

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

靈芝對腸免疫系統功能之影響：第二部分細胞激素(2/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2320-B-041-005-

執行期間：91年08月01日至93年07月31日

執行單位：嘉南藥理科技大學保健營養系

計畫主持人：夏彩蘭

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中 華 民 國 93 年 10 月 28 日

中文摘要

本研究為探討靈芝菌絲體對非免疫和口服免疫小鼠皮耶氏班(Peyer's pateches, PP)和腸繫膜淋巴結(Mesenteric lymph nodes, MLN)細胞分泌細胞激素(IL-2, 4, 5, 6, 10 and interferon (IFN)- γ)之影響。實驗共分二部分。實驗一為5週齡雌性C57BL/6J小鼠飼以含0, 1和3%靈芝菌絲體之AIN-93G飼料4週後，以裂殖素刺激PP和MLN細胞。雖然靈芝菌絲體不影響以phytohemagglutinin (PHA)刺激PP細胞分泌細胞激素，但卻減少以lipopolysaccharide (LPS)和PHA刺激MLN細胞分泌IL-10和IFN- γ 。實驗二是小鼠飼以含0, 1, 3和5%靈芝菌絲體之AIN-93G飼料4週。飼養至第7和第21天時以管餵方式給予小鼠霍亂孤菌毒素(cholera toxin, CT)。以裂殖素和CT刺激MLN細胞，PP細胞只以CT刺激。靈芝菌絲體能減少MLN和PP細胞IFN- γ 的自然分泌。以CT刺激MLN和PP細胞，飼料含靈芝菌絲體的小鼠MLN細胞分泌IFN- γ 皆減少，但此現象只發生在高劑量的靈芝菌絲體組小鼠PP細胞。高劑量的靈芝菌絲體也減少MLN細胞IL-5的自然分泌和PHA刺激MLN分泌IL-5。實驗結果顯示，靈芝菌絲體能影響MLN和PP細胞分泌IFN- γ 。

關鍵詞：靈芝菌絲體，腸道免疫，皮耶氏班，腸繫膜淋巴結，細胞激素

Abstract

The present investigation was to study the effects of *Ganoderma (G) lucidum* mycelium on cytokines production by assessing the cytokine (IL-2, 4, 5, 6, 10 and interferon (IFN- γ)) secreted by PP and MLN cells in non-immunized and orally immunized mice. In experiment 1, 5-week-old female C57BL/6J mice fed AIN-93G diet containing 0 (C), 1 (G1) and 3% (G3) *G. lucidum* mycelium for 4 weeks. PP cells were treated with phytohemagglutinin (PHA) and MLN cells were treated with PHA and lipopolysaccharide (LPS). The cytokine production of PP was not affected by G

lucidum mycelium. Both the secretion of IL-10 and IFN- γ was decreased in LPS- and PHA-treated MLN cells of group G3 mice, respectively. In experiment 2, mice fed with AIN-93G diet containing 0 (C), 1 (GT1), 3(GT3) and 5% (GT5) *G. lucidum* mycelium were orally immunized with cholera toxin (CT). The spontaneous secretion of IFN- γ was significantly reduced in PP and MLN cells of group GT3 and GT5 mice as well as CT-treated PP and MLN cells. Taken together, *G. lucidum* mycelium was able to affect the secretion of IFN- γ in PP and MLN.

Keywords : *Ganoderma lucidum* , gut immunity , Peyer's patches , mesenteric lymph node , cytokines

目錄

中英文摘要 I

一、前言	1
二、研究目的	1
三、文獻探討	1
四、研究方法	2
1·材料	2
2·動物與飼料	2
3·CT 口服免疫	2
4·PP 和 MLN 細胞的製備和培養	2
5·血清 anti-cholera toxin IgA 定量	2
6·細胞激素的定量分析	2
7·統計方法	3
五、結果與討論	3
六、參考文獻	3
七、計畫成果自評	4
八、圖表	6



一、前言

腸免疫系統包括集合淋巴結 (Peyer's patches, PP)、固有層(lamina propria, LP)、上皮內淋巴球(intraepithelial lymphocytes, IEL)和腸繫膜淋巴結(mesenteric lymph nodes, MLN)。PP 含有可誘發免疫反應所需的免疫細胞，即 B, T, 巨噬細胞和輔助細胞(accessory cell)。腸 LP 有分泌抗體的 B 細胞(plasma cell)和 T helper lymphocytes。IEL 包括 helper and cytotoxic T cells，其功能還在研究中。MLN 收集腸的淋巴液，是腸黏膜和系統性免疫系統(systemic immune system)交接的地方。

