

无花果发酵提取物对免疫抑制小鼠的免疫调节

王巧鑫¹, 谢宇宣¹, 斯朝金¹, 陶瑞霄², 赵甲元¹, 廖颖^{1*}

¹ 四川师范大学生命科学学院 成都 610101

² 四川工商职业技术学院 四川都江堰 611830

摘要 目的:探究无花果发酵提取物对环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠免疫调节和肠道微生物菌群的影响。方法:腹腔注射环磷酰胺构建免疫抑制小鼠模型,将小鼠随机分成空白对照组(NC组)、模型对照组(MC组)、无花果发酵提取物组(FF组)和无花果非发酵提取物组(NF组),灌胃期间每2d记录1次小鼠体质量,连续灌胃9d后,检测免疫器官指数、血清中细胞因子、血常规,进行组织病理学观察以及肠道微生物菌群分析。结果:与MC组相比,FF组和NF组的小鼠体质量以及胸腺、脾脏和肝脏等免疫器官指数显著增加($P<0.05$),白细胞、单核细胞和粒细胞总数显著提高($P<0.05$),IL-4、IL-6、TNF- α 和IFN- γ 等细胞因子显著增加($P<0.05$)。组织病理学观察结果显示,FF组和NF组中环磷酰胺对小鼠空肠、胸腺、脾脏和肝脏造成的损伤明显减轻,且FF组比NF组的效果更明显。肠道微生物菌群分析表明,*Blautia*、毛螺菌属、帕拉普氏菌属、梭菌属、乳杆菌属和拟杆菌属的水平与免疫性状密切相关,与MC组相比,FF组中乳杆菌属、螺杆菌属和Unclassified_S24-7丰度的增加比NF组中更明显。结论:黑曲霉发酵的无花果提取物相较于未发酵的无花果提取物,更能提高环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠的免疫功能,改善肠道微生物菌群。

关键词 发酵;无花果;小鼠;免疫调节;肠道微生物菌群

文章编号 1009-7848(2024)10-0145-11 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.10.014

无花果(*Ficus carica* Linn.)是桑科的一种落叶树,一般生长在温暖干燥的气候下^[1-2]。有研究表明,无花果是一种药食同源植物^[3-4],其水提取物可显著提高正常小鼠的碳颗粒清除率和血清溶血素水平,且其水提取物中的多糖是免疫调节活动的主要成分之一^[5]。

免疫系统在宿主防御感染和修复受损组织愈合的过程中发挥着重要的作用^[6]。近年来,肠道微生物菌群在调节宿主代谢免疫力中的作用引起广泛的关注^[7-8],其主要原因是肠道微生物菌群可以刺激免疫反应,保持上皮屏障功能,从而维持免疫系统和肠道内稳态^[9-11]。有报道称,一些食物的原始功能性化合物,如多酚、黄酮、多糖和环肽等,对免疫功能和肠道微生物菌群有调节作用^[12-15]。

微生物发酵通常可以从植物原料中产生高价值的产品^[16-17]。先前研究表明,无花果发酵提取物可以调节环磷酰胺处理小鼠的免疫反应和肠道微

生物菌群^[18],然而,发酵是否能提高无花果提取物在免疫反应和肠道微生物菌群中调节作用的效率尚不清楚。本研究比较黑曲霉发酵的无花果提取物和未发酵的无花果提取物对环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠免疫调节和肠道微生物菌群的影响,并探究无花果发酵提取物对免疫损伤小鼠潜在的修复机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

冻干无花果,威海海金宝食品科技有限公司;环磷酰胺,江苏盛迪医药有限公司;小鼠白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-6(IL-6)、干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附测定(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒,邦奕生物科技有限公司;E.Z.N.A.[®] Stool DNA 试剂盒,D4015,美国Omega有限公司;分析试剂,科隆化学品有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 无花果粗提物的制备及其发酵过程 从普洱茶中分离出黑曲霉 CJ-1,在-80℃条件下用15%甘油保存。将真菌孢子转移并悬浮于0.9%的

收稿日期:2023-10-26

基金项目:固态发酵资源利用四川省重点实验室开放基金项目(2021GTY01)

第一作者:王巧鑫,女,硕士

通信作者:廖颖 E-mail: 421135278@qq.com

氯化钠中,使其活细胞数为 1.0×10^7 CFU/mL,用该孢子悬液作为接种物。

冻干无花果被切成直径为 0.3~0.5 cm 的小块,将无花果(200 g)放置在 1 000 mL 的锥形瓶中,用蒸馏水湿润以获得 70% 的水分,用 1.0 mol/L 氢氧化钠调整 pH 值至 7.0,将培养基 121 °C 消毒 20 min,然后接种 40 mL 的接种物,对照样品接种 40 mL 无菌水作为对照,锥形瓶在 30 °C 培养箱中培养 7 d。

将 10 g 样品和 13 mL 的 95% 乙醇转移到 100 mL 的棕色容量瓶中,然后在 40 °C 下超声(40 kHz,400 W)处理 30 min,在 25 °C 下用酒精稀释至 200 mL 容量瓶中,在 8 000 r/min 离心 20 min,收

集悬浮液并通过 0.45 μ m 的膜过滤器过滤,然后将冻干样品用于后续试验。

1.2.2 实验动物分组及处理 60 只雄性昆明小鼠,(20 \pm 2)g,6 周龄,购自成都达硕实验动物有限公司。根据中国动物护理和使用委员会的指导方针和四川师范大学动物护理和使用委员会的实验程序,将小鼠饲养在 (20 \pm 2)°C,70%~75% 湿度和 12 h 光-暗周期循环的光照条件下,小鼠可以自由获得水和食物。喂养 7 d 后,将 60 只小鼠随机分为 4 组,每组 15 只,分别为空白对照组(NC 组)、模型对照组(MC 组)、无花果发酵提取物组(FF 组)和无花果非发酵提取物组(NF 组),小鼠的给药情况如表 1 所示。

