

加压辅助碱法提取蝉花子实体多糖工艺优化及体外免疫活性研究

金 瑾¹, 隋志方^{1*}, 秦令祥^{2,3}, 赵俊芳^{2,3}, 丁昱婵^{2,3}

(1. 鹤壁市产品质量检验检测中心, 鹤壁 458030; 2. 漯河食品职业学院, 漯河 462300;
3. 漯河市食品研究院有限公司, 漯河 462300)

摘 要: **目的** 优化加压辅助碱法提取蝉花子实体(人工培植)多糖的工艺, 并研究其免疫活性。**方法** 以多糖提取率为指标, 在单因素基础上, 经正交实验优化其提取工艺。同时以小鼠体重增长率、脏器指数, 血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)的含量、免疫球蛋白 A (immunoglobulin A, IgA)、免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)、免疫球蛋白 M (immunoglobulin M, IgM)的含量以及小鼠脾淋巴细胞增殖刺激指数作为指标来评价免疫活性。**结果** 最佳提取工艺条件为: 氢氧化钠浓度 0.2 mol/L、提取压力 1.0 MPa、提取温度 80°C、提取时间 40 min, 在此条件下多糖提取率为 8.68%, 该方法提取效果优于单一提取法。体外免疫活性实验表明, 蝉花子实体多糖能有效增加模型小鼠的体重增长率及脏器指数, 细胞因子(TNF- α 、IL-2 和 IL-6)、免疫球蛋白(IgA、IgG 和 IgM)的含量和脾淋巴细胞增殖刺激指数, 表明其具有明显的提高免疫力作用。**结论** 优化后的提取条件能够有效提取蝉花子实体多糖, 所得多糖具有明显的提高免疫力作用。该研究可为蝉花子实体多糖的提取及开发应用提供科学依据。

关键词: 蝉花子实体; 人工培植; 多糖; 提取工艺; 免疫活性

Optimization of process of *Cordyceps cicadae* fruiting body polysaccharides by pressurization-assisted alkaline extraction method and its *in vitro* immunoactivity

JIN Jin¹, SUI Zhi-Fang^{1*}, QIN Ling-Xiang^{2,3}, ZHAO Jun-Fang^{2,3}, DING Yu-Chan^{2,3}

(1. Hebi Food and Drug Inspection and Testing Center, Hebi 458030, China; 2. Luohe Food Vocational College, Luohe 462300, China; 3. Luohe Food Research Institute Co., Ltd., Luohe 462300, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the process of *Cordyceps cicadae* fruiting body polysaccharides (artificial cultivation) by pressurization-assisted alkaline extraction method, and study its immunoactivity. **Methods** On the basis of single factor, the extraction process was optimized by orthogonal experiment with the extraction rate of polysaccharide as index. At the same time, the body weight growth rate, organ index of mice, and the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-2 (IL-2) and interleukin-6 (IL-6), the content of immunoglobulin immunoglobulin A (IgA),

基金项目: 漯河市重大科技创新专项项目(20210109)

Fund: Supported by the Major Scientific and Technological Innovation Projects of Luohe City (20210109)

*通信作者: 隋志方, 正高级工程师, 主要研究方向为食品及功能食品质量控制与分析检测。E-mail: 35128347@qq.com

*Corresponding author: SUI Zhi-Fang, Professor, Hebi Food and Drug Inspection and Testing Center, Southeast Corner of the Intersection of Xinghe Street and Xiangjiang Road in Qibin District, Hebi 458030, China. E-mail: 35128347@qq.com

immunoglobulin G (IgG), immunoglobulin M (IgM) in serum, and mouse spleen lymphocyte proliferation stimulation index were used to evaluate immune activity. **Results** The optimal extraction conditions were as follows: Sodium hydroxide concentration was 0.2 mol/L, extraction pressure was 1.0 MPa, extraction temperature was 80°C, extraction time was 40 min. Under these conditions, the polysaccharides extraction rate was 8.68%, and the extraction effect of this method was better than that of the single extraction method. *In vitro* immunoactivity tests had shown that *Cordyceps cicadae* fruiting body polysaccharides could effectively increase the body weight growth rate and organ index of model mice, as well as the content of cytokine (TNF- α , IL-2 and IL-6), immunoglobulins (IgA, IgG and IgM), and the spleen lymphocyte proliferation stimulation index, which indicated that it had a significant immune enhancing effect. **Conclusion** The optimized extraction conditions can effectively extract *Cordyceps cicadae* fruiting body polysaccharides, and the obtained polysaccharides from *Cordyceps cicadae* fruiting body have a significant immune enhancing effect. This study can provide scientific basis for the extraction, development, and application of *Cordyceps cicadae* fruiting body polysaccharides.

KEY WORDS: *Cordyceps cicadae* fruiting body; artificial cultivation; polysaccharides; extraction process; immunoactivity

0 引 言

蝉花(*Cordyceps cicadae*), 又称金蝉花、蝉蛹草, 是麦角菌科真菌—蝉拟青霉寄生竹蝉若虫后的复合体^[1], 外形像蝉, 故名“蝉花”^[2]。主要分布在我国的长江以南地区, 尤其江苏、浙江等地^[3]。蝉花中含有多糖、有机酸、虫草素及核苷等多种活性成分^[4-6], 与冬虫夏草含有的活性成分相似^[7], 能够镇痛消炎、调节神经、缓解疲劳及改善肾功能等作用^[8-9]。其中蝉花多糖是蝉花中含有的一种重要生物活性成分, 具有提高免疫力、抗癌、抑菌、抗病毒、降血糖等多种生理功效和功能作用^[10-14]。

