

红须腹菌多糖的提取、羧甲基化修饰及免疫活性研究

黄馨阅, 丁慧敏, 马士玄, 王秋艳, 陶明煊

(南京师范大学食品制药与工程学院, 江苏 南京 210023)

[摘要] 红须腹菌(*Rhizopogon rubescens* (Tul.) Tul) 是一类主要分布于中国云南省及福建省的根须腹菌属食用菌。本文以红须腹菌为原料提取红须腹菌多糖, 再加以羧甲基化修饰, 并通过体内动物实验对两种多糖的免疫活性进行比较研究。采用水提醇沉法提取红须腹菌多糖, 并通过氢氧化钠-氯乙酸体系对多糖进行羧甲基化修饰。以小鼠血清细胞因子含量, 血细胞数量, 单核巨噬细胞吞噬能力及脏器组织形态作为指标评价两种多糖的免疫活性。研究结果表明, 红须腹菌多糖总糖含量为 92.06%, 羧甲基的取代度为 0.352。红须腹菌多糖及羧甲基多糖均对环磷酰胺造成的小鼠脏器指数下降, 部分血清细胞因子含量减少, 造血功能及巨噬细胞吞噬能力减弱, 以及脾脏和胸腺的组织损伤有较为显著的缓解作用, 其中以羧甲基多糖效果更佳。这表明红须腹菌多糖及羧甲基化多糖均具有一定的免疫调节功效, 且羧甲基化多糖的体内免疫活性更为显著。

[关键词] 红须腹菌, 多糖, 羧甲基化修饰, 免疫调节活性

[中图分类号] TS201.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2023)03-0060-09

Extraction, Carboxymethylation Modification and *in Vivo* Immunomodulatory Effects of Polysaccharides from *Rhizopogon Rubescens* (Tul.) Tul

Huang Xinyue, Ding Huimin, Ma Shixuan, Wang Quiyan, Tao Mingxuan

(School of Food Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: *Rhizopogon rubescens* (Tul.) Tul is a kind of edible fungi of the *Rhizopogon*, which is mainly distributed in Yunnan and Fujian provinces of China. The primary polysaccharide fraction from *Rhizopogon rubescens* (Tul.) Tul (PPRR) was extracted by ultrasonic-assisted hot water extraction. Then the PPRR was modified by carboxymethylation to obtain carboxymethyl polysaccharide (CM-PPRR), and the immune activities of the two polysaccharides were compared by animal experiments *in vivo*. The immune activities of the two polysaccharides were evaluated by the content of serum cytokines, the number of blood cells, the phagocytic ability of mononuclear macrophages and the morphology of organs. The results show that the total sugar content of polysaccharide was 92.06%, and the degree of substitution of carboxymethyl was 0.352. *In vivo* experiments show that both the PPRR and CM-PPRR can significantly alleviate the decline of organ index, the content of some serum cytokines, the weakening of hematopoietic function and macrophage phagocytosis, and the tissue damage of spleen and thymus caused by cyclophosphamide (CPA), especially CM-PPRR. It showed that both PPRR and CM-PPRR had certain immunomodulatory effects, and CM-PPRR had more significant immune activity *in vivo*.

Key words: *Rhizopogon rubescens* (Tul.) Tul, polysaccharide, carboxymethylation modification, immunomodulatory activity

红须腹菌(*Rhizopogon rubescens* (Tul.) Tul), 又名红包根菌, 归属于腹菌纲, 层腹菌目, 腹菌科, 根须腹菌属, 一般生长于针叶树下, 为树木外生菌。红须腹菌子实体中富含多种物质, 如蛋白质, 多糖, 酚类等。研究显示, 该菌具有一定的抗癌活性^[1]。但目前有关红须腹菌结构修饰及其免疫调节活性方面的研究鲜有报道。本研究采用超声波辅助热水浸提法提取红须腹菌多糖, 同时利用氢氧化钠-氯乙酸体系对其进行羧甲基化修饰, 并通过体内动物实验研究了两种多糖可能的免疫调节功效, 以期红须腹菌多糖类保健食品的开发提供实验基础和理论参考, 从而促进红须腹菌的深度开发利用。

收稿日期: 2023-01-06.

