

基于巨噬细胞模型的竹荪多糖的免疫功能

尚京迎¹, 付海田¹, 邓超², 张斯秀², 陈敬华^{1*}

(1. 江南大学药学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学无锡医学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为探索竹荪多糖(DI)对巨噬细胞 RAW264.7 免疫功能的影响, 分别采用四唑氮蓝(MTT)法、中性红法、Griess 法、ELISA 法, 检测 DI 对巨噬细胞增殖、吞噬活性、一氧化氮(NO)和白细胞介素 1(IL-1)、白细胞介素 6(IL-6)、 α 肿瘤坏死因子(TNF- α)分泌量的影响; 运用反转录 PCR(RT-PCR)检测 *iNOS* 和 *IL-1*、*IL-6*、*TNF- α* 的 mRNA 表达量的变化。结果表明, 在 25~200 μ g/mL 质量浓度范围内, DI 能够明显促进巨噬细胞增殖, 增强其吞噬活性。同时, DI 能够增强巨噬细胞分泌 NO、*IL-1*、*IL-6*、*TNF- α* 的能力, 且明显提高 *iNOS*、*IL-1*、*IL-6*、*TNF- α* mRNA 的表达水平。因此, 竹荪多糖对巨噬细胞 RAW264.7 具有免疫刺激作用。

关键词: 多糖; 竹荪; 巨噬细胞; 免疫功能

中图分类号: Q 539 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)08—0849—06

Immunomodulatory Effects of A Polysaccharide from *Dictyophora indusiata* on Macrophage

SHANG Jingying¹, FU Haitian¹, DENG Chao², ZHANG Sixiu², CHEN Jinghua^{1*}

(1. School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In order to investigate the immunomodulatory effects of a polysaccharide from *Dictyophora indusiata* (DI) on the immune function of RAW264.7 cells, the effects of DI on cell proliferation, phagocytosis of RAW264.7 cells, levels of NO, *IL-1*, *IL-6* and *TNF- α* production were detected by MTT assay, neutral red test, Griess method, and ELISA, respectively. The mRNA expression level of *iNOS*, *IL-1*, *IL-6* and *TNF- α* were also measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The results indicated that DI contributed significantly to the proliferation of the macrophages and the phagocytic activity was at 25~200 μ g/mL. In addition, the production of NO, *IL-1*, *IL-6* and *TNF- α* in macrophages were increased. Further, the expression of *iNOS*, *IL-1*, *IL-6* and *TNF- α* mRNA were significantly up-regulated. The DI played immunomodulatory effects on macrophage cell line RAW264.7.

Keywords: polysaccharide, *Dictyophora indusiata*, macrophage, immunomodulation

收稿日期: 2015-01-09

基金项目: 教育部博士点基金项目(20110093110008)。

* 通信作者: 陈敬华(1971—), 男, 湖北黄石人, 理学博士, 教授, 主要从事生物大分子和生物功能材料的研究。E-mail: jhchenwhut@126.com

竹荪(*Dictyophora indusiata*)是一类大型真菌,属于真菌门(Eumycota)、担子菌亚门(Basidiomycotina)、腹菌纲(Gasteromycetes)、鬼笔目(Phallales)、鬼笔科(Phallaceae)、竹荪属(*Dictyophora*),其香味浓郁,滋味鲜美,营养丰富,是当今世界上名贵的食用菌之一,具有滋补强壮、宁神健体、益气补脑、润肺止咳、补气养阴及清热利湿等功效^[1-2]。

