾小结和脾动脉周围淋巴鞘数量较多,脾小结面积和脾动脉周围淋巴鞘厚度适中(图 1B)。与对照组相比,模型组小鼠脾脏显微结构呈现轻微的病理变化,白髓面积增大,其内脾小结和脾动脉周围淋巴鞘数量增多,脾小结面积和脾动脉周围淋巴鞘厚度明显增加,红髓内脾索增多,脾窦内血细胞数量增加(图 1D)。与模型组相比,试验 I 和 II 组小鼠脾脏显微结构有所改善,脾小结面积和脾动脉周围淋巴鞘数量逐渐减少,脾小结面积和脾动脉周围淋巴鞘厚度有所降低,红髓内脾索也减少,但脾窦内血细胞数量仍然较多(图 1F 和 1H)。试验 III 组小鼠



注:A、C、E、G、I:胸腺;B、D、F、H、J:脾;A、B:对照组;C、D:模型组;E、F:实验组 I;G、H:试验组 II;I、J:实验组 III。 $\Delta$  表示脾结节,  
→表示脾动脉周围的淋巴鞘

图 1 猴头菇多糖对免疫应激小鼠胸腺和脾脏显微结构的影响(10 $\times$ )

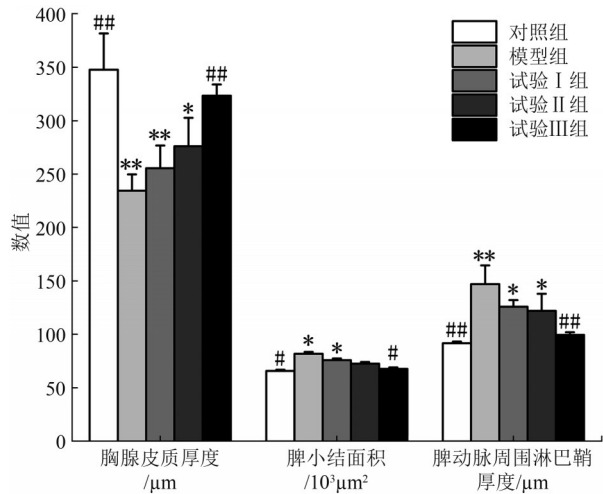
Figure 1 Effect of *Hericium erinaceus* polysaccharide on microstructure of thymus and spleen of immune stressed mice (10 $\times$ )

脾脏显微结构基本正常,与对照组相比无明显差异(图 1J)。

由图 2 可知,与对照组相比,模型组和试验 I 组小鼠胸腺皮质厚度均极显著降低( $P<0.01$ ),试验 II 组小鼠胸腺皮质厚度显著降低( $P<0.05$ );模型组和试验 I 组小鼠脾脏脾小结面积均显著升高( $P<0.05$ );模型组小鼠脾脏脾动脉周围淋巴鞘厚度极显著升高( $P<0.01$ ),试验 I 和 II 组均显著升高( $P<0.05$ ),而试验 III 组小鼠胸腺皮质厚度、脾小结面积和脾动脉周围淋巴鞘厚度均无显著差异( $P>0.05$ )。与模型组相比,对照组和试验 III 组小鼠胸腺皮质厚度均极显著升高( $P<0.01$ ),脾脏脾小结面积则均显著降低( $P<0.05$ ),脾脏动脉周围淋巴鞘厚度也均极显著降低( $P<0.01$ ),而试验 I 和 II 组小鼠胸腺皮质厚度、脾小结面积和脾脏动脉周围淋巴鞘厚度均无显著变化( $P>0.05$ )。

### 2.2 猴头菇多糖对免疫应激小鼠胸腺和脾脏细胞因子分泌的影响

由图 3 可知,与对照组相比,模型组、试验 I 和 II



注:与对照组比较,带\*表示差异显著, $P<0.05$ ,\*\*表示差异极显著, $P<0.01$ ;与模型组比较,#表示差异显著, $P<0.05$ ,##表示差异极显著, $P<0.01$

