



贺智杰,陈乙文,刘倩,等.多脂鳞伞的抗氧化活性及对小鼠免疫功能的影响[J].黑龙江农业科学,2023(1):62-66.

多脂鳞伞的抗氧化活性及对小鼠免疫功能的影响

贺智杰,陈乙文,刘倩,韩子珺,王晓岩

(吉林农业科技学院 中药学院,吉林 吉林 132109)

摘要:多脂鳞伞是一种具有经济价值的食药两用真菌,为了探讨多脂鳞伞抗氧化活性及对小鼠的免疫功能,使用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯与甲醇对多脂鳞伞干燥子实体进行提取得到相应组分,并进行清除 ABTS·、DPPH·自由基的研究;用煎煮法获得多脂鳞伞水提液,对 42~56 日龄昆明小鼠进行为期 20 d 灌胃给药,测定其血清 IL-2、SOD、IFN- γ 及 GSH-Px 等生化指标。结果表明,在抗 ABTS·、DPPH·自由基试验中,多脂鳞伞乙酸乙酯提取组分对 DPPH·自由基清除率达到 91.45%,在质量浓度为 1.0 mg·mL⁻¹ 时,ABTS·自由基清除率为 65.24%,表现出良好的抗氧化活性;多脂鳞伞水提液对小鼠血清中 IL-2、SOD、IFN- γ 及 GSH-Px 的含量均有显著增加,并且呈现浓度依赖性,表现出良好的调节免疫作用,说明多脂鳞伞具有良好的抗氧化及提高机体免疫力的作用。

关键词:多脂鳞伞;提取物;抗氧化活性

多脂鳞伞(*Pholiota adiposa*)属球盖菇科、鳞伞属真菌,是一种较为珍贵的食药兼用真菌,与金毛鳞伞、小孢鳞伞均为同属亲近种,由于其多生长在柳树上并呈现金黄色,又称为“黄伞”“柳香蘑”,并且由于其鲜美的味道广为百姓喜爱^[1-2]。多脂鳞伞是一种温带木腐菌,生长条件较为温和,在世界多处均有分布,在我国主要分布于吉林、辽宁、黑龙江、内蒙古及河北地区,在日本及东欧国家也有分布^[3]。多脂鳞伞具有较高营养价值及药用价值,其肉厚质嫩、味道鲜美,并且富含多种维生素、蛋白质、氨基酸、多糖、凝集素及多种矿质元素;多脂鳞伞具有降血糖、降血脂、抗肿瘤及抗炎等药理作用^[4-6]。

多位学者对多脂鳞伞抗氧化活性进行研究,吉叶梅利用多脂鳞伞发酵液多糖,对羟基自由基 OH·及超氧阴离子自由基 O₂⁻ 清除作用进行研究,利用 Fenton 反应体系,多脂鳞伞胞外多糖对羟自由基 OH·的清除率仅为 38.5%,对超氧阴离子自由基 O₂⁻ 的清除率可达到 80.6%^[7-8];胡清秀等^[9]对多脂鳞伞子实体多糖及菌丝体粉和子实体粉的体外抗氧化作用,对羟基自由基 OH·及超氧阴离子自由基 O₂⁻ 清除作用进行研

究,结果发现,多糖的能力更为显著。研究学者贾乐及其团队应用超声波协同提取法提取多脂鳞伞胞内多糖(IPS)及胞外多糖(EPS)并应用响应面法对提取条件进行优化,并对体外抗氧化作用进行研究,其中胞内多糖(IPS)还原能力较阳性对照组 BHT 高 39.13%±3.47%,胞外多糖(EPS)对还原能力的抑制作用为 0.37%±0.02% (700 nm 吸光度),表现出非常出色的抗氧化作用^[10-11]。

真菌多糖一直作为提高机体免疫力作用的药物在临床使用,如香菇多糖、灵芝多糖等,均具有良好的提高免疫力的作用。相关研究学者进行了关于多脂鳞伞多糖调节机体免疫作用的研究工作。如苏延友等^[12]探讨多脂鳞伞多糖对小鼠腹腔巨噬细胞的激活作用,用 ELISA 法检测培养上清中的细胞因子, Griess 试剂检测其 NO 的含量, FACS 检测巨噬细胞吞噬功能, MTT 间接法观察巨噬细胞体外杀伤活性的变化,结果表明,多脂鳞伞多糖能激活小鼠巨噬细胞,可增强巨噬细胞 IL-1 β 及 NO 产生的水平,增强其吞噬功能及体外杀伤活性。

