

复配灵芝多糖与牛乳酪蛋白水解物对巨噬细胞和小鼠的免疫调节作用

曾志安¹, 曾小玲², 朱秋轶¹, 潘丽娜², 刘星雨¹, 汪家琦², 苗建银¹, 安泗渝¹, 刘果^{1,3}, 曹庸^{1*}
(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 澳优乳业(中国)有限公司, 湖南长沙 410200)
(3. 仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东广州 510225)

摘要: 该文基于牛乳酪蛋白水解物和灵芝多糖的免疫调节功效, 探究其复配物对巨噬细胞和小鼠的免疫调节作用及其潜在协同效应。利用低中高剂量(100、200、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)复配物样品及其单组分(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)样品, 测定巨噬细胞增殖能力、吞噬能力、分泌 NO、IL-6、TNF- α 的能力, 测定小鼠免疫脏器指数、淋巴细胞增殖能力、迟发型变态反应程度和 NK 细胞活性。结果显示: 与空白组相比, 中高低剂量复配物、灵芝多糖和牛乳酪蛋白水解物均能显著提高巨噬细胞的吞噬能力(116.78%、133.47%、137.73%、131.07%、124.63%)、NO 释放量(22.19、27.77、29.49、28.82、26.17 μm)、IL-6 释放量(0.317、0.323、0.293、0.309、0.297 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、TNF- α 释放量(0.42、0.50、0.54、0.52、0.47 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ($P < 0.05$)。复配物低中高剂量均能增加小鼠足趾厚度差(0.305、0.354、0.429 mm)、提高脾淋巴细胞转化能力(25.30%、34.20%、36.13%)、NK 细胞活性(0.36、0.53、0.74) ($P < 0.05$)。研究结果表明, 复配物能促进巨噬细胞和小鼠的免疫调节作用, 并且存在一定的协同作用。

关键词: 灵芝多糖; 牛乳酪蛋白水解物; 免疫调节

文章编号: 1673-9078(2024)09-37-44

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.9.1153

Immunomodulatory Effects of *Ganoderma lucidum* Polysaccharides Complexed with Bovine Casein Hydrolysate on Macrophages and Mice

ZENG Zhian¹, ZENG Xiaoling², ZHU Qiuyi¹, PAN Lina², LIU Xingyu¹, WANG Jiaqi², MIAO Jianying¹, AN Siyu¹,
LIU Guo^{1,3}, CAO Yong^{1*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (2. Ausnutria Dairy (China) Co. Ltd., Changsha 410200, China) (3. College of Food Science and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: The immunomodulatory efficacy of bovine casein hydrolysate and *Ganoderma lucidum* polysaccharides were studied, focusing on the immunomodulatory effects of their complex on macrophages and mice, along with their

引文格式:

曾志安, 曾小玲, 朱秋轶, 等. 复配灵芝多糖与牛乳酪蛋白水解物对巨噬细胞和小鼠的免疫调节作用[J]. 现代食品科技, 2024, 40(9): 37-44.

ZENG Zhian, ZENG Xiaoling, ZHU Qiuyi, et al. Immunomodulatory effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides complexed with bovine casein hydrolysate on macrophages and mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(9): 37-44.

收稿日期: 2023-09-24

基金项目: 湖南省创新平台与人才计划(2019TP2066)

作者简介: 曾志安(1999-), 男, 硕士生, 研究方向: 食品工程, E-mail: 19927533059@qq.com

通讯作者: 曹庸(1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品化学、天然产物化学, E-mail: caoyong2181@scau.edu.cn

potential synergistic effects. Using low, medium, and high doses (100, 200, and 500 $\mu\text{g/mL}$) of the complex and its single-component (200 $\mu\text{g/mL}$), the proliferation capacity, phagocytosis, secretion of NO, interleukin (IL)-6, and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) of macrophages were determined. Additionally, the immune organ index, proliferation capacity of lymphocytes, degree of delayed-type hypersensitivity, and natural killer (NK) cell activity were measured in mice. The results showed that, compared to the blank group, low, medium and high dose complexes, *G. lucidum* polysaccharides, and bovine casein hydrolysates all significantly increased the phagocytosis capacity of macrophages (116.78%, 133.47%, 137.73%, 131.07%, and 124.63%, respectively), with NO release (22.19, 27.77, 29.49, 28.82, and 26.17 μm , respectively), IL-6 release (0.317, 0.323, 0.293, 0.309, and 0.297 $\mu\text{g/mL}$, respectively), and TNF- α release (0.42, 0.50, 0.54, 0.52, and 0.47 $\mu\text{g/mL}$, respectively) ($P < 0.05$). The complexes with low, medium, and high doses all increased the difference in toe thickness (0.305, 0.354, and 0.429 mm, respectively), enhanced spleen lymphocyte's transformation capacity (25.30%, 34.20%, and 36.13%, respectively), and enhanced NK cell activity (0.36, 0.53, and 0.74, respectively) in mice ($P < 0.05$). The study results indicated that the complexes promoted immunomodulatory effects in macrophages and mice and exhibited a synergistic effect.