图2 猴头菇多糖对LPS诱导免疫应激小鼠胸腺和脾脏组织学参数的影响

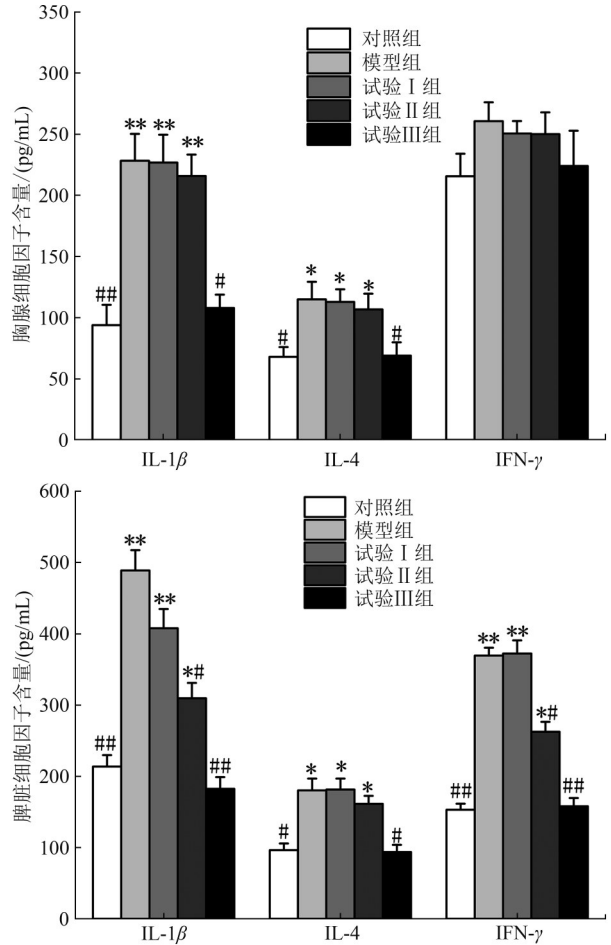
Figure 2 Effects of hericium lentus polysaccharide on the histological parameters of thymus and spleen of LPS induced immune stress mice

组小鼠胸腺 IL-1 $\beta$  含量均极显著升高( $P<0.01$ );胸腺 IL-4 含量均显著升高( $P<0.05$ );但胸腺 IFN- $\gamma$  含量无显著差异( $P>0.05$ )。与模型组相比,对照组和试验 III 组小鼠胸腺 IL-1 $\beta$  含量均极显著或显著降低( $P<0.01$  或  $P<0.05$ );对照组和试验 III 组小鼠胸腺 IL-4 含量也均显著降低( $P<0.05$ )。然而,所有处理组之间小鼠胸腺 IFN- $\gamma$  含量均无显著差异( $P>0.05$ )。

与对照组相比,模型组和试验 I 组小鼠脾脏中 IL-1 $\beta$  与 IFN- $\gamma$  含量均极显著升高( $P<0.01$ ),而试验 II 组脾脏 IL-1 $\beta$  和 IFN- $\gamma$  含量则均显著升高( $P<0.05$ );模型组、试验 I 和 II 组小鼠脾脏中 IL-4 含量均显著升高( $P<0.05$ ),但试验 III 组小鼠脾脏 IL-1 $\beta$ 、IL-4 和 IFN- $\gamma$  含量均无显著差异( $P>0.05$ )。与模型组相比,对照组和试验 III 组小鼠脾脏 IL-1 $\beta$  与 IFN- $\gamma$  含量均极显著降低( $P<0.01$ ),而试验 II 组脾脏 IL-1 $\beta$  和 IFN- $\gamma$  含量也均显著降低( $P<0.05$ );对照组和试验 III 组小鼠脾脏 IL-4 含量均显著降低( $P<0.05$ ),但试验 I 和 II 组脾脏 IL-4 含量无显著差异( $P>0.05$ )。

### 2.3 猴头菇多糖对免疫应激小鼠胸腺和脾脏抗氧化功能的影响

由图 4 可知,与对照组相比,模型组小鼠胸腺 T-SOD 活性显著降低( $P<0.05$ ),而试验 I、II 和 III 组胸腺 T-SOD 活性无显著变化( $P>0.05$ );模型组和试验 I 组小鼠胸腺 GSH-Px 含量与 T-AOC 活性均显著降低( $P<0.05$ ),而试验 II 和 III 组胸腺 GSH-Px 含量与 T-AOC 活性均无显著差异( $P>0.05$ );模型组小鼠胸腺 MDA 含量显著升高( $P<0.05$ ),而试验 I、II 和



