

基于 BALB/c 小鼠模型的松茸低温水提物的免疫调节作用

杜汉廷, 林松毅, 李冬梅, 葛麒, 陈冬*

(大连工业大学食品学院 国家海洋食品工程技术研究中心 辽宁大连 116034)

摘要 以环磷酰胺(CTX)诱导免疫抑制 BALB/c 小鼠为模型,研究长白山野生松茸低温水提物(TMWE)及其粗蛋白组分(TMWE-CP)的体内免疫调节活性。结果表明, TMWE 和 TMWE-CP 组分均可有效拮抗 CTX 的免疫抑制作用,使免疫抑制小鼠的体质量和免疫器官指数得到不同程度的恢复,改善小鼠脾脏损伤,恢复和增强 BALB/c 小鼠的碳颗粒清除能力、迟发型变态反应(DTH)、脾淋巴细胞增殖活性、血清半溶血值(HC₅₀)以及血清 IgG、IgM 表达水平。TMWE 和 TMWE-CP 组分可从非特异性免疫、细胞免疫及体液免疫 3 个方面起到增强免疫抑制小鼠免疫调节功能的作用。此外,在细胞免疫(DTH, 脾淋巴细胞增殖活性)和体液免疫(HC₅₀, 血清 IgG、IgM 水平)方面, TMWE-CP 组免疫调节效果显著优于 TMWE 组($P < 0.05$),而 TMWE 组能够更好地增强非特异性免疫(免疫器官指数和碳颗粒清除能力)。结论: TMWE 和 TMWE-CP 组分可作为潜在的松茸源天然免疫调节剂,在针对性健康产品研发方面具有广阔的应用前景。

关键词 松茸低温水提物; BALB/c 小鼠模型; 非特异性免疫; 细胞免疫; 体液免疫

文章编号 1009-7848(2023)09-0067-12 **DOI**: 10.16429/j.1009-7848.2023.09.008

松茸(*Tricholoma matsutake* Singer)是一种纯天然珍贵稀有的药食两用真菌,享有“菌中之王”的美誉^[1],在我国主要分布于吉林、云南以及川藏地区等。松茸营养丰富,化学成分组成复杂,含有多糖、蛋白质、氨基酸、多肽、甾类、萜类、油脂以及多酚和维生素等物质,其多种营养成分被广泛应用于药品、保健品及化妆品领域^[2]。已有研究证实,松茸中的生物活性组分具有抗癌、抗肿瘤、抗病毒、抗氧化,降低胆固醇的能力^[3]。

免疫稳态平衡对维持机体健康状况具有至关重要的作用。当机体受到外来污染物和内部坏死、突变细胞的感染、侵害时,机体将通过免疫系统中的细胞与器官的协同作用以及免疫反应来维持身体健康的体内稳态平衡^[4-5]。然而,情绪、工作压力和化疗等诸多因素会破坏这种平衡,进而导致免疫紊乱,引发免疫相关疾病,如系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、糖尿病、癌症以及肥胖等^[6]。目前临床上,常使用放线菌素、长春新碱、地塞米松等常规化学药物作为免疫调节剂来调节免疫反应,然而,这些化学药物成本较高,具有不可避免的副作用,并不适合长期使用^[7]。开发一个新的、更安全的免疫调节策略,如开发天然来源的免疫调节剂是预防和治疗免疫抑制疾病的有效方法之一。

目前,国内外学者对食用菌源免疫调节剂的体内免疫调节活性研究已取得一些进展。Meng 等^[8]研究发现,翘鳞肉齿菌提取物通过增加血清免疫球蛋白和免疫因子,中和氧化应激,显著改善 CTX 诱导的免疫抑制小鼠的免疫功能。张瑞^[9]研究发现桦褐孔菌水提物具有良好的免疫调节作用,能明显增强环磷酰胺致免疫低下小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬能力和脾脏淋巴细胞的增殖能力,显著提高 NK 细胞的杀伤活性,提高小鼠肝脏和血清中的 GSH-PX、SOD、CAT、AKP 等酶的活性。Ditamo 等^[10]研究双孢菇中凝集素具有减少先天性和适应性反应的体内免疫调节作用。Jedrzejewski 等^[11]发现云芝提取物具有显著的免疫调节活性,能够促进大鼠细胞因子 IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2 的产生,增强免疫调节能力^[11]。同时,研究发现,猴头菇^[12]、香菇^[13]和裂盖马鞍菌^[14]中获得的提取物对环磷酰胺诱导的小鼠免疫抑制也有保护作用。然而,目前关于松茸源免疫调节剂的体内免疫调节研究较为缺乏。

本文采用环磷酰胺(*Cyclophosphamide*, CTX)诱导建立免疫抑制小鼠模型,评价松茸低温水提物(*Tricholoma matsutake* water extract, TMWE)

收稿日期: 2022-09-16

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项
(2017YFD0400100)

第一作者: 杜汉廷,男,硕士生

通信作者: 陈冬 E-mail: chendong689689@126.com

及其粗蛋白组分(*Tricholoma matsutake* water extract-crude protein, TMWE-CP)对 BALB/c 免疫抑制小鼠免疫调节活性的调节作用,包括非特异性免疫(小鼠体质量与免疫器官指数、脾脏组织病理学和单核-巨噬细胞清除能力)、体液免疫(血清半溶血值和血清免疫球蛋白 G、M 水平)和细胞免疫(迟发型变态反应和脾脏淋巴细胞增殖能力)3 个方面的影响,研究结果可为松茸生物活性成分的免疫调节机制,松茸源免疫调节剂及其功能性产品的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物、材料及试剂

1.1.1 实验动物 实验动物为清洁级(Specific pathogen free, SPF)雄性 BALB/c 小鼠(6~8 周龄, 20 g ± 2 g),购自辽宁长生生物技术有限公司(大连,中国)。所有实验动物和实验研究均经大连工业大学伦理委员会(IDSYXK2017-0005)批准,并符合其标准,小鼠饲养于无菌动物房中(温度:23 °C ± 2 °C,湿度:50% ± 5%,12 小时照明光暗循环)。所有动物可以自由摄取 SPF 级饮水和饲料。

1.1.2 受试物(样品)的制备 松茸:长白山野生松茸冻干片,吉林省延吉市顺鑫松茸贸易有限公司。

松茸粉:取适量冻干松茸片,用高速粉碎机打碎成粉,过 60 目筛,密封置于干燥处备用。

TMWE:根据实验室先前研究,将松茸粉(200 g)与蒸馏水(6 L)混合,20 °C 提取 2 h,取上清液冻干,并在-80 °C 下保存,备用。

TMWE-CP:从 TMAE 中经硫酸铵盐析^[15]、离心、透析、冻干等操作分离得到粗蛋白组分,并在-80 °C 下保存,备用。

采用双缩脲法测定蛋白含量^[16],苯酚硫酸法测定总糖含量^[17],TMWE 中蛋白含量 18.72% ± 3.19%,总糖含量 34.64% ± 4.09%;TMWE-CP 蛋白含量 58.79% ± 0.07%,总糖含量 9.62% ± 0.08%。

1.1.3 试剂 盐酸左旋咪唑(Levamisole, LMS),山东仁和堂药业有限公司;环磷酰胺,上海麦克林生化科技有限公司;红细胞裂解液,北京索莱宝科技有限公司;刀豆球蛋白 A(Concanavalin A, Con A)、印度墨水,上海源叶生物科技有限公司;绵羊