在五種抗體中，腸和其他的黏膜場所對抗抗原最重要的抗體是 IgA，而且佔人體每天抗體生產總量的 60%[9]。口服抗原在腸道是由 PP 上的 M cells 攝入。PP 被認為是 IgA 反應的誘發場所而不是抗體分泌的場所[1]。抗原進入 PP 與 antigen-presenting cells、regulatory T 細胞和 B 細胞相遇。IgA⁺ B 細胞和 T 細胞由 PP 經 MLN 和胸管(thoracic duct) 遊走至血液、脾臟和肝，然後返回腸 LP。在 LP，IgA⁺ B 細胞分化成 IgA plasma cell。IgA plasma cell 產生 dimeric IgA。Dimeric IgA 與上皮細胞的 polymeric immunoglobulin receptor (pIgR)結合後，再運送至腸腔。

小鼠和人的研究結果皆支持 T-helper cell (Th cell)可分為兩個 subset[12]。由抗原對 Th cell 刺激所產生的細胞激素(cytokine)種類，可把 Th cell 分為 Th1 cell 及 Th2 cell。Th1 cell 產生 interleukin(IL)-2, interferon- γ (IFN- γ) 和 tumur necrosis factor- β (TNF- β)，可促進細胞性免疫反應 (cell-mediated immune response)。相反，Th2 cell 分泌 IL-4、IL-5、IL-6 及 IL-10，主要促進體液(抗體)免疫反應 (humoral immune response)。口服的免疫方式主要刺激 PP 產生 Th2 type 細胞激素而促進體液免疫反應[18]。

在執行 89 年度國科會計畫，以小鼠為動物模式，評估靈芝(*G. lucidum*)菌絲體對腸體液免疫反應的影響。研究結果顯示靈芝菌絲體增加小腸內容物的 IgA 含量，但卻抑制特異性抗體(anti-cholera toxin IgA)之反應。本研究之假說為靈芝菌絲體藉由調整腸道細胞激素的分泌而影響腸體液免疫反應。PP 在腸免

疫系統有著重要的功能，為腸免疫反應誘發之處(inductive site)[1]，而 MLN 也是腸免疫系統的一部份。由於 PP 和 MLN 摘取容易，所以以這兩處組織的免疫細胞分泌細胞激素的量作為指標。實驗一是針對非免疫小鼠飼以含靈芝菌絲體之 AIN-93G 飼料，探討靈芝對 PP 和 MLN 細胞以 phytohemagglutinin (PHA)和 lipopolysaccharide(LPS)刺激後，細胞激素分泌量之影響。實驗二是飼以含靈芝菌絲體飼料的小鼠，飼養期間管餵 cholera toxin (CT)，探討靈芝對給予口服免疫小鼠的 PP 和 MLN 細胞分泌細胞激素量之影響。

二、研究目的

本研究目的是探討靈芝菌絲體對小鼠 PP 和 MLN 分泌細胞激素之影響。

三、文獻探討

靈芝對免疫功能的研究包括對自然殺手細胞的活性[17]，對人類血中淋巴球的 mitogenic effect[6]，經 γ 射線處理小鼠脾臟 T cell subset 和細胞免疫功能的回復[2,3]，和抗腫瘤的作用[13,14,15]。其中研究靈芝抗腫瘤為最多，特別是靈芝中多醣體的抗腫瘤作用。研究方法普遍以菌絲體或子實體的抽出物對實驗動物給予腹腔注射，結果顯示靈芝抽出物可增強免疫功能。靈芝為口服的保健食品，而靈芝對腸免疫系統功能之影響的研究卻甚為缺乏。

本研究室之前發現五週齡 C57BL/6J 雌性小鼠飼以含靈芝菌絲體的 A1N-93G 飼料四週，在飼養的第 7 天和第 21 天以管餵方式給予 5 μ g CT，小鼠的小腸內容物、糞便和血清的 anti-CT IgA 與對照組比較均有顯著減少[5]。

靈芝對免疫系統的影響可能是藉由調整細胞激素分泌而達成。已有體外實驗結果顯示，靈芝 (*G. lucidum*) 子實體分離之多醣體，其抗腫瘤作用是藉由促進巨噬細胞和 T 細胞 TNF- α 和 IFN- γ 的分泌 [15]。另一方面，小鼠腹腔注射靈芝(*G. lucidum, G. Tsugae*) 菌絲體酒精不溶部分，血清 IFN titer 增加 [8,17]。靈芝對 PP 和 MLN 細胞細胞激素分泌的影響則沒有相關報告。口服 CT 在腸主