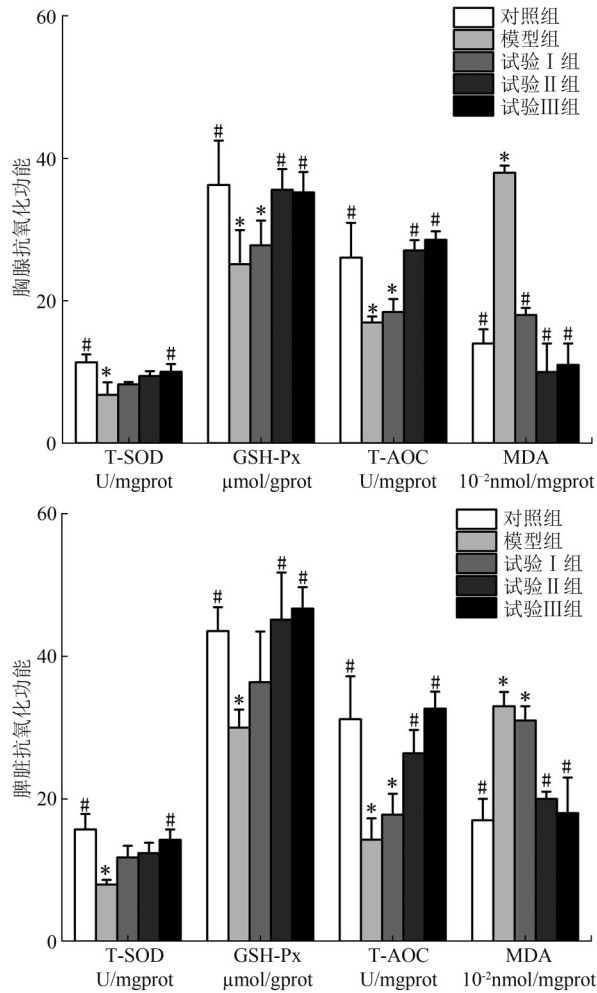
注:与对照组比较,带\*表示差异显著, $P<0.05$ ,\*\*表示差异极显著, $P<0.01$ ;与模型组比较,#表示差异显著, $P<0.05$ ,##表示差异极显著, $P<0.01$

图3 猴头菇多糖对LPS诱导免疫应激小鼠胸腺和脾脏细胞因子含量的影响

Figure 3 Effects of hericium lentus polysaccharide on the cytokine content in thymus and spleen of LPS induced immune stress mice

III 组胸腺 MDA 含量无显著差异( $P>0.05$ )。与模型组相比,对照组和试验 III 组小鼠胸腺 T-SOD 活性显著升高( $P<0.05$ );对照组、试验 II 和 III 组小鼠胸腺 GSH-Px 含量与 T-AOC 活性均显著升高( $P<0.05$ );对照组和所有试验组小鼠胸腺 MDA 含量均显著降低( $P<0.05$ )。

与对照组相比,模型组小鼠脾脏 T-SOD 活性和 GSH-Px 含量显著降低( $P<0.05$ ),而试验 I、II 和 III 组脾脏 T-SOD 活性与 GSH-Px 含量无显著变化( $P>0.05$ );模型组和试验 I 组小鼠脾脏 T-AOC 活性均显著降低( $P<0.05$ ),而 MDA 含量均显著升高( $P<0.05$ ),但试验 II 和 III 组脾脏 T-AOC 活性与 MDA 含量均无显著差异( $P>0.05$ )。与模型组相比,对照组和试验 III 组小鼠脾脏 T-SOD 活性显著升高( $P<0.05$ );对照组、试验 II 和 III 组小鼠脾脏 GSH-Px 含量与 T-AOC 活性均显著升高( $P<0.05$ ),而 MDA 含量



注:与对照组比较,带\*表示差异显著, $P<0.05$ ,\*\*表示差异极显著, $P<0.01$ ;与模型组比较,#表示差异显著, $P<0.05$ ,##表示差异极显著, $P<0.01$