Key words: *Ganoderma lucidum* polysaccharide; bovine casein hydrolysate; immunomodulation

免疫功能可以帮助机体抵御外来入侵抗原以及有害物质或者衰老细胞的损害^[1]。免疫力对人体来说十分重要,提高免疫力能让人们抵抗病毒,抵御疾病,保持良好的健康状况。通过药物可以提高免疫力,但伴随着巨大的副作用,无副作用的天然功能活性因子的需求日益增加。天然功能活性因子可以被加工成功能食品,天然的功能食品食品功效温和、副作用小并且稳定性好,在疾病预防以及康复饮食中广泛使用。天然功能复配食品具有多靶点作用^[2,3]。多糖蛋白质体系中,多糖是稳定剂、结构调理剂,起到保护功能因子的作用^[4,5],灵芝多糖本身具有提高免疫力的作用,添加到复合物中,保护功能因子的同时也能增加健康成分。本研究利用牛乳酪蛋白水解物和灵芝多糖进行复配,达到多机制多通路提高免疫力的效果,并进行实验验证。

乳制品为人类提供足够的蛋白质,研究发现乳源活性多肽具有显著的免疫调节功效^[6-8]。一些研究表明^[9,10],在酪蛋白中,有一些衍生的免疫肽,这些肽可以激活小鼠和人的巨噬细胞活性,使小鼠免受肺炎克雷伯菌的感染,同时免疫肽还可以激活人体的免疫系统,保护机体稳态,保持人体的健康状态。

灵芝中的多糖含量较高,目前知道的种类有200个以上,这些多糖大多以杂多糖形式存在^[11,12]。灵芝多糖通过调节机体氧化水平提高机体的免疫力^[13]。与此同时,灵芝还具有保肝、抗肿瘤、调节免疫逃逸解除的作用,其提高免疫力的作用机理一部分为调节机体的氧化应激水平,使机体处于一个稳态下^[14-18]。

牛乳酪蛋白水解物与赤灵芝多糖复配物的免疫

功效尚无报道,本文研究了两者复配物对巨噬细胞的免疫反应能力影响,进一步将复配物作用在小鼠上,探究复配物在免疫调节中的协同作用,为牛乳酪蛋白水解物和灵芝多糖的进一步开发利用提供理论依据,为其产业化和后续天然功能活性食品开发提供有力的理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验材料

赤灵芝子实体,购买于广州天河长湴菜市场;牛乳酪蛋白,购买于新西兰恒天然公司;Raw264.7巨噬细胞,购买于中国科学院细胞库。

1.1.2 实验试剂

HCl (AR),购于中国天津富宇精细化工;NaOH (AR),购于中国齐齐哈尔电化厂;K₂HPO₄ (AR),购于天津市福晨化学试剂厂;NaCl (AR)、KH₂PO₄ (AR),购于广州化学试剂厂。

1.1.3 实验仪器

AL104 万分天平,瑞典梅特勒-托利多公司;ShimNex WR C18 色谱柱,日本岛津公司;HWS-24 恒温金属浴,一恒科技有限公司;LC-10ATvp pLUS 高效液相色谱仪,日本岛津公司;BPX-70B 生化培养箱,一恒科技有限公司;PHS-3C pH 计,中国上海梅特勒-托利多仪器有限公司;XTZ-D 体式显微镜,重庆奥特光学仪器有限公司;低温连续相变萃取装置,广东省功能食品活性物重点实验室提供。

1.1.4 实验动物

SPF级6~8周BALB/c近交雄性小鼠, 雄性, 体质量均为18~22 g, 由广东斯嘉景达生物科技有限公司提供, 生产许可证号: SCXK(粤)2020~0052, 环境温度25~30℃, 湿度35%~50%, 实验方案经华南农业大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 实验方法

1.2.1 原料制备

1.2.1.1 灵芝多糖

制备方法参考文献^[19]。低温连续相变萃取条件为: 原料颗粒粉碎至3~5目、萃取时间180 min、萃取温度100℃、萃取溶剂水流量30 L/h。得到灵芝粗提物浓缩液后, 静置一定时间用酸碱调整pH值使蛋白质沉淀, 离心后取上清用体积分数80%乙醇进行醇沉, 收集沉淀得到灵芝粗多糖。对固形物为8 wt.%~10 wt.%的灵芝粗多糖水溶液利用喷雾干燥喷粉, 条件为: 进风温度为160℃, 出风温度为90℃, 喷雾流量为3.0 L/h。

1.2.1.2 牛乳酪蛋白水解物

制备方法参考文献^[20]。牛乳酪蛋白原料酶解得到酪蛋白水解物, 酪蛋白水解物经过制备液相分离纯化得到纯度较高的原料, 最后利用喷雾干燥喷粉, 条件为: 进风温度160℃, 出风温度95℃, 转速10 000 r/min。

1.2.1.3 复合物的制备

复合物的制备按照《GB/T 29602-2013 固体饮料》的执行标准进行, 将制备好的灵芝多糖粉末和牛乳酪蛋白水解物粉末, 按照实验设定的比例投入到卧式粉体混合机中充分混合。

1.2.2 巨噬细胞免疫活力评价

1.2.2.1 巨噬细胞增值能力测定

以灵芝多糖、牛乳酪蛋白水解物和复配物(灵芝多糖:牛乳酪蛋白水解物=1:1和1:2)作为样品。用完全培养基配制样品质量浓度梯度: 0、1、10、50、100、200、500、1 000 μg/mL, 收集对数期的细胞, 用适量的细胞浓度铺板, 培养24 h。弃上清, 每个孔加入200 μL样品, 培养24 h后去掉上清, 对照组每孔加入200 μL的0.5 mg/mL MTT溶液, 培养2 h后去掉上清, 最后每孔分别加入适量二甲基亚砜, 在570 nm处测定吸光值, 计算相对活性^[21]。

1.2.2.2 巨噬细胞吞噬能力测定

以复配物(灵芝多糖:牛乳酪蛋白水解物=1:2)