要是引起 Th2 反應[19]。靈芝菌絲體可能抑制 Th2 細胞激素 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 的分泌而降低腸 anti-CT IgA 反應。

四、研究方法

1、材料

噴霧乾燥之靈芝 (*G. lucidum*) 菌絲體由台糖提供。

2、動物與飼料

實驗一：5 週齡的雌性 C57BL/6J 小鼠隨機分為 3 組，分別飼以含 0%、1% 和 3% 靈芝菌絲體的 AIN-93-G 飼料 4 週。每組 24-30 隻，以 3 隻一籠飼養。為了取得足夠的 PP 細胞做培養，集合 3 隻小鼠的細胞作為一個樣品，因此每組的樣品數為 8-10。

實驗二：5 週齡的雌性 C57BL/6J 小鼠隨機分為 4 組，分別飼以含 0、1、3 和 5% 靈芝菌絲體的 AIN-93-G 飼料 4 週。飼養期間給予口服 CT。每組 32-40 隻，以 4 隻一籠飼養。為了取得足夠的 PP 細胞做培養，集合 4 隻小鼠的細胞作為一個樣品，因此每組的樣品數為 8-10。

3、CT 口服免疫

CT 的免疫流程是根據 Elson and Ealding(1984)[4]的方法，以管餵的方式在小鼠飼養第 7 天和第 21 天時給予 0.1ml 含 5 μg CT 的 0.2M NaHCO₃ 溶液。另加一組飼以 AIN-93G 飼料的小鼠，管餵 0.1 ml 0.2M NaHCO₃ 溶液。

4、PP 和 MLN 細胞的製備和培養

以 CO₂ 麻醉小鼠後，眼窩採血，分離血清。再以 CO₂ 犢牲小鼠後，以無菌操作方式取出 PP 和 MLN。PP 取出後，置於含 100U/ml penicillin、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin、25mM Hepes buffer 和 10% fetal bovine serum 之 5ml RPMI 1640 (complete RPMI) 培養液的 petri dish 中，以無菌針筒的尾端將 PP 在 100 mesh 的不鏽鋼篩網磨碎。作成單一細胞懸浮液後，於 450g 離心 5 分鐘，再使細胞懸浮於 complete RPMI 中。以 trypan blue dye exclusion 方法定活細胞的數目。MLN 的處理方法與 PP 相同。

24 well 培養盤加入 MLN 細胞 (2×10^6 cells/ml) 及 complete RPMI 含或不含 20 μg lipopolysaccharide (LPS) 或 phytohemagglutinin (PHA)，在 5% CO₂ 和 37 °C 之條件下培養 48 小時後，收集上清液，貯存於 -80°C，待日後分析細胞激素之用。PP 細胞 (2×10^6 cells/ml) 與含或不含 20 μg PHA 的 complete RPMI 培養 48 小時。實驗二的 MLN 和 PP 細胞數目為 4×10^6 cells/ml。MLN 細胞與 20 μg PHA 或 LPS 或 1 μg CT 共同培養 48 小時。PP 細胞與 1 μg CT 共同培養 48 小時。

5、血清 anti-cholera toxin IgA 定量

採用修改 Ha 之方法[5]。修改之處為 peroxidase 受質溶液是 0.4mM tetramethylbenzidine 和 1.2mM H₂O₂ 的 10mM citric phosphate buffer (pH=5.5)，反應以 50 μl 6N H₂SO₄ 停止，於 450nm 測定 peroxidase 的產物。

6、細胞激素的定量分析

以 sandwiches ELISA 方法定量細胞激素。96 well flat-bottom plate 加入 50 μl 含 rat anti-mouse 細胞激素抗體 (PharMingen, San Diego, CA) 之 0.1M Na₂HPO₄ 緩衝液, pH=9.0 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$: IL-2、IL-5、IL-6; 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$: IFN- γ) 在 4°C 過夜。plate 以 0.01M phosphate buffered saline (PBS, pH=7.4) 含 0.05% Tween 20 (PBST) 洗 3 次。plate 以含 1% bovine serum albumin 的 PBS (blocking buffer) 在 37°C blocking 30 分鐘後，再以 PBST 洗 2 次。小鼠的細胞激素標準品 (PharMingen, San Diego, CA) 或樣品以 complete RPMI-1640 作適當稀釋後，取 50 μl 加入 well 在 4°C 反應過夜。Plate 以 PBST 洗 4 次，加入 50 μl 以 blocking buffer 適當稀釋的 biotinylated rat anti-mouse 細胞激素單株抗體 (PharMingen, San Diego, CA)，在室溫下反應 1 小時，以 PBST 洗 5 次。加入 50 μl 以 blocking buffer 適當稀釋的 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (PharMingen, San Diego, CA)，在室溫下反應 30 分鐘。Plate 以 PBST 洗 5 次後，加入 100 μl 含 0.4mM tetramethylbenzidine 和

