DOI:10.12441/spyswjs.20240521002 [文章编号] 1673-1689(2025)11-0090-10

刺五加-树舌灵芝醇提物的免疫调节作用及指标成分分析

王丽红 生凯睿 卢 铭 苏 瑾 平 洋 张 宇 赵 稷 宫益霞

(佳木斯大学药学院,黑龙江 佳木斯 154007)

摘要:【目的】分析刺五加(APS)与树舌灵芝(GA)以质量比5∶1(m_{APS}∶m_{GA}=5∶1)配伍前后醇提物的成分变化,探究其免疫调节作用及指标成分。**【方法】**采用环磷酰胺(CTX)诱导小鼠建立免疫低下模型、2,4-二硝基氯苯(DNCB)诱导小鼠建立迟发型超敏反应模型(DTH),探究其配伍醇提物对免疫系统的影响;采用超高效液相色谱-质谱联用技术(UHPLC-MS)分析配伍前后有效成分变化;采用差热分析判断配伍后是否有新物质生成;采用单一溶剂萃取法对化学成分进行定性分析。**【结果】**刺五加-树舌灵芝(质量比5∶1)醇提物具有较强的免疫调节作用;超高效液相色谱-质谱联用技术检测发现配伍后醇提物中的有效成分质量分数与2种药物的质量成正比;差热分析结果显示配伍后产生了不同于刺五加和树舌灵芝的新化合物,主要为鞣质、含氧杂环蒽醌类、多糖类、挥发油或油脂类化合物。**【结论】**刺五加-树舌灵芝(质量比5∶1)醇提物具有较强的免疫调节作用,这可能与配伍产生的新化合物共同作用有关,可作为刺五加-树舌灵芝的质量评价指标成分。

关键词:刺五加;树舌灵芝;配伍;免疫调节;成分分析

Immunomodulatory Effects and Marker Components of Alcohol Extract from *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms-*Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat.

WANG Lihong SHENG Kairui LU Ming SU Jin PING Yang
ZHANG Yu ZHAO Ji GONG Yixia

(School of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

Abstract: [**Objective**] The aim of this study was to analyze the compositional changes of the alcohol extracts of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms (APS)-*Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (GA) before and after compounding at a mass ratio of 5∶1 (m_{APS}∶m_{GA}=5∶1) and to investigate the immunomodulatory effects and marker components of the extracts. [**Method**] The mouse models of compromised immunity and delayed-type hypersensitivity (DTH) were established with cytoxan (CTX) and 2, 4-dinitrochlorobenzene (DNCB), respectively, to investigate the effects of the alcohol extracts on the immune system. Ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UHPLC-MS) was used to analyze the changes of the active ingredients before and after compounding. Differential thermal analysis was performed to determine whether new substances were generated after compounding. Single solvent extraction was employed to qualitatively analyze the chemical components. [**Result**] The alcohol extract of *A. senticosus*-*G. applanatum* compounding at a mass ratio of 5∶1 possessed strong immunomodulatory effects. UHPLC-MS showed that the mass fractions of the active ingredients in the alcohol extract were directly proportional to the mass of the two drugs. The differential thermal analysis

基金项目:黑龙江省自然基金项目(PL2024H023);佳木斯大学科技创新团队校级创新团队(cxtd202103);省一流特色学科北药与功能食品特色学科(HLJTSXK-2022-03)。

通信作者:王丽红(1968—),女,博士,教授,生药(中药)鉴定及品质评价和植物的开发利用。E-mail:wlh_6663@163.com

收稿日期:2024-05-21 **修回日期:**2025-07-25

showed that new compounds different from those in *A. senticosus* and *G. applanatum* were generated after the compounding of the two drugs, mainly including tannins, oxygen-containing heterocyclic anthraquinones, polysaccharides, volatile oils, and lipids. [**Conclusion**] The strong immunomodulatory effects of the alcohol extract of *A. senticosus*-*G. applanatum* compounding at a mass ratio of 5∶1 are presumably related to the co-action of new compounds produced by the compounding, and these compounds could be used as maker components for the quality evaluation of *A. senticosus*-*G. applanatum*.

Keywords: *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms; *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat.; compounding; immunomodulation; compositional analysis

免疫系统被破坏会对人们的生活质量、情绪、认知功能和健康产生极大的负面影响[1]。免疫力低下会造成机体伤害；免疫能力过于亢奋，炎症因子数量过多，又易引发炎症的级联反应，因此，维护免疫系统平衡非常重要[2-4]。免疫药物在长期服用下会出现精神和药物性依赖等副作用[5]，寻找安全有效的免疫调节类药物具有重大意义。

刺五加属于五加科（Araliaceae），主要分布于中国东北三省及河北、山西等地。2002年，中国卫生部将刺五加列入《可用于保健食品的物品名单》。刺五加中富含紫丁香苷、刺五加苷E、异嗪皮啶、咖啡酸和绿原酸等活性成分[6-9]，具有抗抑郁、抗疲劳、益气健脾、补肾安神以及免疫力调节等功效，因此常被添加至保健食品中[10]。

树舌灵芝属于灵芝菌科（Ganodermataceae）多年生真菌，是一种可食用的大型高等真菌[11]。《中华本草》《东北药用植物》《中国灵芝新编》中记载，树舌灵芝性平、微苦，食之具有抗癌、化痰、消炎解毒等功效[12-14]。树舌灵芝中包含多糖、甾类、三萜类及脂类化合物等活性成分，具有与灵芝类似的功效，如清热、保肝、治疗心脑血管疾病及风湿性肺结核等生理活性[15-16]。黑龙江省东部山区有大量野生的树舌灵芝，当地居民一直以树舌灵芝泡酒，且长期饮用具有治疗神经衰弱、调节免疫的效果，《中国药用真菌》中也有关于树舌灵芝治疗神经衰弱的验方[11]。然而，目前关于树舌灵芝免疫力调节方面的研究尚未见报道。