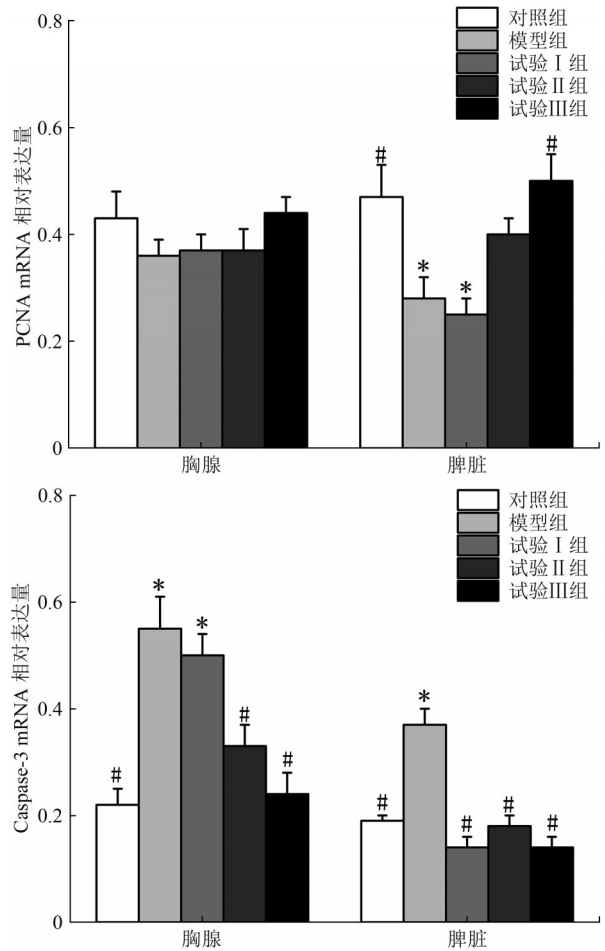
图4 猴头菇多糖对LPS诱导免疫应激小鼠胸腺和脾脏抗氧化功能的影响

Figure 4 Effects of Hericium erinaceus polysaccharide on the antioxidant function in thymus and spleen of LPS induced immune stress mice

均显著降低( $P<0.05$ )。

#### 2.4 猴头菇多糖对免疫应激小鼠胸腺和脾脏增殖和凋亡基因转录的影响

由图5可知,与对照组相比,模型组和试验I组小鼠脾脏PCNA mRNA表达量均显著降低( $P<0.05$ ),而试验II和III组无显著变化( $P>0.05$ );模型组和试验I组小鼠胸腺Caspase-3 mRNA表达量均显著增加( $P<0.05$ );模型组小鼠脾脏Caspase-3 mRNA表达量也显著增加( $P<0.05$ ),但试验II和III组无显著变化( $P>0.05$ )。与模型组相比,对照组和试验III组小鼠脾脏PCNA mRNA表达量均显著升高( $P<0.05$ );对照组、试验II和III组小鼠胸腺和脾脏Caspase-3 mRNA表达量均显著降低( $P<0.05$ )。



注:与对照组比较,带\*表示差异显著, $P<0.05$ ,\*\*表示差异极显著, $P<0.01$ ;与模型组比较,#表示差异显著, $P<0.05$ ,##表示差异极显著, $P<0.01$

图5 猴头菇多糖对LPS诱导免疫应激小鼠胸腺和脾脏PCNA和caspase-3 mRNA表达的影响

Figure 5 Effect of Hericium erinaceus polysaccharide on the expression of PCNA and caspase-3 mRNA in thymus and spleen of LPS induced immune stress mice

### 3 讨论

生物有机体器官的显微结构是维持器官相应生理功能的基础,正常显微结构的改变能够直接影响器官正常生理功能的发挥。适量细菌脂多糖诱导的免疫应激能够对不同动物不同器官的生长发育和显微结构产生一定的损伤。例如,腹腔注射LPS,可显著降低昆明小鼠平均日增重,提高血浆IL-6和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (Tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )浓度及脾脏指数,而日粮中补充硒代蛋氨酸羟基类似物可降低脾脏指数和IL-6、TNF- $\alpha$ 水平<sup>[14]</sup>。腹腔注射 $>5$  mg/kg的LPS,可显著降低小鼠十二指肠、空肠和回肠绒毛高度及V/C比值,诱导小肠组织结构损伤<sup>[15]</sup>。许多研究发现,中草药或者中草药提取物能够在一定程度上改善多种应激因