基金项目: 浙江省动物蛋白食品精深加工技术重点实验室开放基金项目。

通讯作者: 陶明煊, 硕士, 副教授, 研究方向: 生物活性物质及保健功能因子。E-mail: 45017@njnu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验动物和材料

红须腹菌(*Rhizopogon rubescens* (Tul.) Tul)子实体,购自大理市云芝之家。

ICR 雄性小鼠,体重 33~37 g,70 只,许可证编号 SYXK(苏)2020-0047,购自杭州子源实验动物科技有限公司。

DEAE-Cellulose 52, Sephadex G-75, 上海源叶生物科技有限公司;葡萄糖标准品,国药集团化学试剂有限公司;香菇多糖,上海源叶生物科技有限公司;注射用环磷酰胺,百特肿瘤制药有限公司;Elisa 试剂盒,南京建成生物工程研究所。其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

JY92-IIN 超声波细胞破碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;RE-52AA 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;ZQTY-70N 振荡培养箱,上海知楚仪器有限公司;YD-6L 型全自动生物组织包埋机,浙江金华益迪医疗设备厂;LEICA RM2135 石蜡切片机,德国 Leica 公司;BioTek ELX80 酶标仪,上海东风电讯仪器厂;Coulter LH755 血液分析仪,美国 Beckman Coulter 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 红须腹菌多糖的制备

1.3.1.1 提取方法

将红须腹菌子实体置于 50 ℃ 恒温干燥箱中烘干至恒重,粉碎后过 80 目筛。取 10 g 红须腹菌干粉,按料液比 1:30 加入蒸馏水进行超声破碎(200 w, 20 min)。85 ℃ 水浴浸提 3 h 后离心(10 000 g, 15 min),取上清液减压浓缩至原体积的四分之一。用总浓度为 76% 的乙醇沉淀多糖,4 ℃ 静置 12 h 后离心(10 000 g, 10 min),收集沉淀物于 55 ℃ 烘箱中烘干至恒重。沉淀物复溶后通过 Sevage 法去除蛋白质,重复操作多次直至复溶液中无明显蛋白层。复溶液减压蒸发除去有机试剂后流水透析(截留量为 3500 Da)48 h,冷冻干燥后得到红须腹菌粗多糖。

1.3.1.2 红须腹菌多糖的分离和纯化

取 5 mL 5 mg/mL 红须腹菌粗多糖溶液以 1 mL/min 的流速通过 DEAE-Cellulose 52 进行分离,使用 0~0.5 mol/L NaCl 作为洗脱液,每管收集 5 mL。收集的样品采用苯酚-硫酸法进行隔管检测,绘制 DEAE-Cellulose 52 洗脱曲线,收集洗脱峰管中液体浓缩至适当体积后透析(截留量为 3500 Da)48 h 并进行冷冻干燥。干燥后的样品继续用 Sephadex G-75 进行分离。采用蒸馏水以 0.2 mL/min 的流速进行洗脱,每管收集 2 mL,收集洗脱峰管中的液体进行蒸发浓缩,冷冻干燥,得到红须腹菌纯化多糖样品。

1.3.1.3 总糖含量的测定

总糖含量的测定采用苯酚-硫酸法^[2],以无水葡萄糖作为标准品。

标准曲线的制作:称取恒重的无水葡萄糖 10 mg,用蒸馏水溶解后于 100 mL 容量瓶中进行定容。取 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mL 0.1 mg/mL 葡萄糖溶液于试管中,蒸馏水补齐至 0.5 mL,加入 0.5 mL 5% 苯酚,涡旋混匀,再加入 2.5 mL 浓硫酸,摇匀后室温静置 10 min,以第一管作为空白,于 490 nm 处测定吸光度,以葡萄糖浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标,吸光度 A 为纵坐标,绘制标准曲线。

多糖样品中的总糖含量测定:取 0.5 mL 多糖溶液,加入 0.5 mL 5% 苯酚摇匀后,沿管壁加入 2.5 mL 浓硫酸,振荡摇匀,静置 10 min 后于 490 nm 处测定吸光度,代入标准曲线计算总糖含量。

1.3.2 羧甲基化多糖的制备

1.3.2.1 制备方法

红须腹菌纯多糖的羧甲基化修饰根据文献报道的方法^[3]进行适当修改。称取 0.1 g 纯化多糖,用 10 mL 无水乙醇进行搅拌溶解 30 min,在 50 ℃ 下加入 6 mL 15% NaOH 溶液,搅拌 1 h。最后再加入 0.5 g 氯乙酸进行醚化,60 ℃ 搅拌 3 h,冷却至室温后,冰乙酸调 pH 至中性,蒸馏水透析(截留量为 3500 Da)72 h,减压浓缩至原体积的四分之一,加入四倍体积 95% 乙醇进行醇沉,离心(10 000 g, 10 min)后取沉淀用蒸馏水冲洗,冷冻干燥后得到羧甲基化多糖。

1.3.2.2 羧甲基取代度的测定

参照文献报道的方法^[4]并对其进行一定的修改. 准确称取 10 mg 纯多糖加入 2 mL 2 mol/L HCl 进行溶解,搅拌 3.5 h 后离心去除上清液,残渣用甲醇冲洗多次后溶于 50 mL 0.5 mol/L NaOH 溶液中,60 ℃水浴至完全溶解,用 0.1 mol/L HCl 进行滴定,酚酞作为指示剂,以溶液中红色消失作为滴定终点.

$$\text{取代度}=\frac{0.162(C_1V_1-C_2V_2)}{1-0.058(C_1V_1-C_2V_2)}$$

(1)

式中, C_1 为 NaOH 浓度, V_1 为 NaOH 体积, C_2 为 HCl 浓度, V_2 为消耗的 HCl 体积.