目前，中药配伍已成为一项热点研究，即各种药物相配为伍、协力取效的用药方式[17-18]。中药配伍的物质基础是药材之间的有效成分相互作用，从而达到改变药效等效果[19]。李晶等[20]将刺五加联合枸杞子进行配伍，探究其对糖尿病模型小鼠的降血糖作用，发现刺五加和枸杞子配伍后具有更好的治疗糖尿病功效；张翠[21]将黄芪和刺五加配伍组方用于研究鸡免疫功能的增强试验，发现内服高剂量的黄芪和刺五加配伍组方能够增强鸡群的免疫功能。作者所在课题组[22]前期研究了不同比例的刺五加和树舌灵芝配伍后的体外抗氧化活性，发现刺五加（APS）与树舌灵芝（GA）以质量比5∶1配伍的提取物具有较强的抗氧化作用，而免疫反应与氧化应激密切相关，免疫系统可通过氧化反应消除病原，而过度的氧化应激会导致免疫损伤。当m_{APS}∶m_{GA}为5∶1时，刺五加和树舌灵芝配伍醇提物对小鼠的镇静催眠效果最好[23]。本研究拟采用中药配伍方法，探究药食同源的刺五加和树舌灵芝配伍后对小鼠的免疫调节作用，检测配伍前后有效成分质量分数变化并鉴定其化学成分，以推测出其免疫调节药理活性的指标成分，旨在为进一步开发并获得疗效良好的免疫调节作用类中药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

刺五加采自黑龙江省佳木斯市桦南县，树舌灵芝采自佳木斯市汤原县大亮子河林场，经作者鉴定为五加科五加属植物刺五加以及灵芝菌科灵芝属真菌树舌灵芝；雄性昆明小鼠：108只，质量18~22 g，合格证书SCXK（黑）-2013-001，哈尔滨医科大学实验动物学部；刺五加苷E、紫丁香苷、异嗪皮啶：成都普斯生物科技有限公司；齐墩果酸：上海源叶生物科技有限公司；环磷酰胺（CTX）：盛迪医药有限公司；印度墨汁：北京化工厂；98 g/dL 2,4-二硝基氯苯（DNCB）：成都贝斯特试剂有限公司；地塞米松磷酸钠注射液：郑州卓峰制药有限公司；白细胞介素2（IL-2）、白细胞介素4（IL-4）、免疫球蛋（IgG）酶联免疫检测试剂盒：上海酶联生物

科技有限公司。

1.2 仪器与设备

高效液相、Q-Ecactive Seres静电场轨道阱高分辨质谱：DionexUltimate3000 型，美国 Thermo Fisher公司；酶标仪：Multiskan FC 型，赛默飞世尔仪器有限公司；光学显微镜：XSP-13C-LP 型，上海精密仪器仪表有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 刺五加-树舌灵芝对CTX诱导免疫低下小鼠的免疫调节作用分析

1）醇提物的制备：按 m_{APS}∶m_{GA}=5∶1 配比精确称取刺五加-树舌灵芝共 11.25 g，使用体积分数 75% 乙醇溶液为提取溶剂，料液比为 1∶20（g/mL），采用冷凝回流提取法，提取时间 1.5 h，旋转蒸发乙醇后，用 NaCl 溶液定容至 25 mL，制成质量浓度为 0.45 g/mL 混悬液，待用。

2）免疫低下小鼠分组及模型建立：将昆明小鼠随机分为空白组、模型组、APS-GA（质量比 5∶1）组、APS 组和 GA 组，每组 12 只。适应性喂养 7 d，除空白组外，其余各组按 80 mg/（kg·d）腹腔注射 CTX，连续注射 3 d，诱导小鼠，建立免疫功能低下小鼠模型。

3）对 CTX 诱导免疫低下小鼠免疫器官脏器指数的影响：模型组和空白组灌胃 0.9 g/dL 生理盐水，给药组小鼠按 4.505 g/（kg·d）灌胃 APS-GA（质量比 5∶1），连续 10 d，末次给药 1 h 后，处死小鼠。取小鼠胸腺、脾脏和肝脏，称质量，按式（1）计算脏器指数。

$$c=\frac{m_1}{m_2} \tag{1}$$

式中：

c——脏器指数；

m_1——脏器质量，mg；

m_2——小鼠体质量，g。

4）对 CTX 诱导免疫低下小鼠碳廓清除能力的影响：将 5 组小鼠连续灌胃 10 d，末次给药 1 h 后，除空白组外，小鼠尾静脉注射体积比为 1∶4 的印度墨汁生理盐水溶液，每只 0.5 mL，分别于注射后 5、10 min 眼眶取血 20 μL，加入 2 mL 0.1 g/dL Na_2CO_3 溶液，用紫外分光光度计测定 590 nm 处吸光度，分别按式（2）、式（3）计算碳廓清除能力 K 和吞噬指数 α。

$$K=\frac{\lg A_1-\lg A_2}{T_{10}-T_5} \tag{2}$$

$$\alpha=\frac{m_1}{m_2+m_3}\sqrt[3]{K} \tag{3}$$

式中：

K——碳廓清除指数；

A_1、A_2——注射后 5、10 min 时吸光度；

T——时间，min；

α——吞噬指数；

m_1——小鼠体质量，g；

m_2——肝脏质量，g；

m_3——脾脏质量，g。

1.3.2 刺五加-树舌灵芝对DNCB诱导小鼠DTH的影响

1）小鼠 DTH 试验分组及模型建立：小鼠随机分为空白组、模型组、对照组（地塞米松）、APS-GA（质量比 5∶1）组、APS 组和 GA 组，每组 8 只。空白组和模型组每天给生理盐水，对照组分别在第 1、3、5、7、9、11 天给药质量分数 10% 地塞米松磷酸钠注射液 10 mg/（kg·d），给药组每只剂量为 0.090 1 mg[24]。小鼠适应饲养 7 d 后，在给药前一天（d_0）将小鼠背部剃毛，取 5 g/dL DNCB 丙酮-橄榄油溶液（体积比 1∶1）50 μL 致敏[25]，第 2 天强化一次，空白组只攻击不致敏（最后一天涂抹丙酮橄榄油溶液），其余各组均致敏。于致敏当天开始，小鼠按各组给药方式开始连续灌胃 11 d，末次给药 1 h 后，吸取体积分数 5% DNCB 涂抹于小鼠右耳，左耳涂抹丙酮橄榄油，24 h 后观察小鼠变化。最后一天小鼠称质量后，取眼球血；剪下每组小鼠的左右耳廓，在相同位置用打孔器取耳片并称质量，多聚甲醛固定，石蜡切片；按式（4）计算小鼠迟发型超敏反应模型小鼠耳肿胀度。

$$e=\frac{m_1}{m_2} \tag{4}$$

式中：

e——耳肿胀度；

m_1——左耳质量，mg；

m_2——右耳质量，mg。

2）小鼠血清中 IL-2、IL-4、IgG 细胞因子水平测定：末次给药后，收集血液样品，4 000 r/min 离心 10 min，取上清液，获得血清，采用 ELISA 法检测各组小鼠血清中 IL-2、IL-4、IgG 水平。