多脂鳞伞是一种具有巨大潜能的食药两用真菌,具有广泛的研究价值。本研究对多脂鳞伞清除 ABTS·、DPPH·自由基的效果,并测定小鼠血清中 IL-2、SOD、IFN- γ 及 GSH-Px 等生化指标,探讨其免疫活性,以期对多脂鳞伞食药两用价值开发及应用提供借鉴。

收稿日期:2022-10-21

基金项目:吉林省大学生创新创业训练计划项目(SJ2022083)。

第一作者:贺智杰(2001—),男,本科生,专业为中药学。E-mail:2903105237@qq.com。

通信作者:王晓岩(1986—),男,博士,讲师,从事食药两用真菌食用及药用价值研究。E-mail:wangxiaoyan1@126.com。

1 材料与方法

1.1 材料

人工栽培多脂鳞伞子实体(图 1)购自松原市菇乡食用菌专业合作社;健康昆明小鼠 50 只,雌性,体重(22 ± 2 g),日龄 42~56 d,清洁动物(SPF),由辽宁长生生物科技有限公司提供,实验动物编号:SCXK(辽)2022-0017。主要试剂与仪器详见表 1。



图 1 人工栽培多脂鳞伞子实体

表 1 试验主要试剂与仪器信息

仪器/型号	生产公司
实验用旋转蒸发仪(RE52AA)	上海亚荣生化仪器厂
酶标仪(Nano Quant infinite 200PRO)	TECAN 公司
光学显微镜(BX51)	日本 OLYMPUS 公司
苦味酸	安美实验器材有限公司
二氯甲烷、石油醚、乙酸乙酯、 甲醇等分析纯	安美实验器材有限公司
胸腺肽肠溶片	西安迪赛生物药业有限责任公司
IL-2、IFN- γ 、SOD、GSH-Px 试剂盒	南京建成生物工程研究所

1.2 方法

1.2.1 多脂鳞伞体外抗 DPPH·与 ABTS·自由基研究 化学成分提取:将多脂鳞伞子实体 60℃条件下进行烘干,粉碎,将其干燥子实体 300 g 用适量石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、甲醇试剂分别进行回流提取,合并各个组分提取液,并挥干试剂,分别得到石油醚提取组分、二氯甲烷提取组分、乙酸乙酯提取组分及甲醇提取组分。本试验所用试剂均为分析纯,详细提取方式参照文献[13]进行。

抗氧化试验:多脂鳞伞石油醚提取组分、二氯甲烷提取组分、乙酸乙酯提取组分及甲醇提取组分配制成 0.4、0.6、0.8 和 1.0 mg·mL⁻¹的溶液,所得组分进行抗氧化活性试验(DPPH·, ABTS·)。其中,以 BHT(2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚)作为抗 DPPH·自由基试验的阳性对照药, Trolox

(6-羟基-2,5,7,8-四甲基色烷-2-羧酸)作为抗 ABTS·自由基试验的阳性对照药。

DPPH 法:DPPH 即 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼,该方法广泛用于测量生物样品及食物样品抗氧化能力,其原理为在 517 nm 处,DPPH·自由基单电子有吸收强度,其醇溶液呈紫色,清除 DPPH·自由基时,其紫色变浅[14]。

用电子天平精确称取 DPPH 样品 0.01 g,用 80%的酒精定容至 50 mL,得到质量浓度为 0.2 mg·mL⁻¹,用移液枪取 1 mL 后,稀释至 DPPH 浓度为 0.04 mg·mL⁻¹[14]。根据 DPPH 的相对分子质量可得此时 DPPH 的物质量浓度为 0.1 mg·mL⁻¹。按照 DPPH·清除说明书进行实验,检测 DPPH·在 517 nm 吸光度从而判断多脂鳞伞各提取物的抗氧化能力的强弱[14]。