1.3.3 红须腹菌多糖及羧甲基化多糖的红外光谱(FT-IR)测定

取 5 mg 多糖经 KB 压片后利用傅里叶红外光谱仪在 4 000~400 cm^{-1} 波长范围内进行扫描(仪器分辨率为 4 cm^{-1} ,扫描 32 次).

1.3.4 小鼠模型的建立与分组

参照文献^[5],将 70 只五周龄 ICR 雄性小鼠随机均分为空白对照组,实验组(模型对照组,阳性对照组,纯多糖低、高剂量组,羧甲基多糖低、高剂量组)共 7 组. 给药情况如表 1 所示. 给药 14 d 结束后,各组小鼠禁食 12 h,称量体重,颈椎处死小鼠.

表 1 动物分组及给药

Table 1 Animal grouping and administration

组别	腹腔注射(第 1-3 d)	灌胃(第 1-14 d)
空白对照组	生理盐水	生理盐水
模型对照组	70 mg CPA/kg bw·d	生理盐水
阳性对照组	70 mg CPA/kg bw·d	50 mg LNT/kg bw·d
PPRR 低剂量组	70 mg CPA/kg bw·d	25 mg PPRR/kg bw·d
PPRR 高剂量组	70 mg CPA/kg bw·d	100 mg PPRR/kg bw·d
CM-PPRR 低剂量组	70 mg CPA/kg bw·d	25 mg CM-PPRR/kg bw·d
CM-PPRR 高剂量组	70 mg CPA/kg bw·d	100 mg CM-PPRR/kg bw·d

1.3.5 脾脏和胸腺组织形态学的观察

取小鼠脾脏和胸腺放入 4%多聚甲醛溶液中进行固定,经洗涤、脱水、透明、浸蜡后进行包埋、切片. 石蜡切片经脱蜡后用不同梯度浓度的乙醇(至水)进行水洗,苏木素染色 5 min,蒸馏水水洗,切片浸泡在 1%盐酸乙醇中分化 2 s,蒸馏水水洗 10 min,在 0.5%伊红液中染色 2 min. 最后进行常规脱水、透明、树脂封片后置于显微镜上进行观察拍照.

1.3.6 体重及脏器指数的测定

称量小鼠体重及脏器重量后,按下式计算脏器指数.

$$\text{脏器指数}=\frac{\text{脏器重量}(\text{mg})}{\text{小鼠体重}(\text{g})}$$

(2)

1.3.7 小鼠血清细胞因子的测定

取小鼠眼眶后静脉丛血于 EP 管中,室温静置 1 h 后离心(3 000 g,10 min),得到血清. 利用 Elisa 试剂盒检测肿瘤坏死因子(TNF- α)、 γ -干扰素(IFN- γ)及细胞白介素-2(IL-2)含量.

1.3.8 造血功能的测定

采小鼠眼眶血于抗凝管中,在 12 h 内用全血细胞仪进行白细胞(WBC)、红细胞(RBC)和血小板(PLT)的计数.

1.3.9 单核巨噬细胞吞噬功能的测定

单核巨噬细胞的吞噬功能采用碳粒廓清试验^[6]来进行测定. 第 14 d 对小鼠进行末次灌胃 2 h 后,于小鼠尾静脉注射印度墨汁溶液(印度墨汁:生理盐水=1:5),注射量为 0.1 mL/10 g bw. 在注射后的 2 min 和 10 min 分别从小鼠的眼眶采血 20 μL 加入到 2 mL 0.1% Na_2CO_3 溶液中. 混匀后,以 0.1% Na_2CO_3 溶液为空白,在 630 nm 处测定其吸光度. 取血后,按照动物伦理要求对小鼠进行颈椎处死,解剖取其肝脏和脾脏,按照式(3)计算小鼠的单核-巨噬细胞吞噬指数.

$$K=(\lg OD_1-\lg OD_2)/(t_2-t_1)$$

$$\text{吞噬指数}\alpha=\text{体重}/\text{肝重}+\text{脾重}\times\sqrt[3]{K}$$

(3)

式中, K 为廓清指数, t_1 为第一次眼球取血时间(2 min), t_2 为第二次眼球取血时间(10 min), OD_1 为 t_1 时样品的吸光度, OD_2 为 t_2 时样品的吸光度, α 为校正廓清指数.