作为样品, 用完全培养基配制成不同质量浓度梯度: 0、100、200、500 μg/mL, 同时分别配置200 μg/mL的牛乳酪蛋白水解物和灵芝多糖样品。细胞培养和样品的添加参考1.2.2.1方法, 实验组加入200 μL不同浓度的样品, 阳性对照组为加1 μg/mL脂多糖(LPS)。培养24 h后, 在每个孔加入适量质量分数为0.1%中性红溶液, 继续培养, 离心去掉上清。使用PBS溶液清洗, 每个孔加入适量细胞裂解液, 震荡5 min, 在540 nm处测定吸光值。

1.2.2.3 巨噬细胞分泌NO能力测定

样品配制方法参考1.2.2.2, 细胞培养和样品的添加方法参考1.2.2.1, 培养24 h后收集细胞上清150 μL。按照试剂盒操作加入Griess A 50 μL, Griess B 50 μL。然后低速振荡10 min, 在酶标仪上于540 nm处测量吸光值, 按照NO测定试剂盒的说明测定细胞中NO释放量。

1.2.2.4 巨噬细胞分泌IL-6、TNF-α含量测定

样品配制方法参考1.2.2.2, 细胞培养和样品的添加方法参考1.2.2.1, 培养24 h后去掉上清, 每个孔加入200 μL样品, 阳性对照为1 μg/mL LPS, 培养结束后收集上清, 按试剂盒操作方法处理样品, 在490 nm处测定吸光值, 最后计算TNF-α、IL-6释放量。

1.2.3 小鼠免疫活性测定

1.2.3.1 动物实验设计

动物试验参考保健食品功能检验与评价方法(2023年版)。样品为牛乳酪蛋白水解物2:1灵芝多糖(复配样品), 阳性对照为脂多糖(LPS)。其中24只小鼠分为四组分别测定不同指标, 包括脾淋巴细胞转化、足跖增厚法、血清溶血素及常规解剖留样实验, 每组6只。表1为具体分组。

表1 免疫实验分组

Table 1 Immunoassay grouping

组别	只数	样品	剂量/(mg/kg)
空白对照组	24	水	
阳性对照组	24	脂多糖	100
复配样品低剂量组	24		50
复配样品中剂量组	24	复配样品	100
复配样品高剂量组	24		200

1.2.3.2 小鼠免疫脏器指数测定

解剖前24 h喂最后一次样品, 解剖前称重, 随后收集血液样本, 然后使用二氧化碳麻醉, 立刻分离脏器, 脏器使用生理盐水清洗三次。记录脏器质量, 以脾脏或胸腺(mg)与体质量(g)的比值来

衡量免疫活性。

1.2.3.3 小鼠淋巴细胞增殖能力测定

把小鼠处死后，快速取脾并放入保存液中，测定时把脾脏磨碎，制备成细胞悬液并且用完全培养液制备特定浓度的样本。参考小鼠淋巴细胞增殖能力测定方法制备待测样本。最后在每个孔加入 1 mL 酸性异丙醇，使用酶标仪测定光密度，波长为 570 nm。根据样品组和对照组的光密度差值衡量淋巴细胞的增殖能力^[22]。

1.2.3.4 小鼠迟发型变态反应程度测定

饲养小鼠一段时间后，取小鼠进行抗羊红细胞抗体 (SRBC) 注射实验，注射后经过四天培养，测量小鼠左后足跖部厚度，然后再注射适量体积分数为 20% SRBC，经过 24 h 测量小鼠左后足跖部厚度，重复三次，记录数据。以前后足跖部厚度的差值表示迟发型变态反应程度 (DTH) 程度，若样品组差值显著高于对照组，则提示样品有效^[23]。

1.2.3.5 小鼠NK细胞活性测定

把小鼠处死后，立即取脾放入保存液中，测定时磨碎脾脏，制备成细胞悬液并且用完全培养液制备特定浓度的样本。按照小鼠 NK 细胞活性测定的方法制备样品，测定时重复三次取平均值，最后使用酶标仪测定光密度，波长为 490 nm^[24]。

1.2.4 复配物稳定性测定

将复配物放在 4 °C 和 25 °C 下存放 25 d，在特定时间取样，配置成 10 mg/mL 的溶液，分别用不同的检测器分析不同保存条件下，复配物中灵芝多糖的分子量变化和牛乳酪蛋白水解物含量的变化，揭示复配物的稳定性。

1.2.4.1 灵芝多糖分子量的测定

灵芝多糖的分子量测定使用视差折光检测器，将复配样品配置成 10 mg/mL 过 0.22 μm 滤膜待测。色谱柱为凝胶色谱柱，流动相为纯水，测定流速是 0.6 mL/min，进样量为 20 μL^[25]。

1.2.4.2 牛乳酪蛋白水解物含量测定

将测定 pH 值后的复配样品过膜后，使用高效液相色谱仪进行分析^[26]。色谱条件为：C18 柱子 (4.6 mm×250 mm, 5 μm, Ultimate)，SPD-10A 检测器，波长为 214 nm。流动相为纯水和以及含有 φ=0.1% TFA 的乙腈。

1.3 数据处理

以上实验所获得的数据利用 Excel 2013 和 IBM SPSS Statistics 26 软件处理，数据结果表示方式为

平均值 ± 标准差值，作图采用 GraphPad Prism 9.0 软件分析，各组间进行单因素方差分析，同时根据 LSD 法进行显著性分析，当 $P < 0.05$ 说明结果显著。