天然野生蝉花, 无孢子囊壳包被, 生成孢子后会被风吹散, 因此, 其孢子粉不易采收, 影响了其功效和应用价值, 因此, 蝉花的人工培植成了研究热点和重点。目前, 人工培植蝉花有两种方法, 一种是采用液体深层发酵获得菌丝体, 另一种是采用生物固体发酵培养蝉花子实体^[15], 其中蝉花子实体(人工培植)是蝉花功效作用的主要成分。蝉花子实体(人工培植)于 2020 年 12 月被国家卫健委(2020 年第 9 号)批准为新食品原料^[16]。因此, 研究蝉花子实体的功效作用和深加工具有一定的市场前景和推广价值, 但是如何利用蝉花子实体中的活性成分, 开发高附加值的产品, 是蝉花子实体推广应用的关键。

目前, 食用菌多糖的提取方法有: 水浸提法^[17]、超声法^[18]、酶法^[19]、微波法^[20]等, 这些方法各有优劣, 其中传统水提法操作简单、时间长、得率不高; 酶解法条件限制多, 酶活性易被破坏; 超声法和微波法对设备要求高, 提取时间短。加压提取法是近年来发展的一种新的提取方法, 原理是在密闭容器中, 通过提高压力, 从而提高了溶剂的沸点, 利用高压和高温破坏物料的细胞壁结构, 促进和加速细胞内的活性成分溶出^[21], 此法具有高效、短时、提取

率高等优点^[22]。XU 等^[23]采用加压水提法提取黑穗醋栗果实多糖, 多糖得率是热水提取法的 3.26 倍。碱法提取是多糖提取的常见方法, 与水提相比碱法对细胞壁结构破坏更高^[24], 可以破坏细胞壁中纤维素和半纤维素间的氢键, 使多糖与蛋白质间的结合键断裂, 利于难溶性多糖从细胞壁中溶出, 提高了多糖的提取率^[25], 具有提取率高、耗时短等特点。由于蝉花子实体中含有较多的蛋白质、纤维素和半纤维素, 多糖不易从细胞壁中溶出, 因此, 本研究采用加压辅助碱法提取蝉花子实体(人工培植)多糖(以下简称蝉花子实体多糖), 并利用正交实验法优化提取工艺, 同时对蝉花子实体多糖的体外免疫活性进行研究, 以期对蝉花子实体多糖的高效提取及提高免疫力产品开发应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

雄性小鼠, SPF 级, 1 月龄, 体重(20 $\pm$ 2) g, 购于河南斯克贝斯生物科技有限公司[许可证号: SCXK(豫)-2020-0005], 证书编号 C57BL/6j。

蝉花子实体(人工培植-生物固体发酵法培养得到), 购于亳州中药材市场。

无水乙醇、葡萄糖、苯酚、氢氧化钠、浓硫酸(分析纯, 淄博科晓仪器有限公司); 环磷酰胺(纯度 99%, 广州市优试生物有限公司); 左旋咪唑(纯度 97%, 山东信合药业有限公司); 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、免疫球蛋白 A (immunoglobulin A, IgA)、免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)、免疫球蛋白 M (immunoglobulin M, IgM) 酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (欣博盛生物科

技有限公司); 刀豆蛋白 A (concanavalin A, ConA)(上海康朗生物科技有限公司); RPMI1640 培养基(河南文魁实业有限公司); CCK-8 试剂盒(上海瑞番生物有限公司)。

1.2 仪器

FA10045E 型电子天平(精度 0.1 mg, 深圳市荣达仪器有限公司); 101-1A 型电热鼓风干燥箱(惠州市捷扬环保设备有限公司); BY-FSJ 型多功能粉碎机(南京邦元制药设备有限公司); CWYF-II 高压反应釜(江苏华安科研仪器有限公司); RE-501-型旋转蒸发仪(郑州科文仪器有限公司); UV-2600 紫外可见分光光度计[天美仪拓实验室设备(上海)有限公司]; TG-16G 台式高速离心机(江苏新春兰科学仪器有限公司); DZF-6020Z 真空干燥箱(无东莞市鑫祺机械设备有限公司); HM-96A 型酶标仪(山东恒美电子科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 原料预处理

将蝉花子实体(人工培植)放入 50℃烘箱中, 烘干 6 h, 粉碎过 100 目筛, 得蝉花子实体(人工培植)粉, 备用。

1.3.2 加压辅助碱法提取蝉花子实体多糖

称取一定量蝉花子实体(人工培植)粉, 按料液比 1:20 (g:mL)加入一定浓度的氢氧化钠水溶液, 混合均匀, 放入高压反应釜中, 进行加压辅助碱法提取(一定的压力、温度和时间), 提取液离心分离(转速 6000 r/min, 时间 20 min), 然后取上清液经 Sevage 法脱蛋白和 D280 大孔树脂脱盐, 经旋转蒸发仪减压浓缩, 浓缩液进行醇沉(4 倍乙醇, 于 4℃冰箱, 静置过夜), 醇沉后, 溶液再经微滤, 真空干燥, 得到蝉花子实体多糖。

1.3.3 蝉花子实体多糖含量的测定

采用王娜等^[26]的苯酚-硫酸法, 通过葡萄糖标准曲线的方程, 按式(1)计算蝉花子实体(人工培植)多糖提取率:

$$\text{蝉花子实体多糖提取率}/\% = \frac{m_1}{m_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中, m_1 为提取的蝉花子实体多糖质量, g; m_2 为蝉花子实体(人工培植)样品质量, g。