1.3.10 数据处理和统计

采用 SPSS 25.0 统计软件对数据进行处理和显著性分析,数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm SD$)表示.

2 结果与分析

2.1 红须腹菌多糖的制备

采用 DEAE-Cellulose 52 对红须腹菌粗多糖进行第一阶段的分离纯化,用苯酚-硫酸法隔管测定多糖含量. DEAE-Cellulose 52 洗脱曲线见图 1. 采用蒸馏水以 1 mL/min 的固定洗脱速度进行洗脱,得到中性红须腹菌多糖(neutral refined polysaccharide from *Rhizopogon rubescens*, RPRR-Z). 采用 0~0.5 mol/L NaCl 溶液逐级进行浓度梯度洗脱,得到含量最高的酸性红须腹菌多糖(acid refined polysaccharide from *Rhizopogon rubescens*, RPRR-S). 使用 Sephadex G-75 对 RPRR-S 进行进一步纯化. 用去离子水以 0.2 mL/min 的流速进行洗脱,洗脱曲线见图 2. 收集含量较多的组分(purified polysaccharide from *Rhizopogon rubescens*, PPRR)进行冷冻干燥,最终得到红须腹菌纯化多糖. 使用苯酚-硫酸法测定了 RPRR-S 及 PPRR 的总糖含量,分别为 80.61% 和 92.06%.

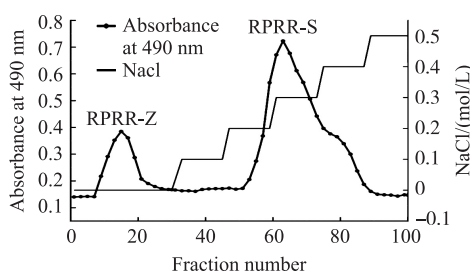


图 1 RPRR 的 DEAE-Cellulose 52 色谱柱洗脱图

Fig. 1 DEAE-Cellulose 52 column elution diagram of RPRR

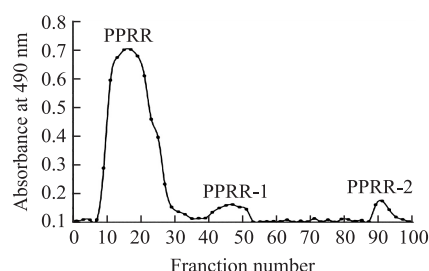


图 2 PPRR 的 Sephadex G-75 色谱柱洗脱图

Fig. 2 Sephadex G-75 column elution of PPRR

2.2 红须腹菌羧甲基多糖的制备

采用水媒法^[7]对 PPRR 进行了羧甲基化修饰,得到羧甲基化多糖(carboxymethyl purified polysaccharide from *Rhizopogon rubescens*, CM-PPRR),并对其进行了羧甲基取代度的测定,经测定该多糖羧甲基取代度为 0.352.

2.3 PPRR 及 CM-PPRR 的红外光谱分析

PPRR 和 CM-PPRR 的红外光谱图见图 3. PPRR 和 CM-PPRR 的红外光谱吸收峰位置虽发生了移动,但大体相似,可能是因为多糖分子中引入了羧甲基基团. 3 600~3 200 cm^{-1} 和 3 000~2 800 cm^{-1} 区域为—OH 和—CH 引起的多糖特征吸收峰^[8]. 与 PPRR 的红外峰相比,CM-PPRR 在 3 438 cm^{-1} 处的吸收峰变宽,表明羧甲基基团的引入加强了羟基的缔合作用^[9]. 在 1 626 cm^{-1} 、1 427 cm^{-1} 和 1 377 cm^{-1} 处出现了新的较强吸收峰,其中 1 626 cm^{-1} 处为—C=O 非对称伸缩振动,1 427 cm^{-1} 处为—C=O 对称伸缩振动,1 377 cm^{-1} 处为—CH₂COOH 中 CH 的伸缩振动,三者都是羧甲基的特征吸收峰^[10-11]. CM-PPRR 的其余吸收峰与 PPRR 相似,表明红须腹菌酸多糖在分子结构不变的情况下成功引入了羧甲基基团.