ABTS 法:2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐,与过二硫酸钾反应,可以生成绿色的 ABTS·自由基,并且在 734 nm 处 ABTS·自由基有最大吸收,所以,通过检测 734 nm 的吸光度,可以测定其浓度[15]。因此,按照该原理检测 ABTS 在 734 nm 吸光度从而判断抗氧化能力的强弱[15]。

根据 ABTS 在氧化剂作用下呈现绿色的原理,在 734 nm 吸光度作用下测定其吸光度值计算样品抗氧化能力。移液枪分别移取 400 μ L ABTS 溶液与氧化剂溶液相混合,得到 ABTS 工作母液,避光室温条件下保存 12~16 h,取出后,用 80%的酒精溶液将其 ABTS 工作液,计算令 A_{734} 值为 0.7 ± 0.05 [15]。再用移液枪精确移取 10 μ L 多脂鳞伞各提取物样品与 200 μ L 的 ABTS 工作液于 96 孔板中,轻轻混匀,孵育 5 min 后,测定 A_{734} [15]。

1.2.2 多脂鳞伞水提物对小鼠血清中 IL-2、IFN- γ 、SOD 和 GSH-Px 水平的影响 将多脂鳞伞干燥子实体 150 g 进行粉碎,分别加入 1 L 蒸馏水 65℃提取 3 次,合并浓缩成浸膏。多脂鳞伞干燥子实体 150 g 进行粉碎并加入 1 L 蒸馏水进行煎煮提取,提取 3 次,每次 30 min,随后合并提取液并浓缩为浸膏,4℃保存。试验用昆明小鼠 50 只进行分组,每组 10 只,共分为 5 组。将多脂鳞伞水提物浓缩浸膏分为高、中、低 3 个剂量组,给药剂量根据人给药剂量的体表面积与小鼠体表等效剂量换算,其中高剂量组为 12.5 mg·kg⁻¹,中剂量组 6.25 mg·kg⁻¹,低剂量组 3.125 mg·kg⁻¹,

10 mg·kg⁻¹ 胸腺肽肠溶片作为阳性药^[16],空白对照组给等量生理盐水,连续灌胃给药 20 d。

灌胃给药 20 d 后,试验小鼠取血前一晚禁食不禁水,取血后,迅速进行 4℃ 离心得到血清。将血清按照试剂盒说明书检测待测指标,显色终止后 450 nm 处测量 OD 值,绘制线性标准曲线,计算各项指标实际浓度,进行结果分析。

1.2.3 数据分析 使用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,试验数据均以平均数±标准差(S. D.)表示。差异显著性由单向方差分析(ANOVA)确定,然后进行 Duncan's 检验,进行 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平的显著性分析。

2 结果与分析

2.1 多脂鳞伞各提取物的抗氧化能力

2.1.1 DPPH·自由基清除作用 如表2所示,多脂鳞伞石油醚提取组分、二氯甲烷提取组分、乙酸乙酯提取组分及甲醇提取组分抗 DPPH·自由基结果表明,多脂鳞伞 4 个提取组分清除 DPPH·自

由基能力强弱如下:乙酸乙酯组分>甲醇组分>二氯甲烷组分>石油醚组分,并且不同浓度的相同组分清除 DPPH·自由基能力都随着浓度的升高呈现一定的浓度依赖性。其中,多脂鳞伞乙酸乙酯提取组分高剂量组 DPPH·自由基清除率可高达 91.45%,在所有组别中,清除率最高,且高于阳性给药组,并呈现一定浓度依赖性。

2.1.2 ABTS·自由基清除作用 如表3所示,多脂鳞伞石油醚提取组分、二氯甲烷提取组分、乙酸乙酯提取组分及甲醇提取组分抗 ABTS·自由基结果表明,不同浓度的相同组分其清除 ABTS·自由基能力都随着浓度的升高而呈现一定的浓度依赖性。多脂鳞伞乙酸乙酯提取组分对 ABTS·自由基的清除能力最强,其自由基清除率以 Trolox 最高,Trolox 组 ABTS·自由基清除率达 70.22%,多脂鳞伞乙酸乙酯提取组分对 ABTS·自由基的清除率可达 65.24%,高于除 Trolox 外的其他组别,并呈现一定浓度依赖性。