1.3.4 实验设计

(1)单因素实验

固定料液比 1:20 (g:mL), 对四因素五水平的实验方案进行研究。以蝉花子实体多糖提取率为指标, 考察氢氧化钠浓度(0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 mol/L)、提取压力(0.6、0.8、1.0、1.2 和 1.4 MPa)、提取温度(50、60、70、80 和 90℃)和提取时间(10、20、30、40 和 50 min)对提取率的影响。

(2)正交实验设计

在单因素实验基础上, 选择表 1 中的 4 个因素设计正交实验。

1.3.5 不同提取方法的比较

为研究两种方法协同提取的有效性, 课题组进行了加压水提法、碱液提取法和加压辅助碱法提取的对比实验,

实验后测定蝉花子实体多糖提取率。其中, 加压水提法的提取条件为: 提取压力 0.3 MPa、料液比 1:20 (g:mL)、提取温度 70℃、提取时间 30 min; 碱液提取法的提取条件为: 氢氧化钠浓度 0.3 mol/L、料液比 1:20 (g:mL)、提取温度 70℃、提取时间 30 min; 加压辅助碱法的提取条件为: 提取压力 0.3 MPa、氢氧化钠浓度 0.3 mol/L、料液比 1:20 (g:mL)、提取温度 70℃、提取时间 30 min。

表 1 正交实验因素水平表

Table 1 Factor levels table of orthogonal experimental design

水平	因素			
	A 氢氧化钠浓度/(mol/L)	B 提取压力/MPa	C 提取温度/℃	D 提取时间/min
1	0.2	0.8	60	20
2	0.3	1.0	70	30
3	0.4	1.2	80	40
4	0.5	1.4	90	50

1.3.6 体外免疫活性实验

(1)小鼠模型的建立及给药方案

将 60 只 SPF 级雄性小鼠, 适应性喂养 7 d 后, 随机分为 6 组, 分别为: 空白对照组、模型组(环磷酰胺)、左旋咪唑组(10 mg/kg)、蝉花子实体多糖低剂量组(50 mg/kg)、中剂量组(100 mg/kg)、高剂量组(200 mg/kg), 每组 10 只。空白对照组注射生理盐水, 余下各组小鼠注射环磷酰胺(50 mg/kg), 若一周后小鼠模型都出现免疫力低下的迹象, 例如自主活动减少、体重增加缓慢、反应迟缓、蜷缩和拱起背部以及毛发略显暗淡等特征^[27], 说明造模成功。造模的同时, 给每组小鼠分别按 20 mL/kg 灌胃, 固定时间每天 9 点, 连续 42 d。实验期间小鼠饲养于昼夜交替 12 h、温度 24~26℃、湿度 50%~55%、噪音处于 60 dB 以下的 SPF 级动物房内, 且自由饮食。

(2)小鼠体重增长率及脏器指数的测定

小鼠实验前称量一次体重(初次体重), 实验期间每周称取一次小鼠体重, 末次给药后, 禁食、不禁水 16 h, 称量小鼠体重(末次体重), 按照公式(2)计算小鼠体重增长率(%), 随后将小鼠处死, 并于冰上将小鼠的胸腺、脾脏摘掉, 用预冷的 0.9%生理盐水清洗干净, 水分经滤纸吸干, 称重, 按照公式(3)计算脏器指数(mg/g)。

$$\text{体重增长率}/\% = (\text{末次体重} - \text{初次体重}) \times 100 / \text{末次体重} \quad (2)$$

$$\text{脏器指数} = \text{脏器质量} / \text{小鼠末次体重} \quad (3)$$

(3)小鼠细胞因子和免疫球蛋白含量检测

末次给药后, 禁食、不禁水 16 h, 对小鼠眼球取血, 所取血样在 4℃冰箱内放置过夜, 在低温和 3000 r/min 的条件下, 离心 10 min, 分离血清。采用 ELISA 试剂盒, 测定血清中 TNF- α 、IL-2、IL-6 含量和免疫球蛋白 IgA、IgG、

IgM 的含量。

(4)小鼠脾淋巴细胞增殖实验

参照武万兴等^[28]的方法并加以改进制备小鼠脾细胞悬液(细胞密度为 5×10^6 个/mL), 然后分别加入 96 孔培养板中, 每孔加入 90 μL , 分 2 孔加入, 一孔按 5 $\mu\text{g/mL}$ 加 ConA 液 10 μL , 另一孔加 RPMI1640 完全培养液 10 μL 作为对照, 每个样品设 3 个复孔, 每个培养板设置空白对照孔(只加 RPMI1640 完全培养液)。放于含 5% CO_2 的培养箱中培养(温度 37°C , 48 h)。于 450 nm 处, 采用 CCK-8 法用酶标仪测定 OD 值, 并计算小鼠脾淋巴细胞增殖刺激指数^[29], 见公式(4)。

小鼠脾淋巴细胞增殖刺激指数=(对照孔 OD-空白 OD)/(加 ConA 孔 OD-空白 OD) (4)

1.4 数据处理

每组实验均重复 3 次。采用正交设计助手 V3.1 专业版和 SPSS 17 软件对数据进行分析与处理。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 氢氧化钠浓度对蝉花子实体多糖提取率的影响

蝉花子实体多糖提取率随着氢氧化钠浓度的增加先升高后下降。当氢氧化钠浓度为 0.3 mol/L 时, 提取率达到最大值为 8.66%, 之后随之下降。可能是由于在一定的碱液浓度内, 增加氢氧化钠浓度, 碱破坏细胞壁的程度增强, 多糖溶出增多, 提取率升高; 当氢氧化钠浓度大于 0.3 mol/L 后, 过大碱液浓度, 促使多糖发生脱脂反应^[30], 多糖结构被部分破坏而降解, 提取率下降。这与王娜等^[26]的研究结果一致。故将氢氧化钠浓度确定为 0.3 mol/L。