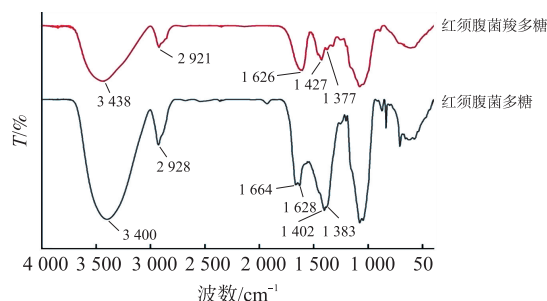


图 3 PPRR 的 FT-IR 谱图

Fig. 3 FT-IR spectrum of PPRR

2.4 PPRR 和 CM-PPRR 体内免疫活性分析

2.4.1 PPRR 及 CM-PPRR 对小鼠脾脏和胸腺的影响

2.4.1.1 小鼠脏器指数的测定

脾脏和胸腺作为机体重要的免疫器官,可以较好地反映机体的免疫功能^[12]. 胸腺是机体的中心免疫器官,是 T 细胞分化、发育和成熟的场所. 健康的脾脏为身体提供抗炎、抗肿瘤因子、自然杀伤细胞和不同类型的 Th 细胞,帮助身体避免各种病毒和细菌的感染^[13-14]. 当机体免疫功能增强时免疫器官的重量会随免疫细胞的增殖分化而增加,反之则减少. 所以测定小鼠的胸腺、脾脏指数可以间接反映样品对小鼠免疫系统的调节作用^[15-17].

如图 4 所示,在注射环磷酰胺(cyclophosphamide, CPA)后,模型组小鼠胸腺和脾脏指数分别下降至空白对照组的 55.0% 及 72.1%. 而在灌胃适当浓度的 PPRR (1,6 mg/mL) 后,胸腺和脾脏指数均呈现剂量依

赖性增加,在 1 mg/mL、6 mg/mL 浓度下,胸腺和脾脏指数分别为模型组的 123.8%、111.5%、148.6%及 120.0%。而 CM-PPRR 各剂量组脏器指数较模型对照组也有显著上升($P<0.05$),且与 CM-PPRR 浓度呈正相关关系。对比 PPRR,CM-PPRR 对免疫抑制型小鼠脏器指数的影响更为显著($P<0.05$)。上述结果表明 PPRR 和 CM-PPRR 均可通过减少免疫抑制剂对胸腺和脾脏的伤害而发挥免疫调节的作用,其中 CM-PPRR 的作用更为显著。

2.4.1.2 小鼠胸腺和脾脏的形态学观察

对脾脏和胸腺进行形态学观察可以更加直观地了解样品对小鼠脾脏和胸腺造成的影响,从而进一步验证通过研究脏器指数得到的结论^[18-19]。其中 HE 图像是用来评估免疫器官损伤的常规方法之一,可以较为直接地探究器官的免疫抑制状态^[20]。

如图 5 A 所示,空白对照组小鼠脾脏中红髓和白髓分界明显,在白髓中央可见中央动脉,脾小梁不规则

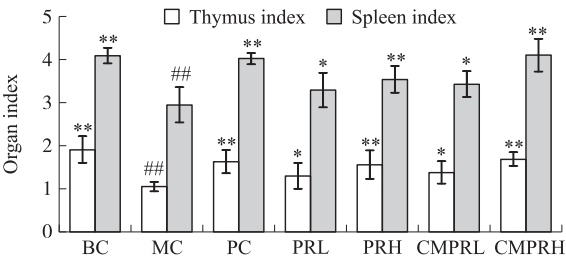
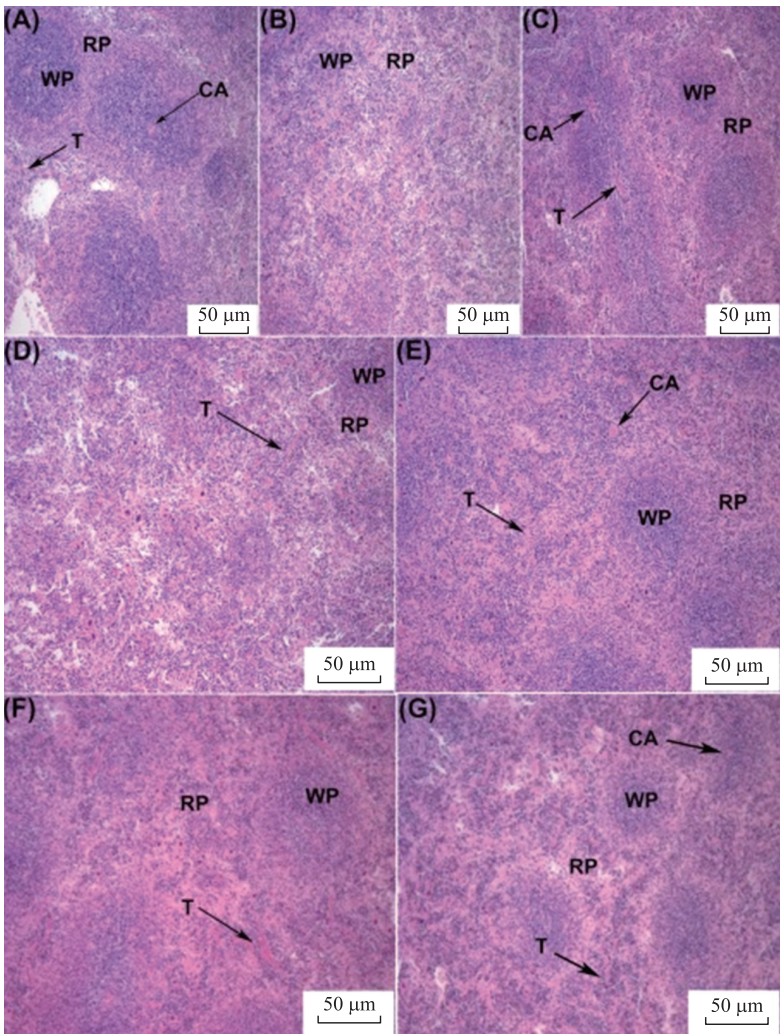