2 结果与讨论

2.1 巨噬细胞免疫活性模型结果

2.1.1 各组样品对巨噬细胞增殖能力的影响

本文采用巨噬细胞增殖模型来初步研究复配物以及单组分的毒性和最佳作用剂量，马海航等^[27]研究发现巨噬细胞的数量能反映机体免疫功能情况。图 1 显示，赤灵芝多糖对巨噬细胞的增殖能力促进作用最强，其次是 1:1 配方，但 1:1 配方在 100、500 μg/mL 时促进效果下降，而 1:2 配方则呈现上升趋势，在 200 μg/mL 时复配物的促进作用甚至超过了赤灵芝多糖，此外牛乳酪蛋白水解物也能促进巨噬细胞的增殖能力，所以后续实验选用灵芝多糖 1:2 牛乳酪蛋白水解物作为样品。同时，所有配方在 500 μg/mL 及以下质量浓度时未显示出毒性，当质量浓度达到 1 000 μg/mL 时，多糖和 1:1 配方作用后的巨噬细胞增殖率已经下降，所以在后续实验中选用 100、200 和 500 μg/mL 这三种质量浓度进行进一步研究。

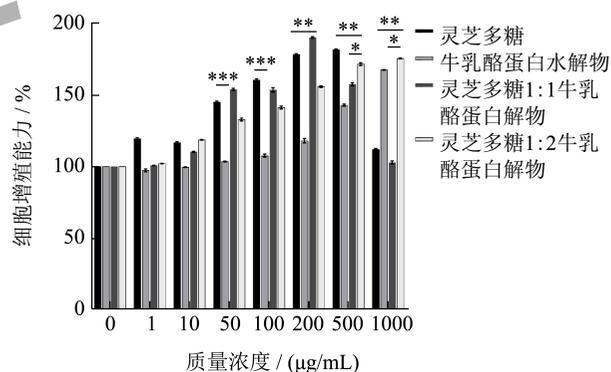


图 1 增殖能力图

Fig.1 Proliferation ability chart

注：* 代表显著性差异 ($P < 0.05$)，** 代表极显著性差异 ($P < 0.01$)。

2.1.2 复配物对巨噬细胞吞噬能力、分泌NO能力、分泌IL-6、TNF-α能力的影响

巨噬细胞是人体免疫的重要防线，吞噬能力能反映免疫调节作用的强弱^[28]。激活的细胞除了形态发生变化外，也会产生多种免疫应答反应，同时释放 NO 以及细胞因子 (TNF-α、IL-6) 等，一氧化氮 (NO) 是目前生物体内发现最小且具有生物活性

的分子，其功能有防御病原体、神经传导以及血管舒张的作用，这些调控因子与免疫调节过程息息相关^[29]。这些细胞因子是从单核-巨噬细胞、淋巴细胞等分泌的，作用是介导免疫反应。细胞因子的含量可作为判断机体免疫活性的指标之一^[30,31]。在这些细胞因子中，TNF- α 又叫肿瘤坏死因子- α ，在机体的免疫系统中能直接杀伤肿瘤，对人体来说十分重要，分泌的器官是巨噬细胞与淋巴细胞^[32]。图2显示，与空白对照组相比，各浓度的样品都可以增强巨噬细胞的吞噬能力，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，说明复配物在巨噬细胞的免疫反应中起到积极作用，其中复配物中高剂量 (133.47%、137.73%) 比两者单组分 (131.07%、124.63%) 的促进作用高，甚至接近阳性对照组 ($P < 0.05$)，初步表现出协同效应；与空白组相比，各浓度复配物及其单组分作用后，巨噬细胞中 NO 的释放量显著上升 ($P < 0.05$)，高剂量复配物的促进作用高于两者单组分；同时，与空白组相比，各浓度样品作用下，巨噬细胞 IL-6、TNF- α 的分泌量也是显著上升 ($P < 0.05$)，中高剂量复配物的促进作用接近或者超过两者单组分。可以初步看出，复配物对巨噬细胞的免疫调节作用具有一定的协调作用。