红细胞(Sheep red blood cell, SRBC)、豚鼠血清,广州鸿泉生物科技有限公司;SA 缓冲液、都氏试剂、多聚甲醛固定液(4%),北京雷根生物技术有限公司;Cell Counting Kit-8 (CCK-8)检测试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司;免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G, IgG) 和免疫球蛋白 A (Immunoglobulin M, IgM) ELSIA 试剂盒,上海酶联生物科技有限公司。

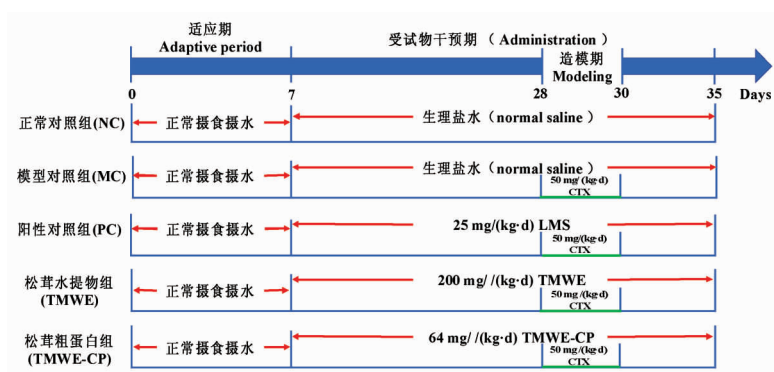
1.2 仪器与设备

Leica DM2500 荧光显微镜,徕卡显微系统(上海)贸易有限公司;日本 Infinite M 200 多功能酶标,瑞士 Tecan 公司;NU-437-400S 垂直流生物安全柜、NU-5810E CO₂ 培养箱,美国 Nuair 公司。

1.3 方法

1.3.1 实验动物分组设计 如图 1 所示,所有小鼠适应 7 d 后,将 50 只雄性 BALB/c 小鼠随机分为 5 组 ($n=10$): 正常对照组 (Normal control group, NC), 模型对照组 (Model control group, MC), 阳性对照组 (Positive control group, PC), 松茸低温水提取物组 (*Tricholoma matsutake* water extract group, TMWE) 和松茸水提粗蛋白组 (*Tricholoma matsutake* water extract-crude protein group, TMWE-CP)。如图 1 所示,NC 和 MC 组小鼠分别灌胃 0.2 mL 生理盐水 (0.1 mL/10 g BW, Body weight),PC 组灌胃 25 mg/(kg·d) LMS^[18], TMWE 组灌胃 200 mg/(kg·d) TMWE^[19],TMWE-CP 组给予 200 mg/(kg·d) TMWE 中蛋白含量相当的 TMWE-CP (64 mg/(kg·d)) 灌胃处理,试验总共 5 周,每 3 d 记录 1 次小鼠体质量,直至试验结束。在灌胃处理的第 29 天、30 天,除 NC 组,其它各组所有小鼠腹腔注射 50 mg/(kg·d) CTX^[20]以建立小鼠免疫抑制模型。第 35 天完成最后一次给药后,所有小鼠禁食不禁水 12 h,摘眼球取血并离心血液以收集血清,颈椎脱位法处死小鼠,收集胸腺、脾脏、肝脏于无菌离心管中,并在-80 °C 下保存,备用。

1.3.2 小鼠体质量及免疫器官指数的测定 在受试物灌胃处理期间,每周测量并记录各组小鼠的体重。在注射过程中每天测量 1 次小鼠的体重。灌胃结束后,颈椎脱位法处死小鼠,取出小鼠的胸



注:CTX:环磷酰胺;LMS:盐酸左旋咪唑;TMWE:松茸低温水提物;TMWE-CP:松茸低温水提粗蛋白。

图 1 BALB/c 小鼠实验设计示意图

Fig.1 Schematic diagram of the BALB/c mice experimental design

腺、脾脏,称重。免疫器官指数的计算公式如下^[20]:

$$\text{脾脏指数}(\text{mg/g}) = \frac{\text{脾脏质量}(\text{mg})}{\text{体质量}(\text{g})} \quad (1)$$

$$\text{胸腺指数}(\text{mg/g}) = \frac{\text{胸腺质量}(\text{mg})}{\text{体质量}(\text{g})} \quad (2)$$

1.3.3 组织病理学 小鼠处死后,取出脾组织,用 4%多聚甲醛固定 24 h,进行石蜡包埋,切片(厚度 4 μm),H&E 染色,然后在光学显微镜下观察染色并拍照^[21]。

1.3.4 碳颗粒清除能力的测定^[22] 小鼠末次给药 24 h 后,称重,小鼠尾静脉注射 0.1 mL/10 g 印度墨汁 (1:4),尾静脉注射后立即计时,分别于 2 min (T_1) 和 10 min (T_2) 时眼静脉丛各取血 20 μL , 然后与 2 mL 0.1% 碳酸钠溶液混合。在 600 nm 波长下测定混合液在 T_1 和 T_2 时的 OD 值, 记为 A_1 、 A_2 , 取 2 mL 0.1% Na_2CO_3 作空白。采血后颈椎脱位法处死小鼠,解剖取出小鼠的肝脏、脾脏并称重。碳颗粒清除能力(α)计算公式如下:

$$\alpha = \sqrt[3]{\frac{\lg A_1 - \lg A_2}{T_2 - T_1}} \times \frac{\text{体质量}(\text{g})}{\text{肝脏质量}(\text{g}) + \text{脾脏质量}(\text{g})} \quad (3)$$

式中: α ——碳颗粒清除能力; T_1 ——采血时间 2 min; T_2 ——采血时间 10 min; A_1 —— T_1 时混合液的 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 值; A_2 —— T_2 时混合液的 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 值。

1.3.5 Con A 诱导的小鼠脾细胞增殖试验^[23] 灌胃后处死小鼠,无菌取出小鼠脾脏,置于 5 mL 无菌 PBS 中。用一次性注射器内芯,轻微用力将脾脏磨碎,通过 200 目网状筛生成单细胞悬液,Hank's

液清洗 3 次。用红细胞裂解缓冲液处理细胞,离心 (1 000 r/min, 5 min) 去除红细胞。将细胞用 RPMI-1640 (含 10% 胎牛血清) 完全培养基清洗和重悬。控制脾细胞浓度至 2×10^6 个/mL。然后,将 180 μL 脾细胞悬液和 20 μL Con A 接种到 96 孔细胞培养板中,使 Con A 的最终浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$,另取 200 μL RPMI-1640 完全培养基作空白对照。96 孔细胞培养板在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳培养箱中孵育 48 h。在培养结束前 4 h,向每个孔中加入 WST (水溶性四唑盐) 溶液,并继续培养 4 h。最后,使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度。

1.3.6 迟发型超敏反应(Delayed type hypersensitivity, DTH)的测定 参考魏艳等^[24]的研究方法,采用足跖增厚法测定 DTH。每只小鼠腹腔注射 0.2 mL 2% (体积分数) SRBC (约 1×10^8 个细胞) 进行 DTH 试验。腹腔免疫 4 d 后,使用游标卡尺 (0.01 mm) 测量左后爪的厚度,然后向小鼠左后爪测量部位皮下注射含有约 1×10^8 个细胞的 20 μL 的 20% SRBC (体积分数)。24 h 后,测量左后爪的厚度 (测量 3 次,取平均值),并计算跖骨肿胀厚度差异,以反映 DTH 的程度。