表 1 实验动物分组及给药情况

Table 1 Grouping and administration of experimental animals

分组	腹腔注射 3 d		胃内灌服 9 d	
	环磷酰胺	0.9%NaCl	无花果非发酵提取物	无花果发酵提取物
NC 组	80 mg/(kg·d)	0.9%NaCl	0.5 mL/d	—
MC 组	80 mg/(kg·d)	—	0.5 mL/d	—
FF 组	80 mg/(kg·d)	—	—	100 mg/(kg·d)
NF 组	80 mg/(kg·d)	—	100 mg/(kg·d)	—

在实验过程中,每 2 d 测量 1 次小鼠体质量。第 19 天,在无菌条件下收集小鼠粪便样本提取 DNA,并在 -80 °C 冰箱保存^[18]。灌胃后,将小鼠眼睛采集的血样分为两部分:一部分用于血常规检测,另一部分离心(3 000 r/min,4 °C,15 min)后 -20 °C 保存。颈椎脱位的小鼠安乐死处理后,收集胸腺、肝脏、脾脏和空肠,用 10% 福尔马林固定,以便进一步观察组织学图像,并根据公式(1)^[18]称量小鼠的器官质量,计算器官指数:

$$\text{器官指数} = \text{器官质量}(\text{mg}) / \text{体质量}(\text{g}) \quad (1)$$

1.2.3 血清中细胞因子水平的测定 根据制造商的说明,使用 ELISA 试剂盒分析血清中 IL-4、IL-6、IFN- γ 和 TFN- α 的水平。

1.2.4 血常规检验 使用自动血细胞分析仪进行白细胞(WBC)、淋巴细胞(Lymph)、单核细胞(Mon)和粒细胞(Gran)的计数。

1.2.5 肠道微生物菌群分析 根据制造商的说明,使用 E.Z.N.A.[®] Stool DNA 试剂盒从小鼠粪便

样本中提取基因组 DNA,并进行肠道微生物菌群分析^[18]。用正向引物 F: Illumina 适配器序列 1 + 5'-ACTCTACGGGAGGCAGCA-3' 和反向引物 R: Illumina 适配器序列 2 + 5'-GGACTACHVG GGTWTCTAAT-3' 扩增细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 区。粪便样本由上海派森诺生物科技有限公司(中国上海)在 Illumina MiSeq 平台上进行测序和生物信息学分析。基于核糖体数据库,使用 QIIME 平台,将粪便样本中原始序列聚类(相似性 $\geq 97\%$)为不同的操作分类单元(OTUs)。使用 R 软件包(V3.4.0, <https://www.r-project.org/>),根据 OTUs 的丰度,进行 alpha 多样性、beta 多样性和不同物种的筛选。

1.3 统计分析

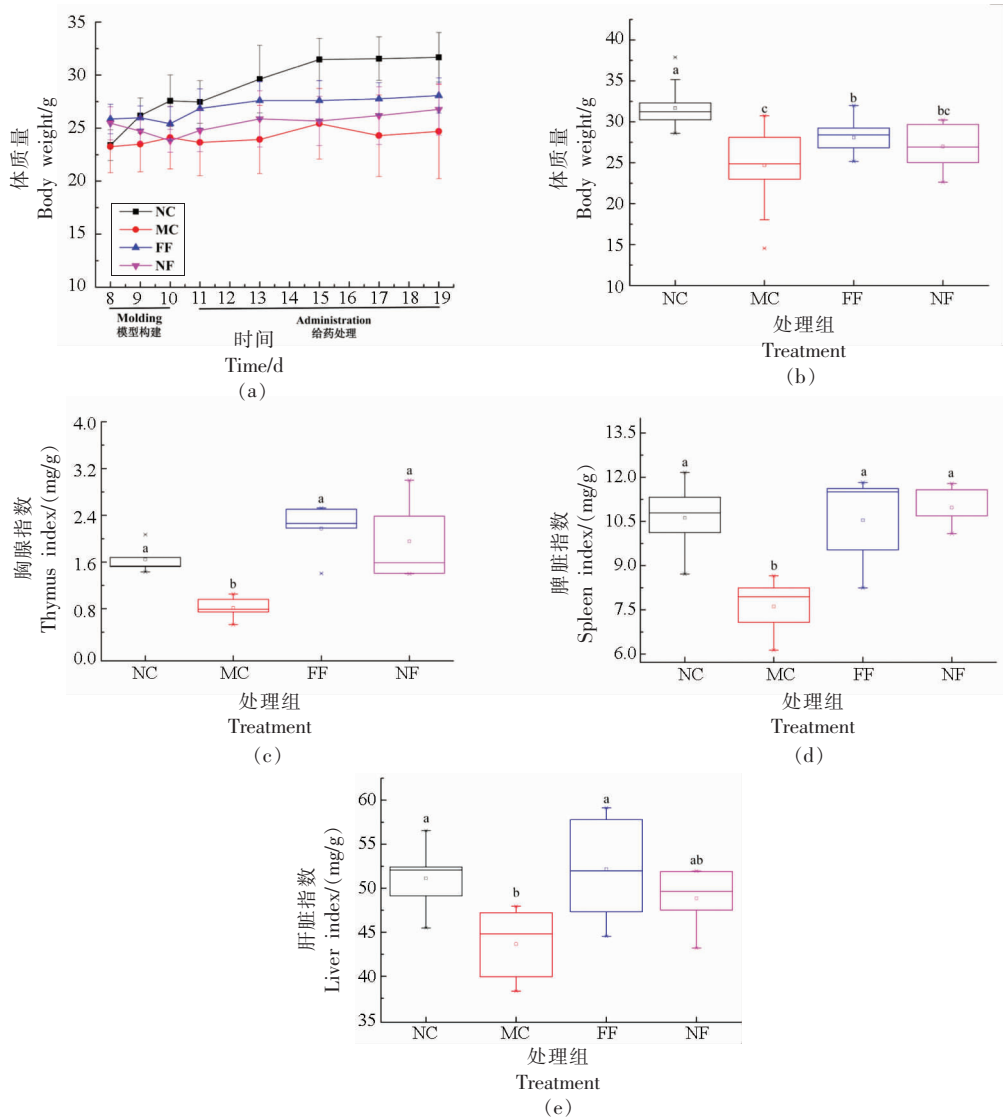
采用 SPSS 25.0 统计处理软件进行统计分析,包括 T 检验、单因素方差分析和非参数检验, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义,数值变量的结果用“平均值 \pm 标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 无花果发酵和非发酵提取物对小鼠体质量和免疫器官指数的影响