竹荪多糖是长裙竹荪的主要活性物质。关于竹荪多糖的研究,国内外主要集中在多糖的提取方法和结构解析上^[3-6],对竹荪多糖的药理研究较少。已有部分报道证明,竹荪多糖具有抗肿瘤、抗氧化等作用^[3,7-8]。本文中从小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 细胞为模型,研讨竹荪多糖对 RAW264.7 细胞增殖、吞噬活性,以及 NO、IL-1、IL-6、TNF- α 的分泌及 iNOS、IL-1、IL-6、TNF- α mRNA 的表达的影响,旨在探究竹荪多糖的免疫调节功能,为充分开发应用竹荪提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 细胞 小鼠巨噬细胞株 RAW264.7,购自中国科学院上海细胞库,培养于含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中,置于 37℃、体积分数 5% CO₂ 细胞培养箱中,每天换液,隔 2 d 传代 1 次,细胞长至对数生长期时,按不同实验目的处理。

1.1.2 试剂 DMEM 高糖培养基,美国 Gibco 公司产品;胎牛血清,美国 Hyclone 公司产品;脂多糖(LPS)、MTT,美国 Sigma 公司产品;ELISA 试剂盒,美国 R&D 公司产品;RNA 提取及纯化试剂盒,美国 Invitrogen 公司产品;cDNA 逆转录试剂盒,美国 Fermenta 公司产品;PCR 酶,宝生物工程(大连)有限公司产品。

1.1.3 竹荪多糖 竹荪子实体购自四川省长宁县,经水提醇沉后得粗多糖,再以 seavage 法脱蛋白质,除杂后冷冻干燥得到实验用的竹荪多糖。经苯酚硫酸法检测其总糖质量分数为 93.6%,考马斯亮蓝法测定蛋白质质量分数为 5.73%。将 10 mg 竹荪多糖溶于 10 mL 细胞培养液,过滤除菌,-20℃分装保存。

1.1.4 仪器与设备 Multiskan GO 酶标仪、CO₂ 细胞培养箱,美国 Thermo 公司制造;倒置荧光显微镜,德国 Leica 公司制造;凝胶成像系统、PCR 仪,美

国 Bio-Rad 公司制造;精密电子天平,美国 Mettler Toledo 公司制造;RE52-99 旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂制造;紫外可见分光光度计,日本日立仪器有限公司制造;FreeZone2.5L 冷冻干燥机,美国 Labconco 公司制造。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测竹荪多糖对 RAW264.7 细胞增殖的影响 取对数生长期的细胞以 5×10^3 /孔接种于 96 孔培养板,37℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱孵育 6 h。加入 200 μ L 不同质量浓度(25、50、100、200 μ g/mL)的竹荪多糖干预,同体积的 1 μ g/mL LPS 为阳性对照组,同体积的完全培养液为空白对照组,设 4 个复孔,继续孵育 48 h,然后加入 10 μ L MTT(5 g/L)再孵育 4 h,离心 5 min(3 000 r/min),弃上清液,每孔加 100 μ L DMSO,避光轻振 10 min,酶标仪 570 nm 检测 OD 值^[9]。

1.2.2 中性红法检测竹荪多糖对 RAW264.7 细胞吞噬活性的影响 取对数生长期细胞以 3×10^4 /孔接种于 96 孔培养板,37℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱孵育 24 h。实验组、空白对照组、阳性对照组处理同 1.2.1,48 h 后弃上清液,每孔加入 100 μ L 质量分数为 0.072% 的中性红溶液,继续孵育 30 min,弃中性红,用预温的 PBS 缓冲液洗 3 遍,每次 200 μ L,甩干。然后加入冰醋酸-无水乙醇(体积比 1:1)细胞溶解液 100 μ L/孔,4℃放置 2 h,酶标仪 550 nm 检测 OD 值^[10]。

1.2.3 Griess 法检测竹荪多糖对 RAW264.7 分泌 NO 的影响 取对数生长期的 RAW264.7 细胞,以 5×10^4 /孔接种于 96 孔细胞培养板中,37℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱孵育 6 h。实验组、空白对照组、阳性对照组处理同 1.2.1,48 h 后取上清液,按照 Griess 试剂盒说明书操作方法检测 NO 的生成^[10]。