1.3.7 血清半溶血值 (Serum half-hemolysis value, HC_{50})^[23]的测定 在灌胃处理结束前 4 d,每只小鼠腹腔注射 0.2 mL 的 2% (体积分数) SRBC 悬液。4 d 后,小鼠眼眶采血,测定半溶血值 (HC_{50})。首先,用 1 mL SA 缓冲液稀释 20 μL 血清,取 1 mL 稀释血清样品,0.5 mL 10% (体积分数) SRBC 悬液和 1 mL 豚鼠补体 (1:10),在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵

育 30 min。冰浴以终止反应,离心(2 000 r/min, 10 min),取 1 mL 上清,加入 3 mL 都氏试剂。阳性对照组分别加入 0.25 mL 的 10% (体积分数)SRBC 悬液、3.75 mL 都氏试剂,彻底混合并孵育 10 min。测量 490 nm 下的 OD 值。 HC_{50} 的计算公式如下:

$$HC_{50} = \frac{OD_{\text{样品}}}{OD_{\text{SRBC}}} \times \text{稀释倍数} \quad (4)$$

1.3.8 血清免疫球蛋白(IgG、IgM)的测定 血清 IgG、IgM 分析采用酶联免疫吸附分析检测试剂盒测定。按照制造商的说明,使用酶标仪在 450 nm 处测量溶液的 OD 值,血清 IgM、IgG 浓度根据标准曲线计算。

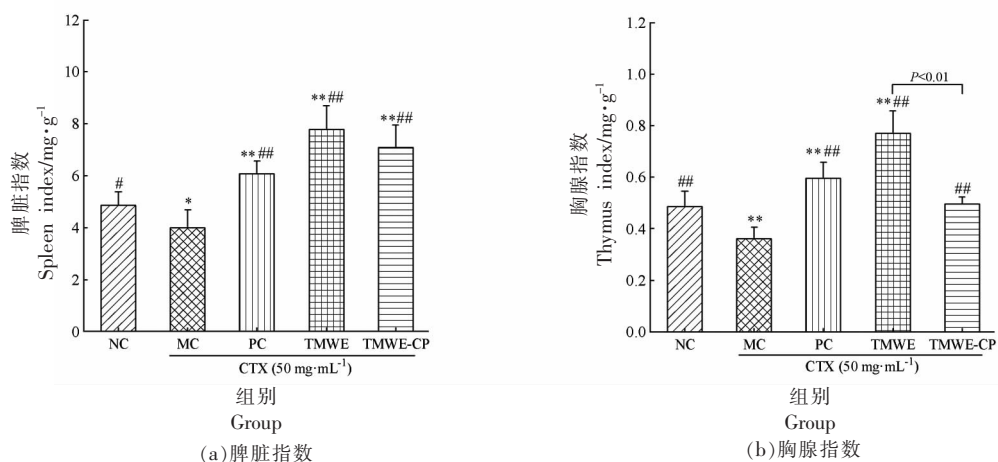
1.4 统计学分析

试验数据采用 Origin 2019b、SPSS 25.0 软件进行处理和分析。每个试验至少平行重复 3 次,数据以均值±标准差表示。采用单因素方差分析,然后采用 Tukey HSD 检验,比较组间差异,显著性水平设为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 TMWE 和 TMWE-CP 对免疫抑制小鼠体质量和免疫器官指数的影响

胸腺和脾脏是免疫细胞生长、分化、成熟和产生免疫反应的重要免疫器官,其免疫调节作用与器官指数的增加密切相关,各器官指标在一定程度上反映了免疫器官的功能状况^[25]。如图 2 所示,MC 组的免疫器官指数明显低于 NC 组($P < 0.05$),表明成功建立免疫抑制模型。在建立 CTX 诱导的免疫抑制小鼠模型时,常使用 LMS 作阳性模型药物,经 LMS 处理的小鼠的免疫器官指数也高于 MC 组($P < 0.05$)。此外,与 MC 组相比,经 TMWE 和 TMWE-CP 处理的小鼠的免疫器官指数均显著增加($P < 0.05$),表明 TMWE 和 TMWE-CP 组分可减轻 CTX 引起的免疫器官萎缩,能够拮抗 CTX 所致的免疫器官指数下降。此外,TMWE 组胸腺指数显著($P < 0.01$)高于 TMWE-CP 组。以上结果表明,TMWE 和 TMWE-CP 均可有效的改善 CTX 诱导的免疫抑制,具有预防和治疗效果,并且 TMWE 对免疫器官损伤的改善效果更为显著。



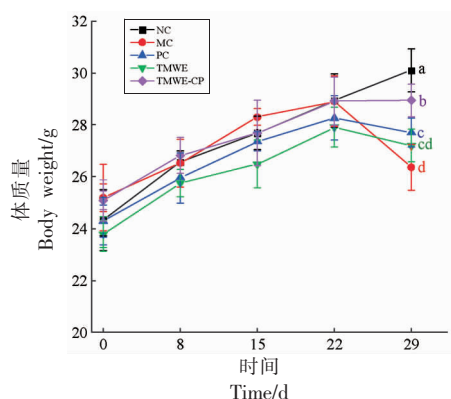
注:与正常对照组(NC)相比,*:差异显著($P < 0.05$),**:差异极显著($P < 0.01$);与模型对照组(MC)相比,#:差异显著($P < 0.05$),##:差异极显著($P < 0.01$);NC:正常对照组;MC:模型对照组;PC:阳性对照组;TMWE:松茸水提物组;TMWE-CP:松茸粗蛋白组。

图 2 TMWE 和 TMWE-CP 对小鼠免疫器官指数的影响

Fig.2 The effects on immune organ index of TMWE and TMWE-CP

不同组分处理的小鼠体质量变化如图 3 所示。第 1 天至第 22 天,所有处理组的小鼠的体质量,均呈上升趋势。第 23 天后,NC 组小鼠的体质量持续增加,而其它组小鼠体质量显著下降

($P < 0.05$),表明造模成功。造模期后,TWME-CP 组小鼠的体质量下降程度最小,MC 组小鼠体质量下降程度最大,其它组小鼠体质量趋势相近,说明 TWME-CP 组分可显著抑制 CTX 导致的小鼠体质量



注:不同字母表示第 29 天各组小鼠平均体质量具有显著性差异($P<0.05$);NC:正常对照组;MC:模型对照组;PC:阳性对照组;TMWE:松茸水提物组;TMWE-CP:松茸粗蛋白组。