1.3.3 UHPLC-MS分析有效成分

1）供试品溶液制备：按m_{APS}∶m_{GA}=5∶1配比精密称取5.00 g，提取后将样品浓缩至10 mL，加入10 mL甲醇，用热浸法超声10 min，超声功率50 W、频率40 kHz，用甲醇定容至25 mL，各吸取1.0 mL溶液，1 000 r/min离心5 min，取上清液，用0.22 μm微孔滤膜过滤后待测。

取APS-GA（质量比5∶1）样品、APS样品及GA样品共3份，制作有效成分标准曲线，并测定其有效成分刺五加苷E、紫丁香苷、异嗪皮啶、齐墩果酸的质量分数。

2）色谱条件：高效液相系统配有电喷雾离子源（ESI）及Analyst 14数据处理系统；色谱柱为kromasil 100-5-C18柱（250 mm×4.6 mm×5 μm）；柱温为室温；进样量5 μL；流量0.5 mL/min；流动相为乙腈-0.05 g/dL甲酸（体积比20∶80）。

3）质谱条件：质谱系统采集方式为双离子检测扫描（SIM）；离子极性为正、负离子模式，离子化方式为电喷雾离子化；毛细管电压3.0 kV；鞘气压力3×10^6 Pa；辅助气压1×10^6 Pa；离子传输管温度320 ℃；加热蒸发温度350 ℃；刺五加苷E：*m/z* 743.0~743.5 $[M+H]^+$、紫丁香苷：*m/z* 373.148~373.150 [M+H]、异嗪皮啶：*m/z* 222.7~223.3 [M+H]、齐墩果酸：*m/z* 455.10~455.11 [M+H]。

1.3.4 差热分析

分别将1.3.1下所得APS、GA以及APS-GA（质量比5∶1）配伍醇提物冻干研磨后放入铝坩埚中，以α-Al_2O_3作为参比物，以10 ℃/min速率将温度从0 ℃升到500 ℃。记录其差热分析（DTA）曲线，对样品进行热谱扫描，样品重复测定3次。

1.3.5 化学成分定性分析

1）醇提物制备：精密称取烘干的APS、GA、APS-GA（质量比5∶1）各60.00 g。将3份样品用石油醚浸泡24 h，超声30 min。用石油醚反复提取3~4次，合并提取液，过滤杂质后使用旋转蒸发仪除去石油醚，分别得到3种样品的石油醚浸膏，残渣保留并挥干石油醚。挥干后将3份残渣用无水乙醇浸泡24 h，超声30 min，按上述方法制备各乙醇提取物浸膏。加水溶解后加入等体积氯仿、乙醚、乙酸乙酯、正丁醇依次萃取3~4次，合并滤液，根据溶剂极性不同，选择上层或下层溶液。将得到的萃取液分别进行旋蒸，得到氯仿、乙醚、乙酸乙酯、正丁醇的干燥浸膏，密封冷藏备用。

2）化学成分鉴定：采用碘蒸气法和硫酸显色法对有机化合物进行鉴定；采用三氯化铁反应鉴定鞣质类成分；选择碘化铋钾试剂沉淀反应和硅钨酸试剂沉淀反应对生物碱进行定性鉴定；采用三氯化铝试验和盐酸镁粉试验检查黄酮类化合物；采用醋酸镁试验对氧杂环及蒽醌进行定性鉴别；采用紫环（Molish）反应鉴别糖类；采用磷钼酸乙醇试验鉴别挥发油和油脂；采用泡沫试验对皂苷类进行定性鉴别；采用香草醛盐酸试验鉴定多酚类化合物。

1.3.6 统计分析

采用Duncan's multiple range test方法分析，显著性差异比较为任意2组间的比较，不同小写字母表示差异显著（P<0.05）；采用Origin软件制图。

2 结果与讨论

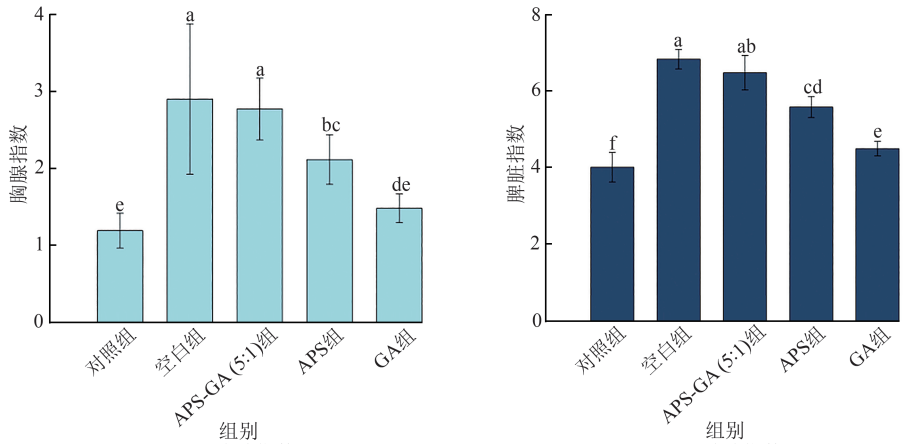
2.1 CTX诱导的免疫低下小鼠模型试验

2.1.1 APS-GA对CTX模型小鼠免疫器官的影响

由图1可知，与空白组相比，给药组和对照组的胸腺指数和脾脏指数具有极显著差异（P<0.01），胸腺和脾脏指数明显升高；与空白组相比，APS-GA（质量比5∶1）配伍组胸腺指数达到正常值，并高于对照组（P<0.05）；APS-GA（质量比5∶1）组脾脏指数最高，且各组间无显著性差异（P>0.05）。刺五加和树舌灵芝两者配伍后对小鼠免疫调节作用显著，说明APS-GA（质量比5∶1）配伍醇提物对小鼠的免疫器官具有改善作用。