无花果发酵提取物和非发酵提取物对小鼠体质量的影响如图 1a 和 1b 所示,NC 组小鼠的体质量显著高于 MC 组、FF 组和 NF 组,说明环磷酰胺抑制了小鼠的生长。FF 组和 NF 组的体质量恢复效果优于 MC 组,说明无花果发酵提取物和非发

酵提取物可以减轻环磷酰胺处理小鼠造成的损伤,并且,无花果发酵提取物更有效,当注射环磷酰胺 3 d 后,FF 组小鼠的体质量始终高于 NF 组。如图 1c~1e 所示,MC 组的胸腺、脾脏和肝脏指数明显低于 NC 组,与 MC 组相比,FF 组和 NF 组的胸腺、脾脏和肝脏指数显著升高($P<0.05$),说明无花果发酵提取物和非发酵提取物均减轻了环磷酰胺引起的损伤,并且无花果发酵提取物更有效。



注:不同小写字母表示组间差异显著($P<0.05$),下同。

图 1 无花果发酵和非发酵提取物对小鼠体质量和免疫器官指数的影响

Fig.1 Effect of fig-fermented and non-fermented extracts on body weight and immune organ index in mice

2.2 无花果发酵和非发酵提取物对小鼠血清中细胞因子和血常规参数的影响

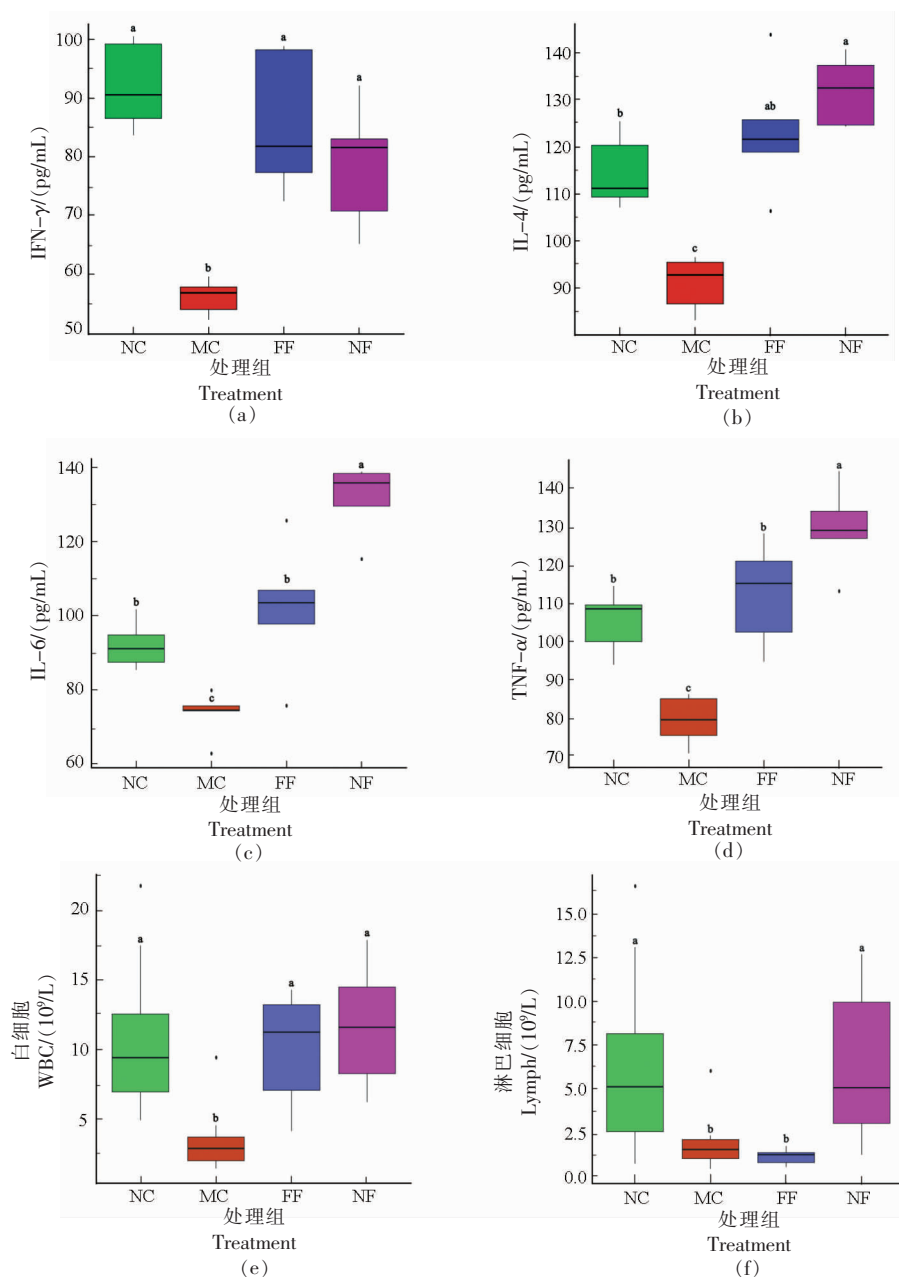
无花果发酵提取物和非发酵提取物对血清中

细胞因子产生的影响如图 2a~2d 所示。MC 组的 IL-4、IL-6、TNF- α 和 IFN- γ 水平均显著低于 NC 组,表明环磷酰胺抑制了小鼠的免疫功能。FF 组

和 NF 组的细胞因子水平均高于 MC 组 ($P < 0.05$), 说明无花果发酵提取物和非发酵提取物可以通过促进细胞因子的产生, 缓解环磷酰胺诱导的免疫抑制效应, 并增强了免疫力。然而这些细胞因子的水平在 FF 组和 NF 组中有所不同, NF 组 IL-4、IL-6 和 TNF- α 的水平显著高于 FF 组 ($P < 0.05$), 而 IFN- γ 的水平则相反, 可能存在 NF 组和 FF 组涉及的促进细胞因子分泌的机制不同。