1.2.4 ELISA 法检测竹荪多糖对 RAW264.7 分泌细胞因子的影响 取对数生长期的 RAW264.7 细胞,以 5×10^4 /孔接种于 96 孔细胞培养板中,37℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱孵育 6 h。实验组、空白对照组、阳性对照组处理同 1.2.1,48 h 后取上清液,用 ELISA 试剂盒测定 IL-1、IL-6 和 TNF- α 含量,具体操作方法参照试剂盒说明书,酶标仪 450 nm 检测 OD 值^[9]。

1.2.5 RT-PCR 法检测细胞因子 mRNA 的表达 取对数生长期 RAW264.7 细胞,以 5×10^5 /孔接种于 6

孔细胞培养板中,37℃、体积分数5% CO₂培养箱孵育12 h。实验组、空白对照组、阳性对照组处理同1.2.1,48 h后吸去上清液,用TRIzol收集细胞,按照试剂说明提取总RNA,用紫外分光光度计检测RNA浓度和纯度,然后总RNA逆转录合成cDNA,以cDNA为模板进行扩增。基因引物序列见表1,35个循环扩增,得到的扩增产物进行1.5 g/dL的琼脂糖凝胶电泳,Image Lab 软件分析^[11]。

表1 基因引物序列

Table 1 List of primers used in polymerase chain reactions

基因	引物序列(5'-3')	退火温度/℃
<i>iNOS</i>	上游:TCCTACACCACACCAAAC 下游:CTCCAATCTCTGCCTATCC	54
<i>IL-1</i>	上游:TGCAGAGTTCCTCAACTGCTACATC 下游:GTGCTGCCTAATGTCCCTTGAATC	64
<i>IL-6</i>	上游:TGCTGGTGACAACCACGGCC 下游:GTACTCCAGAAGACCAGAGG	60
<i>INF-α</i>	上游:AGGTTCTGTCCCTTTCACCTACTG 下游:AGAGAACCTGGGAGTCAAGGTA	60
<i>β-actin</i>	上游:TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC 下游:TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG	63

1.2.6 统计学分析 统计学处理结果以平均数±标准误差表示,采用SPSS 19.0软件中的单因素方差分析进行显著性检验,组间的两两比较采用LSD法。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

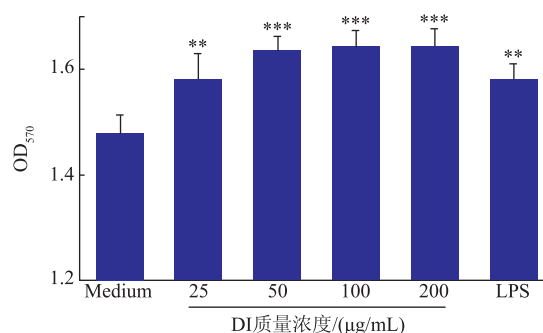
2.1 竹荪多糖对 RAW264.7 增殖的影响

巨噬细胞发挥免疫功能的基础是细胞的存活,存活的状态直接影响其功能的发挥及应答的强弱^[12]。活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶可以将外源性MTT还原为水不溶性蓝紫色结晶甲臜,而死细胞却无此功能。在一定细胞数量范围内,甲臜结晶形成的量与活细胞数量成正比,因此,通过测定反应后的吸光度可以判断活细胞的数量,也能在一定程度上反映细胞的活性能力。由图1可知,在25~200 μg/mL质量浓度范围内,竹荪多糖实验组吸光度与空白对照组相比较均有显著性差异($P<0.01$),与阳性对照组相比较均无显著性差异($P>0.05$),说明竹荪多糖在25~200 μg/mL质量浓度范围内具有促进巨噬细胞增殖的活性,无细胞毒性。