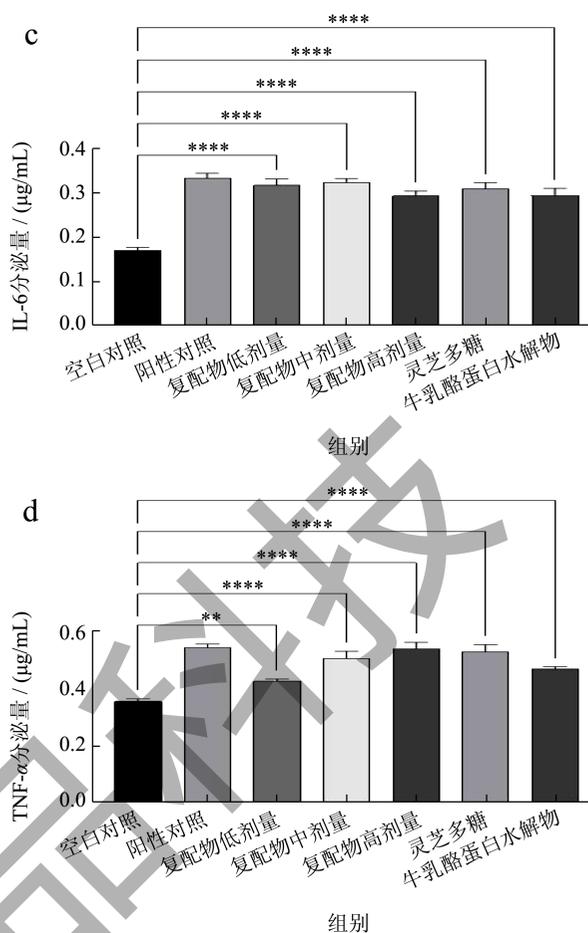
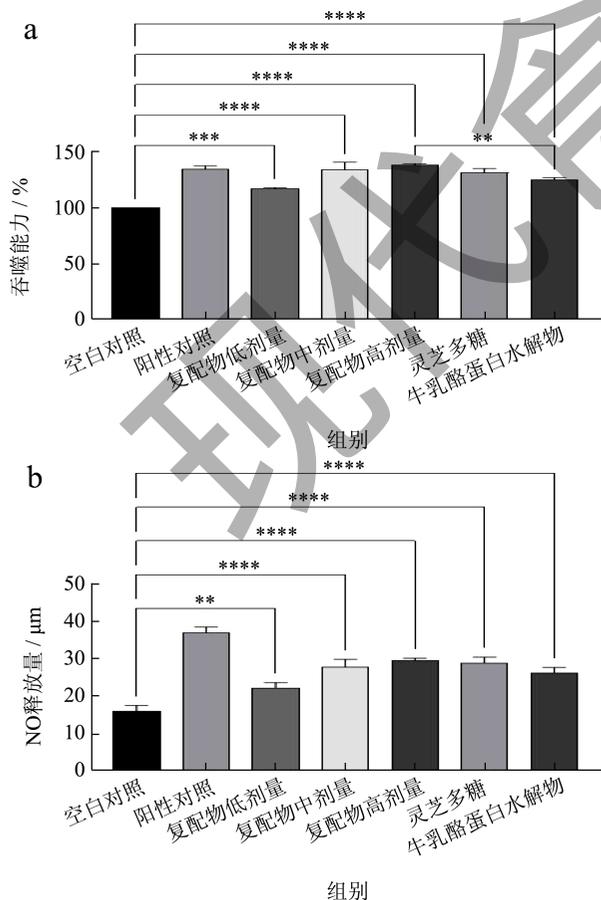


图2 样品对巨噬细胞吞噬能力、NO 释放量、IL-6 含量、TNF- α 含量的影响

Fig.2 Effect of compound samples on macrophage phagocytosis, NO release, IL-6 content and TNF- α content

注：****表示 $P < 0.0001$ ，***表示 $P < 0.0005$ ，**表示 $P < 0.007$ 。

2.2 小鼠免疫活性模型结果

2.2.1 复配物对小鼠免疫脏器指数的影响

表2 小鼠体质量与脏器系数表

Table 2 Body weight and organ coefficient of mice			
组别	体质量/g	胸腺指数/%	脾脏指数/%
空白组	29.53 ± 1.45	0.16 ± 0.039	0.290 ± 0.10
阳性对照组	29.45 ± 1.35 ^{ns}	0.19 ± 0.024 ^{***}	0.301 ± 0.14 ^{***}
复方低剂量组	29.20 ± 0.88 ^{ns}	0.17 ± 0.029 [*]	0.289 ± 0.06 ^{ns}
复方中剂量组	28.78 ± 1.40 ^{ns}	0.17 ± 0.024 [*]	0.300 ± 0.09 ^{***}
复方高剂量组	27.74 ± 0.74 ^{ns}	0.21 ± 0.021 ^{****}	0.307 ± 0.05 ^{****}

注：****表示 $P < 0.001$ ；***表示 $P < 0.01$ ；**表示 $P < 0.05$ ；*表示 $P < 0.1$ 。

喂养期间,小鼠毛色光泽,活动饮食正常,精神状况良好。由表2可知,喂养过程中,各组小鼠体质量增长速度均一,最终体质量并无明显差异,说明复配物都不会对小鼠体质量有影响。胸腺是T淋巴细胞发育成熟的场所,脾脏含有大量成熟的T、B淋巴细胞,机体的免疫功能与这两个器官关系密切,机体免疫能力的强弱可以通过相应的脏器指数反应^[33]。结果表明,复配物对胸腺指数及脾脏指数无显著影响,但与空白组对比有提高趋势。

2.2.2 复配物对小鼠脾淋巴细胞增殖能力、迟发型变态反应程度、NK细胞活性的影响

活化的T淋巴细胞是机体发挥细胞免疫作用的重要因素。在检测细胞免疫水平的指标中,最重要的是T淋巴细胞的增殖能力,通过测定增殖能力可以反应T淋巴细胞的活化程度^[34]。当T细胞再次与抗原接触时,会引起免疫反应,释放细胞因子,伴随的是组织局部炎症反应,而反应的强度与细胞免疫活性相关,迟发性变态反应程度是体内细胞免疫的标志^[35]。自然杀伤细胞(Natural Killer Cell, NK)是一种免疫细胞,在免疫过程中可以直接杀伤靶细胞。NK细胞活性是判断机体非特异性免疫的重要指标^[36]。本实验中,主要探究各浓度的复配物对小鼠各免疫指标的变化,进一步揭示复配物对小鼠的免疫调节作用。图3显示,与空白组对比,随着复配物浓度上升小鼠脾淋巴细胞转化能力提高,且中剂量提高率达到67%效果极显著($P<0.01$),提示着复配物能提高小鼠的免疫调节能力;此外,与空白组相比,随着复配物剂量上升小鼠的迟发型变态反应程度提高,且高剂量提高率达到38.49%($P<0.05$),复配物高剂量作用甚至超过阳性对照,DTH是一种细胞介导的免疫反应,通常在初始接触某种特定抗原后的24~72 h内发生,这种免疫反应涉及到特异性T细胞和巨噬细胞的协同作用^[37],该现象提示复配物有可能是调动特异性T细胞和巨噬细胞起到增强免疫调节的作用;此外,与空白组相比,复配物中高剂量组小鼠体现出较高的NK细胞活性且复方中剂量提高率达到98%($P<0.01$)有极显著差异,提示复配物能提高NK细胞对病毒和肿瘤细胞的杀伤力,维持机体免疫稳态。根据《保健食品功能活性评价规范》,若任意两个指标呈现阳性,则说明受试样品有效。综