1.2mM H₂O₂ 的 10mM citric phosphate buffer (pH=5.5)，反應以 50μl 6N H₂SO₄ 停止，於 450nm 測定 peroxidase 的產物。IL-4 和 IL-10 使用 OptEIA mouse IL-4 和 IL-10 set 定量 (PharMingen, San Diego, CA)，根據製造商的方法定量。

7、統計方法

實驗數據以 one-way ANOVA 分析後，以 Dunnett's test 找出實驗組與對照組之間的顯著差異 ($P < 0.05$)。數據經 square root transformation 後仍不呈常態分佈，則以 Wilcoxon two-sample test 找出實驗組與對照組之間的顯著差異 ($P < 0.05$)。

五、結果與討論

實驗一：靈芝菌絲體對非免疫小鼠 PP 和 MLN 分泌細胞激素之影響。

靈芝菌絲體對小鼠的生長和攝食量並沒有影響(Table 1)。

靈芝菌絲體對 PP 分泌 Th1 (IL-2 和 IFN-γ) 和 Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 和 IL-10) 細胞激素之影響列於 Table 2。雖然已集合 3 隻小鼠的 PP 細胞，所得的細胞數目仍是有限。由於本實驗主要探討靈芝對 Th1 和 Th2 細胞激素的影響，故選用 PHA 刺激 PP 細胞。PP 分泌細胞激素不受靈芝菌絲體的影響。

靈芝菌絲體對 MLN 分泌 Th1 和 Th2 細胞激素之影響列於 Table 3。靈芝菌絲體不影響 MLN 分泌 IL-2、IL-4、IL-5 和 IL-6。但靈芝菌絲體減少 G3 組小鼠 LPS 刺激分泌 IL-10。靈芝菌絲體也減少 IFN-γ 的自然分泌，而 G3 組小鼠 PHA 刺激分泌 IFN-γ 也顯著減少。

實驗二：靈芝菌絲體對免疫小鼠 PP 和 MLN 分泌細胞激素之影響。

靈芝菌絲體和管餵 CT 對小鼠的開始體重、最終體重、攝食量和血清 anti-CT IgA 的濃度並沒有影響(Table 4)。

靈芝菌絲體對 PP 分泌 Th1 和 Th2 細胞激素之影響列於 Table 5。經口服 CT 免疫的小鼠，GT3 和 GT5 組 PP 細胞自然分泌 IFN-γ 與 C 組比較有顯著減少。以 CT 刺激 PP 細

胞，GT5 組小鼠分泌 IFN-γ 幾乎完全被抑制。其他細胞激素則不受靈芝和 CT 的影響。

靈芝菌絲體對 MLN 分泌 Th1 和 Th2 細胞激素之影響列於 Table 6。除了 IFN-γ 和 IL-5 外，其他細胞激素分泌量在 MLN 不受靈芝菌絲體和 CT 的影響。與 PP 結果一致，靈芝菌絲體抑制 MLN 細胞自然分泌與 CT 分泌 IFN-γ。而且靈芝菌絲體劑量愈高，抑制效果愈明顯。另一方面，IL-5 的自然分泌與 PHA 刺激結果相同，也受高劑量靈芝菌絲體的抑制。

根據前次實驗結果，餵食靈芝菌絲體的小鼠，其血清、腸內容物和糞便 anti-CT IgA 的量顯著減少(5)。本次實驗以血清 anti-CT IgA 濃度作為靈芝菌絲體降低腸免疫功能的指標，則靈芝菌絲體並未降低腸道免疫功能。前次實驗和本次實驗所使用的靈芝菌絲體不是同一批醣酵的靈芝菌絲體，可能是造成結果不一致的原因。因此廠商生產保健食品的隱定性，是研究結果一致性的關鍵。