2.2 竹荪多糖对 RAW264.7 吞噬活性的影响

吞噬是巨噬细胞发挥其免疫作用的重要方式

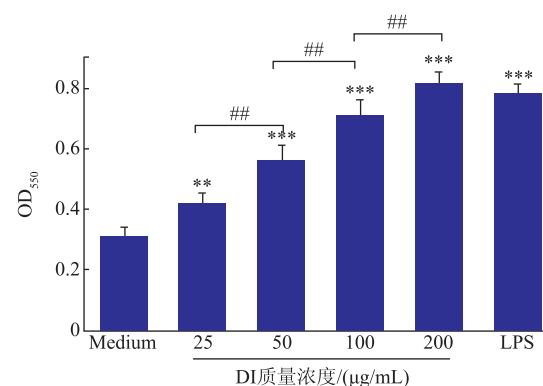
之一,巨噬细胞通过吞噬侵入的病原体和体内衰老、畸变的细胞而提高机体的抗感染能力^[12]。中性红吞噬实验结果见图2。



注:*** $P<0.001$,** $P<0.01$ 。

图1 竹荪多糖对 RAW264.7 增殖的影响

Fig. 1 DI induced proliferation of RAW264.7 cells



注:*** $P<0.001$,** $P<0.01$,## $P<0.01$ 。

图2 竹荪多糖对 RAW264.7 吞噬活性的影响

Fig. 2 Effects of DI on phagocytosis of RAW264.7 cells

在25~200 μg/mL质量浓度范围内,竹荪多糖实验组对RAW264.7细胞吞噬活性的影响明显高于空白对照组($P<0.01$),且吞噬活性随干预浓度的增加而增强;竹荪多糖质量浓度为200 μg/mL时,其对RAW264.7吞噬功能的促进作用与阳性对照组相比较无显著性差异($P>0.05$)。表明在25~200 μg/mL质量浓度范围内,竹荪多糖对RAW264.7细胞吞噬活性具有增强作用,且具有浓度依赖性。提示竹荪多糖对巨噬细胞的吞噬能力有上调作用,增强了巨噬细胞吞噬病原微生物的非特异性免疫反应能力。

2.3 竹荪多糖对 NO 分泌量的影响

NO是激活的巨噬细胞杀灭病原微生物及肿瘤细胞的主要效应分子,广泛参与机体多种生理及病理过程,其可通过作为信使分子以及发挥自身的细

胞毒性效应这两方面的作用来实现巨噬细胞免疫功能的增强^[13]。根据 Griess 法,得到 $OD_{540}(y)$ 与 NO_2^- 浓度(x)的标准方程为

$$y=0.007\ 6x-0.001\ 3 \quad (1)$$

测定样品的 OD_{540} 值,通过标准方程计算 NO_2^- 的浓度。图 3 结果显示:当竹荪多糖质量浓度为 25~200 $\mu\text{g/mL}$ 时,与空白对照组相比,实验组均能够极显著地增强巨噬细胞分泌 NO 的能力($P<0.001$);当竹荪多糖质量浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时,巨噬细胞分泌 NO 量最高,接近于阳性对照组($P>0.05$)。表明在 25~200 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内,竹荪多糖能激活巨噬细胞,提高其分泌 NO 的能力。适量 NO 的分泌是炎症反应初期机体对抗炎症的积极表现,从而实现机体免疫力的提高。