上,在小鼠上的实验结果提示该复配物具有良好的免疫调节作用。

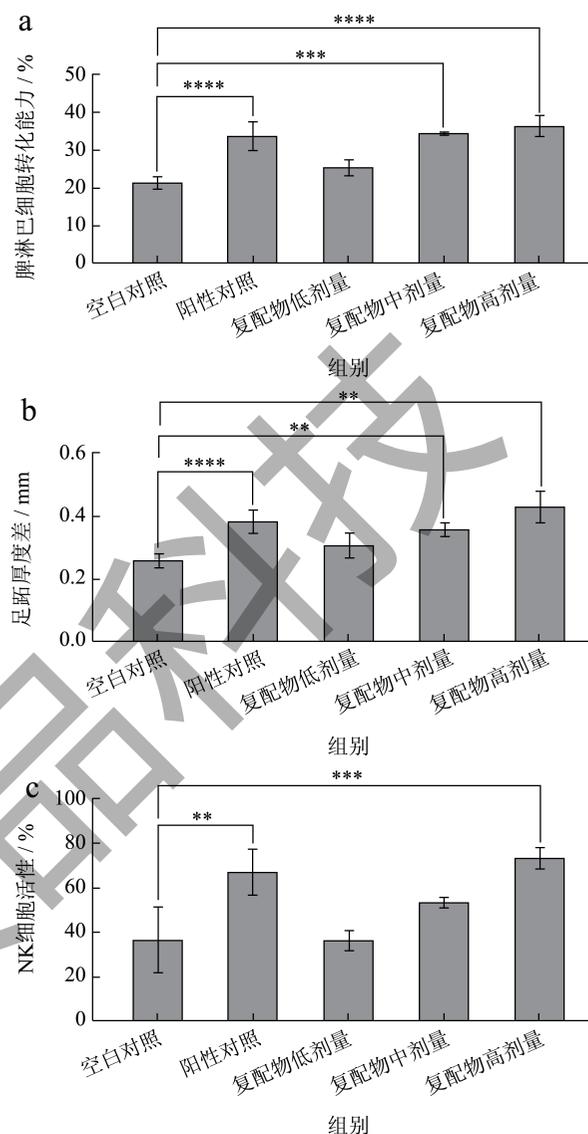


图3 复配物对小鼠脾淋巴细胞转化能力、迟发型变态反应程度、NK细胞活性的影响

Fig.3 Effect of compound samples on the transforming capacity, degree of delayed metaplasia and NK cell activity of mouse spleen lymphocytes

注:****表示 $P<0.0001$,***表示 $P<0.0005$,**表示 $P<0.007$,a:小鼠脾淋巴细胞转化能力;b:巨噬细胞NO释放量;c:小鼠足趾厚度差。

2.3 复配物的稳定性情况

在本实验中,用复配物作为样品,检测复配物中各组分的变化情况,从而判断复配物在产业化中的稳定性。高长永等^[38]研究发现,牛乳老蛋白水解物具有抗突变性、抗氧化性、抗菌性等功能。陆

晓和等^[39]测定了不同厂家批次的灵芝多糖,发现灵芝多糖在常温干燥条件下具有良好的稳定性。白晨等^[40]研发了一款灵芝多糖复配饮料,发现在常温干燥避光条件下,灵芝多糖的活性下降缓慢,提示其稳定性良好。图4显示,根据视差折光检测器的结果,利用葡聚糖标准曲线得到灵芝多糖的相对分子量在3 500~3 900 ku,其在4℃和25℃环境中都有较好的稳定性,25 d内分子量组成情况基本没有变化。在25℃保存中,灵芝多糖第20天时产生了少部分降解及聚合现象,说明灵芝多糖更适合在低温保存。图5显示,牛乳酪蛋白水解物在4℃和25℃环境中都有较好的稳定性,25 d内牛乳酪蛋白水解物液相图中活性单体变化较小。这个结果表明了复配物具有一定的稳定性,适合产业化生产。

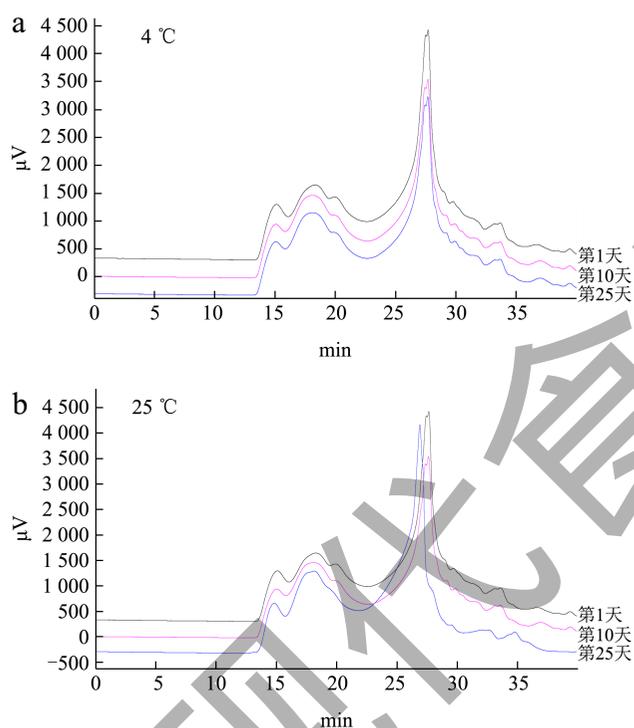


图4 不同温度下保存的复配物中多糖分子量(GPC)图
Fig.4 Plot of the molecular weight of polysaccharides (GPC) in complexes stored at different temperatures