綜合實驗一和實驗二的結果，靈芝菌絲體對非免疫小鼠 MLN 和口服免疫小鼠 PP 和 MLN 細胞減少 IFN-γ 分泌最為顯著。體外和體內的實驗証實，IFN-γ 可增加 pIgR 的合成和 secretory component 的分泌[7,10,11,16]。pIgR 是運送 IgA 至腸腔的接受器。本研究沒有測定腸 secretory IgA 的含量，因此免疫小鼠減少 IFN-γ 分泌是否會導致減少 pIgR 數目而減少特異性 IgA 抗體反應則需進一步探討。

六、參考文獻

1. Cebra, J.J. and Shroff, K.E. (1994) Peyer's patches as inductive sites for IgA commitment. In "Handbook of mucosal immunology", eds by Ogra, P.L., Mestecky, J., Lamm, M.E., Strober, W., McGhee, J.R. and Bienenstock, J., pp. 151-158, Academic Press, California.
2. Chen, W.-C., Hau, D.-M., Wang C.-C., Lin, I.-H and Lee, S.-S. (1995a) Effects of *Ganoderma lucidum* and Krestin on subset T-cell in spleen of γ-irradiated mice. Am. J. Chinese. Med. 23:289-298.
3. Chen, W.-C., Hau, D.-M. and Lee, S.-S. (1995b) Effects of *Ganoderma lucidum* and

- Krestin on cellular immunocompetence in γ -irradiated mice. Am. J. Chinese. Med. 23:71-80
4. Elson, C.O. and Ealding, W. (1984) Generalized systemic and mucosal immunity in mice after mucosal stimulation with cholera toxin. J. Immunol. 132:2736-2741
 5. Ha, C.-L. (2003) The inhibitory effect of the Chinese herb *Ganoderma lucidum* mycelium on gut immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice. Nutr. Res. 23:691-701.
 6. Haak-Frendscho, M., Kino, K., Sone, T. and Jardieu, P. (1993) Ling Zhi-8: A novel T cell mitogen induces cytokine production and upregulation of ICAM-1 expression. Cellular Immunol. 150:101-113.
 7. Krajč, P., Tasken, K., Kvæle, D. and Brandtzaeg, P. (1993) Interferon- γ stimulation of messenger RNA for human secretory component (poly-Ig receptor) depends on continuous intermediate protein synthesis. Scand. J. Immunol. 37:251-256.
 8. Lee, S.-S., Wei, Y.-H., Chen, C.-F., Wang, S.-Y. and Chen, K.-Y. (1995) Antitumor effects of *Ganoderma lucidum*. J. Chin. Med. 6:1-12.
 9. McGhee, J.R., Mestecky, J., Elson, C. and Kiyono, H. (1989) Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. J. Clin. Immunol. 9:175-199.
 10. Piskurich, J.F., France, J.A., Tamer, C.M., Willmer, C.A., Kaetzel, C.S. and Kaetael, D.M. (1993) Interferon- γ induces polymeric immunoglobulin receptor mRNA in human intestinal epithelial cells by a protein synthesis dependent mechanism. Mol. Immunol. 30:413-421.
 11. Prabhala, R.H. and Wira, C.R. (1991) Cytokine regulation of the mucosal immune system: in vivo stimulation by interferon- γ of secretory component and immunoglobulin A in uterine secretions and proliferation of lymphocytes from spleen. Endocrinology. 129:2913-2923.
 12. Romagnani, S. (1992) Induction of Th1 and Th2 responses: a key role for the 'natural' immune response? Immunol. Today 13:379-381.
 13. Song, Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, E. and Misaki, A. (1985) Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. Agric. Biol. Chem. 49:2641-2653.
 14. Wang, S., Zhang, J., Mizuno, T., Zhang, C., Ito, H., Mayuzumi, H. and Li, J. (1993) Antitumor active polysaccharides from the Chinese mushroom Songshan Lingshi, the fruiting body of *Ganoderma tsugae*. Biosci. Biotech. Biochem. 57:894-900.
 15. Wang, S.-Y., Hsu, M.-L., Hsu, H.-C., Tzeng, C.-H., Lee, S.-S., Shiao, M.-S. and Ho, C.-K. (1997) The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. Int. J. Cancer 70:699-705.
 16. Wira, C.R., Bodwell, J.E. and Prabhala, R.H. (1991) In vivo response of secretory component in the rat uterus to antigen, IFN- γ , and estradiol. J. Immunol. 146:1893-1899.
 17. Won, S.-J., Lin M.-T. and Wu, W.-L. (1992) *Ganoderma Tsugae* mycelium enhances splenic natural killer cell activity and serum interferon production in mice. Japan. J. Pharmacol. 59:171-176.
 18. Xu-Amano, J., Aicher, W.K., Taguchi, T., Kiyono, H. and McGhee, J.R. (1992) Selective induction of Th2 cells in murine Peyer's patches by oral immunization. Int. Immunol. 4:433-445.
 19. Xu-Amano, J., Kiyono, H., Jackson, R.J., Staats, H.F., Fujihashi, K., Burrows, P.D., Elson, C.O., Pillai, S. and McGhee, J.R. (1993) Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues. J. Exp. Med. 178:1309-1320.