2.1.2 提取压力对蝉花子实体多糖提取率的影响

蝉花子实体多糖提取率随着提取压力的升高呈现先上升后下降的趋势。当提取压力为 1.0 MPa 时, 蝉花子实体多糖达到最大, 为 8.68%, 压力继续升高时, 提取率反而下降。可能是由于, 在一定的压力范围内, 升高提取压力, 利于蝉花子实体细胞壁的破碎, 加速多糖的溶出, 提取率上升; 当提取压力大于 1.0 MPa 后, 过高的压力, 会促使部分对多糖的分解^[21], 提取率降低。这与郭雪等^[31]的研究结果趋势一致。故将提取压力确定为 1.0 MPa。

2.1.3 提取温度对蝉花子实体多糖提取率的影响

蝉花子实体多糖提取率随着提取温度的升高先升高后降低。当提取温度为 70°C 时, 蝉花子实体多糖达到最大, 为 8.69%, 然后降低。可能是由于, 在加压的情况下, 提取温度升高, 有利于细胞内多糖的扩散和溶出, 提取率升高; 当提取温度大于 70°C 后, 在加压下的热碱液, 会导致多糖降解^[32], 提取率降低。这与梁雪等^[33]的研究结果趋势一致。故将提取温度确定为 70°C 。

2.1.4 提取时间对蝉花子实体多糖提取率的影响

蝉花子实体多糖提取率随着提取时间的延长先升高后降低。当提取时间为 30 min 时, 蝉花子实体多糖达到最大, 为 8.67%, 随后会下降。可能是由于, 延长提取时间, 有利于细胞破壁, 多糖溶出增多, 提取率升高; 当提取时间大于 30 min 后, 过长的提取时间, 易导致其他杂质溶出, 促使多糖溶出减少^[34], 提取率降低。这与洪开文^[35]的研究结果趋势一致。故将提取时间确定为 30 min。

2.2 正交实验结果

蝉花子实体多糖提取正交实验结果见表 2, 方差分析结果见表 3。

表 2 正交实验结果
Table 2 Results of orthogonal experiment

实验号	因素					多糖提取率/%
	A	B	C	D	空白	
1	1	1	1	1	1	6.81
2	1	2	2	2	2	7.98
3	1	3	3	3	3	8.36
4	1	4	4	4	4	6.93
5	2	1	2	3	4	7.45
6	2	2	1	4	3	7.16
7	2	3	4	1	2	6.56
8	2	4	3	2	1	7.65
9	3	1	3	4	2	7.52
10	3	2	4	3	1	7.69
11	3	3	1	2	4	7.22
12	3	4	2	1	3	6.51
13	4	1	4	2	3	5.42
14	4	2	3	1	4	5.53

表 2(续)

实验号	因素					多糖提取率/%
	A	B	C	D	空白	
15	4	3	2	4	1	5.21
16	4	4	1	3	2	5.49
k_1	7.520	6.800	6.670	6.353	6.840	/
k_2	7.205	7.090	6.787	7.068	6.887	/
k_3	7.235	6.837	7.265	7.248	6.863	/
k_4	5.412	6.645	6.650	6.705	6.782	/
R	2.108	0.445	0.615	0.895	0.105	/

注: /表示无此项,下同。

表 3 方差分析结果
Table 3 Variance analysis results

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A	11.157	3	27.346	9.280	*
B	0.408	3	1.000	9.280	/
C	0.993	3	2.434	9.280	/
D	1.895	3	4.645	9.280	/
误差	0.41	3	/	/	/

注: *表示差异显著($P<0.05$)。

由表 2、3 的结果分析可知,4 个因素的影响顺序为: $A>D>C>B$ 。氢氧化钠浓度(A)对蝉花子实体多糖提取率影响较大,达到了显著水平,其他因素不显著。经对 R 值的分析,得出最佳提取工艺参数为: $A_1B_2C_3D_3$,即氢氧化钠浓度 0.2 mol/L、提取压力 1.0 MPa、提取温度 80℃、提取时间 40 min。在上述最优条件下做验证实验,重复 3 次,得到蝉花子实体多糖提取率为 8.68%(3 次平均值)。

2.3 蝉花子实体多糖不同提取方法的比较

由表 4 可知,不同提取方法所得的多糖提取率不同,加压辅助碱法提取多糖的提取率最高为 8.69%,与加压水提法和碱液提取法相比,分别提高了 27.42%和 23.62%,说明协同提取效果优于单一提取法。

2.4 小鼠免疫活性实验结果

2.4.1 小鼠体重增长率及脏器指数的测定

脏器指数在一定程度上能反映机体的免疫力^[36]。模型

组小鼠与空白对照组相比,其体重增长率、胸腺指数和脾脏指数极显著下降($P<0.01$)。与模型组相比,左旋咪唑组小鼠体重增长率、胸腺指数和脾脏指数极显著增加($P<0.01$);蝉花子实体多糖低、中、高剂量组小鼠体重增长率增加显著($P<0.01$);蝉花子实体多糖低剂量组小鼠脏器指数有所增加,但无显著性,中、高剂量组脏器指数显著增加($P<0.05$, $P<0.01$),说明蝉花子实体多糖能显著增加免疫力低下小鼠模型的体重增长率和脏器指数,提高其免疫力,这与杜金莎等^[37]研究的结果相一致。