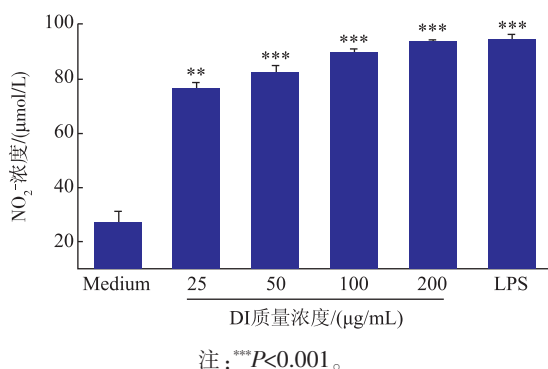


图 3 竹荪多糖对 NO 分泌量的影响

Fig. 3 Effects of DI on NO production in RAW264.7 cells

2.4 竹荪多糖对细胞因子分泌量的影响

当机体受外界因素刺激后,活化的巨噬细胞作为主要的非特异性免疫效应细胞,能够产生多种细胞因子($IL-1$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 等)参与免疫系统的调节,进一步启动特异性免疫反应,促进 T、B 淋巴细胞的增殖分化,增强 NK 细胞的杀伤功能,刺激免疫调节介质和炎症介质的表达^[14]。因此,通过考察多糖干预后巨噬细胞相关细胞因子的分泌情况,可以了解巨噬细胞的活化程度。

由图 4 可知,当质量浓度为 25~200 $\mu\text{g/mL}$ 时,竹荪多糖显著性促进巨噬细胞分泌 $IL-1$ ($P<0.001$);当质量浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时,竹荪多糖刺激巨噬细胞分泌 $IL-1$ 的量达到 99.07 ng/L,与阳性对照组(98.05 ng/L)相比无显著性差异($P>0.05$)。说明在 25~200 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内,竹荪多糖能激活巨噬细胞,提高其分泌细胞因子 $IL-1$ 的能力。

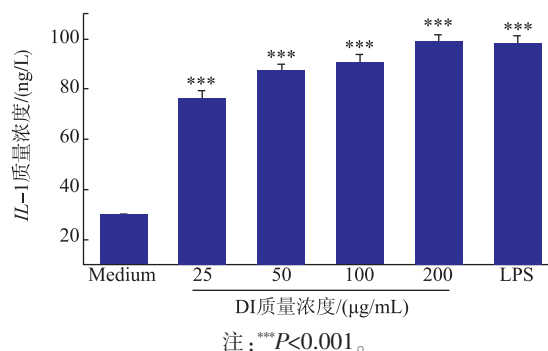


图 4 竹荪多糖对 $IL-1$ 分泌量的影响

Fig. 4 Effects of DI on $IL-1$ production in RAW264.7 cells

由图 5 可知,当质量浓度为 25~200 $\mu\text{g/mL}$ 时,竹荪多糖显著促进巨噬细胞分泌 $IL-6$ ($P<0.001$),并且随干预浓度的增加, $IL-6$ 分泌量增多 ($P<0.05$);当质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,竹荪多糖刺激巨噬细胞分泌 $IL-6$ 的量达到 102.11 pg/mL,与阳性对照组(104.79 pg/mL)相比无明显差异($P>0.05$)。说明在 25~200 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内,竹荪多糖能激活巨噬细胞,提高其分泌细胞因子 $IL-6$ 的能力,且呈浓度依赖性。

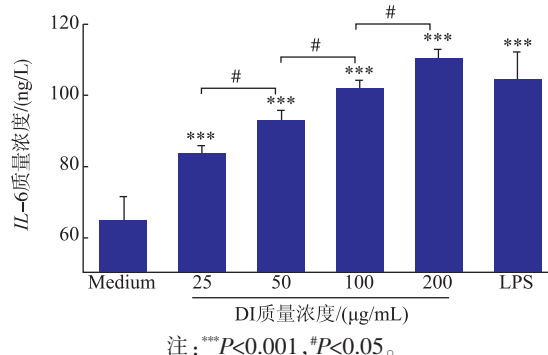


图 5 竹荪多糖对 $IL-6$ 分泌量的影响

Fig. 5 Effects of DI on $IL-6$ production in RAW264.7 cells

由图 6 可知,当质量浓度为 25~200 $\mu\text{g/mL}$ 时,竹荪多糖显著促进巨噬细胞分泌 $TNF-\alpha$ ($P<0.001$);当质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,竹荪多糖刺激巨噬细胞分泌 $TNF-\alpha$ 的量达到 758.03 ng/L,与阳性对照组的 786.17 ng/L 比较无明显差异($P>0.05$)。说明竹荪多糖可激活巨噬细胞,刺激 $TNF-\alpha$ 的分泌。