表 2 多脂鳞伞 DPPH·自由基清除率对比

组别	清除率/%			
	0.4 mg·mL ⁻¹	0.6 mg·mL ⁻¹	0.8 mg·mL ⁻¹	1.0 mg·mL ⁻¹
BHT(CK)	81.33±0.82	0.83±1.97	85.26±0.36	88.39±1.67
石油醚	45.37±0.52**	48.25±1.07**	50.25±0.65**	54.86±0.79**
二氯甲烷	62.75±1.21**	67.43±0.58**	71.24±0.62**	77.32±0.91**
乙酸乙酯	70.14±0.26**	78.61±0.87	85.76±0.67	91.45±0.89
甲醇	64.87±0.23**	70.97±0.76**	73.25±1.25**	75.68±0.87**

注:* 表示与同浓度对照组相比在 $P<0.05$ 差异显著;** 表示与同浓度对照组相比在 $P<0.01$ 水平差异显著。下同。

表 3 多脂鳞伞 ABTS·自由基清除率对比

组别	清除率/%			
	0.4 mg·mL ⁻¹	0.6 mg·mL ⁻¹	0.8 mg·mL ⁻¹	1.0 mg·mL ⁻¹
Trolox(CK)	48.21±0.84	57.83±0.71	66.53±1.05	70.22±0.62
石油醚	20.63±0.87**	24.27±0.92**	29.49±0.75**	35.43±0.94**
二氯甲烷	28.93±0.89**	35.14±1.21**	39.26±0.94**	44.57±0.97**
乙酸乙酯	42.82±1.27**	51.85±0.82**	58.14±0.75**	65.24±0.89*
甲醇	30.53±0.29**	38.24±0.47**	42.83±0.52**	47.78±0.38**

2.2 多脂鳞伞水提物对小鼠血清 IL-2、IFN-γ、SOD 和 GSH-Px 表达水平的影响

如表 4 所示,试验用昆明小鼠在不同剂量多脂鳞伞水提物给药 20 d 后,其白细胞介素-2(IL-2)表达水平明显高于空白对照组及阳性组并呈现剂量依赖性,并且与空白对照组相比,具有极显著差

异($P<0.01$)。多脂鳞伞水提液高剂量组处理的小鼠血清中干扰素-γ(IFN-γ)及谷胱甘肽过氧化物(GSH-Px)表达水平较为理想,均极显著高于空白对照组($P<0.01$)。脂鳞伞高剂量组处理小鼠血清中 SOD 表达水平与阳性组相差无几,但极显著均高于空白组($P<0.01$)。

表 4 多脂鳞伞水提液对小鼠血清中 IL-2、IFN-γ、SOD 和 GSH-Px 表达水平的影响

组别	白细胞介素-2/ (pg·mL ⁻¹)	超氧化物歧化酶/ (ng·mL ⁻¹)	干扰素-γ/ (ng·L ⁻¹)	谷胱甘肽过氧化物/ (pg·mL ⁻¹)
空白组	19.75±0.32	24.34±0.69	367.89±39.29	32.71±1.59
阳性药组	28.69±0.73**	26.67±0.85**	450.72±37.62**	44.21±0.66**
多脂鳞伞高剂量组	37.35±0.34**	27.94±0.74**	487.46±41.92**	46.55±1.40**
多脂鳞伞中剂量组	32.16±0.89**	27.58±0.67**	442.46±18.40**	45.73±0.54**
多脂鳞伞低剂量组	29.38±0.46**	27.33±0.43**	407.33±34.27**	42.89±0.82**

3 讨论

经研究表明,多数食药真菌具有抗氧化应激能力、提高机体免疫力作用^[17]。本试验中采用多脂鳞伞不同溶剂提取物清除 DPPH·与 ABTS·自由基,以探究其抗氧化能力,结果表明,多脂鳞伞各组分均有不同程度的抗氧化能力,并且在相同组分不同浓度条件下均呈现一定的量效关系,其中多脂鳞伞乙酸乙酯提取物对 DPPH·及 ABTS·自由基的清除率最好。由此可得出结论,多脂鳞伞乙酸乙酯组分具有良好的抗氧化作用,可对多脂鳞伞乙酸乙酯提取组分进一步进行化学成分分析,以寻找具有活性的单体化合物。