2.1.2 APS-GA对CTX诱导的免疫低下小鼠碳廓清除能力的影响

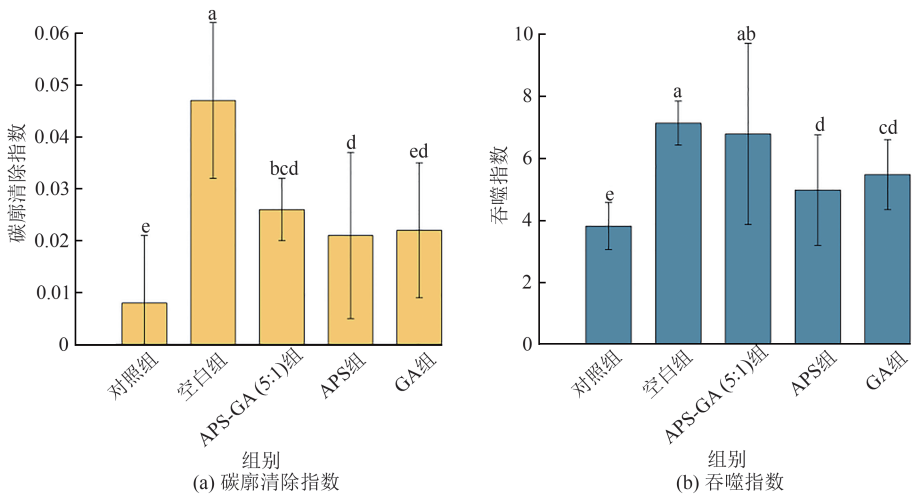
碳廓清除能力是指机体的巨噬细胞在机体的特异性免疫和非特异性免疫中发挥作用的能力，免疫试验结果可以用碳廓清除能力判定，碳廓清除能力与吞噬指数成正比[26]。由图2可知，与空白组相比，对照组的K值和α值均降低，说明造模成功（P<0.01）；与空白组相比，给药组和对照组的K值和α值具有极显著差异（P<0.01），两者均可提高小鼠碳廓清除能力及吞噬指数；APS-GA（质量比5∶1）组与对照组存在显著性差异（P<0.05），且APS-GA（质量比5∶1）组的K值和α值最高，表明其治疗效果最佳。



不同字母代表差异显著。

图 1　各给药组对免疫低下小鼠脏器指数的影响

Fig. 1　Effects of each administration group on organ indexes of immunocompromised mice



不同字母代表差异显著。

图 2　各给药组对小鼠碳廓清除能力和吞噬指数的影响

Fig. 2　Effects of each administration group on carbon clearance index and phagocytic index of mice

2.2　DNCB 诱导的 DTH 试验

2.2.1　APS-GA 对 DTH 小鼠耳肿胀度的影响

造模后第 3 天，小鼠背部开始出现肿胀、红斑、结痂等过敏反应。由图 3 可知，正常小鼠耳组织结构清晰，表皮厚度正常，而 DNCB 诱导的小鼠耳肿模型水肿明显，表皮增厚，有大量炎症细胞浸润，可见真皮乳头水肿，胶原纤维间隙增大。由图 4 可知，模型组和空白组存在极显著差异（$P<0.01$），说明 DNFB 引起的迟发型超敏反应模型造模成功，对照组的小鼠耳肿胀度与模型组相比差异显著（$P<0.05$）；与模型组相比，APS-GA（质量比 5∶1）组对小鼠耳肿的改善作用效果明显（$P<0.05$）。

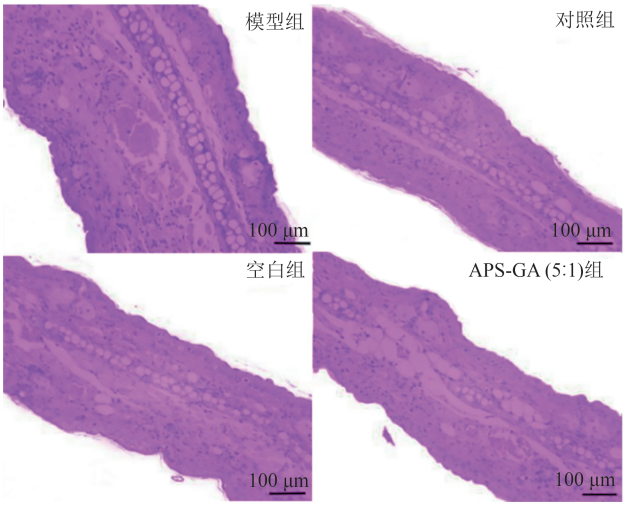
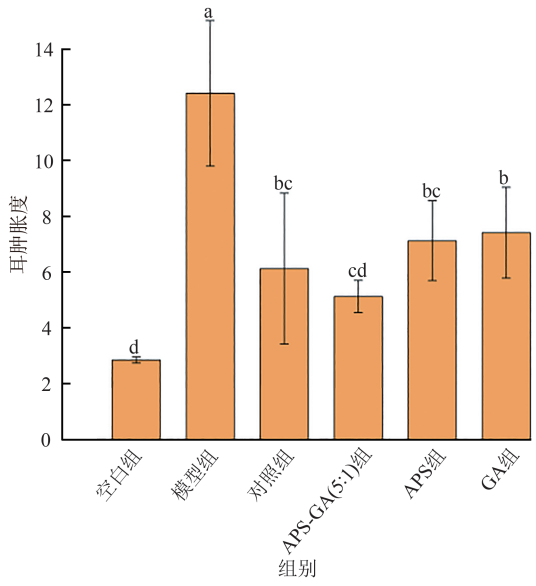