2.4.2 小鼠细胞因子和免疫球蛋白含量的测定

细胞因子是一种能够调节免疫的小分子多肽,对调节免疫有重要作用^[38]。由表 6 可知,与空白对照组相比,模型组小鼠的细胞因子 TNF- α 、IL-2 和 IL-6 含量极显著降低($P<0.01$)。与模型组小鼠相比,左旋咪唑组和蝉花子实体多糖组小鼠的细胞因子 TNF- α 、IL-2 和 IL-6 含量均显著增加($P<0.05$, $P<0.01$),这与杜金莎^[39]的研究结果相一致。

表 4 不同提取方法提取效果的比较
Table 4 Comparison of extraction effects of different extraction methods

提取方法	料液比(g/mL)	氢氧化钠 浓度/(mol/L)	提取压力/MPa	提取温度/℃	提取时间/min	多糖提取率/%
加压水提法	1:20	/	1.0	70	30	6.82±0.34
碱液提取法	1:20	0.3	/	70	30	7.03±0.25
加压辅助碱法	1:20	0.2	1.2	70	30	8.69±0.38 ^{ab}

注:与加压水提法相比,^a表示具有显著性差异($P<0.05$);与碱液提取法相比,^b表示具有显著性差异($P<0.05$)。

表 5 蝉花子实体多糖对小鼠体重增长率及脏器指数的影响(n=10)

Table 5 Effects of polysaccharides from *Cordyceps cicadae* fruiting body on body weight growth rates and organ indexes in mice (n=10)

组别	体重 增长率/%	胸腺指数 /(mg/g)	脾脏指数 /(mg/g)
空白对照组	23.17	2.36±0.25	3.28±0.29
模型组	3.42 ^{##}	1.08±0.11 ^{##}	2.09±0.22 ^{##}
左旋咪唑组	19.68 ^{**}	2.03±0.19 ^{**}	2.86±0.24 ^{**}
蝉花子实体多糖 低剂量组	12.23 ^{**}	1.33±0.13	2.21±0.21
蝉花子实体多糖 中剂量组	15.56 ^{**}	1.76±0.18 [*]	2.58±0.19 [*]
蝉花子实体多糖 高剂量组	19.23 ^{**}	2.01±0.20 ^{**}	2.88±0.18 ^{**}

注: 与空白对照组相比, [#]*P*<0.05; ^{##}*P*<0.01; 与模型组相比, ^{*}*P*<0.05; ^{**}*P*<0.01, 下同。

表 6 蝉花子实体多糖对小鼠细胞因子水平的影响(n=10)

Table 6 Effects of polysaccharides from *Cordyceps cicadae* fruiting body on cytokine levels in mice (n=10)

组别	TNF- α / (pg/mL)	IL-2/ (pg/mL)	IL-6/ (pg/mL)
空白对照组	353.59±34.85	0.265±0.012	33.62±3.29
模型组	172.62±28.64 ^{##}	0.124±0.011 ^{##}	15.09±1.52 ^{##}
左旋咪唑组	325.43±32.56 ^{**}	0.235±0.009 ^{**}	28.91±2.25 ^{**}
蝉花子实体多 糖低剂量组	217.86±29.88 [*]	0.157±0.013 [*]	18.84±1.44 [*]
蝉花子实体多 糖中剂量组	268.15±30.45 ^{**}	0.192±0.018 ^{**}	23.25±2.24 ^{**}
蝉花子实体多 糖高剂量组	312.45±35.24 ^{**}	0.228±0.015 ^{**}	26.88±2.52 ^{**}

体液免疫功能检查的常用方法是测定血清免疫球蛋白(Ig)。由表 7 可知, 与空白对照组相比, 模型组小鼠的免疫球蛋白 IgA、IgG 和 IgM 含量极显著降低(*P*<0.01), 说明环磷酰胺可导致小鼠免疫力低下。与模型组小鼠相比, 左旋咪唑组和蝉花子实体多糖组小鼠的免疫球蛋白 IgA、IgG 和 IgM 含量均显著增加(*P*<0.05, *P*<0.01)。说明蝉花子实体多糖具有提高机体免疫力的作用, 这与贾国军等^[16]的研究结果相一致。

2.4.3 小鼠脾淋巴细胞增殖能力的检测

脾淋巴细胞增殖刺激指数的大小可反映机体免疫水平。由表 8 可知, 与空白对照组相比, 模型组小鼠的脾淋巴细胞增殖刺激指数极显著降低(*P*<0.01)。与模型组相比, 左旋咪唑组小鼠脾淋巴细胞增殖刺激指数极显著增加(*P*<0.01); 蝉花子实体多糖组小鼠低剂量组虽有所增加, 但无显著性差异; 中、高剂量组小鼠脾淋巴细胞增殖刺激指数明显增加, 且差异性具有统计学意义(*P*<0.05, *P*<0.01)。说明蝉花子实体多糖能有效增加小鼠脾淋巴细胞

增殖刺激指数, 提高机体免疫力水平。这与李思迪等^[40]的研究结果相一致。

表 7 蝉花子实体多糖对小鼠免疫球蛋白含量的影响(n=10)

Table 7 Effects of polysaccharides from *Cordyceps cicadae* fruiting body on immunoglobulin content in mice (n=10)