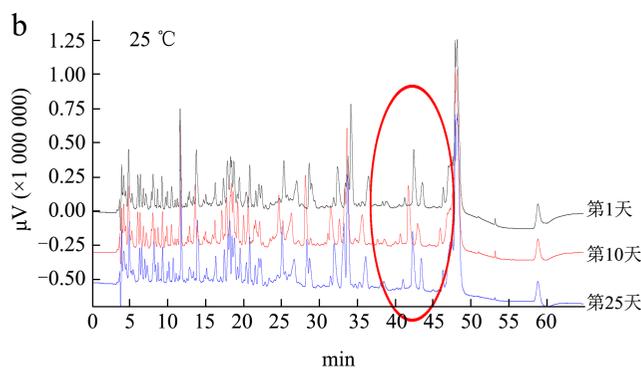
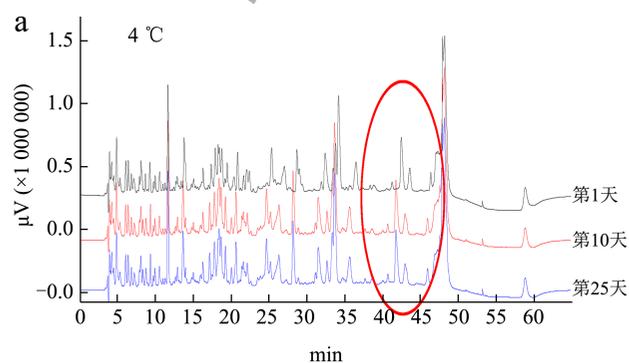


图5 不同温度下保存的复配物中牛乳酪蛋白水解物液相图
Fig.5 Liquid phase diagram of bovine milk casein hydrolysate samples stored at different temperatures

3 结论

本研究实验分为了三部分,首先利用巨噬细胞测定了复配物的免疫调节功效,然后利用小鼠进一步展现复配物的作用,最后分析了原料的优点,阐述了复配物的特点。结果表明,复配物能提高巨噬细胞的增殖能力,提高其吞噬能力,对与免疫力相关的NO、IL-6、TNF- α 都起到促进作用,同时复合配方在不影响小鼠生长发育的情况下,促进小鼠的免疫脏器指数,提高小鼠淋巴细胞增殖能力,进而提高小鼠的免疫力。复配物的稳定良好,在配方产业化发展中,配方原料的稳定性是很重要的,尤其是该原料的功能活性和贮藏特性。该复配物体现了赤灵芝多糖和牛乳酪蛋白水解物的免疫活性,添加牛乳酪蛋白水解物后,使得复合配方更有营养。本研究存在的不足是,尚未解释该复配物的作用机理以及相关通路以及其免疫协同作用的具体机制,但本次研究能为后续的开发和机理机制探究提供一定的经验。

参考文献

- [1] 智宇星,李红梅,徐安龙,等.中西医视角下对免疫的再认识——基于辨证论治和免疫态的讨论[J].中医杂志,2022,63(21):2001-2008.
- [2] TOBALDINI E, COSTANTINO G, SOLBIATI M, et al. Sleep, sleep deprivation, autonomic nervous system [J]. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 2017, 74: 321-329.
- [3] 刘海春,胡晨旭,王家明,等.药食同源组方联合益生菌对免疫低下小鼠的免疫增强作用[J].现代食品科技,2023,39(2):119-124.
- [4] ANAL A K, SHRESTHA S, SADIQ M B. Biopolymeric-