图 3　DTH 诱导的小鼠耳廓 HE 染色局部组织

Fig. 3　HE staining of the auricle tissue of DTH-induced mice



不同字母代表差异显著。

图4　各给药组对小鼠肿胀度的影响

Fig. 4　Effects of each administration group on the degree of ear swelling in mice

2.2.2　APS-GA对DTH小鼠血清细胞因子质量浓度的影响

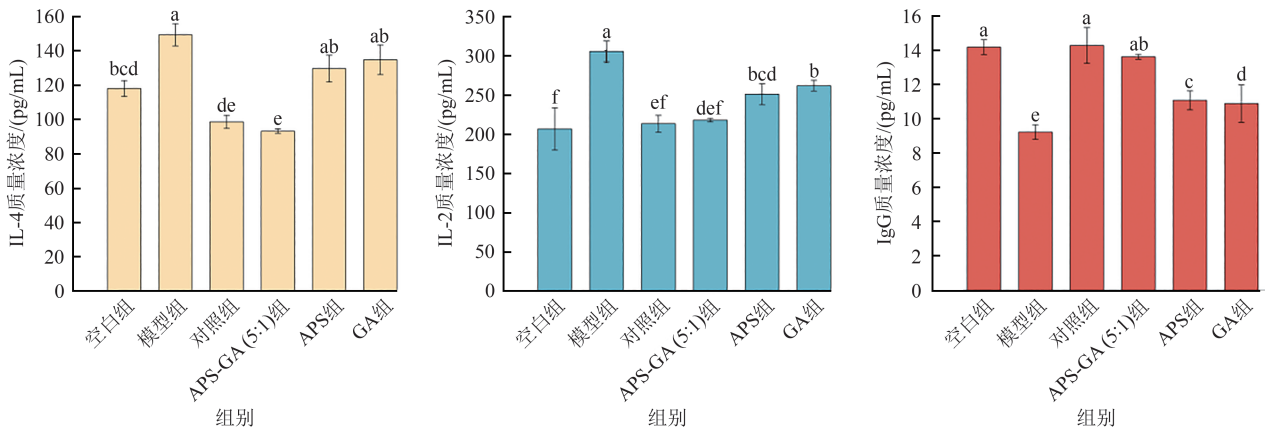
迟发型超敏反应又称IV型超敏反应，属于IV型细胞介导的迟发型介导反应，是由效应T细胞与特定抗原反应后引起的炎症反应[27]。IL-2和IL-4为T细胞活化的必要步骤，所以DTH需要特异性辅助T细胞的刺激，而IgG也是一种能引起特异性免疫反应的细胞因子，故将其作为考察指标[28-29]。

由图5可知，模型组与空白组相比具有显著性差异（$P<0.05$）；与模型组相比，对照组小鼠细胞因子IL-4、IL-2水平呈下降趋势（$P<0.01$），IgG水平呈上升趋势（$P<0.01$）。模型组和APS-GA（质量比5∶1）组具有显著性差异（$P<0.05$），其余各组间无显著性差异（$P>0.05$），均能降低IL-4水平和IL-2水平，提高小鼠IgG水平。综上，APS-GA（质量比5∶1）配伍能最大程度降低IL-4、IL-2水平，提高IgG水平，对小鼠具有特异性免疫增强作用。

2.3　UHPLC-MS分析有效成分结果

通过CTX诱导的小鼠免疫低下试验以及DNCB诱导的小鼠DTH试验，发现APS-GA（质量比5∶1）配伍醇提物具有较强的免疫调节作用。Yang等[30]研究表明，基于UPLC-MS检测的APS中主要活性成分包含紫丁香苷、刺五加苷E、异嗪皮啶等；其中紫丁香苷表现出抗疲劳和免疫调节活性等作用；刺五加苷E具有抗抑郁和抗疲劳作用；异嗪皮啶具有抗菌以及抗炎作用。根据《中国药典》的记载，APS浸膏中质量检测的有效成分为刺五加苷E、紫丁香苷、异嗪皮啶，树舌灵芝同属植物灵芝质量检测的有效成分为齐墩果酸[31]。

由图6和表1可知，刺五加苷E、紫丁香苷、异嗪皮啶的质量分数随着醇提物中APS所占比例的增加而增加，与配伍后APS的质量成正比；齐墩果酸的质量分数随着醇提物中树舌灵芝药物所占比例的增加而增加，与配伍后树舌灵芝的质量成正比。说明APS、GA配伍后各指标成分的种类和质量分数未发生改变。

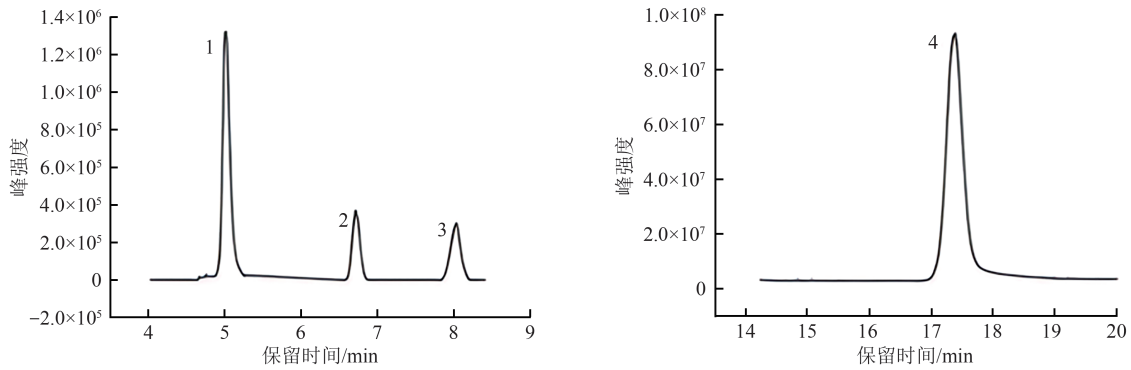


(a) IL-4质量浓度　(b) IL-2质量浓度　(c) IgG质量浓度

不同字母代表差异显著。

图5　各给药组对DTH小鼠血清中细胞因子的影响

Fig. 5　Effects of each administration group on serum cytokines in the mouse model of DTH