白细胞介素-2(IL-2)的主要功能为活化 CD4+Th1 细胞,从而产生具有广泛生物活性的细胞因子,可促进 Th0 和 CTL 的增殖,故为调控免疫应答的重要因子^[18]。同时 IL-2 也参与抗体反应、造血和肿瘤监视等,且在肿瘤微环境中起到肿瘤免疫作用^[19]。在本试验中,经多脂鳞伞水提液给药后,小鼠血清中 IL-2 表达水平显著升高,并呈现浓度依赖性,表现出较好的提高免疫力的作用。

在本研究中,多脂鳞伞水提液也能够诱导 IFN-γ 细胞因子表达水平,可提高机体免疫力、预防癌症、高血压、糖尿病等疾病的发生^[20-21]。SOD 为超氧化物歧化酶,GSH-Px 为还原性谷胱甘肽,二者在机体中均具有较好的还原性和抗氧化应激性^[22]。在多脂鳞伞水提液给药后,小鼠血清中 SOD 与 GSH-Px 均显著升高,由此得出,多脂鳞伞具有较强的抗氧化应激作用。

本试验结果证实,多脂鳞伞子实体水提液可提高小鼠血清中 IL-2、IFN-γ、SOD 和 GSH-Px 等细胞因子表达水平,具有很好的免疫增强功能。但是,本试验主要以体外抗氧化试验以及小鼠血

清中的生化因子作为研究依据,综合以往的研究,今后应对体内抗氧化试验以及对人体免疫功能进行研究,完善多脂鳞伞抗氧化作用及提高免疫功能的研究。因此,可以从免疫作用、抗氧化作用、提高机体抗氧化应激作用、细胞凋亡及自噬等多种途径研究多脂鳞伞相关作用机制。

多脂鳞伞是鳞伞属中一种较为珍贵的食药真菌,但是目前还没有全面推广,其亲近种——滑子蘑已是市场中常见的食用菌。本实验对多脂鳞伞的抗氧化活性、提高免疫力的作用及抗氧化应激性进行了研究,可为多脂鳞伞食药两用价值提供数据支持。

4 结论

多脂鳞伞具有较好的清除 DPPH·自由基与 ABTS·自由基能力,表现出良好的抗氧化作用,并且能显著提高小鼠血清中 IL-2、IFN-γ、SOD 和 GSH-Px 等细胞因子的表达水平,提高机体免疫调节功能及抗氧化应激能力,表现出良好的抗氧化作用及提高免疫力的作用。

参考文献:

[1] 图力古尔,宋超,盖宇鹏. 多脂鳞伞(*Pholiota adiposa*)子实体个体发育[J]. 食用菌学报,2011,18(2):20-23,77.

[2] 王守现,刘宇,许峰,等. 野生黄伞 JZB2116005 菌株的鉴定及生物学特性研究[J]. 江西农业大学学报,2013,35(3):603-608.

[3] 田恩静,图力古尔. 中国鳞伞属(广义)已知种类及其分布[J]. 菌物研究,2004(1):25-34.

[4] 史亚丽,蔡德华,王晓洁,等. 大负荷运动训练对小鼠免疫功能的影响及黄伞多糖干预作用研究[J]. 体育科学,2009,29(6):67-72.

[5] ZOU Y,DU F,HU Q,et al. The structural characterization of a polysaccharide exhibiting antitumor effect from *Pholiota adiposa* mycelia[J]. Scientific Reports,2019,9(1):1-10.

[6] 宫春宇,胡清秀,韩永超,等. 黄伞菌株多糖提取工艺及免疫调节作用研究[J]. 食品工业,2012,33(8):48-51.