七、計畫成果自評

本研究工作大致按原計劃進行，實驗一原包括 5% 的靈芝菌絲體組(G5)，但 G5 組小鼠飼養至第四週體重減少，按本實驗室過去

的經驗，此為異常現象，為求實驗的嚴謹，把 G5 組小鼠刪除。本研究為延續 89 年度國科會計畫的研究，目的在探討靈芝菌絲體抑制特異性抗體反應的原因。台糖提供本次實驗的靈芝菌絲體未能使餵食小鼠產生抑制血清 anti-CT-IgA 的反應，與前次實驗結果不同，故無法達成預期的實驗目的。無論如何，靈芝菌絲體對腸道免疫的研究甚為缺乏，本研究的結果顯示靈芝菌絲體抑制免疫小鼠 PP 和 MLN 細胞分泌 IFN- γ ，提供了研究靈芝菌絲體影響腸道免疫的另一層面。



八、圖表

Table 1. Growth indices for mice fed AIN-93G diet, only, or with different levels of *Ganoderma lucidum* mycelium for 28 days^a

groups ^b	n	Weight (g/mouse)		Feed intake (g/mouse for 28 days)
		Initial ^c	Final	
C	8	16.2±0.5	19.8±0.7	88.7±8.9
G1	10	15.9±0.7	19.4±0.7	84.9±4.1
G3	10	15.8±0.5	19.1±0.9	86.1±5.9

^aMean±SD. No significant differences among treatment groups according to Dunnett's test.

^bNC, negative control; C, control; G1 and G3, control diet containing 1 and 3% (wt/wt) *Ganoderma lucidum* mycelium, respectively.

^cWilcoxon's two-sample test.

Table 2. Cytokines secretion of Peyer's patches cells in mice fed AIN-93G diet, only, or with different levels of *Ganoderma lucidum* mycelium for 28 days^a

groups ^b	C	G1	G3
Interleukin 2 (pg/ml)			
spontaneous	148.2±48.9	148.4±90.4	150.0±50.5
PHA	290.0±139.0	354.4±141.4	354.4±115.6
Interleukin 4 (pg/ml)			
spontaneous	ND ^c	ND	ND
PHA	ND	ND	ND
Interleukin 5 (pg/ml)			
spontaneous	ND	ND	ND
PHA	ND	ND	ND
Interleukin 6 (pg/ml)			
spontaneous	485.0±207.0	595.5±294.9	375.5±243.6
PHA	321.1±189.0	614.8±400.8	465.2±214.3
Interleukin 10 (pg/ml)			
spontaneous	ND	ND	ND
PHA	ND	ND	ND
Interferon-γ (ng/ml)			
Spontaneous	5.5±1.6	4.9±1.7	4.7±1.9
PHA	110.2±31.1	99.0±34.7	94.2±38.4

^aMean±SD. n=10 per group except n=9 for group C. Within each cytokine, values with asterisks differed (P<0.05) from group C according to Dunnett's test.

^bNC, negative control; C, control; G1 and G3, control diet containing 1 and 3% (wt/wt) *Ganoderma lucidum* mycelium, respectively. Cells (2×10^6 cells/ml) were cultured with and without 20 µg/ml phytohemagglutinin (PHA) for 2 days.

^cND=not detectable

Table 3. Cytokines secretion of mesenteric lymph nodes cells in mice fed AIN-93G diet, only, or with different levels of *Ganoderma lucidum* mycelium for 28 days^a