(a) 齐墩果酸、紫丁香苷、刺五加苷色谱图　(b) 异嗪皮啶色谱图

1—齐墩果酸；2—紫丁香苷；3—刺五加苷E；4—异嗪皮啶。

图 6　刺五加苷E、紫丁香苷、异嗪皮啶及齐墩果酸标准品色谱图

Fig. 6　Chromatograms of eleutheroside E, syringin, isofraxidin, and oleanolic acid standards

表 1　各样品中 4 种成分的质量分数

Table 1　Mass fractions of 4 components in each sample

单位：mg/g

组别	刺五加苷E质量分数	紫丁香苷质量分数	异嗪皮啶质量分数	齐墩果酸质量分数
APS-GA（5∶1）组	0.945	1.175	0.120	1.495
APS 组	1.180	1.440	0.120	1.105
GA 组	/	/	/	9.520

注：“/”表示未检测。

2.4　差热分析

由于免疫试验中 APS-GA（质量比 5∶1）醇提物对小鼠具有良好的调节作用，且相比于 APS、GA 单独给药组效果更好，具有显著性差异（$P<0.05$）。由图 7 可知，APS-GA（质量比 5∶1）配伍后的曲线与 APS、GA 曲线明显不同。刺五加在 60~80、125~150、175~200 ℃为放热，在 90~125、150~175、200~225 ℃为吸热；树舌灵芝在 75~100、100~125、175~200 ℃为放热，在 100~125、125~150、225~250 ℃为吸热；配伍醇提物在 100~125、150~175 ℃为放热，在 200~225 ℃为吸热。综上，配伍醇提物曲线在刺五加和树舌灵芝产生吸收峰之间，故推测配伍后产生了新的物质。

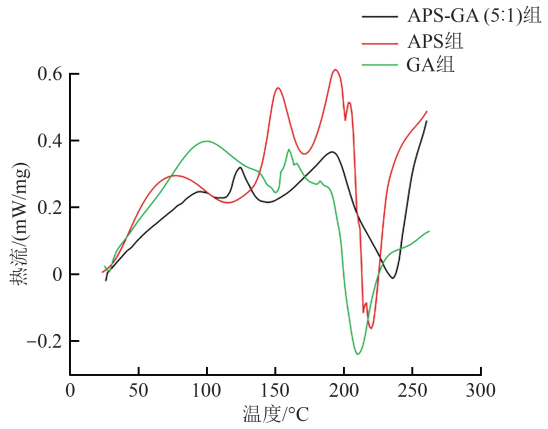


图 7　差热分析结果

Fig. 7　Differential thermal analysis results

2.5　化学成分分析

碘蒸气法、碘化铋钾和硅钨酸沉淀反应、盐酸镁粉和三氯化铝试验、泡沫试验以及香草醛试验结果说明，APS-GA（质量比 5∶1）醇提物中的有机化合物、生物碱类物质、黄酮类化合物、皂苷类成分及酚类化合物均未发生变化；氯仿-浓硫酸试验结果说明，APS-GA（质量比 5∶1）配伍后其甾体或三萜类成分种类发生了变化，且含量减少。三氯化铁试验结果推测，当 m_{APS}∶m_{GA} 为 5∶1 时，APS-GA 中所含的缩合鞣质类成分变成了可水解鞣质类成分；醋酸镁试验结果推测 APS-GA（质量比 5∶1）配伍中含氧杂环或蒽醌类成分的种类和含量发生了改变；Molish 反应结果发现 APS-GA（质量比 5∶1）配伍组产生了不同于刺五加和树舌灵芝的游离或结合糖类物质；磷钼酸甲醇试验推测 APS-GA（质量比 5∶1）配伍组产生了不同于树舌灵芝的挥发油或油脂类成分。

化学成分定性分析发现，APS-GA（质量比 5∶1）配伍醇提物中产生了不同于刺五加和树舌灵芝的新化合物类型为鞣质、含氧杂环及蒽醌类、多糖类及挥发油或油脂类化合物。Li 等[32]研究表明，很多鞣质（如丹宁酸）具有优良的抗氧化和抗炎性，可作为免疫增强添加剂；Kabata 等[33]研究发现，在鸡饲料中添加来自不同植物的丹宁能更好地促进

肉鸡生长，提高其机体免疫力及抗氧化能力。蒽醌类化合物可以通过各种信号通路调节免疫反应来减轻病理损伤[34]；Khanal等[35]研究发现，蒽醌衍生物具有增强免疫和抗病毒感染等生物活性，可作为COVID-19感染中的免疫增强分子，参与调节与免疫调节和（非）传染性疾病相关的多种途径。大多数多糖可以通过激活非特异性或特异性免疫反应来调节宿主免疫系统，在免疫调节方面具有巨大的潜力[36]；Yang等[37]研究发现，刺五加多糖能够抵抗免疫抑制剂诱导的免疫抑制，改善正常鸡和免疫缺陷鸡的疫苗接种效果，可作为一种新型的免疫抑制剂。挥发油具有双向免疫调节作用，可增加*IL-2*、*IL-4*等基因表达水平进而增强免疫活性[38]。Su等[39]研究发现，油脂类化合物具有作为提取抗生素生长促进剂的特性，将其添加至饲料中能够提升对肉鸡的机体免疫力。

综上，鞣质、蒽醌、多糖及挥发油类化合物均具有较强的免疫调节作用，由此推测APS-GA（质量比5∶1）配伍醇提物中生成的鞣质、蒽醌、多糖及挥发油类化合物共同作用发挥了免疫调节作用，可作为APS-GA质量评价的指标成分。

2.6　免疫调节作用分析

由表2可知，与对照组相比，APS-GA（质量比5∶1）配伍时，CTX治疗组的胸腺指数和脾脏指数、碳廓清除能力和吞噬指数最优，表明其非特异性免疫作用最强。根据细胞炎症因子水平可知，与模型组相比，APS-GA（质量比5∶1）配伍醇提物具有较强的提高小鼠特异性免疫的作用（$P<0.05$）。