图 3 TMWE 和 TMWE-CP 对小鼠体质量的影响

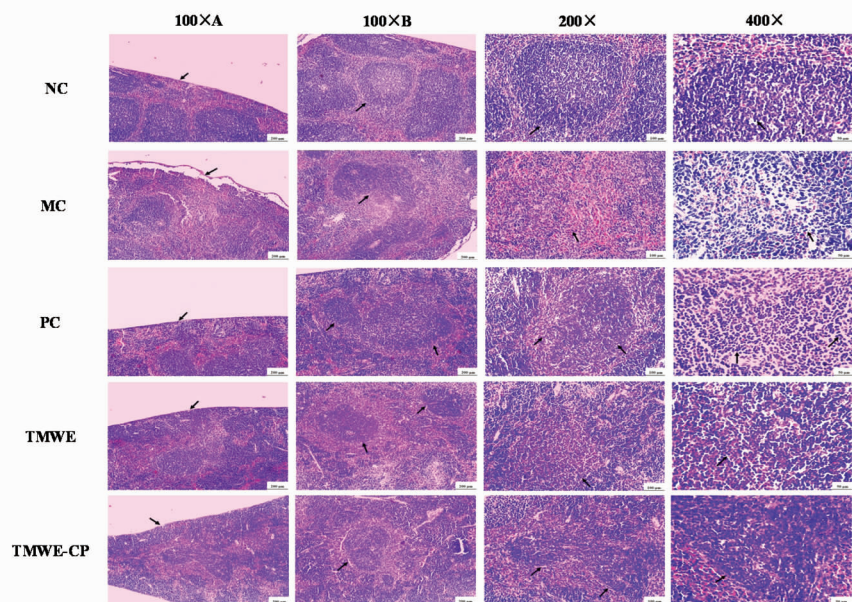
Fig.3 The effects on body weight of TMWE and TMWE-CP

量减轻。小鼠体质量的变化表明 TMWE 和 TMWE-CP 均具有一定的免疫调节能力。

2.2 TMWE 和 TMWE-CP 对免疫抑制小鼠脾脏

组织形态学影响

通过对脾脏形态学观察,评价 TMWE 和 TMWE-CP 组分处理对免疫器官的影响。如图 4 所示,HE 染色显示,NC 对照组脾囊(100×A)未被破坏,生发中心融合(100×B、200×),脾红、白髓结构正常,淋巴细胞排列紧密(400×)。相比之下,MC 组的脾囊(100×A)被破坏,生发中心(100×B)离散,红白髓间边界不清楚且淋巴细胞数量减少、稀疏。而通过 TMWE 和 TMWE-CP 的持续干预,其受损程度相比 MC 组较轻,脾囊(100×A)趋于完整,生发中心趋于融合(100×B),淋巴细胞数量恢复,排列趋于紧密(400×),组织表现几乎接近 NC 组。此外,与 TMWE 组相比,TMWE-CP 组淋巴细胞排列更紧密,数量显著恢复(400×),但生发中心(100×B)融合度稍低,表明 TMWE 对脾脏损伤的恢复效果更好。综上,TMWE 和 TMWE-CP 的干预处理均可改善 CTX 诱导的脾脏组织损伤,二者对脾脏均具有预防和保护作用,TMWE 组分改善效果更好。



注:放大倍数:100×、200×、400×;NC:正常对照组;MC:模型对照组;PC:阳性对照组;TMWE:松茸水提物组;TMWE-CP:松茸粗蛋白组。

图 4 TMWE 和 TMWE-CP 对小鼠脾脏组织病理变化的影响

Fig.4 Effects of TMWE and TMWE-CP on pathological changes of spleen in mice

2.3 TMWE 和 TMWE-CP 对免疫抑制小鼠碳颗粒清除能力的影响

巨噬细胞在免疫应答和宿主防御中起关键作

用,它不仅是一种重要的免疫细胞,而且也是单核巨噬细胞系统的主要组成部分,可通过吞噬作用直接清除肿瘤、外部病毒、细菌甚至癌细胞,从而

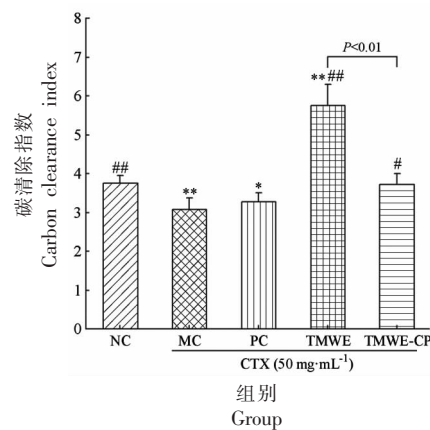
介导非特异性免疫反应^[26]。碳粒廓清试验是检测单核-巨噬细胞吞噬能力的经典试验方法。结果如图5所示,MC组小鼠吞噬细胞吞噬指数与NC组相比显著下降($P<0.01$),这表明注射CTX可降低小鼠的碳颗粒清除能力。与MC组相比,TMWE和TMWE-CP处理能够显著提高免疫抑制小鼠的碳颗粒清除能力,其结果具有统计学差异($P<0.05$),由此表明,TMWE和TMWE-CP处理均能够预防并逆转CTX的免疫抑制作用,以此增强机体非特异性免疫。另外,与NC组小鼠相比,口服TMWE可显著增强小鼠巨噬细胞的吞噬作用,其作用效果显著优于TMWE-CP给药处理($P<0.01$)。结果表明TMWE在机体非特异性免疫方面具有良好的免疫增强效果,且优于TMWE-CP。

2.4 TMWE和TMWE-CP对免疫抑制小鼠脾淋巴细胞转化增殖率的影响

如图6所示,经Con A诱导后,MC组小鼠脾淋巴细胞增殖率显著降低($P<0.05$),表明CTX能够严重损害脾淋巴细胞的增殖。经给药干预后,TMWE和TMWE-CP组脾淋巴细胞增殖率显著高于MC组,由此表明TMWE和TMWE-CP均可以显著改善由CTX处理引起的小鼠脾淋巴细胞增殖率降低作用。与TMWE组相比,TMWE-CP组小鼠脾淋巴细胞增殖率显著提高。以上结果表明,TMWE和TMWE-CP组分对免疫抑制小鼠脾淋巴细胞增殖具有显著改善作用,TMWE-CP组分在脾淋巴细胞增殖的细胞免疫水平上更加显著。

2.5 TMWE和TMWE-CP对免疫抑制小鼠迟发型超敏反应(DTH)的影响

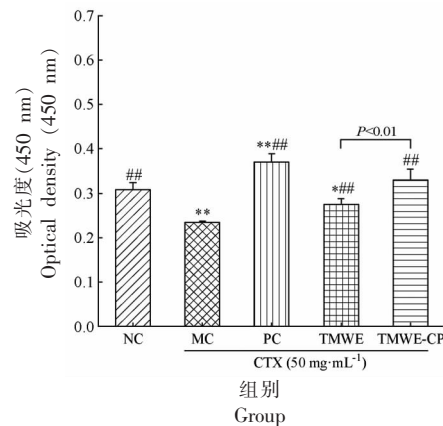
免疫抑制小鼠迟发型超敏反应结果如图7所示,经SRBC致敏后,MC组与NC组小鼠的DTH水平差异具有统计学意义($P<0.05$),表明模型建立良好。PC组及各受试组与MC组小鼠的DTH水平差异具有统计学意义($P<0.05$),表明TMWE和TMWE-CP均能够显著增强特异性增敏效应T细胞介导的淋巴细胞免疫反应。此外,与TMWE组相比,TMWE-CP组小鼠的DTH水平显著提高($P<0.05$),与免疫抑制小鼠脾淋巴细胞增殖转化能力的试验结果趋势一致。以上结果表明,TMWE及TMWE-CP组分可显著增强T细胞介导的免疫应答能力,增强免疫抑制小鼠细胞免疫功能,且