素造成的器官生长发育异常或者器官显微结构损伤。猴头菇多糖是从猴头菇菌中提取的一种良好的真菌多糖。最初的研究显示猴头菇对动物胃肠道显微结构、胃肠消化功能具有较好的促进作用,当前的研究进一步发现,猴头菇多糖对免疫器官结构、肿瘤发生、激素分泌、血糖水平等均可产生有益作用。饮水添加 0.03% 的猴头菇多糖可抑制呼肠孤病毒感染引起的雏番鸭脾脏和肝脏肿大,减少肝脏和脾脏中的坏死点,改善肝脏和脾脏组织结构<sup>[16]</sup>。体外添加 25~400 mg/L 的猴头菇多糖能够显著协同 ConA 刺激小鼠脾脏淋巴细胞 Th1 细胞因子(IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ )和 Th2 细胞因子(IL-4、IL-6)的分泌及 mRNA 的表达,表明 HEP 能协同 ConA 通过调节 Th1/Th2 平衡发挥双重免疫调节作用<sup>[17]</sup>。灌胃 150 和 300 mg/kg 猴头菇多糖,不仅能够显著地且剂量依赖地降低链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ)诱导的糖尿病大鼠空腹血糖水平,增强糖耐受能力,提高脾脏、胸腺和肾脏器官指数,而且还能够减轻糖尿病大鼠的肝功能损伤和血脂代谢异常<sup>[18]</sup>。本研究发现,灌胃 320 mg/kg 的猴头菇多糖能够显著增加 LPS 模型组胸腺皮质厚度,降低脾小结面积和动脉周围淋巴鞘厚度;减少胸腺皮质内的空泡样结构和胸腺小体数量,改善脾脏显微结构。分析其主要原因是补充适量的猴头菇多糖能够调节细胞因子分泌,减弱 LPS 对免疫器官造成的炎症反应,进而改善 LPS 对免疫器官显微结构的损伤。

免疫功能和抗氧化功能均是动物机体非常重要的生理功能,两者之间存在非常密切的相互促进关系。机体抗氧化功能的增强能够为免疫细胞的增殖提供良好的环境,有利于免疫细胞正常功能发挥,而免疫功能的增强能够提高抗氧化酶活性,增强抗氧化能力。研究发现,LPS 诱导的免疫应激能够显著影响动物机体免疫功能和抗氧化功能。在免疫应激过程中,免疫细胞被刺激产生多种细胞因子,尤其是 IL-1 $\beta$ 、IL-4 和 IFN- $\gamma$  等促炎症细胞因子被释放,进而导致机体发生炎症反应<sup>[5]</sup>。同时,在 LPS 的刺激下,机体多种细胞的活动增强,各种类型氧自由基显著增加,逐渐超过抗氧化酶的清除能力,进而使抗氧化酶活性下降,MDA 水平提高,导致机体发生氧化损伤<sup>[19、20]</sup>。相关研究证实,猴头菇多糖具有较好的免疫调节和抗氧化增强功能。用 50  $\mu$ g/mL 的猴头菇多糖处理大鼠树突状细胞后,可显著增加组织相容性复合物 II(Histocompatibility complex, MHC II)类和 CD80/86 表面抗原,并促进 IL-2、IFN- $\gamma$  和 IL-10 的分泌<sup>[21]</sup>;用适当剂量的猴头菇多糖处理 RAW264.7 巨噬细胞后,也可显著增加 IL-

4 和 TNF- $\alpha$  水平,增强巨噬细胞活动<sup>[22]</sup>。灌胃给以小鼠 75 和 150 mg/kg 猴头菇多糖可显著增加刀豆蛋白 A (Con A)刺激的淋巴细胞增殖率、胸腺指数、吞噬细胞吞噬率和小肠分泌型免疫球蛋白 A (Secretory immunoglobulin A, SIgA)水平,并激活小肠内丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen activated protein kinase, MAPK)和蛋白激酶 B (Protein kinase B, AKT)细胞信号通路<sup>[23]</sup>。给小鼠灌胃 300 mg/kg 猴头菇多糖,可使肾缺血再灌注组的血尿素氮和血清 SOD 显著下降,GSH 水平显著升高,MDA 含量显著降低,改善小鼠抗氧化功能<sup>[9]</sup>。本研究也发现,灌胃 240 mg/kg 猴头菇多糖,可显著降低 LPS 诱导的胸腺和脾脏促炎症细胞因子 IL-1 $\beta$  和 IL-4 水平及脾脏 IFN- $\gamma$  含量,并增加 LPS 诱导的胸腺和脾脏 T-SOD 和 T-AOC 活性及 GSH-Px 含量,降低 MDA 含量,改善免疫应激对胸腺和脾脏免疫功能及抗氧化功能的状况。分析其主要原因是,猴头菇多糖可能通过激活胸腺和脾脏淋巴细胞内的 MAPK 和 AKT 信号通路,进而调节 LPS 诱导的促炎细胞因子分泌及抗氧化酶活性,影响胸腺和脾脏的免疫功能及抗氧化功能<sup>[24]</sup>。