表2　免疫试验结果

Table 2　Results of immune experiments

分组	胸腺指数	脾脏指数	碳廓清除能力	吞噬指数	耳肿胀度	IL-4质量浓度/（pg/mL）	IL-2质量浓度/（pg/mL）	IgG质量浓度/（pg/mL）	刺五加苷E质量分数/（mg/g）	紫丁香苷质量分数/（mg/g）	异嗪皮啶质量分数/（mg/g）	齐墩果酸质量分数/（mg/g）
APS-GA（5∶1）组	2.77^{a}	6.49^{a}	0.042^{a}	6.79^{a}	5.14^{c}	93.22^{b}	218.26^{c}	13.60^{a}	0.945	1.175	0.120	1.495
APS组	2.12^{b}	5.59^{b}	0.021^{c}	4.98^{c}	7.14^{b}	129.72^{a}	251.30^{b}	11.07^{b}	1.180	1.440	0.120	1.105
GA组	1.48^{c}	4.50^{c}	0.022^{b}	5.48^{b}	7.43^{a}	134.87^{a}	262.23^{a}	10.88^{b}	/	/	/	9.520

注：“/”表示未检测；同列不同小写字母代表差异显著（$P<0.05$）。

综上，与单独使用APS或GA相比，无论从非特异性免疫还是特异性免疫的试验结果分析，APS-GA（质量比5∶1）配伍醇提物具有最佳的调节作用，此时4种有效成分的质量分数均不是最高值，而差热分析及化学分析试验发现APS-GA（质量比5∶1）醇提物中产生了新的化合物类型。结合化学成分定性结果分析，经配伍后生成了鞣质、蒽醌、多糖及挥发油类化合物，以上化合物均具有免疫调节作用，故推测APS-GA（质量比5∶1）配伍后，以上化合物发挥了免疫调节功能，可作为APS-GA质量评价的指标成分。

3　结论

将刺五加和树舌灵芝配伍后的醇提物经给药治疗免疫缺陷小鼠后，其免疫器官、碳廓清除能力、吞噬能力、小鼠耳肿及血清中各细胞因子水平变化情况均有明显改善。表明刺五加-树舌灵芝（质量比5∶1）配伍醇提物对小鼠非特异性免疫作用和特异性免疫具有增强作用，且与刺五加、树舌灵芝单独作用相比具有显著性差异（$P<0.05$）。利用UHPLC-MS检测两者配伍提取后4种主要活性成分质量分数，配伍后的刺五加苷E、紫丁香苷、异嗪皮啶及齐墩果酸的质量分数相比刺五加和树舌灵芝组基本不变。通过差热分析发现，经配伍后产生了新物质，为鞣质、含氧杂环及蒽醌类、多糖类及挥发油或油脂类化合物。结合化学成分定性分析结果，推测配伍后新生成的化合物在调节免疫功效中发挥了作用，可作为刺五加-树舌灵芝质量评价的指标成分参考。

参考文献

[1] 彭颖．冠突散囊菌与茶多酚复合物对免疫抑制小鼠的保护作用[J]．食品与机械，2023，39（8）：160-165．
PENG Y．Protective effect of *Eurotium cristatum* fermentation broth mixed with tea polyphenols on immunosuppressive mice[J]．Food & Machinery，2023，39（8）：160-165．(in Chinese)

[2] 陈巍文，朱建津，黄建平，等．γ-谷维素和半胱胺对应激小鼠氧化还原状态及免疫功能的影响[J]．食品与生物

技术学报，2022，41(4)：1-11.
CHEN W W，ZHU J J，HUANG J P，et al. Effects of γ-oryzanol and cysteamine on redox status and immunity of stressed mice [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41(4)：1-11.(in Chinese)
[3] LI C G，LU Y，WANG J，et al. Immunoregulation of bovine lactoferrin together with osteopontin promotes immune system development and maturation[J]. Food & Function，2024，15(2)：866-880.
[4] SHANG L L，YAN Y G，LI Z，et al. Hydro-sensitive，*in situ* ultrafast physical self-gelatinizing，and red blood cells strengthened hemostatic adhesive powder with antibiosis and immunoregulation for wound repair[J]. Advanced Science，2024，11(4)：2306528.
[5] XU M Z，JI Y H. Immunoregulation of synovial macrophages for the treatment of osteoarthritis[J]. Open Life Sciences，2023，18(1)：20220567.
[6] 于纯淼，廖贤，于苗苗，等. 刺五加在中国保健食品中的应用[J]. 食品与机械，2023，39(8)：234-240.
YU C M，LIAO X，YU M M，et al. Application of *Acanthopanax senticosus* in functional food in China[J]. Food & Machinery，2023，39(8)：234-240.(in Chinese)
[7] HE Y，WANG Y M，ZHANG X，et al. Chemical characterization of small-molecule inhibitors of monoamine oxidase B synthesized from the *Acanthopanax senticosus* root with affinity ultrafiltration mass spectrometry[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry，2020，34(8)：e8694.
[8] HU H B，LI H M，HAN M H，et al. Chemical modification and antioxidant activity of the polysaccharide from *Acanthopanax leucorrhizus*[J]. Carbohydrate Research，2020，487：107890.
[9] LAU K M，YUE G G，CHAN Y Y，et al. A review on the immunomodulatory activity of *Acanthopanax senticosus* and its active components [J]. Chinese Medicine，2019，14：25.
[10] LI T，FERNS K，YAN Z Q，et al. *Acanthopanax senticosus*：photochemistry and anticancer potential[J]. The American Journal of Chinese Medicine，2016，44(8)：1543-1558.
[11] 徐锦堂. 中国药用真菌学[M]. 北京：北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社，1997：805.
[12] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草：1卷[M]. 上海：上海科学技术出版社，1999：533-534.
[13] 朱有昌. 东北药用植物[M]. 哈尔滨：黑龙江科学技术出版社，1989：1240.
[14] 赵继鼎. 中国灵芝新编[M]. 北京：科学出版社，1989：11-35.
[15] LIU X Y，LIU S L，WEI H W，et al. Preliminary species diversity and community phylogenetics of wood-inhabiting basidiomycetous fungi in the Dabie Mountains，Central China reveal unexpected richness[J]. IMA Fungus，2023，14(1)：23.
[16] 梁耕源. *FIP-gap*基因影响树舌灵芝菌丝体生长及转录组分析[D]. 沈阳：沈阳农业大学，2023.
[17] 魏婷，何先元，朱潇宏，等. 九制黄精及其配伍对CUMS抑郁模型小鼠物质能量代谢的影响[J]. 食品与机械，2022，38(7)：180-185，207.
WEI T，HE X Y，ZHU X H，et al. Comparative study of processed *Polygonatum cyrtonema* and its compatibility affecting on material and energy metabolism in CUMS depressed model mice [J]. Food & Machinery，2022，38(7)：180-185，207.(in Chinese)
[18] GAO Y，WU X X，ZHAO N，et al. Scientific connotation of the compatibility of traditional Chinese medicine from the perspective of the intestinal flora[J]. Frontiers in Pharmacology，2023，14：1152858.
[19] 王志昊，周文静，费程浩，等. 中药复方及组分配伍优化策略与实践[J]. 中国实验方剂学杂志，2025，31(1)：299-310.
WANG Z H，ZHOU W J，FEI C H，et al. Optimization strategy and practice of traditional Chinese medicine compound and its component compatibility[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae，2025，31(1)：299-310.(in Chinese)
[20] 李晶，魏健. 刺五加、枸杞子配伍对糖尿病模型小鼠降血糖作用的研究[J]. 食品研究与开发，2017，38(9)：179-182.
LI J，WEI J. Effect of compatibility of *Acanthopanaxs enticosus* and Chinese wolfberry fruit on reducing blood sugar in diabetic model mice[J]. Food Research and Development，2017，38(9)：179-182.(in Chinese)
[21] 张翠. 黄芪和刺五加配伍组方增强鸡免疫功能的实验研究[D]. 长春：吉林大学，2013.
[22] 郎佳佳. 基于免疫调节和氧化应激探究益经汤治疗卵巢储备功能减退的疗效机制[D]. 济南：山东中医药大学，2023.
[23] 卢铭，王凤芝，李琪，等. 不同配伍比例刺五加和树舌的镇静催眠作用[J]. 安徽农业科学，2019，47(3)：150-153.
LU M，WANG F Z，LI Q，et al. Sedative and hypnotic effects of different compatibility ratios of *Acanthopanax*