- [7] 吉叶梅,胡清秀,宫春宇,等.黄伞胞外多糖抗自由基作用的研究[J].生物技术,2007(2):29-31.
- [8] 蒋晓琴,丁晓明,刘海燕,等.多脂鳞伞粗多糖抗肿瘤及对荷瘤小鼠免疫功能影响的研究[J].中国药师,2007,10(2):129-121.
- [9] 胡清秀,宫春宇,闫梅霞.黄伞及黄伞多糖体外抗氧化作用的研究[J].中南林业科技大学学报,2007(6):58-62.
- [10] DENG P,ZHANG G Q,ZHOU B,et al. Extraction and *in vitro* antioxidant activity of intracellular polysaccharide by *Pholiota adiposa* SX-02 [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering,2011,111(1):50-54.
- [11] SUN Z G,TIAN Y,JIAM S,et al. Extraction and *in vitro* antioxidant activity of exopolysaccharide by *Pholiota adiposa* SX-01 [J]. African Journal of Microbiology Research, 2012,6(8):1869-1876.
- [12] 苏延友,康莉,杨志孝,等.黄伞多糖的提取及对小鼠腹腔巨噬细胞的激活效应研究[J].泰山医学院学报,2004(0):9-11.
- [13] 唐燕霞,拉喜那木吉拉,包海鹰.硬枝树花的化学成分及抗氧化研究[J].菌物学报,2015,34(1):169-176.
- [14] 宋见喜,任婷,王贺,等.高山红景天多糖的硫酸化修饰及DPPH自由基清除活性研究[J].中草药,2017,48(24):5125-5129.
- [15] 杨文建,孙勇,袁彪,等.食药菌超细粉免疫调节和抗氧化功能研究[J].菌物学报,2015,34(2):302-304.
- [16] 余曦明,尹抗抗,李鑫,等.卡介菌多糖核酸对小鼠血清 IL-2、IFN- γ 水平及免疫功能的影响[J].湖南中医杂志,2013,29(5):115-116.
- [17] 陈金阳,陆儒涵,王玲,等.药用植物内生菌抗氧化活性研究进展[J].中草药,2016,47(20):3720-3727.
- [18] 牛肖飞,袁雪晶,马凤娟.白细胞介素-2 家族细胞因子在哮喘中的表达及其靶向拮抗剂的研究进展[J].医学综述,2022,28(13):2646-2650.
- [19] LEYV D E,GARCIA,SASTRE A. The virus battles:IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion [J]. Cytokine and Growth Factor Reviews,2001,12(2-3):143.
- [20] 徐晓玉,熊天琴,魏大鹏.防感片对小鼠脾细胞分泌 IL-2 影响的实验研究[J].中国实验方剂学杂志,2002,8(4):34-36.
- [21] 唐燕霞,包海鹰,王新斌,等.硬枝树花中抑制 H-22 荷瘤小鼠肿瘤的活性成分研究[J].菌物学报,2015,34(2):278-286.
- [22] 汪坤,赵旭,杨艳华,等.基于抗氧化应激研究醒脑灌肠液对脑出血大鼠血脑屏障的保护作用[J].时珍国医国药,2020,31(8):1813-1817.

Antioxidant Activity of *Pholoiata adiposa* and Effects on Immune Function in Mice

HE Zhijie, CHEN Yiwen, LIU Qian, HAN Zijun, WANG Xiaoyan

(College of Traditional Chinese Medicine, Jilin Agricultural Science and Technology University, Jilin 132109, China)

Abstract: The fruiting bodies of *Pholoiata adiposa* were cultivated as materials, and the corresponding extracts were obtained with petroleum ether, methylene chloride, ethyl acetate and methanol as solvents. The antioxidant activities of DPPH \cdot and ABTS \cdot free radical scavenging rate were studied. The results showed that, the ethyl acetate extract of polylipidium had DPPH \cdot radical scavenging ability, and its clearance rate was 91.45%. The ethyl acetate extract had the strongest scavenging ability for ABTS \cdot radical, and the scavenging rate of ABTS \cdot radical was 65.24% when the mass concentration was 1.0 mg \cdot mL $^{-1}$. Kunming mice were given different doses of water extract for 20 days. The levels of cytokines such as IL-2, SOD, IFN- γ and GSH-Px in serum were determined to evaluate the immune function of Kunming mice. The results showed that the contents of IL-2, SOD, IFN- γ and GSH-Px in the serum of the mice treated with different concentrations of polylipidosis were significantly increased, and all of them had good immunomodulatory and anti-oxidative stress effects.

Keywords: *Pholoiata adiposa*; extract; antioxidant activity

欢迎关注本刊微信公众号