细胞增殖和凋亡是决定细胞命运的两个重要细胞内事件,两者通过相互的协调和动态平衡调节着细胞生长、分化和衰老。许多体内外刺激因素均可通过影响细胞的增殖和凋亡过程对相应组织器官的生长发育及生理功能产生影响。PCNA 是一种非组核蛋白,主要参与细胞损伤修复和染色体重组等多种细胞事件,其表达高低可以反映细胞增殖和分化情况<sup>[25]</sup>。Caspase-3 是凋亡酶(Caspases)家族中最重要的凋亡执行者,被认为是细胞发生凋亡的标志酶<sup>[26]</sup>。研究发现,猴头菇多糖能够促进正常细胞增殖,抑制多种因素对细胞凋亡的影响。体外添加猴头菇子实体多糖能够显著刺激小鼠 T 和 B 淋巴细胞增殖,增强细胞免疫和体液免疫功能<sup>[27]</sup>。体外添加适量的猴头菇多糖,可显著促进胃癌细胞(SGC7901)Caspase-3、促凋亡和抗凋亡蛋白 HIF-1 $\alpha$  的表达,升高活性氧(Reactive oxygen, ROS)水平,降低半抑制浓度(Half inhibitory concentration, IC50)的给药浓度,诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[28]</sup>。本研究也发现,LPS 能够诱导胸腺和脾脏 PCNA mRNA 表达降低,Caspase-3 mRNA 表达增加,进而抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,而灌胃补充猴头菇多糖能够促进 PCNA mRNA 表达,降低 Caspase-3 mRNA 表达,改善 LPS 对胸腺和脾脏增殖和凋亡的影响。分析其主要原因可能是,猴头菇多糖中含有的菌丝体糖蛋白能够通过某种信号级联激活胸腺和脾脏细

胞内的 Caspase-8/-3 途径、p53 依赖线粒体途径和磷脂酰肌醇 3-激酶(Phosphatidylinositol 3-kinase, PI3k)/Akt 信号通路,影响增殖和凋亡相关基因表达,进而影响细胞的增殖和凋亡过程<sup>[29]</sup>。

综合以上结果,灌胃补充 240 mg/kg 的猴头菇多糖能够明显改善 LPS 诱导免疫应激小鼠胸腺和脾脏显微结构、免疫功能、抗氧化功能和细胞凋亡状况,增加胸腺皮质厚度,降低脾小结面积和动脉周围淋巴鞘厚度及促炎细胞因子 IL-1 $\beta$  和 IL-4 水平,提高抗氧化酶活性含量,抑制细胞凋亡基因表达。