无花果发酵提取物和非发酵提取物对部分血

常规参数产生的影响如图 2e~2h 所示。与 NC 组相比, MC 组的白细胞、淋巴细胞、粒细胞和单核细胞计数均明显减少。FF 组和 NF 组的白细胞、单核细胞和粒细胞计数均高于 MC 组 ($P < 0.05$), 然而白细胞和单核细胞的计数, 在 FF 组和 NF 组之间没有显著差异。NF 组的淋巴细胞计数明显高于 FF 组, 而粒细胞计数则相反, 并且 FF 组的淋巴细胞计数低于 MC 组。



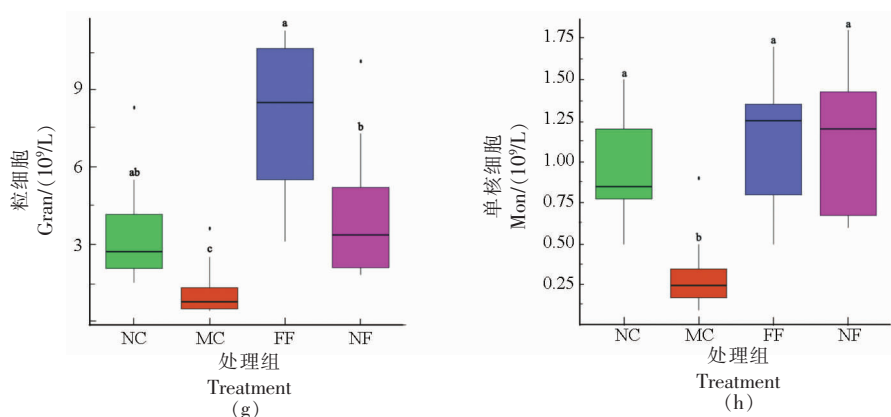


图 2 无花果发酵和非发酵提取物对血清中细胞因子和部分血常规参数的影响

Fig.2 Effect of fig-fermented and non-fermented extracts on cytokines in serum and some blood routine parameters

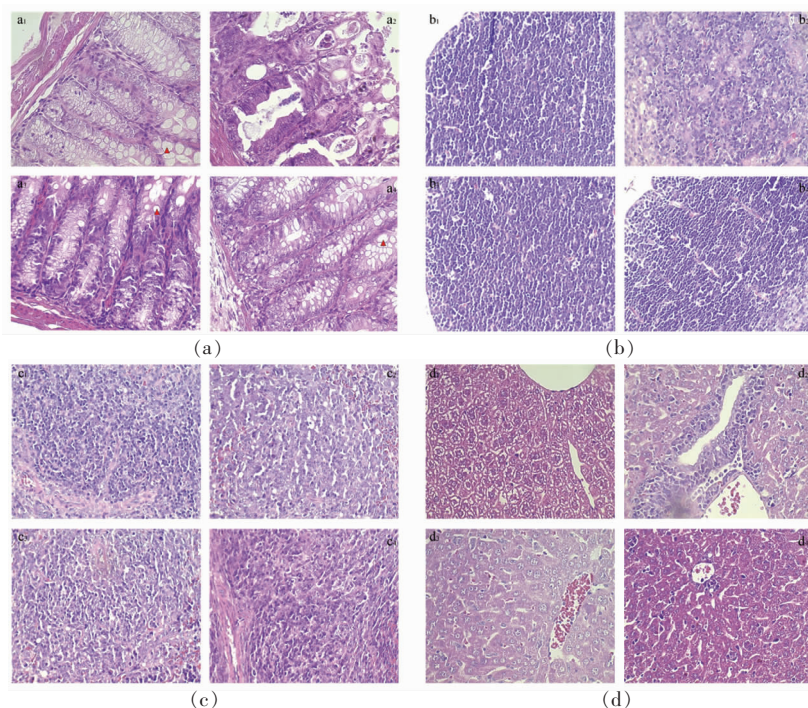
2.3 无花果发酵和非发酵提取物对小鼠空肠、胸腺、脾脏和肝脏的组织学影响

经无花果发酵提取物和非发酵提取物处理后,空肠、胸腺、脾脏和肝脏的组织学如图 3a~3d 所示。如图 3a 所示,与 NC 组相比,环磷酰胺能显著引起空肠上皮组织的损伤,从图中可以看到,MC 组小鼠空肠上皮表面结构不完整,柱状细胞和杯状细胞含量较少,还有部分细胞碎片。无花果发酵提取物和非发酵提取物处理后,FF 组和 NF 组

小鼠空肠上皮表面结构明显增殖和愈合,出现柱状细胞和杯状细胞。

如图 3b 所示,MC 组小鼠的胸腺皮质和髓质结构较 NC 组小鼠弱,皮质与髓质之间的边界不明确,MC 组小鼠的胸腺皮质较薄,细胞密度较低,纤维组织增生。与 MC 组相比,FF 组和 NF 组小鼠的皮质和髓质之间的边界变得清晰,并且 FF 组小鼠的胸腺结构比 NF 组更清晰。

如图 3c 所示,NC 组小鼠脾脏的小梁、白髓和



注:图中 1、2、3 和 4 分别代表 NC 组、MC 组、FF 组和 NF 组。

图 3 无花果发酵和非发酵提取物对空肠、胸腺、脾脏和肝脏的组织学影响

Fig.3 Effect of fig-fermented and non-fermented extracts on histological in jejunum, thymus, spleen and liver

红髓结构清晰,而MC组小鼠脾脏的白髓和红髓中心分散,边界区域不清楚,可见大量凋亡细胞。与MC组相比,FF组和NF组小鼠的白髓和红髓结构变得清晰。

如图3d所示,NC组小鼠未见组织学异常,然而在MC组的小鼠中观察到肝板和肝窦的排列紊乱,经无花果发酵提取物和非发酵提取物处理后,FF组和NF组小鼠的肝板和肝窦排列紊乱的程度明显降低。