注:与正常对照组(NC)相比,*:差异显著($P<0.05$),**:差异极显著($P<0.01$);与模型对照组(MC)相比,#:差异显著($P<0.05$),##:差异极显著($P<0.01$);NC:正常对照组;MC:模型对照组;PC:阳性对照组;TMWE:松茸水提物组;TMWE-CP:松茸粗蛋白组。

图5 TMWE和TMWE-CP对免疫抑制小鼠碳颗粒清除能力的影响

Fig.5 Effects of TMWE and TMWE-CP on carbon particle clearance ability in immunosuppressed mice



注:与正常对照组(NC)相比,*:差异显著($P<0.05$),**:差异极显著($P<0.01$);与模型对照组(MC)相比,#:差异显著($P<0.05$),##:差异极显著($P<0.01$);NC:正常对照组;MC:模型对照组;PC:阳性对照组;TMWE:松茸水提物组;TMWE-CP:松茸粗蛋白组。

图6 TMWE和TMWE-CP对免疫抑制小鼠脾淋巴细胞增殖活性的影响

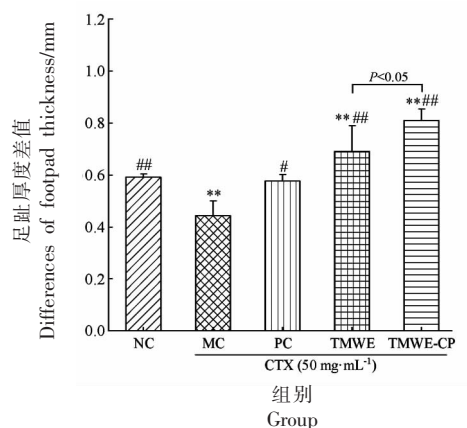
Fig.6 Effect of TMWE and TMWE-CP on splenic lymphocyte proliferation activity in immunosuppressed mice

TMWE-CP组分作用效果更加显著。

2.6 TMWE和TMWE-CP对免疫抑制小鼠血清半溶血值(HC₅₀)的影响

通过测定HC₅₀值来评价TMWE及其不同组

分对免疫抑制小鼠体液反应的影响。如图 8 所示, MC 组的溶血素产生水平明显低于 NC 组 ($P<0.05$), 说明 CTX 显著抑制了小鼠血清总补体溶血活性。与 MC 组相比, TMWE 和 TMWE-CP 组 HC_{50} 水平显著提升 ($P<0.05$)。另一方面, 与 NC 组相比, TMWE 和 TMWE-CP 组 HC_{50} 水平差异具有统计



注:与正常对照组(NC)相比,*:差异显著($P<0.05$),**:差异极显著($P<0.01$);与模型对照组(MC)相比,#:差异显著($P<0.05$),##:差异极显著($P<0.01$);NC:正常对照组;MC:模型对照组;PC:阳性对照组;TMWE:松茸水提物组;TMWE-CP:松茸粗蛋白组。

图 7 TMWE 和 TMWE-CP 对免疫抑制小鼠 DTH 的影响

Fig.7 Effects of TMWE and TMWE-CP on DTH in immunosuppressed mice

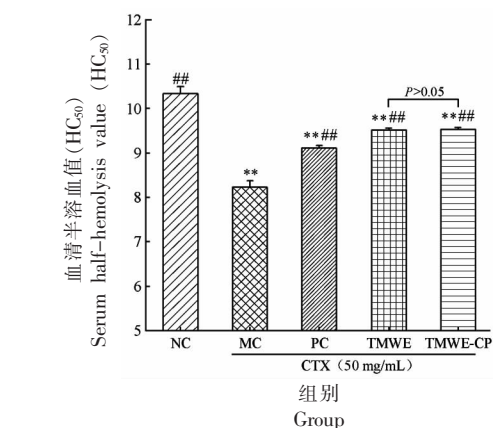
2.7 TMWE 和 TMWE-CP 对免疫抑制小鼠血清免疫球蛋白(IgG、IgM)的影响

小鼠血清中 IgG、IgM 含量如图 9 所示, MC 组与 NC 组相比,在注射 CTX 后, IgG、IgM 的表达水平显著降低($P<0.05$)。与 MC 组相比,灌胃 TMWE 和 TMWE-CP 能够显著增强 CTX 免疫抑制小鼠的 IgG、IgM 的表达水平 ($P<0.05$)。其中, TMWE-CP 的小鼠 IgG 表达水平显著高于 TMWE 组 ($P<0.05$), IgM 表达水平未见显著性差异 ($P>0.05$)。由此表明, TMWE 和 TMWE-CP 组分的灌胃干预均可恢复免疫抑制小鼠的 IgG 和 IgM 水平, 可改善免疫抑制小鼠的体液免疫功能, 且以 TMWE-CP 组分作用效果较优。

3 讨论

环磷酰胺(CTX)是一种应用十分广泛的抗肿

瘤药物之一,但同时它也是一种高效的免疫抑制药物,故本研究以 CTX 作为动物免疫抑制模型的制备药物^[25]。试验结果显示,腹腔注射 CTX 后, MC 组及各试验组小鼠均表现出不同程度的精神萎靡不振,伴随小鼠体重明显下降,这与衣伟萌等^[27]对太子参须提取物免疫抑制改善研究中的免疫抑制小鼠表现特征相近。此外, MC 组的免疫器官指数、碳颗粒清除能力、脾淋巴细胞增殖转化活性、DTH、 HC_{50} 、IgG 与 IgM 水平较 NC 组小鼠相比均显著降低,表明 CTX 使小鼠免疫功能受到抑制,免疫抑制模型成功建立。



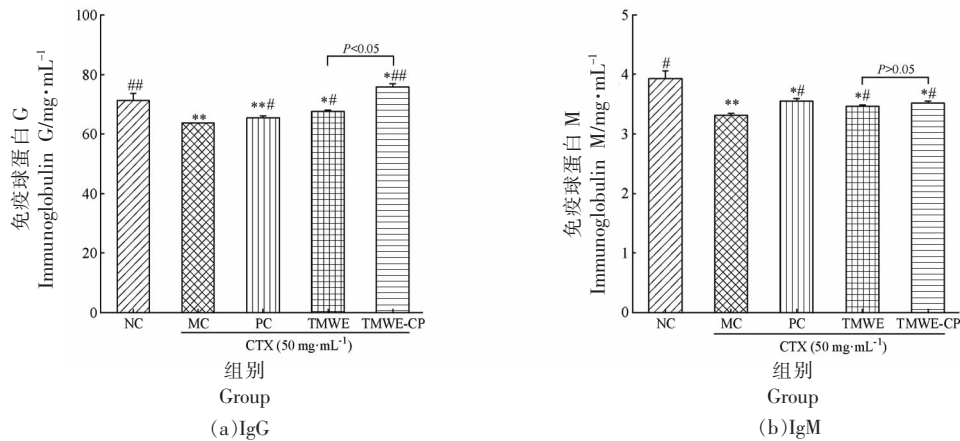
注:与正常对照组(NC)相比,*:差异显著($P<0.05$),**:差异极显著($P<0.01$);与模型对照组(MC)相比,#:差异显著($P<0.05$),##:差异极显著($P<0.01$);NC:正常对照组;MC:模型对照组;PC:阳性对照组;TMWE:松茸水提物组;TMWE-CP:松茸粗蛋白组。