组别	IgA/ (μ g/mL)	IgG/ (mg/mL)	IgM/ (mg/mL)
空白对照组	68.87±9.23	2.25±0.13	0.285±0.014
模型组	42.57±7.54 ^{##}	1.31±0.11 ^{##}	0.134±0.012 ^{##}
左旋咪唑组	62.59±8.69 ^{**}	2.14±0.12 ^{**}	0.267±0.015 ^{**}
蝉花子实体多 糖低剂量组	48.75±8.05 [*]	1.58±0.13 [*]	0.178±0.013 [*]
蝉花子实体多 糖中剂量组	55.65±8.34 ^{**}	1.92±0.15 ^{**}	0.215±0.016 ^{**}
蝉花子实体多 糖高剂量组	61.82±7.91 ^{**}	2.11±0.18 ^{**}	0.258±0.018 ^{**}

表 8 蝉花子实体多糖对小鼠脾淋巴细胞增殖刺激指数的影响(n=10)

Table 8 Effects of polysaccharides from *Cordyceps cicadae* fruiting body on the spleen lymphocyte proliferation stimulation index in mice (n=10)

组别	脾淋巴细胞增殖刺激指数
空白对照组	0.25±0.015
模型组	0.18±0.022 ^{##}
左旋咪唑组	0.24±0.018 ^{**}
蝉花子实体多糖低剂量组	0.20±0.021
蝉花子实体多糖中剂量组	0.22±0.019 [*]
蝉花子实体多糖高剂量组	0.24±0.023 ^{**}

3 结 论

本研究采用加压辅助碱法提取蝉花子实体多糖, 经单因素和正交实验优化得到最佳提取工艺为: 氢氧化钠浓度 0.2 mol/L、提取压力 1.0 MPa、提取温度 80℃、提取时间 40 min, 在此条件下蝉花子实体多糖提取率为 8.68%, 该方法提取效果优于单一提取法。体外免疫活性实验表明, 蝉花子实体多糖能有效增加模型小鼠的体重增长率及脏器指数, 细胞因子(TNF- α 、IL-2 和 IL-6)的含量, 免疫球蛋白(IgA、IgG 和 IgM)的含量和脾淋巴细胞增殖刺激指数, 表明其具有明显的提高免疫力作用。本研究可为蝉花子实体多糖的高效提取及深加工产品开发应用方面提供科学依据。

参考文献

[1] 邵佳蔚, 于瑞莲, 喻振, 等. 人工蝉花子实体对庆大霉素所致小鼠急性肾衰竭的影响及机制研究[J]. 中国药房, 2018, 29(19): 2648–2652.
SHAO JW, YU RL, YU Z, et al. Study on the effects of artificial *Isaria cicadae* cystocarp on gentamicin-induced acute renal failure in mice and its mechanism [J]. Chin Pharm, 2018, 29(19): 2648–2652.
[2] 李增智, 栾丰刚, HYWEL-JONES NIGEL L, 等. 与蝉花有关的虫草菌