## 参考文献

- [1] 包龙飞. 鼠李糖乳杆菌对免疫应激条件下肉鸡生长性能、肠道结构和免疫功能的影响[D]. 南昌: 江西农业大学, 2019.  
BAO L F. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* on growth performance, intestinal morphology and immune function of broilers under immune stress[D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2019.
- [2] 江丹莉, 刘丽, 陈芳, 等. 细菌内毒素对肉鹅生长性能及免疫机能的影响研究[J]. 中国家禽, 2011, 33(7): 10-15.  
JIANG D L, LIU L, CHEN F, et al. Effects of LPS on growth performance and immune function in meat geese [J]. China Poultry, 2011, 33(7): 10-15.
- [3] 林彬彬, 张彬, 李凤娜, 等. 免疫应激的作用机制及对动物生长的影响[J]. 生物技术通报, 2014(3): 50-54.  
LIN B B, ZHANG B, LI F X, et al. The Mechanisms of immune stress and the impact on animal growth [J]. Biotechnology Bulletin, 2014(3): 50-54.
- [4] ZHENG A, ZHANG A, CHEN Z, et al. Molecular mechanisms of growth depression in broiler chickens (*Gallus Gallus domesticus*) mediated by immune stress: a hepatic proteome study[J]. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2021, 12(4): 1-19.
- [5] 张杰, 叶黄素对 LPS 应激黄羽肉鸡生长性能、抗氧化及免疫功能的影响[D]. 福州: 福建农林大学, 2017.  
ZHANG J. Effects of xanthophyll II on growth performance, antioxidation and immune function of LPS-stimulated yellow-feathered broilers [D]. Fuzhou: Fujian agriculture and Forestry University, 2017.
- [6] YIN G W, HUANG J H, MA M T, et al. Oyster crude polysaccharides attenuates lipopolysaccharide-induced cytokines production and PPAR $\gamma$  expression in weanling piglets [J]. Springerplus, 2016, 5: 677-681.
- [7] 张宝翠, 刘晓鹏, 朱玉昌, 等. 猴头菇的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(8): 2285-2292.  
ZHANG B C, LIU X P, ZHU Y C, et al. Research progress on *Hericium erinaceus* [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2019, 10(8): 2285-2292.
- [8] 罗珍, 黄萍, 郭重仪, 等. 猴头菇多糖增强免疫功能的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 182-183.  
LUO Z, HUANG P, GUO Z Y, et al. Experimental study on enhancing immune function of *Hericium erinaceus* polysaccharide [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical
- Formulae, 2011, 17(4): 182-183.
- [9] HAN Z H, YE J M, WANG G F. Evaluation of *in vivo* antioxidant activity of *Hericium erinaceus* polysaccharides [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 52: 66-71.[LinkOut]
- [10] 郑玲红, 吴异健, 廖加磊, 等. 猴头菇多糖对 MDRV 感染番鸭血清中细胞因子及激素水平的影响[J]. 中国兽医科学, 2017, 47(2): 249-256.  
ZHENG L H, WU Y J, LIAO J L, et al. Effect of hericium polysaccharide on partial cytokines and hormones in muscovy ducks infected with muscovy duck reovirus [J]. Chinese Veterinary Science, 2017, 47(2): 249-256.
- [11] 张建龙, 丘富安, 董星, 等. 猴头菇多糖对氧化应激状态下仔猪回肠形态结构及通透性的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49(1): 203-210.  
ZHANG J L, QIU F A, DONG X, et al. Effects of *Hericium erinaceus* polysaccharide on ileal morphology and permeability of piglets under oxidative stress [J]. Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica, 2018, 49(1): 203-210.
- [12] 钟千贵, 邱铭锰, 杨娟, 等. 猴头菇多糖对胃肠道益生菌生长的影响[J]. 食品工业科技, 2019, 40(19): 301-304.  
ZHONG Q G, QIU M M, YANG J, et al. Effects of *Hericium erinaceus* polysaccharides on the growth of gastrointestinal probiotics [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(19): 301-304.
- [13] 骆钰, 李鸿文, 刘珍妮, 等. 猴头菇多糖对 MDRV 感染雏番鸭主要免疫器官细胞凋亡及血清免疫相关指标的影响[J]. 中国兽医科学, 2019, 49(4): 512-521.  
LUO Y, LI H W, LIU Z N, et al. Effects of *Hericium erinaceus* polysaccharide on apoptosis of the main immune organs and serum immune-related indexes of Muscovy duckling infected with Muscovy duck reovirus [J]. Chinese Veterinary Science, 2019, 49(4): 512-521.
- [14] CHAO Y, YU B, HE J, et al. Effects of different levels of dietary hydroxy-analogue of selenomethionine on growth performance, selenium deposition and antioxidant status of weaned piglets [J]. Archives of Animal Nutrition, 2019, 73(5): 374-383.
- [15] 王梦竹, 贾军峰, 乔新月, 等. 不同浓度脂多糖对小鼠免疫功能及小肠组织形态的影响[J]. 中国生物制品学杂志, 2019, 32(4): 380-385.  
WANG M Z, JIA J F, QIAO X Y, et al. Effect of lipopolysaccharide at various concentrations on immune function and intestinal tissue morphology of mice [J]. Chinese Journal of Biologicals, 2019, 32(4): 380-385.
- [16] 陈艺娟, 吴异健, 黄一帆, 等. 猴头菇多糖对呼肠孤病毒感染番鸭组织病变及细胞凋亡的影响[J]. 中国预防兽医学报, 2010, 32(1): 14-18.  
CHEN Y J, WU Y J, HUANG Y F, et al. Effects of *Hericium erinaceus* polysaccharide on reovirus-induced tissue necrosis and apoptosis in Muscovy ducks [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2010, 32(1): 14-18.
- [17] 郑乃珍, 郑小香, 潘晓丽, 等. 猴头菇多糖协同 ConA 对小鼠脾细胞分泌 Th1, Th2 细胞因子及基因表达的影响[J]. 中国兽