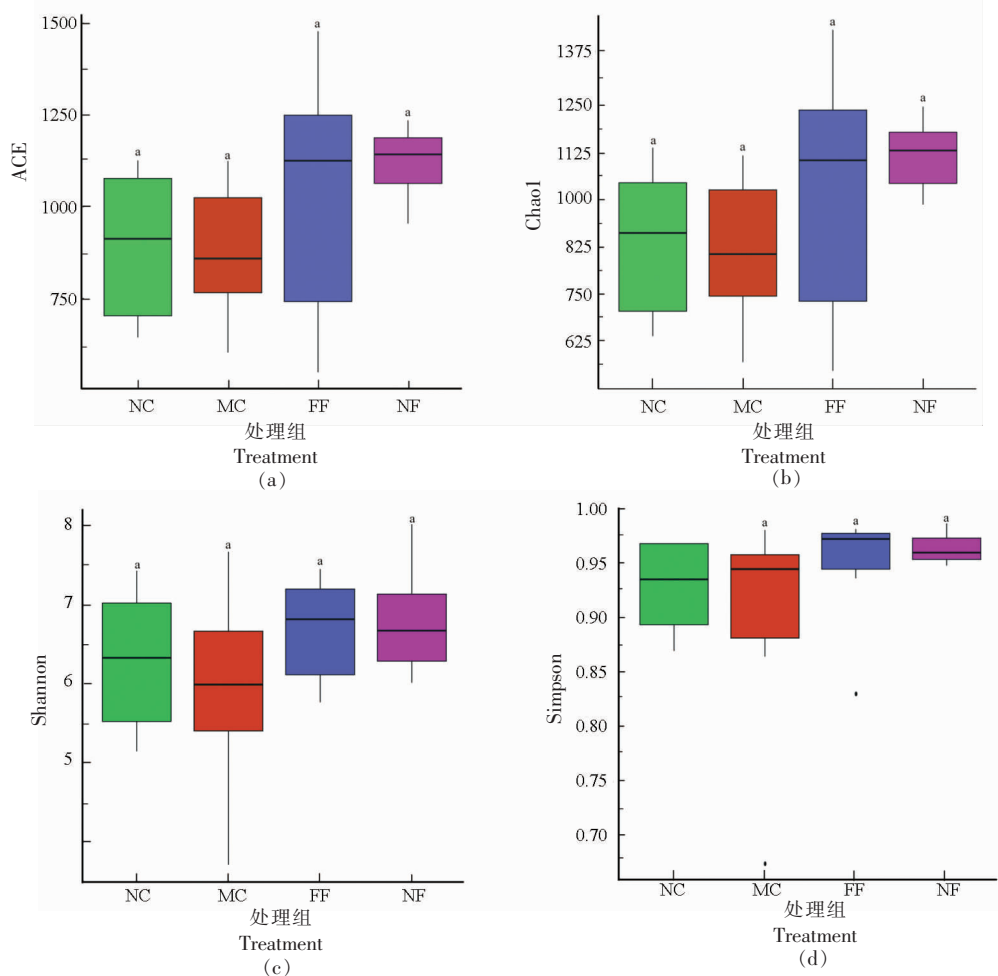
2.4 无花果发酵和非发酵提取物对小鼠肠道微生物菌群的影响

从4组粪便样本中,共获得了920 811个16S rRNA基因V3-V4区的高质量序列,共鉴定出24 926个OTUs和7 829个属。在门的水平上,最丰富的细菌主要有硬壁菌门(51.80%)、拟杆菌门(38.85%)、变形菌门(6.42%)、放线菌门(1.63%)和脱铁杆菌门(0.52%)。

细菌丰富度(用ACE和Chao1指数来表示)

和多样性(用Shannon和Simpson指数来表示)的变化,如图4a~4d所示。由图可知,各组间ACE和Chao1指数无显著性差异,同样,Shannon和Simpson指数在各组间也无显著性差异($P>0.05$)。结果表明,环磷酰胺、无花果发酵提取物和非发酵提取物对细菌丰富度和多样性没有显著改变。

采用主成分分析(PCA)和层次聚类分析来确定不同组间微生物组成的不同分类。如图4e所示,PCA结果显示,NC组和MC组之间有明显的分离,无花果发酵提取物和非发酵提取物对肠道微生物菌群组成也有明显影响。在PC1上,显示了总方差的63.83%,MC组、FF组和NF组的距离存在显著差异($P<0.05$),NC组、FF组和NF组的距离具有可比性,这表明无花果发酵提取物和非发酵提取物干预可使MC组的肠道微生物菌群组成向NC组转移。与NF组的距离相比,FF组的距离更接近于NC组,说明FF组的肠道微生物菌群组成更能恢复到NC组中可见的状态。



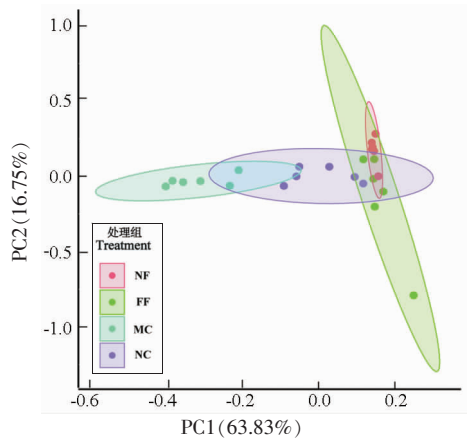


图 4 无花果发酵和非发酵提取物对肠道微生物菌群的影响

Fig.4 Effects of fig-fermented and non-fermented extracts on gut microbiota

以相对丰度大于 0.1%的物种为基础,分析了环磷酸胺、无花果发酵提取物和非发酵提取物干预下肠道微生物菌群的特定细菌系统类型。如图 5 所示,与 NC 组相比,MC 组的小鼠共 12 个 OTUs 显著变化(11 个上调,1 个下调),与 MC 组相比,

FF 组和 NF 组分别改变了 12 个 OTUs(3 个上调,9 个下调)和 8 个 OTUs(3 个上调,5 个下调),环磷酸胺改变的 12 个 OTUs 被无花果发酵提取物显著逆转。将 FF 组和 NF 组分别与 NC 组比较,FF 组中的 OTU170、OTU803、OTU2747 和 OTU3003