- 生物多样性的研究 II: 重要药用真菌蝉花有性型的发现及命名[J]. 菌物学报, 2021, 40(1): 95–107.
- LI ZZ, LUAN FG, HYWEL-JONES NL, *et al.* Biodiversity of cordycipitoid fungi associated with *Isaria cicadae* Miquel II: Teleomorph discovery and nomenclature of Chanhua, an important medicinal fungus in Chian [J]. *Mycosystema*, 2021, 40(1): 95–107.
- [3] 卞智慧, 于瑞莲, 魏思敏, 等. 蝉花、蛹虫草和冬虫夏草药材中脂肪酸含量的比较研究[J]. 中国药房, 2017, 28(30): 4252–4256.
- BIAN ZH, YU RL, WEI SM, *et al.* Comparative study on the contents of fatty acids in *Isaria cicadae*, *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* [J]. *Chin Pharm*, 2017, 28(30): 4252–4256.
- [4] 李挺, 宋斌, 林群英. 蝉花的研究进展[J]. 中药材, 2008, (9): 1443–1448.
- LI T, SONG B, LIN QY. Research progress of cicada flower [J]. *Chin Med Mat*, 2008, (9): 1443–1448.
- [5] ZHAO J, XIE J, WANG LY, *et al.* Advanced development in chemical analysis of *Cordyceps* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 87: 271–289.
- [6] MENG C, HAN Q, WANG X, *et al.* Determination and quantitative comparison of nucleosides in two *Cordyceps* by HPLC-ESI-MS-MS [J]. *J Chromatogr Sci*, 2019, 57(5): 426–433.
- [7] 温鲁, 唐玉玲, 张平. 蝉花与有关虫草活性成分检测比较[J]. 江苏中医药, 2006, (1): 45–46.
- WEN L, TANG YL, ZHANG P. Comparison of detection of active components between *Cordyceps soboli fera* and related *Cordyceps* [J]. *Jiangsu J Tradit Chin Med*, 2006, (1): 45–46.
- [8] 屈可伸. 蝉花的中药药理研究进展[J]. 健康之路, 2016, 15(9): 25.
- QU KS. Progress in pharmacological research of cicada flower [J]. *Health Way*, 2016, 15(9): 25.
- [9] 陈惠. 食用菌与健康[M]. 上海: 上海科学普及出版社, 2021.
- CHEN H. Edible mushrooms and health [M]. Shanghai: Shanghai Science Popularization Press, 2021.
- [10] ZHANG Y, WU YT, ZHENG W, *et al.* The antibacterial activity and antibacterial mechanism of a polysaccharide from *Cordyceps cicadae* [J]. *J Funct Food*, 2017, 38: 273–279.
- [11] 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.
- JIANG N, GAO DW, LIN JS, *et al.* Research progress of cicada flower [J]. *J Jiangsu Agric Sci*, 2017, 45(8): 11–14.
- [12] 秦文平, 慕程, 殷世鹏. 中药蝉花的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国中医药图书情报杂志, 2019, 43(4): 73–76.
- QIN WP, MU C, YIN SP. Research progress of chemical components and pharmacological effect of *Isaria cicadae* Miquel [J]. *Chin J Lib Inf Sci Tradit Chin Med*, 2019, 43(4): 73–76.
- [13] 李建平, 张铁, 曾文波. 蝉花虫草分类地位及其遗传多样性研究进展[J]. 中国食用菌, 2019, 38(11): 1–5, 16.
- LI JP, ZHANG T, ZENG WB. Research progresses on taxonomic status and genetic diversity of *Isaria cicadae* [J]. *Chin Edible Fungi*, 2019, 38(11): 1–5, 16.
- [14] 李龙宇, 葛言琪, 伍一炜, 等. 蝉花多糖的研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2019, 33(4): 83–86.
- LI LY, GE YQ, WU YW, *et al.* Research progress on polysaccharides from *Cordyceps cicadae* [J]. *Res Pract Chin Med*, 2019, 33(4): 83–86.
- [15] 李忠, 刘爱英, 金道超. 蝉拟青霉深层发酵的研究[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2010, 30(6): 682–687.
- LI Z, LIU AIY, JIN DC. Study on submerged fermentation of *Paecilomyces cicadae* [J]. *J Hebei Univ Technol (Nat Sci Ed)*, 2010, 30(6): 682–687.
- [16] 贾国军, 王小英, 负建民, 等. 蝉花多糖的提取和生物活性及产品研发进展[J]. 食品与机械, 2023, 39(5): 217–223.
- JIA GJ, WANG XY, YU JM, *et al.* Research progress on extraction, biological activities and product development of polycharides from cicada flower [J]. *Food Mach*, 2023, 39(5): 217–223.
- [17] 宋佳敏, 王鸿飞, 孙朦, 等. 响应面法优化金蝉花多糖提取工艺及抗氧化活性分析[J]. 食品科学, 2018, 39(4): 275–281.
- SONG JM, WANG HF, SUN M, *et al.* Optimization of extraction and antioxidant activity of polysaccharides from *Cordyceps cicadae* by response surface methodology [J]. *Food Sci*, 2018, 39(4): 275–281.
- [18] 凡军民, 谢正林, 谢春芹, 等. 超声波辅助双水相体系提取蝉花多糖及抗氧化研究[J]. 食品科技, 2020, 45(5): 196–201.
- FAN JM, XIE ZL, XIE CQ, *et al.* Optimization of ultrasonic-assisted aqueous two-phase extraction and antioxidant activity of polysaccharides from *Cordyceps cicadae* [J]. *Food Sci Technol*, 2020, 45(5): 196–201.
- [19] 南婷婷, 许东霞, 王余宸铭, 等. 蝉花孢子粉多糖的酶辅助提取及其对酒精性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(2): 295–301, 309.
- NAN TT, XU DX, WANG YCM, *et al.* Enzyme-assisted extraction of polysaccharides from *Cordyceps cicadae* spores and its hepatoprotective effect against alcohol induced liver injury in mice [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2021, 42(2): 295–301, 309.
- [20] 姚婷, 罗靖, 宋捷民. 金蝉花多糖的微波辅助提取工艺研究[J]. 江西中医学院学报, 2012, 24(5): 73–76.
- LUO T, LUO J, SONG JM. Study on microwave-assisted extraction of polysaccharides in *Cordyceps cicadae* [J]. *J Jiangxi Univ Chin Med*, 2012, 24(5): 73–76.
- [21] 钟鑫, 郭俊麟, 佟喜旺, 等. 加压溶剂法提取榛蘑多糖的工艺优化及其抗氧化研究[J]. 粮食与油脂, 2019, 32(5): 93–96.
- ZHONG X, GUO JL, TONG XW, *et al.* Optimization of extraction process of polysaccharide from *Armillaria mellea* by pressurized liquid method and evaluation of antioxidative activity [J]. *Cere Oil*, 2019, 32(5): 93–96.
- [22] 张闪闪, 杨嘉丹, 赵文婷, 等. 加压热水浸提银耳多糖的工艺优化、结构鉴定及抗氧化活性分析[J]. 吉林农业大学学报, 2023, 45(3): 324–331.
- ZHANG SS, YANG JD, ZHAO WT, *et al.* Process optimization, structure identification and antioxidant activity analysis of polysaccharides from *Tremella fuciformis* by pressurized hot water extraction method [J]. *J Jilin Agric Univ*, 2023, 45(3): 324–331.
- [23] XU Y, CAI F, YU ZY, *et al.* Optimisation of pressurized water extraction of polysaccharides from blackcurrant and its antioxidant [J]. *Food Chem*, 2016, 194: 650–658.
- [24] 张召, 易阳, 彭凯迪, 等. 莲藕多糖的碱法提取工艺优化与抗氧化活性评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(2): 256–263.
- ZHANG Z, YI Y, PENG KD, *et al.* Optimization of alkaline extraction technology and evaluation of antioxidant activity of *Nelumbo nucifera* Gaertn. polysaccharide [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(2): 256–263.
- [25] 王悦, 刘晓谦, 张永欣, 等. 基于碱提多糖收率及含量的茯苓质量评价