Groups ^b	C	G1	G3
Interleukin 2 (pg/ml)			
spontaneous	ND	ND	ND
LPS	184.1±70.1	193.8±60.6	188.5±111.0
PHA	530.1±37.8	538.8±47.4	538.4±62.3
Interleukin 4 (pg/ml)			
spontaneous	ND ^d	ND	ND
LPS	ND	ND	ND
PHA	ND	ND	ND
Interleukin 5 (pg/ml)			
spontaneous	ND	ND	ND
LPS	ND	ND	ND
PHA	ND	ND	ND
Interleukin 6 (pg/ml)			
spontaneous	ND	ND	ND
LPS (ng/ml)	65.4±28.5	66.2±28.0	56.1±33.1
PHA	167.7±79.0	220.0±88.9	238.7±113.7
Interleukin 10 (pg/ml)			
spontaneous	ND	ND	ND
LPS	1090.4±438.2	910.5±376.4	687.7±379.5*
PHA	1042.5±1189.3	717.1±938.2	824.9±670.3
Interferon-γ (ng/ml)			
spontaneous ^c	2.6±0.8	1.4±0.7*	1.5±3.0*
LPS ^c	12.4±7.0	14.2±11.4	18.5±29.3
PHA	10.4±1.2	9.2±1.5	8.5±1.1

^aMean±SD. n=10 per group except n=9 for group C. Within each cytokine, values with asterisks differed (P<0.05) from group C according to Dunnett's test.

^bNC, negative control; C, control; G1 and G3, control diet containing 1 and 3% (wt/wt) *Ganoderma lucidum* mycelium, respectively. Cells (2 x 10⁶ cells/ml) were cultured with and without 20μg/ml lipopolysaccharide (LPS) or phytohemagglutinin (PHA) for 2 days.

^cWilcoxon's two-sample test.

^dND=not detectable

Table 4. Growth indices and serum anti-cholera toxin-IgA concentration for mice fed AIN-93G diet, only, or with different levels of *Ganoderma lucidum* mycelium for 28 day^a

groups ^b	n	Weight (g/mouse)		Feed intake ^c (g/mouse for 28 days)	serum anti-CT-IgA ^c (μg/ml)
		Initial	Final		
NC	7	16.1±0.6	18.6±0.8	72.7±2.9	0.1±0.03
C	10	15.9±0.7	18.9±0.5	73.0±3.1	56.8±12.2
GT1	10	15.9±0.6	19.1±0.6	72.8±2.5	58.2±10.1
GT3	10	15.9±0.6	18.9±0.8	72.4±2.8	53.6±18.1
GT5	10	15.8±0.7	18.9±0.6	71.3±5.2	49.7±15.2

^aMean±SD. No significant differences between groups according to Dunnett's test.

^bNC, negative control; C, control; GT1, GT3, and GT5, control diet containing 1, 3 and 5% (wt/wt) *Ganoderma lucidum* mycelium, respectively. Animals were orally given either 0.1ml of 0.2 mol/L NaHCO₃ (NC) or 5 μg cholera toxin (C, GT1, GT3 and GT5) at day 7 and day 21 of the 28-day feeding period.

^cWilcoxon's two-sample test.

Table 5. Cytokines secretion of Peyer's patches cells in orally immunized mice fed AIN-93G diet, only, or with different levels of *Ganoderma lucidum* mycelium for 28 d^a

Groups ^b	NC	C	GT1	GT3	GT5
Interleukin 2 (pg/ml)					
spontaneous	96.8±69.6*	87.1±62.4	98.8±52.3	78.4±41.7	71.1±53.2
CT ^c	11.8±15.4*	2190.1±1601.5	2390.1±1293.3	2104.7±976.4	2128.5±1476.5
Interleukin 4 (pg/ml)					
spontaneous	ND ^d	ND	ND	ND	ND
CT	ND	ND	ND	ND	ND
Interleukin 5 (pg/ml)					
spontaneous	ND	ND	ND	ND	ND
CT ^c	269.7±145.5*	2229.8±1609.3	1914.2±808.1	1652.9±372.1	1734.6±812.6
Interleukin 6 (pg/ml)					
spontaneous	790.1±363.2	722.3±585.2	988.2±652.9	640.0±228.2	736.3±439.8
CT	3323.2±1239.0	6315.5±5186.3	9056.1±5768.1	5796.9±2248.0	6174.3±3751.0
Interleukin 10 (pg/ml)					
spontaneous	265.8±114.9	308.7±178.9	295.7±125.1	225.2±80.8	260.0±84.9
CT	176.7±58.19	351.5±312.0	331.5±191.9	177.7±50.4	212.3±192.8
Interferon-γ (pg/ml)					
spontaneous	4386.7±930.2	4063.7±1908.0	3118.7±1885.0	2040.3±1454.8*	829.3±643.5*
CT	2862.9±1770.7	1538.7±1305.2	1284.3±1398.8	1002.7±798.0	32.0±101.2*

^aMean±SD. n=10 per group except n=7 for group NC. Within each cytokine, values with asterisks differed (P<0.05) from group C according to Dunnett's test.