图 4 PPRR 和 CM-PPRR 对小鼠脏器指数的影响($n=5$)

Fig. 4 Effect of PPRR and CM-PPRR on organ index in mice($n=5$)

#表示与空白组对比,*表示与模型对照组相比,##和*表示 $P<0.05$,##和**表示 $P<0.01$ 。

BC:空白对照组;MC:模型对照组;PC:阳性对照组;PRL:PPRR 低剂量组;PRH:PPRR 高剂量组;CMPRL:CM-PPRR 低剂量组;CMPRH:CM-PPRR 高剂量组。



注:WP:white pulp,白髓;RP:red pulp;红髓;T:trabeculae,脾小梁;CA:central arteriole,中央动脉。

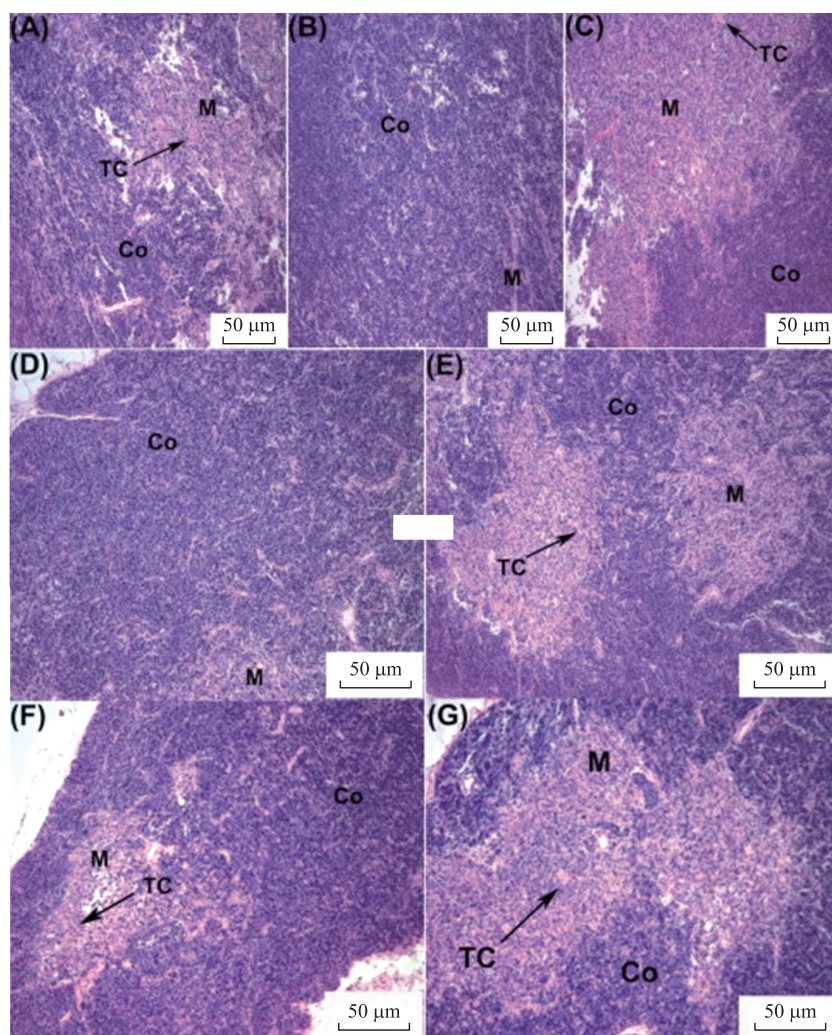
图 5 PPRR 和 CM-PPRR 对小鼠脾脏组织病理变化的影响(HE 染色,×100)