图 8 TMWE 和 TMWE-CP 对免疫抑制小鼠 HC_{50} 的影响

Fig.8 Effects of TMWE and TMWE-CP on HC_{50} in immunosuppressed mice

瘤药物之一,但同时它也是一种高效的免疫抑制药物,故本研究以 CTX 作为动物免疫抑制模型的制备药物^[25]。试验结果显示,腹腔注射 CTX 后, MC 组及各试验组小鼠均表现出不同程度的精神萎靡不振,伴随小鼠体重明显下降,这与衣伟萌等^[27]对太子参须提取物免疫抑制改善研究中的免疫抑制小鼠表现特征相近。此外, MC 组的免疫器官指数、碳颗粒清除能力、脾淋巴细胞增殖转化活性、DTH、 HC_{50} 、IgG 与 IgM 水平较 NC 组小鼠相比均显著降低,表明 CTX 使小鼠免疫功能受到抑制,免疫抑制模型成功建立。

脾脏和胸腺是动物体内主要的免疫器官,含有大量的淋巴细胞和巨噬细胞,在细胞免疫和体液免疫中发挥重要作用,而 CTX 可抑制巨噬细胞分化,并减少免疫器官中的淋巴细胞数量,从而使体重、脾脏和胸腺质量下降^[28]。因此,小鼠体重、脾



注:与正常对照组(NC)相比,*:差异显著($P<0.05$),**:差异极显著($P<0.01$);与模型对照组(MC)相比,#:差异显著($P<0.05$),##:差异极显著($P<0.01$);NC:正常对照组;MC:模型对照组;PC:阳性对照组;TMWE:松茸水提取物组;TMWE-CP:松茸粗蛋白组。

图9 TMWE和TMWE-CP对免疫抑制小鼠血清免疫球蛋白的影响

Fig.9 Effects of TMWE and TMWE-CP on IgG(a) and IgM(b) in serum of immunosuppressed mice

脏病理学特征以及免疫器官指数能够反映机体非特异性免疫水平。在本研究中,MC组的体重和免疫器官指数较NC组显著降低,小鼠脾脏的脾囊被破坏,生发中心离散,淋巴细胞数量减少,红、白髓边界不清晰,组织表现较差,脾脏病理学特征提示存在脾脏损伤的情况。当小鼠经TMWE和TMWE-CP的持续干预,免疫器官指数均出现了不同程度的改善,经TMWE干预的小鼠胸腺指数显著($P<0.01$)高于TMWE-CP组,所有受试组小鼠体重呈逐渐恢复趋势,特别是TMWE-CP组。此外,组织病理学观察也表明,TMWE和TMWE-CP处理可改善CTX诱导的脾脏损伤,保护脾囊,促进生发中心融合,恢复淋巴细胞数量,小鼠的脾脏组织结构逐渐改善。另一方面,巨噬细胞是单核-巨噬细胞系统的重要组成部分,其通过吞噬作用吞噬病原体,并参与先天和后天免疫,而巨噬细胞吞噬能力则是评价机体的非特异性免疫功能重要检测指标^[5]。碳廓清试验是检测巨噬细胞吞噬能力的经典试验方法,它通过测定血液中碳粒的消失速率反映巨噬细胞系统吞噬异物的能力^[24]。试验结果显示,灌胃TMWE和TMWE-CP组分均能够预防并逆转CTX的免疫抑制作用,且TMWE作用效果明显高于TMWE-CP组分给药处理。综合以上结果表明,TMWE和TMWE-CP的干预处理能拮抗CTX对免疫器官的抑制作用,改善脾脏组织

结构,恢复并提升小鼠碳颗粒清除能力,增强机体的非特异性免疫功能,从而提高机体的免疫力。另外,与TMWE-CP相比,TMWE受试干预在机体非特异性免疫方面表现出较优的免疫改善效果。

DTH和脾淋巴细胞增殖转化能力是评价动物体内和体外细胞免疫的两个重要参数。本研究采用跖骨增厚法检测免疫抑制小鼠DTH的程度,通过注射SRBC致敏并激活T淋巴细胞,使局部组织发生膨胀,以反映动物体内细胞免疫功能^[29]。本研究结果表明,SRBC致敏后,与MC组相比,TMWE和TMWE-CP持续干预处理可明显增强免疫抑制小鼠迟发型超敏反应,且TMWE-CP组分比TMWE组分DTH效果更加显著。通常DTH的发生与效应T细胞、巨噬细胞及其产生的细胞因子或细胞毒性介质有关,由此推测,TMWE和TMWE-CP组分对免疫抑制小鼠DTH的促进作用,可能是通过促进T细胞转化为效应细胞及增强巨噬细胞的活性来实现的。Con A常作为一种非特异性促有丝分裂调节剂使用,而CTX是一种非特异性抗有丝分裂免疫抑制剂,前者单独作用于淋巴细胞时,可促进T淋巴细胞增殖转化,后者对T、B淋巴细胞增殖和分化具有抑制作用,导致机体免疫系统和器官的损伤^[22,30],因此,本研究采用Con A诱导活化免疫抑制小鼠脾脏淋巴细胞,通过CCK-8试剂盒检测T淋巴细胞增殖活性,结

果表明 TMWE 和 TMWE-CP 组分均显著增加 Con A 诱导的 T 淋巴细胞的增殖活性,与 TMWE 相比, TMWE-CP 的作用效果更加显著($P < 0.05$)。综上,在细胞免疫方面, TMWE 和 TMWE-CP 组分的持续干预可使细胞免疫功能显著增强,且 TMWE-CP 的 DTH 和脾淋巴细胞增殖活性作用效果均显著优于 TMWE 组分,即 TMWE-CP 组分在细胞免疫方面作用效果更显著。

免疫球蛋白是指 B 细胞响应特定抗原后增殖和分化而产生的蛋白质,它广泛存在于所有脊椎动物的血液、淋巴和体液中^[7]。当受到抗原性刺激后, IgM 首先被合成并诱导其它免疫细胞破坏外源刺激物,其在初次免疫中占据重要地位, IgG 是免疫球蛋白中分子质量最小和最常见的抗体类型, IgG 在脾脏和淋巴结中产生,在激活补体系统、中和免疫反应中的毒素方面发挥重要作用^[31-32]。它们都与体液免疫密切相关。ELISA 法测定小鼠血清 IgG、IgM 水平的结果表明,注射 CTX 使正常小鼠的 IgG、IgM 表达量下降,而 TMWE 和 TMWE-CP 组分持续干预能够显著增强 CTX 免疫抑制小鼠的 IgG、IgM 的表达水平,与 TMWE 组分相比, TMWE-CP 能够显著增强血清 IgG 的表达水平,而二者在 IgM 的表达水平上作用效果无显著性差异($P > 0.05$)。此外, B 淋巴细胞在受到 SRBC 刺激后,在免疫抑制小鼠的体液免疫反应中产生溶血素特异性抗体,且溶血素特异性抗体与体液免疫呈正相关,血清中溶血素特异性抗体的水平可以通过测定体外溶血过程中释放的血红蛋白量来反映出来^[33]。HC₅₀ 测定试验结果表明,经 TMWE 与 TMWE-CP 组分持续干预显著增加了免疫抑制小鼠的血清溶血素特异性抗体水平,二者作用效果相近($P > 0.05$)。综上, TMWE 和 TMWE-CP 均可有效改善 CTX 处理小鼠的体液免疫功能,且以 TMWE-CP 组分体液免疫改善效果较优。