and tree tongue [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2019, 47(3): 150-153.(in Chinese)

[24] 杨青春，庞怡，陈绍红，等. 浒苔多糖EP2对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国海洋药物，2018，37(3)：41-47.
YANG Q C, PANG Y, CHEN S H, et al. Effects of EP2 fraction of *Enteromorpha* polysaccharidson immune function in mice[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2018, 37(3): 41-47.(in Chinese)

[25] 张娜，杨晓丹，刘树民. 刺五加多糖对2、4-二硝基氟苯（DNFB）诱发的超敏反应作用及初步机制研究[J]. 中医药信息，2015，32(3)：26-28.
ZHANG N, YANG X D, LIU S M. Effect of ASP on hypersensitivity induced by DNFB and its mechanism[J]. Information on Traditional Chinese Medicine, 2015, 32(3): 26-28.(in Chinese)

[26] 张弓，黄剑林，高鹏. 绿萝花总多糖对小鼠免疫功能的增强作用[J]. 中成药，2018，40(8)：1839-1841.

[27] ISHIDA M, SASAKI T, NISHI K, et al. Suppressive effect of ethanol extract from mango (*Mangifera indica* L.) peel on IgE production *in vitro* and *in vivo* [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2018, 82(4): 732-739.(in Chinese)

[28] LIU S, WANG K J, LIN S Z, et al. Comparison of the effects between tannins extracted from different natural plants on growth performance, antioxidant capacity, immunity, and intestinal flora of broiler chickens[J]. Antioxidants, 2023, 12(2): 441.

[29] XIN D D, LI H H, ZHOU S Y, et al. Effects of anthraquinones on immune responses and inflammatory diseases[J]. Molecules, 2022, 27(12): 3831.

[30] YANG F J, YANG L, WANG W J, et al. Enrichment and purification of syringin, eleutheroside E and isofraxidin from *Acanthopanax senticosus* by macroporous resin[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(7): 8970-8986.

[31] 国家药典委员会编委会. 中国药典2015版第一部[M]. 北京：化学工业出版社，2015：206.

[32] LI W F, XING W, WANG S C, et al. An online coupled peritoneal macrophage/cell membrane chromatography and high-performance liquid chromatography/mass spectrometry method to screen for anti-inflammatory components from the Chinese traditional medicine *Chloranthus multistachys* Pei[J]. Biomedical Chromatography, 2013, 27(11): 1580-1586.

[33] KABATA H, MORO K, KOYASU S. The group 2 innate lymphoid cell (ILC2) regulatory network and its underlying mechanisms. Immunological Reviews, 2018, 286(1): 37-52.

[34] SU X Q, LIU B, GONG F T, et al. Isofraxidin attenuates IL-1β-induced inflammatory response in human nucleus pulposus cells [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2019, 120(8): 13302-13309.

[35] KHANAL P, PATIL B M, CHAND J, et al. Anthraquinone derivatives as an immune booster and their therapeutic option against COVID-19 [J]. Natural Products and Bioprospecting, 2020, 10(5): 325-335.

[36] YING Y, HAO W. Immunomodulatory function and anti-tumor mechanism of natural polysaccharides: a review [J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1147641.

[37] YANG S B, SHAN C L, MA X, et al. Immunomodulatory effect of *Acanthopanax senticosus* polysaccharide on immunosuppressed chickens [J]. Poultry Science, 2021, 100(2): 623-630.

[38] 林碧霞. 金线莲挥发油成分的提取及体外免疫活性研究[D]. 福州：福建医科大学，2017.

[39] SU G Q, WANG L, ZHOU X W, et al. Effects of essential oil on growth performance, digestibility, immunity, and intestinal health in broilers[J]. Poultry Science, 2021, 100(8): 101242.