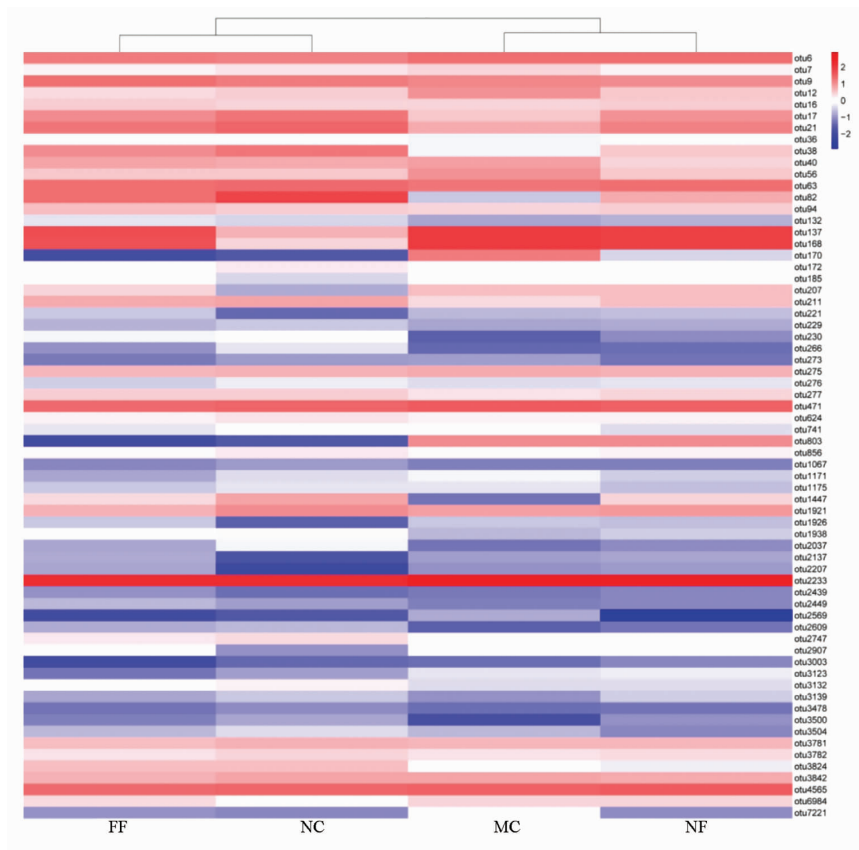


图 5 无花果发酵和非发酵提取物对肠道微生物菌群组成的改变

Fig.5 Changes in the composition of the gut microbiota between fig-fermented and non-fermented extracts

与 NC 组更接近。在被提取物改变的 OTUs 中,在属的水平上,OTU82 属于 *Blautia*, OTU230 属于拟杆菌属, OTU803 属于螺杆菌属, OTU1447 属于毛螺菌属, OTU1938 属于帕拉普氏菌属, OTU2569 属于梭菌属, OTU3824 属于瘤胃球菌属, OTU3003 和 OTU3500 属于乳杆菌属, OTU170、OTU2609、OTU2747 和 OTU7221 属于 *Unclassified_S24-7*。因此,与提取物调节相关的主要细菌属是 *Blautia*、螺杆菌属、毛螺菌属、帕拉普氏菌属、梭菌属、瘤胃球菌属、乳杆菌属、拟杆菌属和 *Unclassified_S24-7*。

无花果发酵提取物比非发酵提取物能更有效地恢复乳杆菌属、螺杆菌属和 *Unclassified_S24-7* 的丰度。

采用 Spearman 相关分析研究可能有助于调节免疫的肠道微生物菌群,分析环磷酸胺处理的小鼠在属的水平上主要肠道微生物菌群的相对丰度与免疫反应参数之间的相关性,结果如图 6 所示, *Blautia*、毛螺菌属、帕拉普氏菌属、梭菌属、乳杆菌属和拟杆菌属的水平与器官指数、血清细胞因子和血常规参数等免疫特性密切相关。

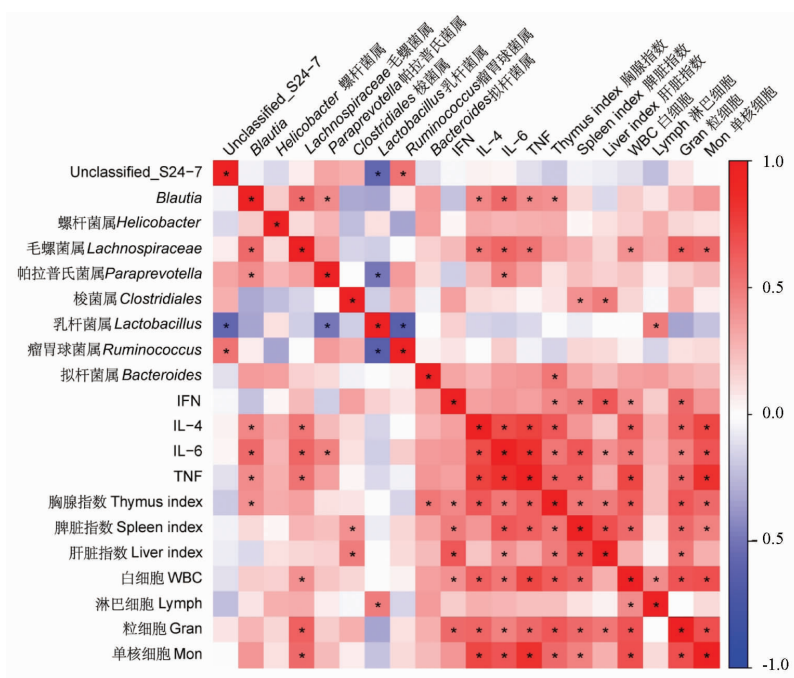


图 6 优势细菌属与免疫性状之间的相关性分析

Fig.6 Correlation analysis between dominant bacterial genus and immune traits

3 讨论

发酵可以通过改变多酚和黄酮的浓度来提高植物的功能特性^[19],本课题组前期研究表明,无花果发酵提取物可调节环磷酸胺诱导的免疫反应^[18],本研究比较了无花果发酵提取物和非发酵提取物对环磷酸胺诱导的免疫损伤小鼠的免疫反应和肠道微生物菌群的调节作用。