- 医学报, 2016, 36(5): 795-801.
- ZHENG N Z, ZHENG X X, PAN X L, et al. The effect of synergistical stimulation of *Hericium erinaceus* polysaccharide combined with ConA on the secretion and mRNA expression of Th1 and Th2 cytokines of murine splenic lymphocyte [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2016, 36 (5) : 795-801.
- [18] ZHANG C, LI J, HU C L, et al. Antihyperglycaemic and organic protective effects on pancreas, liver and kidney by polysaccharides from *Hericium erinaceus* SG-02 in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 10847.
- [19] BOZINOVSKI S, SEOW H J, CRACK P J, et al. Glutathione peroxidase-1 primes pro-inflammatory cytokine production after LPS challenge *in vivo*[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33172.
- [20] BUŁDAK Ł, ŁABUZEK K, BUŁDAK R J, et al. Metformin affects macrophages' phenotype and improves the activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and decreases malondialdehyde concentration in a partially AMPK-independent manner in LPS-stimulated human monocytes/macrophages[J]. Pharmacological Reports, 2014, 66 (3): 418-429.[LinkOut]
- [21] SHEU S C, LYU Y, LEE M S, et al. Immunomodulatory effects of polysaccharides isolated from *Hericium erinaceus* on dendritic cells [J]. Process Biochemistry, 2013, 48 (9) : 1402-1408. [LinkOut]
- [22] REN Z, QIN T, QIU F A, et al. Immunomodulatory effects of hydroxyethylated *Hericium erinaceus* polysaccharide on macrophages RAW<sub>264.7</sub>[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, (Pt1), 105: 879-885.
- [23] SHENG X T, YAN J M, MENG Y, et al. Immunomodulatory effects of *Hericium erinaceus* derived polysaccharides are mediated by intestinal immunology[J]. Food & Function, 2017, 8 (3): 1020-1027.
- [24] WANG X Y, ZHANG D D, YIN J Y, et al. Recent developments in *Hericium erinaceus* polysaccharides: Extraction, purification, structural characteristics and biological activities [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59 (sup1): S96-S115.
- [25] 王慧, 屈志国, 爱群, 等. PCNA和P21在腮腺多形性腺瘤中的表达及二者的相关性研究[J]. 临床口腔医学杂志, 2016, 32(12): 721-726.
- WANG H, QU Z G, AI Q, et al. The expression and relationship between PCNA and P21 in the pleomorphic adenoma of parotid gland [J]. Journal of Clinical Stomatology, 2016, 32 (12) : 721-726.
- [26] FOLCH J, ALVIRA D, LÓPEZ-QUEROL M, et al. Evaluation of transcriptional activity of caspase-3 gene as a marker of acute neurotoxicity in rat cerebellar granular cells [J]. Toxicology in Vitro, 2010, 24(2):465-471.
- [27] WU F F, ZHOU C H, ZHOU D D, et al. Structural characterization of a novel polysaccharide fraction from *Hericium erinaceus* and its signaling pathways involved in macrophage immunomodulatory activity [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 37: 574-585.
- [28] WU F F, ZHOU C H, ZHOU D D, et al. Structure characterization of a novel polysaccharide from *Hericium erinaceus* fruiting bodies and its immunomodulatory activities [J]. Food & Function, 2018, 9 (1): 294-306.
- [29] ZAN X, CUI F, LI Y, et al. *Hericium erinaceus* polysaccharide-protein HEG-5 inhibits SGC-7901 cell growth via cell cycle arrest and apoptosis [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 76: 242-253.