2.5 细胞因子 mRNA 的表达

mRNA 是基因与表达产物间的桥梁,大部分蛋白质表达水平和 mRNA 转录水平具有相关性。在多糖的干预下,巨噬细胞相关细胞因子 mRNA 表达的增强是提高其细胞因子分泌量的原因之一^[15]。 β -actin 是管家型基因,在所有组织中的表达相对持续

稳定。本实验以 β -actin 作为内参,运用 RT-PCR 技术考察了巨噬细胞相关细胞因子 mRNA 的表达情况。结果如图 7 所示。

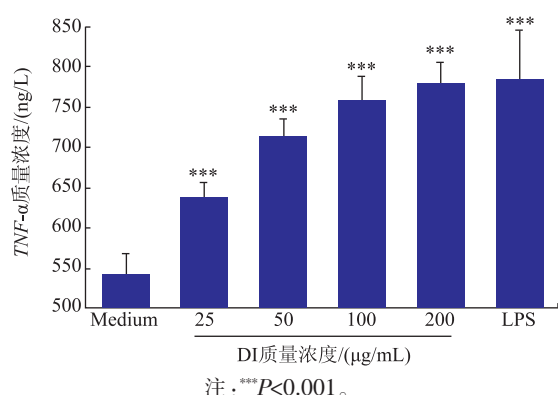


图 6 竹荪多糖对 $TNF-\alpha$ 分泌量的影响

Fig. 6 Effects of DI on $TNF-\alpha$ production in RAW264.7 cells

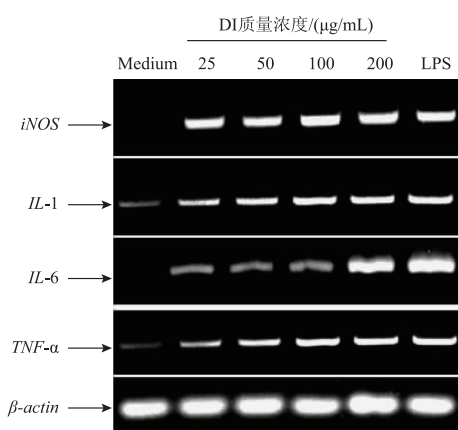


图 7 细胞因子 mRNA 的表达

Fig. 7 Effects of DI on cytokine gene expression by RAW264.7 cells

β -actin 各组间条带亮度相似,说明提取的总 RNA 量无显著性差异;与空白对照组比较,不同质量浓度的竹荪多糖干预巨噬细胞后 $iNOS$ 、 $IL-1$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ mRNA 的表达量都有不同程度的升高;当竹荪多糖质量浓度为 25 μ g/mL 时, $IL-1$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ mRNA 的表达量均较低;当竹荪多糖质量浓度为 200 μ g/mL 时, $iNOS$ 、 $IL-1$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 的条带亮度均与阳性对照组相似;巨噬细胞 $iNOS$ 、 $IL-1$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ mRNA 的表达量变化趋势与其分泌 NO、 $IL-1$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 的量相关,推测竹荪多糖可能通过在转录水平上调节 $iNOS$ 、 $IL-1$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ mRNA 的

表达,从而实现巨噬细胞 NO、 $IL-1$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 分泌的增加。