- based emulsions and their effects during processing, digestibility and bioaccessibility of bioactive compounds in food systems [J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 87: 691-702.
- [5] JIE P, FU-SHENG Z, BIN-BIN K, et al. Interactions among various functional macromolecules and its application [J]. *Chemical Research in Chinese Universities*, 2004, 25(11): 2042-2047.
- [6] SHAH N P. Effects of milk-derived bioactives: an overview [J]. *British Journal of Nutrition*, 2012, 84(S1): S3-S10
- [7] KORHONEN H. Milk-derived bioactive peptides: from science to applications [J]. *Journal of Functional Foods*, 2009, 1(2): 177-187
- [8] 曹庸, 陈媛媛, 苗建银, 等. 利用膜片钳技术筛选乳源中牛乳酪蛋白水解物粗提物的方法: 中国, CN105548531A[P]. 2016.
- [9] MIGLIORE-SAMOUR D, FLOC'H F, JOLLES P. Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation [J]. *Journal of Dairy Research*, 2009, 56: 357-359.
- [10] LAHOV E, REGELSON W. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: caseicidin, isracidin peptides [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 1996, 34: 131-145.
- [11] 李梦娇, 卢玮玉, 吴彦彦, 等. 灵芝功能性成分及其应用进展[J]. *食品安全导刊*, 2021, 25: 182-183.
- [12] 吴睿婷, 付王威, 万敏, 等. 黑灵芝多糖对糖尿病大鼠血糖血脂调节及肠道菌群的影响[J]. *食品科学*, 2022, 43(5): 91-102.
- [13] 朱柏雨, 朱永清, 陈航, 等. 康定灵芝功效成分分析及体外抗氧化、降血糖活性评价[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(13): 292-298.
- [14] 刘洋, 韩志明, 张瑞, 等. 灵芝保肝作用的研究进展[J]. *特产研究*, 2023, 45(6): 159-165.
- [15] 刘洋, 陈会英, 范雪枫, 等. 灵芝多糖辅助DNA疫苗对小鼠肿瘤免疫治疗的影响[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(5): 84-91.
- [16] 潘云霞, 焦卓亚, 彭灿, 等. 灵芝多糖调控抗氧化因子表达抑制乳腺癌恶性表型研究[J]. *中草药*, 2022, 53(23): 7440-7448.
- [17] 曹芹雪, 任璐, 田君, 等. 灵芝多糖通过调控ICOS/ICOSL对宫颈癌荷瘤小鼠的肿瘤抑制及对免疫逃逸的解除作用研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2022, 38(7): 833-837.
- [18] MENG X, LIANG H, LUO L. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities [J]. *Carbohydrate Research*, 2016, 424: 30-41.
- [19] 张柳莲, 黄清铧, 王丽宁, 等. 响应面优化超声波微波协同提取灵芝子实体多糖工艺[J]. *食品工业*, 2023, 44(2): 45-48.
- [20] 陈媛媛. 牛乳源促睡眠肽的纯化鉴定、活性评价、机制及应用研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2017
- [21] 杨银银, 李惠武, 刘玲, 等. THP-1来源的M1型巨噬细胞对食管鳞癌细胞的凋亡、增殖与迁移作用[J]. *生命的化学*, 2022, 42(5): 921-927.
- [22] 李月勤, 史洪涛, 张利卫, 等. 发酵黄芪对肉鸡脾脏指数及淋巴细胞增殖的影响[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2022, 24: 113-115, 139.
- [23] 冯萍, 陈芳, 陈少秀, 等. 氯强油搽剂对小鼠迟发型变态反应的影响[J]. *儿科药学杂志*, 2020, 26(8): 3-6.
- [24] 白吉庆, 贺新怀, 席孝贤. 姬松茸菌孢多糖对小鼠NK、LAK细胞活性影响的实验研究[J]. *陕西中医*, 2007, 9: 1252-1254.
- [25] 段语嫣, 冯杰, 刘艳芳, 等. 灵芝液态发酵胞内外多糖结构特征及其活性研究进展[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(6): 2721-2737.
- [26] 丁顺杰, 罗金凤, 丁晓雯, 等. 酶解缙丝蚕蛹蛋白抗氧化肽的分离与稳定性研究[J]. *食品科学*, 2015, 36(3): 35-40.
- [27] 马海航, 郝赵伟, 刘冲, 等. 腺苷脱氨酶抑制巨噬细胞增殖迁移的作用研究[J]. *现代生物医学进展*, 2021, 21(3): 414-417.
- [28] 陈经纬, 邓伟, 张卓亚, 等. 系统性红斑狼疮患者巨噬细胞表型和功能初步研究[J]. *现代免疫学*, 2018, 38(2): 100-103, 99.
- [29] REN L, ZHANG J, ZHANG T. Immunomodulatory activities of polysaccharides from *Ganoderma* on immune effector cells [J]. *Food Chemistry*, 2021, 340: 127-933.
- [30] 梁敏, 赵盼盼, 王晓岑, 等. 贾第虫硫氧还蛋白对小鼠腹腔巨噬细胞炎性细胞因子分泌的影响[J]. *中国生物制品学杂志*, 2022, 35(5): 544-550.
- [31] CHO J Y, SADIQ N B, KIM J C, et al. Optimization of antioxidant, anti-diabetic, and anti-inflammatory activities and ganoderic acid content of differentially dried *Ganoderma lucidum* using response surface methodology [J]. *Food Chemistry*, 2021, 335: 127-645.
- [32] 李芳宇, 齐滨, 边帅, 等. 人参根提取物增强巨噬细胞RAW264.7的自噬水平并提高其增殖和吞噬能力[J]. *天然产物研究与开发*, 2021, 33(3): 380-385.
- [33] 陈蔼如, 沈燕, 罗琼, 等. 白藜芦醇通过促进活化T淋巴细胞凋亡改善小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎[J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(11): 1627-1633.
- [34] 潘利明, 林励. 玉叶金花苷酸甲酯对LPS诱导RAW264.7巨噬细胞NO分泌量的影响[J]. *中医药导报*, 2014, 20(4): 58-60.
- [35] 谢长才, 许能贵, 符文彬, 等. 针刺对IV型变态反应模型豚鼠干预作用的研究[J]. *广州中医药大学学报*, 2009, 26(2): 138-140, 199.
- [36] 吕莎. 复元醒脑汤对糖尿病脑梗死大鼠PI3K、AKT及血清TNF- α 、IL-6表达的影响[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2022.
- [37] 张洁, 梁平, 李建波, 等. 青蒿鳖甲汤加减治疗癌性发热疗效及对NF- κ Bp65蛋白、IL-6、IL-10、TNF- α 的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2023, 41(5): 220-223.
- [38] 高长永, 于鹏, 张兰威, 等. 酪蛋白水解方法及水解产物功能性的研究进展[J]. *中国乳品工业*, 2011, 39(11): 39-40, 44.
- [39] 陆晓和, 马爱华, 王楠, 等. 灵芝胶囊中多糖含量及稳定性研究[J]. *中国新药杂志*, 2003, 6: 451-453.
- [40] 白晨, 王淑珍, 高雁, 等. 灵芝-松茸功能饮料中活性多糖稳定性的研究[J]. *食品工业*, 2001, 3: 43-44, 46.