胸腺和脾脏作为人体重要的免疫器官,在免疫调节中发挥着重要作用^[8-9,18],一般用胸腺和脾脏指数来反映免疫指数^[20]。据报道香豆酸可以改善免疫功能^[12,15],使用含有香豆酸的无花果发酵提取物和非发酵提取物可使胸腺和脾脏指数恢复到

接近 NC 组的水平,FF 组比 NF 组的结果更接近 NC 组的水平,其主要原因是无花果发酵提取物中酚酸和黄酮的增加,且黑曲霉的次生代谢产物环肽在调节免疫反应方面非常有效^[12,18,21]。

细胞因子可以直接参与多种免疫功能的调节,在免疫应答中发挥重要作用^[8-9]。FF 组和 NF 组的 IL-4 和 IFN- γ 水平几乎与 NC 组的相同,这可能归因于香豆酸,因为它已被证明可以调节 Th1/Th2 平衡,抑制抗原特异性 IgE 抗体的形成^[22-23]。FF 组中 IL-4、IL-6、TNF- α 和 IFN- γ 的水平与 NC 组相比无明显差异,而 NF 组中存在一定差异,这可能是由具有免疫调节特性的环肽引起的^[24]。

组织病理学观察结果表明,空肠、胸腺、脾脏和肝脏在无花果发酵提取物和非发酵提取物处理后,可以从环磷酰胺诱导的损伤中恢复,说明无花果发酵提取物和非发酵提取物调节了环磷酰胺处理小鼠的免疫反应。Ding 等^[9]发现多酚可减轻免疫器官的损伤,在组织病理学观察中,无花果发酵提取物的改善作用优于无花果非发酵提取物,这是因为无花果发酵提取物中多酚和次生代谢产物明显增加。

免疫反应与肠道微生物菌群的组成有关^[11,25],环磷酰胺改变的肠道微生物菌群组成可被果实提取物调节^[8-9,12,20]。拟杆菌门是胃肠道微生物菌群中最大的革兰氏阴性菌门,是健康肠道保证内稳态的基石^[26-27],包括拟杆菌属、另枝菌属、副拟杆菌和普雷沃氏菌^[28],本研究表明,FF 组和 NF 组中拟杆菌属的相对丰度明显高于 MC 组,与 NC 组基本相似。虽然在其它研究中,环磷酰胺处理后微生物菌群中硬壁菌门的比例增加^[29],但本研究得到了相反的结果,其主要原因是宿主肠道的炎症抑制了硬壁菌门和拟杆菌属的生长。在健康成人中,变形杆菌门占肠道微生物菌群的比例不到 1%,而它们是肠道和肠外疾病的主要原因^[30]。因此,在 FF 组和 NF 组中,变形杆菌门的相对丰度显著降低。然而,在这两种处理中,肠道微生物菌群的变化是不同的,与 NF 组相比,FF 组中的乳杆菌属、Unclassified_S24-7 和螺杆菌属的相对丰度显著增加,表明环肽、较高浓度的香豆酸对这些细菌有影响。

综上所述,与未发酵的无花果提取物相比,黑曲霉发酵的无花果提取物更能有效增加环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠的体质量、免疫器官指数、部分血常规参数和细胞因子的产生,还能改善环磷酰胺对小鼠造成的组织学损伤,同时对肠道微生物菌群的调节效果更明显。本研究结果可为无花果发酵提取物的开发利用及其对免疫损伤小鼠潜在的修复机制提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] ABE T. Fig (*Ficus carica* L.) leaf tea suppresses allergy by acceleration disassembly of IgE-receptor complexes[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2020, 84(5): 1013-1022.
- [2] ABE T, KOYAMA Y, NISHIMURA K, et al. Efficacy and safety of fig (*Ficus carica* L.) leaf tea in adults with mild atopic dermatitis: A double-blind, randomized, placebo-controlled preliminary trial[J]. *Nutrients*, 2022, 14(21): 4470.
- [3] HAJAM T A, H S. Phytochemistry, biological activities, industrial and traditional uses of fig (*Ficus carica*): A review[J]. *Chem Biol Interact*, 2022, 368: 110237.
- [4] RASOOL I, AZIZ A, KHALID W, et al. Industrial application and health prospective of fig (*Ficus carica*) by-products[J]. *Molecules*, 2023, 28(3): 960.
- [5] YANG X M, YU W, OU Z P, et al. Antioxidant and immunity activity of water extract and crude polysaccharide from *Ficus carica* L. fruit[J]. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 2009, 64(2): 167-173.
- [6] SUN Y J, LIU Y, AI C Q, et al. Caulerpa lentilifera polysaccharides enhance the immunostimulatory activity in immunosuppressed mice in correlation with modulating gut microbiota[J]. *Food Funct*, 2019, 10(7): 4315-4329.
- [7] CHISTIYAKOV D A, BOBRYSHV Y V, KOZAROV E, et al. Role of gut microbiota in the modulation of atherosclerosis-associated immune response[J]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 671.
- [8] TANG C, SUN J, ZHOU B, et al. Effects of polysaccharides from purple sweet potatoes on immune response and gut microbiota composition in normal and cyclophosphamide treated mice[J]. *Food Funct*, 2018, 9(2): 937-950.
- [9] DING Y, YAN Y M, CHEN D, et al. Modulating effects of polysaccharides from the fruits of *Lycium barbarum* on the immune response and gut microbiota in cyclophosphamide-treated mice[J]. *Food Funct*, 2019, 10(6): 3671-3683.
- [10] JIA L L, ZHANG M, LIU H, et al. Early-life fingolimod treatment improves intestinal homeostasis and pancreatic immune tolerance in non-obese diabetic mice[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2021, 42(10): 1620-1629.
- [11] ROOKS M G, GARRETT W S. Gut microbiota, metabolites and host immunity[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2016, 16(6): 341-352.