3 讨论

巨噬细胞是具有多种功能的免疫效应细胞,能够分泌促炎症细胞因子如 $IL-1$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 等,并且对病原微生物及癌细胞表现出较高的吞噬能力,在机体先天性免疫系统中发挥重要作用。 $TNF-\alpha$ 是由多种活化的免疫和非免疫细胞产生的促炎症细胞因子,是特异性免疫应答和炎症反应之间的重要连接纽带,在宿主防御机制中发挥重要的作用,可以直接杀伤肿瘤细胞,并且能够刺激一系列免疫调节介质和炎症介质的表达^[14]。 $IL-6$ 是一种多功能细胞因子,可以促进 T、B 细胞的增殖分化,促进 B 细胞的终末分化及分泌抗体^[16]。巨噬细胞受刺激活化时,释放的大量 NO 具有细胞毒作用,可杀伤肿瘤细胞,也可以诱发炎症反应保护机体抵御外界不利因素的侵害^[17]。 $IL-1$ 是活化巨噬细胞分泌的重要细胞因子,不仅能够促进 B 淋巴细胞分泌 $IL-12$,而且能够增强 NK 细胞的杀伤功能^[18]。

作者所在实验室前期采用热水浸提获得的竹荪子实体多糖为三螺旋构象 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖,体外无抗肿瘤细胞活性,而动物实验显示具有抑制肿瘤生长的效果^[8]。由此推测竹荪多糖是否是通过免疫增强效应实现其体内抗肿瘤活性。因此,本实验以巨噬细胞为模型,研究竹荪多糖的免疫活性,结果表明:在一定质量浓度范围内,竹荪多糖能够促进巨噬细胞增殖,增强其吞噬活性,促进其分泌 NO、 $IL-1$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$;与此同时,竹荪多糖还能增加巨噬细胞 $iNOS$ 、 $IL-1$ 、 $IL-6$ 和 $TNF-\alpha$ mRNA 的表达。据此推测,竹荪多糖是通过在转录水平上调节 $iNOS$ 、 $IL-1$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ mRNA 的表达,从而实现巨噬细胞 NO、 $IL-1$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 分泌的增加。