Fig. 5 Effect of PPRR and CM-PPRR on pathological changes of spleen in mice(HE staining,×100)

A.空白对照组;B.模型对照组;C.阳性对照组;D.PPRR 低剂量组;E.PPRR 高剂量组;F.CM-PPRR 低剂量组;G.CM-PPRR 高剂量组。

分布在脾脏中. 白髓染色深表明含有较多的淋巴细胞. 而模型组小鼠脾脏白髓和红髓结构混乱,二者间无明显界线,未见中央动脉和脾小梁,白髓颜色变浅表明淋巴细胞大量减少,小鼠脾脏发生严重病变(图5 B). 如图5 C所示,阳性对照组小鼠脾脏白髓和红髓的界线变明显,白髓染色变深,可见中央动脉和脾小梁,但清晰度较空白对照组略低,可见实验浓度下的香菇多糖(lentinan, LNT)对免疫抑制型小鼠的脾脏组织具有保护作用,但无法使脾脏恢复到正常状态. 而PPRR低剂量组小鼠脾脏中的红髓和白髓界线逐渐清晰,但清晰度不及空白对照组,可见脾小梁. 白髓的面积较少且染色较浅,说明淋巴数量较少. 与模型对照组相比,小鼠的脾脏损伤有所改善,说明PPRR对免疫抑制型小鼠具有一定的保护作用(图5 D). 图5 E中PPRR高剂量组小鼠脾脏组织中白髓与红髓的界线与PPRR低剂量组相比更加清晰,可见明显的中央动脉和脾小梁,白髓面积变大且染色变深,表明PPRR对免疫抑制型小鼠的脾脏保护作用呈剂量-效应关系. 与PPRR低剂量组相比,CM-PPRR低剂量组小鼠脾脏组织中的白髓和红髓界线更为清晰,白髓的面积变大且染色变深,可见脾小梁,未见中央动脉(图5 F). 上述结果表明在同等浓度下,CM-PPRR对免疫抑制型小鼠脾脏的保护作用强于PPRR. 图5 G中CM-PPRR高剂量组小鼠脾脏组织中的红髓和白髓界线明显,可见明显的中央动脉和脾小梁,表明CM-PPRR对免疫抑制型小鼠脾脏的保护作用与多糖样品浓度呈现剂量-效应关系.

CPA、PPRR、CM-PPRR对小鼠胸腺的影响如图6所示. 空白对照组小鼠胸腺组织中皮质和髓质的分界明显,髓质中可见明显的胸腺小体,未见组织坏死现象(图6 A). 而模型对照组则与之相反,模型组小鼠胸腺皮质和髓质之间没有明显界线,髓质大面积减少,未发现胸腺小体,说明CPA对小鼠的胸腺造成了一



注:Co;cortex,皮质;M;medulla,髓质;TC:thymic corpuscle,胸腺小体.

图6 PPRR和CM-PPRR对小鼠胸腺组织病理变化的影响(HE染色,×100)

Fig. 6 Effect of PPRR and CM-PPRR on pathological changes of thymus in mice(HE staining, ×100)

A.空白对照组;B.模型对照组;C.阳性对照组;D.PPRR低剂量组;E.PPRR高剂量组;F.CM-PPRR低剂量组;G.CM-PPRR高剂量组.

定的损伤(图 6 B). 如图 6 C 所示,与模型对照组相比,阳性对照组小鼠胸腺皮质和髓质的分界更为明显,可见清晰的胸腺小体,表明 LNT 可在一定程度上恢复了免疫抑制剂对小鼠胸腺造成的损伤. 如图 6 D 所示,PPRR 低剂量组小鼠胸腺较模型组而言皮质和髓质界线的清晰度略有提升,髓质的面积变大,这表明 PPRR 对免疫抑制型小鼠的胸腺有一定的保护作用. 而 PPRR 高剂量组(图 6 E)与 PPRR 低剂量组相比,髓质和皮质的分界线更加明显,且髓质的面积更大,表明 PPRR 对免疫抑制型小鼠胸腺的保护作用呈浓度依赖关系. 相较于 PPRR 低剂量组,CM-PPRR 低剂量组小鼠胸腺中皮质与髓质之间的界线更加明显,且髓质的面积更大,表明在同样的浓度下,CM-PPRR 具有比 PPRR 更强的胸腺保护作用(图 6 F). 如图 6 G 所示,CM-PPRR 高剂量组与 CM-PPRR 低剂量组相比,小鼠皮质与髓质的分界线更加清晰且髓质的面积更大,表明 CM-PPRR 对免疫抑制型小鼠胸腺的保护作用随着浓度的增加而增加.