^bNC, negative control; C, control; GT1, GT3, and GT5, control diet containing 1, 3 and 5% (wt/wt) *Ganoderma lucidum* mycelium, respectively. Animals were orally given either 0.1 ml of 0.2 mol/L NaHCO₃ (NC) or 5 µg cholera toxin (C, GT1, GT3 and GT5) at day 7 and day 21 of the 28-day feeding period. Cells (4 x 10⁶ cells/ml) were cultured with and without 1 µg/ml cholera toxin (CT) for 2 days.

^cWilcoxon's two-sample test.

^dND=not detectable.

Table 6. Cytokines secretion of mesenteric lymph nodes cells in orally immunized mice fed AIN-93G diet, only, or with different levels of *Ganoderma lucidum* mycelium for 28 d^a

Treatment groups ^b	NC	C	GT1	GT3	GT5
Interleukin 2 (pg/ml)					
spontaneous	146.7±90.1	187.4±108.8	145.0±60.8	143.2±88.4	146.6±90.6
LPS	476.4±126.4	429.5±104.9	415.9±105.7	408.7±76.4	395.7±132.4
PHA	472.7±81.1	473.9±99.8	491.8±119.1	475.7±139.6	428.3±115.0
CT ^c	116.1±93.9*	2520.9±2321.2	1695.9±1071.7	1352.7±807.8	2254.8±2213.2
Interleukin 4 (pg/ml)					
spontaneous ^c	ND	ND	ND	ND	ND
LPS	ND	ND	ND	ND	ND
PHA	ND	ND	ND	ND	ND
CT	ND	ND	ND	ND	ND
Interleukin 5 (pg/ml)					
spontaneous	686.5±231.6	780.6±227.5	734.6±220.6	727.2±269.1	486.8±138.8*
LPS	1602.3±772.3	1289.5±551.2	1065.3±513.8	1303.6±776.0	1462.8±891.9
PHA	6443.4±3792.4	5868.5±2319.0	4910.9±1338.4	4238.2±1271.7	2670.0±1174.5*
CT	5244.1±809.3*	13657.1±4736.8	11665.1±2644.1	10564.3±3177.9	12264.3±5244.9
Interleukin 6 (pg/ml)					
spontaneous	ND ^d	ND	ND	ND	ND
LPS	170.6±56.6	161.2±28.0	153.6±20.0	144.6±30.6	159.7±30.9
PHA	369.3±278.2	378.7±453.7	181.8±117.6	172.2±173.4	388.7±364.7
CT	6735.6±5115.8	8544.4±4256.0	7807.6±4183.1	6152.0±4045.5	9377.0±4025.4
Interleukin 10 (pg/ml)					
spontaneous	ND	ND	ND	ND	ND
LPS	2988.8±873.1	3134.4±714.0	3583.3±573.9	3536.0±998.5	2499.1±1534.0
PHA	ND	ND	ND	ND	ND
CT	74.8±90.6	199.6±202.3	74.0±73.1	69.9±96.8	121.5±101.5
Interferon-γ (ng/ml)					
spontaneous	3.3±0.8	2.5±0.7	1.6±0.8*	0.6±0.7*	0.004±0.01*
LPS ^c	318.3±141.0	312.9±178.3	253.5±97.0	205.0±147.3	308.8±292.0
PHA ^c	2.2±1.1	2.6±0.6	2.1±1.2	1.6±0.9	2.8±3.7*
CT	5.5±3.3	4.9±0.7	4.3±0.3*	4.0±0.6	3.6±0.6

^aMean±SD. n=9 per group except n=7, 10 and 8 for group NC, GT3 and GT5, respectively. Within each cytokine, values with asterisks differed ($P<0.05$) from group C according to Dunnett's test.

^bNC, negative control; C, control; G1, G3 and G5, control diet containing 1, 3 and 5% (wt/wt) *Ganoderma lucidum* mycelium, respectively. Animals were orally given either 0.1 ml of 0.2 mol/L NaHCO₃ (NC) or 5 µg cholera toxin (C, GT1, GT3 and GT5) at day 7 and day 21 of the 28-day feeding period. Cells (4 x 10⁶ cells/ml) were cultured with and without 20 µg/ml lipopolysaccharide (LPS) or phytohemagglutinin (PHA)

or 1 µg/ml cholera toxin (CT) for 2 days.

^cWilcoxon's two-sample test.

^dND=below detection limit