大量研究表明,食用菌多糖在一定程度上具有良好的增强免疫作用^[14]。在本研究中, TMWE 和 TMWE-CP 主要成分测定结果表明, TMWE 含有更丰富的粗多糖,但试验结果发现 TMWE-CP 特异性免疫调节作用(体液免疫和细胞免疫)优于 TMWE 组分。这可能是因为, TMWE 组分中虽存在较多比例的粗多糖,但其生物活性与其中多糖分

子的糖单元组成、糖苷键类型及支链的长度、取代度等有关^[34]。另外,当蛋白质和多糖在同一体系共存时,其分子间具有共价键与非共价键的相互作用,相互作用导致体系内部微观结构形态的变化,进而影响体系的物理化学性质^[35]。此外,提取物中蛋白质经人体摄入后,大多于消化道内被酶解为小肽的形式,通过肠壁转运消化吸收,而氨基酸的物理化学特性(正电荷数量、疏水性和链长等)可影响免疫效应,如带正电荷的肽类似于趋化因子,与免疫细胞上的受体结合,激活免疫反应^[36-37]。所以, TMWE 与 TMWE-CP 的免疫调节作用的差异可能与受试物提取分离工艺,受试物体内消化吸收特性以及受试物所在体系中的不同成分间相互作用相关,其免疫调节机制仍需进一步研究论证。

4 结论

本研究基于 CTX 诱导免疫抑制 BALB/C 小鼠模型,从非特异性免疫、细胞免疫和体液免疫 3 个角度评价松茸低温水提物(TMWE)及其粗蛋白组分(TMWE-CP)的免疫调节作用。研究结果表明, TMWE 和 TMWE-CP 组分可恢复和增强免疫抑制小鼠的免疫调节能力,其作用表现在增强免疫抑制小鼠的免疫器官指数、碳颗粒清除能力、迟发型超敏反应、脾淋巴细胞增殖能力及改善免疫抑制小鼠脾脏组织形态和血清免疫指标。此外, TMWE 在非特异性免疫方面具有较好的免疫调节效果, TMWE-CP 在细胞免疫和体液免疫方面的免疫调节作用较显著,这可能与其提取分离纯化工艺、体内消化吸收特性以及其所在体系中相互作用有关。因此,关于 TMWE 和 TMWE-CP 组分的体内免疫调节机制,以及 TMWE 和 TMWE-CP 组分中主要免疫活性成分的筛选仍需进一步的研究。本研究表明 TMWE 和 TMWE-CP 组分是一种具有良好开发前景的免疫调节剂。本研究可为松茸保健食品的研发提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] YAMANAKA T, YAMADA A, FURUKAWA H. Advances in the cultivation of the highly-prized ectomycorrhizal mushroom *Tricholoma*

- matsutake[J]. *Mycoscience*, 2020, 61(2): 49–57.
- [2] LI M Q, YANG R W, ZHANG H, et al. Development of a flavor fingerprint by HS–GC–IMS with PCA for volatile compounds of *Tricholoma matsutake* Singer[J]. *Food Chemistry*, 2019, 290: 32–39.
- [3] LI M Q, GE Q, DU H T, et al. Potential mechanisms mediating the protective effects of *tricholoma matsutake*–derived peptides in mitigating DSS–induced colitis[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(19): 5536–5546.
- [4] HUANG F, ZHANG R F, LIU Y, et al. Dietary litchi pulp polysaccharides could enhance immunomodulatory and antioxidant effects in mice[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 92: 1067–1073.
- [5] PARK H Y, OH M J, KIM Y, et al. Immunomodulatory activities of *Corchorus olitorius* leaf extract: Beneficial effects in macrophage and NK cell activation immunosuppressed mice[J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 46: 220–226.
- [6] YU F M, ZHANG Z W, YE S W, et al. Immunoenhancement effects of pentadecapeptide derived from *Cyclina sinensis* on immune–deficient mice induced by Cyclophosphamide[J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 60: 103408.
- [7] ZENG Y, HU X Y, YU Z Y, et al. Immune enhancement and antioxidant effects of low molecular–weight peptides derived from *Nibea japonica* muscles on immune–deficient mice induced by Cyclophosphamide[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 102(10): 42–50.
- [8] MENG F X, XU P J, WANG X, et al. Investigation on the immunomodulatory activities of *Sarcodon imbricatus* extracts in a cyclophosphamide (CTX)–induced immunosuppressed mouse model[J]. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2017, 25(4): 460–463.
- [9] 张瑞. 桦褐孔菌水提物免疫调节作用及急性毒性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2018.
- ZHANG R. Immunomodulatory effect and acute toxicity of the water extract of *Inonotus obliquus* [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2018.
- [10] DITAMO Y, RUPIL L L, SENDRA V G, et al. *In vivo* immunomodulatory effect of the lectin from edible mushroom *Agaricus bisporus* [J]. *Food & Function*, 2015, 7(1): 262–269.
- [11] JEDRZEJEWSKI T, PIOTROWSKI J, KOWALCZEWSKA M, et al. Polysaccharide peptide from *coriolus versicolor* induces interleukin 6–related extension of endotoxin fever in rats[J]. *International Journal of Hyperthermia*, 2015, 31(6): 626–634.
- [12] WU F F, HUANG H H. Surface morphology and protective effect of *Hericium erinaceus* polysaccharide on cyclophosphamide–induced immunosuppression in mice[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 251: 116930.
- [13] CHEN S P, LIU C C, HUANG X J, et al. Comparison of immunomodulatory effects of three polysaccharide fractions from *Lentinula edodes* water extracts[J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 66: 103791.
- [14] ZHANG W N, GONG L L, LIU Y, et al. Immunoenhancement effect of crude polysaccharides of *Helvella leucopus* on cyclophosphamide–induced immunosuppressive mice[J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 69: 103942.
- [15] 赵小莉, 付洋, 赵强, 等. 硫酸铵沉淀分离富硒大豆蛋白的初步研究[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(13): 92–95, 100.
- ZHAO X L, FU Y, ZHAO Q, et al. Preliminary study on ammonium sulfate precipitation of selenium–enriched soybean protein isolate[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(13): 92–95, 100.
- [16] 靳挺, 沈科丞, 施亚芳, 等. 高黏度壳聚糖回收鱼糜漂洗液中蛋白质的研究[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(11): 165–169.
- JIN T, SHEN K C, SHI Y F, et al. Research on recovery of protein from surimi rinse by high viscosity chitosan[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(11): 165–169.
- [17] 李杰, 章金辉, 叶庆生, 等. 大苞鞘石斛和铁皮石斛多糖提取及其免疫调节作用比较[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(1): 89–95.
- LI J, ZHANG J H, YE Q S, et al. Extracting and immune activity comparison of polysaccharides from *Dendrobium wardianum* and *Dendrobium officinale*[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(1): 89–95.
- [18] GAO S, HONG H, ZHANG C, et al. Immunomodulatory effects of collagen hydrolysates from yak (*Bos grunniens*) bone on cyclophosphamide–induced