4 结语

作者所在实验室初步证明了竹荪多糖对巨噬细胞具有免疫调节作用,可以作为免疫调节剂应用于保健食品领域。然而,竹荪多糖激活巨噬细胞的机制仍不明了,如其与巨噬细胞表面何种受体结合,以及后续启动的信号通路有哪些等问题,需要作进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 郑杨,邹青青,张岱,等. 竹荪的化学成分及生理活性研究进展[J]. 食品科学与技术学报,2013,31(3):39-45.
ZHENG Yang,ZHOU Qingqing,ZHANG Dai,et al. Research progress on chemical composition and biological activities of *Dictyophora indusiata*[J]. **Journal of Food Science and Technology**,2013,31(3):39-45. (in Chinese)
- [2] 吴定涛,巨瑶君,陆静峰,等. 糖谱法比较不同产地竹荪多糖结构特征[J]. 食品科学,2014,35(13):98-102.
WU Dingtao,JU Yaojun,LU Jingfeng,et al. Characterization and comparison of polysaccharides from *Dictyophora indusiata* using saccharide mapping[J]. **Food Science**,2014,35(13):98-102. (in Chinese)
- [3] DENG C,HU Z,FU H T,et al. Chemical analysis and antioxidant activity in vitro of a β -D-glucan isolated from *Dictyophora indusiata*[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2012,51(1-2):70-75.
- [4] WU S H,GONG G L,WANG Y Y,et al. Response surface optimization of enzyme-assisted extraction polysaccharides from *Dictyophora indusiata*[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2013,61:63-68.
- [5] 丁瑞玲,令狐娅,郭春连,等. 竹荪多糖提取工艺及其对肿瘤抑制作用的研究[J]. 广州化工,2014,42(15):61-63.
DING Ruirui,LINGHU Ya,GUO Chunlian,et al. Optimization of extraction technique of *Bamboo Fungus* polysaccharide and its inhibition in tumor cells[J]. **Guangzhou Chemical Industry**,2014,42(15):61-63. (in Chinese)
- [6] HUA Y L,YANG B,TANG J,et al. Structural analysis of water-soluble polysaccharides in the fruiting body of *Dictyophora indusiata* and their in vivo antioxidant activities[J]. **Carbohydrate Polymers**,2012,87(1):343-347.
- [7] HUA Y L,GAO Q,WEN L R,et al. Structural characterisation of acid and alkali-soluble polysaccharides in the fruiting body of *Dictyophora indusiata* and their immunomodulatory activities[J]. **Food Chemistry**,2012,132(2):729-743.
- [8] DENG C,FU H T,TENG L P,et al. Anti-tumor activity of the regenerated triple-helical polysaccharide from *Dictyophora indusiata*[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2013,61:453-458.
- [9] 蔡海兰,黄晓君,聂少平,等. 铁皮石斛多糖对 RAW264.7 细胞分泌 TNF- α 的影响 [J]. 中国药理学通报,2012,28(11):1553-1556.
CAI Hailan,HUANG Xiaojun,NIE Shaoping,et al. Effects of polysaccharides from *Dendrobium Officinale* on the production of TNF- α by RAW264.7 cells[J]. **Chinese Pharmacological Bulletin**,2012,28(11):1553-1556. (in Chinese)
- [10] 张丽霞,张雅君,张丽萍. 灵芝多糖的提取纯化及其免疫活性 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2014,42(6):168-172.
ZHANG Lixia,ZHANG Yajun,ZHANG Liping. Extraction and purification of polysaccharide from *Ganoderma lucidum* and its immunological activities[J]. **Journal of Northwest A and F University (Nat Sci Ed)**,2014,42(6):168-172. (in Chinese)
- [11] ZANG C X,DAI Z R. Immunomodulatory activities on macrophage of a polysaccharide from *Sipunculus nudus* L [J]. **Food and Chemical Toxicology**,2011,49(11):2961-2967.
- [12] 叶莎莎,曾耀英,尹乐乐. 红景天苷对小鼠腹腔巨噬细胞体外增殖、凋亡、吞噬、ROS 和 NO 产生的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2011,27(3):237-241.
YE Shasha,ZENG Yaoying,YIN Lele. Effects of salidroside on proliferation,apoptosis,phagocytosis,ROS and NO production of murine peritoneal macrophages in vitro [J]. **Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology**,2011,27(3):237-241. (in Chinese)
- [13] 张晓红,董莉,杨雅欣,等. 紫金龙乙醇组分对脂多糖诱导的 RAW 264.7 细胞分泌炎症因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(21):149-152.
ZHANG Xiaohong,DONG Li,YANG Yaxin,et al. Effects of ethanol componentons from *Aconitum vilmorinianum* on inflammatory cytokines in LPS-stimulated RAW264.7 cell [J]. **Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae**,2014,20(21):149-152. (in Chinese)
- [14] 陈榕芳,吴小南,陈洁. 浒苔多糖粗提物调节巨噬细胞 RAW264.7 免疫功能研究[J]. 海峡预防医学杂志,2012,18(2):4-7.
CHEN Rongfang,WU Xiaonan,CHEN Jie. Study on regulation of immunity function of macrophage cell line RAW264.7 by crude polysaccharide extracted from *enteromorpha*[J]. **Strait Journal of Preventive Medicine**,2012,18(2):4-7. (in Chinese)
- [15] 程安玮. 甘草多糖的提取及对小鼠腹腔巨噬细胞的免疫调节[D]. 无锡:江南大学 食品学院,2008.
- [16] ISHIBASHI T,KIMURA H,SHIKAMA Y,et al. Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice [J]. **Blood**,1989,74(4):1241-1244.
- [17] KIM H S,KIM Y J,LEE H K,et al. Activation of macrophages by polysaccharide isolated from *Paecilomyces cicadae* through toll-like receptor 4[J]. **Food and Chemical Toxicology**,2012,50(9):3190-3197.
- [18] JANIK J E,MILLER L L,LONGO D L,et al. Phase II trial of interleukin-1 alpha and indomethacin in treatment of metastatic melanoma[J]. **Journal of the National Cancer Institute**,1996,88(1):44-49.