- [12] DING S J, JIANG H M, FANG J. Regulation of immune function by polyphenols[J]. *Journal of Immunology Research*, 2018, 2018: 1264074.
- [13] Du J, LI J J, ZHU J H, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Ficus carica*[J]. *Food & Function*, 2018, 9(7): 3930–3943.
- [14] GRIGAS J, RUZAUSKAS M, PAUTIENIUS A, et al. Investigation of immunomodulatory and gut microbiota-altering properties of multicomponent nutraceutical prepared from lactic acid bacteria, bovine colostrum, apple production by-products and essential oils[J]. *Foods*, 2021, 10(6): 1313.
- [15] SCHEPETKIN I A, RAMSTEAD A G, KIRPOTINA L N, et al. Therapeutic potential of polyphenols from *epilobium angustifolium* (fireweed)[J]. *Phytotherapy Research: PTR*, 2016, 30(8): 1287–1297.
- [16] TANGYU M, MULLER J, BOLTEN C J, et al. Fermentation of plant-based milk alternatives for improved flavour and nutritional value[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(23/24): 9263–9275.
- [17] TANGYU M, FRITZ M, ARAGAO-BORNER R, et al. Genome-based selection and application of food-grade microbes for chickpea milk fermentation towards increased *L*-lysine content, elimination of indigestible sugars, and improved flavour[J]. *Microb Cell Fact*, 2021, 20(1): 109.
- [18] ZHAO J Y, GONG L M, WU L L, et al. Immunomodulatory effects of fermented fig (*Ficus carica* L.) fruit extracts on cyclophosphamide-treated mice[J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 75: 104219.
- [19] HUSSAIN A, BOSE S, WANG J H, et al. Fermentation, a feasible strategy for enhancing bioactivity of herbal medicines[J]. *Food Research International*, 2016, 81: 1–16.
- [20] SUN H, NI X Q, SONG X, et al. Fermented Yupingfeng polysaccharides enhance immunity by improving the foregut microflora and intestinal barrier in weaning rex rabbits[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(18): 8105–8120.
- [21] MA Y M, LIANG X A, ZHANG H C, et al. Cytotoxic and antibiotic cyclic pentapeptide from an endophytic *Aspergillus tamarii* of *Ficus carica* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(19): 3789–3793.
- [22] MOON P D, HAN N R, LEE J S, et al. P-coumaric acid, an active ingredient of *Panax ginseng*, ameliorates atopic dermatitis-like skin lesions through inhibition of thymic stromal lymphopoietin in mice[J]. *J Ginseng Res*, 2021, 45(1): 176–182.
- [23] LIN L J, HUANG H Y. DFSG, a novel herbal cocktail with anti-asthma activity, suppressed MUC5AC in A549 cells and alleviated allergic airway hypersensitivity and inflammatory cell infiltration in a chronic asthma mouse model[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121: 109584.
- [24] SELSTED M E, OUELLETTE A J. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response[J]. *Nature Immunology*, 2005, 6(6): 551–557.
- [25] PICKARD J M, ZENG M Y, CARUSO R, et al. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease[J]. *Immunological Reviews*, 2017, 279(1): 70–89.
- [26] JIAO L, KOURKOUMPETIS T, HUTCHINSON D, et al. Spatial characteristics of colonic mucosa-associated gut microbiota in humans[J]. *Microb Ecol*, 2022, 83(3): 811–821.
- [27] ZHAO Y, LI K, LUO H Q, et al. Comparison of the intestinal microbial community in ducks reared differently through high-throughput sequencing [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 9015054.
- [28] GIBIINO G, LOPETUSO L R, SCALDAFERRI F, et al. Exploring bacteroidetes: Metabolic key points and immunological tricks of our gut commensals[J]. *Digestive and Liver Disease*, 2018, 50(7): 635–639.
- [29] XU X F, ZHANG X W. Effects of cyclophosphamide on immune system and gut microbiota in mice[J]. *Microbiological Research*, 2015, 171: 97–106.
- [30] CERF-BENSUSSAN N, GABORIAU-ROUTHIAU V. The immune system and the gut microbiota: Friends or foes?[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2010, 10(10): 735–744.

Immunoregulation of *Ficus carica* Linn. Fermentation Extract on Immunosuppressed Mice

Wang Qiaoxin¹, Xie Yuxuan¹, Si Chaojin¹, Tao Ruixiao², Zhao Jiayuan¹, Liao Ying^{1*}

¹College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610101

²Sichuan Technology and Business College, Dujiangyan 611830, Sichuan)

Abstract Objective: To investigate the effects of *Ficus carica* Linn. fermentation extract on immunomodulation and intestinal microflora in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. Methods: Immunosuppressed mice models were constructed by intraperitoneal injection of cyclophosphamide, and the mice were randomly divided into blank control group (NC group), model control group (MC group), *Ficus carica* Linn. fermented extract group (FF group) and *Ficus carica* Linn. non-fermented extract group (NF group). The body weight of mice was recorded every 2 days during the gavage period. After 9 days of continuous gavage, the immune organ index, serum cytokines and blood routine were detected, the histopathological observation and intestinal microbial flora analysis were performed. Results: Compared with MC group, the body weight and immune organ indexes of thymus, spleen and liver in FF group and NF group were significantly increased ($P<0.05$), the total number of leukocytes, monocytes and granulocytes were significantly increased ($P<0.05$), and cytokines such as IL-4, IL-6, TNF- α and IFN- γ were significantly increased ($P<0.05$). The results of histopathological observation showed that the damage caused by cyclophosphamide to mice jejunum, thymus, spleen and liver in FF group and NF group was significantly reduced, and the effect was more pronounced in FF group than NF group. The analysis of intestinal microflora showed that the levels of *Blautia*, *Lachnospiraceae*, *Paraprevotella*, *Clostridiales*, *Lactobacillus*, and *Bacteroides* were closely related to immune traits, and compared with MC group, the abundance of *Lactobacillus*, *Helicobacter*, and Unclassified_S24-7 in FF group increased more significantly than that in NF group. Conclusion: Compared with the non-fermented *Ficus carica* Linn. extract, the *Ficus carica* Linn. extract fermented by *Aspergillus niger* can improve the immune function of immunosuppressed mice induced by cyclophosphamide and improve the intestinal microflora.

Keywords fermentation; *Ficus carica* Linn.; mice; immunomodulation; intestinal microflora