- immunosuppression in BALB/c mice[J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 60: 103420.
- [19] GAJIC D, SAKSIDA T, KOPRIVICA I, et al. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) fruit extract modulates immune response *in vivo* and *in vitro* [J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 66: 103836.
- [20] WU Y, ZHU C P, ZHANG Y, et al. Immunomodulatory and antioxidant effects of pomegranate peel polysaccharides on immunosuppressed mice[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 137: 504–511.
- [21] LI M Q, LV R Z, WANG C Z, et al. Tricholoma matsutake-derived peptide WFNNAGP protects against DSS-induced colitis by ameliorating oxidative stress and intestinal barrier dysfunction[J]. *Food & Function*, 2021, 12(23): 11883–11897.
- [22] 陈云, 李周勇, 史玉东, 等. 嗜热链球菌 MN-BM-A01 对小鼠免疫的调节作用[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(7): 53–58.
- CHEN Y, LI Z Y, SHI Y D, et al. Immunoregulatory effect of *Streptococcus thermophilus* MN-BM-A01 on mice[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(7): 53–58.
- [23] GAO D, LIU Z, LIU F, et al. Study of the immunoregulatory effect of *Lactobacillus rhamnosus* 1.0320 in immunosuppressed mice [J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 79: 104423.
- [24] 魏艳, 曾小群, 潘道东, 等. 水苏糖-植物乳杆菌共生元对小鼠免疫功能的影响[J]. *中国食品学报*, 2014, 14(1): 14–19.
- WEI Y, ZENG X Q, PAN D D, et al. Effects of *Stachyose-Lactobacillus plantarum* synbiotics on immune function in mice[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2014, 14(1): 14–19.
- [25] MA T T, LI C, ZHAO F Q, et al. Effects of co-fermented collagen peptide – jackfruit juice on the immune response and gut microbiota in immunosuppressed mice[J]. *Food Chemistry*, 2021, 365: 130487.
- [26] 欧凯西, 刘捷, 张缘, 等. 风热清口服液对免疫低下小鼠免疫调节作用的研究[J]. *世界中医药*, 2021, 16(17): 2591–2595, 2599.
- OU K X, LIU J, ZHANG Y, et al. Study on immunomodulatory property of fengreqing oral liquid on immunosuppressive mice[J]. *World Chinese Medicine*, 2021, 16(17): 2591–2595, 2599.
- [27] 衣伟萌, 陈赛红, 闵思明, 等. 太子参须提取物对免疫抑制小鼠免疫保护作用的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2020, 32(5): 837–844.
- YI W M, CHEN S H, MIN S M, et al. Study on the immunoprotective effects of Radix Pseudostellariae fibrous root extraction in immunosuppressed mice [J]. *Natural Product Research and Development*, 2020, 32(5): 837–844.
- [28] CHEN X L, CAI B Y, WANG J, et al. Mulberry leaf-derived polysaccharide modulates the immune response and gut microbiota composition in immunosuppressed mice [J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 83(25): 104545.
- [29] ABID S, KHAJURIA A, PARVAIZ Q, et al. Immunomodulatory studies of a bioactive fraction from the fruit of *Prunus cerasus* in BALB/c mice[J]. *International Immunopharmacology*, 2012, 12(4): 626–634.
- [30] PENG S S, YANG Y J, LI S J, et al. Immunomodulatory activities of *Lactobacillus rhamnosus* ZDY114 and donkey milk in BALB/c mice[J]. *International Dairy Journal*, 2014, 34(2): 263–266.
- [31] XIONG L, OUYANG K H, CHEN H, et al. Immunomodulatory effect of *Cyclocarya paliurus* polysaccharide in cyclophosphamide induced immunocompromised mice [J]. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2020, 24: 100224.
- [32] FENG X, YANG X, XIU B, et al. IgG, IgM and IgA antibodies against the novel polyprotein in active tuberculosis[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2014, 14(1): 1–9.
- [33] CHEN Y, TANG J B, WANG X K, et al. An immunostimulatory polysaccharide (SCP-IIa) from the fruit of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2012, 50(3): 844–848.
- [34] 马合帕丽·马哈巴提. 比较四种天然多糖免疫增强作用及其构效关系[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2020.
- MAHEPALI M. Comparison of structural characteristics and immunoregulatory activities of four natural polysaccharides[D]. Wulumuqi: Xinjiang University, 2020.
- [35] 张曼, 王岸娜, 吴立根, 等. 蛋白质、多糖和多酚间相互作用及研究方法[J]. *粮食与油脂*, 2015, 28(4): 42–46.
- ZHANG M, WANG A N, WU L G, et al. The in-

- teraction and research methods between protein, polysaccharide and polyphenol[J]. *Cereals & Oils*, 2015, 28(4): 42–46.
- [36] CHEUNG R C F, NG T B, WONG J H. Marine peptides: bioactivities and applications [J]. *Marine Drugs*, 2015, 13(7): 4006–4043.
- [37] 黄沐晨, 杨傅佳, 陈旭, 等. 海洋源生物活性肽的构效关系与作用机理研究进展[J]. *食品科学*, 2021, 42(19): 271–280.
- HUANG M C, YANG F J, CHEN X, et al. Progress in understanding the structure–activity relationship and mechanism of action of marine bioactive peptides[J]. *Food Science*, 2021, 42(19): 271–280.

Immunomodulatory Effect of *Tricholoma matsutake* Low-temperature Water Extracts Based on BALB/c Mouse Model

Du Hanting, Lin Songyi, Li Dongmei, Ge Qi, Chen Dong*

(School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, National Engineering Research Center of Seafood, Dalian 116034, Liaoning)

Abstract The immunologic effects of *Tricholoma matsutake* water extract (TMWE) and *Tricholoma matsutake* water extract–crude protein (TMWE–CP) extracted from wild *Tricholoma matsutake* (*T. matsutake*) in Changbai Mountain with low temperature water, were investigated based on the immunosuppressed male BALB/C mice induced by cyclophosphamide (CTX). Compared with the immunosuppressed model control group, the experimental results showed that TMWE and TMWE–CP could slow down the decline of body weight, increased the splenic and thymic indices and alleviated the morpho–pathological characteristics of spleen exposed to CTX. TMWE and TMWE–CP could enhance and restore carbon particle scavenging ability, delayed type hypersensitivity, and splenic lymphocyte proliferation activity of BALB/C mice. The serum levels of IgG, IgM and serum half–hemolysis concentration of both groups were significantly increased ($P<0.05$). Therefore, they could enhance the immune ability of immunosuppressed mice from non–specific immunity, cellular immunity and humoral immunity. In addition, compared with TMWE group, TMWE–CP had more significant immunomodulatory effects in cellular immunity (delayed type hypersensitivity and splenic lymphocyte proliferation activity) and humoral immunity (serum half–hemolysis concentration and serum levels of IgG, IgM) ($P<0.05$), while TMWE group could better enhance non–specific immunity (immune organ index and carbon particle scavenging ability). In conclusion, TMWE and TMWE–CP might be used as potential natural immunomodulator of *T. matsutake*, and has wide application prospects in the utilization and development of effectivity–specific health products and immunomodulating agent of *T. matsutake*.

Keywords *Tricholoma matsutake* low–temperature water extract; BALB/c mouse model; non–specific immunity; cellular immunity; humoral immunity