- 方法研究[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(2): 443–454.
- WANG Y, LIU XQ, ZHANG YX, *et al.* Quality evaluation methods of *Poria* based on yield and content of alkali extracted polysaccharide [J]. Chin J Chin Mater Med, 2023, 48(2): 443–454.
- [26] 王娜, 刘玉叶, 刘美玲, 等. 响应面优化金丝小枣碱提多糖工艺及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(7): 163–169.
- WANG N, LIU YY, LIU ML, *et al.* Optimization of alkali extraction process of 'Jinsixiaozao' polysaccharide by response surface methodology and its antioxidant activity [J]. Sci Technol Food Ind, 2023, 44(7): 163–169.
- [27] 尹志强, 申丽媛, 姜泽昆, 等. 白藜芦醇对免疫力低下小鼠的免疫调节作用研究[J]. 食品科技, 2021, 46(9): 216–220.
- YIN MQ, SHEN LY, JIANG ZK, *et al.* Study on the immunomodulatory effect of resveratrol on immunosuppressive mice [J]. Food Sci Technol, 2021, 46(9): 216–220.
- [28] 武万兴, 段志辉, 薛瑞轩, 等. 基于网络药理学研究灵芝-西洋参-冬虫夏草复方增强免疫力活性及作用机制[J]. 食品工业科技, 2023, 44(8): 392–404.
- WU WX, DUAN ZH, XUE LX, *et al.* Research on the immune enhancing activity and mechanism of *Ganoderma lucidum* American ginseng *Ophiocordyceps sinensis* compound based on network pharmacology [J]. Sci Technol Food Ind, 2023, 44(8): 392–404.
- [29] 窦霞, 杨锡仓, 史巧霞, 等. 红党参多糖对免疫力低下模型小鼠免疫功能的影响[J]. 甘肃中医药大学学报, 2021, 38(6): 7–11.
- DOU X, YANG XC, SHI QX, *et al.* The effect of polysaccharides from *Codonopsis pilosula* on immune function in mice with immune deficiency [J]. J Gansu Univ Tradit Chin Med, 2021, 38(6): 7–11.
- [30] 曾红亮, 张怡, 薛雅茹, 等. 响应面法优化金柑多糖碱提取工艺的研究[J]. 热带作物学报, 2015, 36(1): 179–184.
- ZENG HL, ZHANG Y, XUE YR, *et al.* Optimization of the alkali extraction technology of *Fortunella margarita* polysaccharides via response surface methodology [J]. J Trop Crop, 2015, 36(1): 179–184.
- [31] 郭雪, 李兴国, 孙侨冶, 等. 响应面法优化加压水提法提取笃斯越橘多糖的工艺研究[J]. 北方园艺, 2019, (5): 116–122.
- GUO X, LI XG, SUN QY, *et al.* Optimization of pressurized water extraction technology of polysaccharides from *Duchesne bilberry* by response surface methodology [J]. North Hort, 2019, (5): 116–122.
- [32] 王萱萱, 刘春宇, 谢贝昱, 等. 碱提甘蔗皮多糖提取工艺、初步结构及其对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 中国农业科学, 2021, 54(12): 2653–2665.
- WANG XX, LIU CY, XIE BY, *et al.* Extraction technology, preliminary structure and α -glucosidase inhibition of polysaccharide with alkaline extracted from sugarcane peel [J]. Sci Agric Sin, 2021, 54(12): 2653–2665.
- [33] 梁雪, 杨越冬, 杜彬, 等. 用加压溶剂萃取法提取板栗多糖的工艺条件[J]. 经济林研究, 2013, 31(3): 98–102.
- LIANG X, YANG YD, DU B, *et al.* Process conditions of pressurized solvent extraction of polysaccharide in China chestnut [J]. Nonwood Forest Res, 2013, 31(3): 98–102.
- [34] CAI WR, GU XH, TANG J. Extraction, purification, and characterization of the polysaccharides from *Opuntia milpa alta* [J]. Carbohydr Polym, 2007, 71(3): 403–410.
- [35] 洪开文. 微波辅助碱法提取非黄多糖的工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵科技, 2023, 59(3): 36–42.
- HONG KW. Study on microwave assisted alkali extraction process and antioxidant activity of polysaccharide from hotbed chives [J]. Food Ferment Sci Technol, 2023, 59(3): 36–42.
- [36] 罗青, 禄璐, 闫亚美, 等. 枸杞粉及其多糖对环磷酰胺致免疫低下小鼠免疫及肠道菌群的调节作用[J]. 食品科学, 2022, 43(11): 137–148.
- LUO Q, LU L, YAN YM, *et al.* Regulatory effect of *Lycium barbarum* powder and its polysaccharide on immunity and gut microbiota of immunocompromised mice induced by cyclophosphamide [J]. Food Sci, 2022, 43(11): 137–148.
- [37] 杜金莎, 吕中明, 王民生. 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.
- DU JS, LV ZM, WANG MS. The effect of cicada flower fruiting body on immune function in mice [J]. Jiangsu Med J, 2013, 39(18): 2117–2119.
- [38] MASI A, GLOZIER N, DALE R, *et al.* The immune system, cytokines, and biomarkers in autism spectrum disorder [J]. Neurosci Bull, 2017, 33(2): 194–204.
- [39] 杜金莎. 蝉花子实体的免疫调节作用及其机制[D]. 南京: 东南大学, 2013.
- DU JS. Immunomodulatory effect and mechanism of cicada flower fruiting body [D]. Nanjing: Southeast University, 2013.
- [40] 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.
- LI SD, SHENG YH, ZHANG ZL, *et al.* Experimental study on the effects of cicada flower water extract and cicada flower compound on immune function in mice [J]. Drug Eva Res, 2020, 43(4): 636–641.

(责任编辑: 于梦娇 张晓寒)

作者简介



金 瑾, 高级工程师, 主要研究方向为食品检验检测。
E-mail: emma1008sun@163.com



隋志方, 正高级工程师, 主要研究方向为食品及功能食品质量控制与分析检测。
E-mail: 35128347@qq.com