2.4.2 小鼠血清细胞因子的测定

细胞因子在免疫系统中发挥重要作用,其含量也可较直观地反映机体免疫系统的状态^[21-22]. IL-2, TNF- α , IFN- γ 等细胞因子在细胞内病原体防御方面扮演重要角色^[23]. 若免疫抑制剂使免疫系统受损,则血清中的细胞因子如 IL-2, TNF- α 等含量也会明显下降^[24-25]. 如图 7 所示,在向小鼠注射 CPA 后,模型组细胞因子(IL-2、IFN- γ 、TNF- α)的分泌较空白组都有明显降低($P<0.01$),表明实验建立免疫抑制模型成功. LNT 已被证实具有较好的免疫调节作用^[26],能有效促进细胞因子的分泌,故选用 LNT 作为阳性对照.

由图 7 可知,PPRR 以浓度依赖性方式增强着 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 的分泌. 其中当 PPRR 浓度达到 6 mg/mL 时,IL-2、IFN- γ 、TNF- α 的浓度可达 210.59、543.76、436.23 pg/mL,分别为模型组的 1.98、1.55、1.69 倍及阳性对照组的 1.02、0.84、0.98 倍. 同样地,CM-PPRR 也以浓度依赖性方式增强着 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 的分泌. CM-PPRR 高剂量组较低剂量组三种细胞因子(IL-2、IFN- γ 、TNF- α)含量分别上升了 31.1%、32.4%及 22.5%. 并且 CM-PPRR 各剂量组的三种细胞因子含量较 PPRR 各剂量组都有显著提高($P<0.05$). 其中 CM-PPRR 高剂量组 IL-2 及 TNF- α 含量均达到了阳性对照组水平. 上述结果表明,PPRR 及 CM-PPRR 可促进 IL-2、IFN- γ 等细胞因子的分泌,从而实现免疫调节作用,并且在一定浓度范围内促进作用与 LNT 相差不大. 而对 PPRR 进行羧甲基化修饰后此促进作用显著提高.

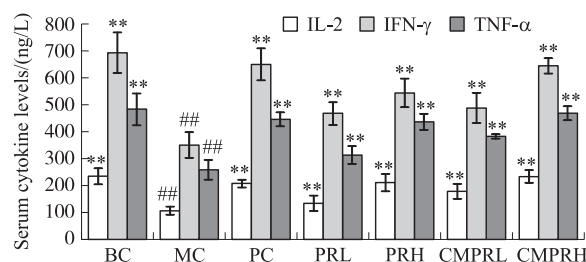


图 7 红须腹菌多糖及羧甲基多糖对小鼠血清中细胞因子含量的影响($n=5$)

Fig. 7 Effect of PPRR and CM-PPRR on the concentration of IL-2, IFN- γ and TNF- α serum of mice($n=5$)

#表示与空白组对比, *表示与模型对照组相比, ##和 **表示 $P<0.01$.

BC:空白对照组;MC:模型对照组;PC:阳性对照组;PRL:PPRR 低剂量组;PRH:PPRR 高剂量组;CMPRL:

CM-PPRR 低剂量组;CMPRH:CM-PPRR 高剂量组.

2.4.3 小鼠血细胞的测定

CPA 具有的细胞毒性可损伤细胞核 DNA 或干扰 DNA 的合成,从而抑制骨髓造血干细胞的分化和增殖,产生骨髓抑制,对机体造血功能造成不良影响^[27-28].

如图 8-10 所示,造模后 WBC、RBC、PLT 的数目都有所降低,证实 CPA 可在一定程度上抑制骨髓干细胞的增殖. 而在所测试的浓度范围内(1~6 mg/mL),PPRR 可在一定程度上增强骨髓干细胞的增殖能力,且呈现一定的剂量-效应关系. 其中在 PPRR 浓度达到 6 mg/mL 时,WBC、RBC、PLT 数量可达 5.4×10^9 /mL、 8.53×10^{12} /mL、 8.94×10^{11} /mL,分别为模型组的 1.21、1.78、1.61 倍和阳性组的 0.86、1.02、0.88 倍. 对 CM-PPRR 而言,其同样以浓度依赖的方式影响着血细胞的增殖,并且影响作用与 PPRR 各剂量组差别不大($P>0.05$). 上述结果表明,PPRR 及 CM-PPRR 可减轻 CPA 对骨髓的抑制作用,有利于骨髓造血功能的恢复.

2.4.4 单核-巨噬细胞吞噬功能的测定

巨噬细胞是重要的吞噬细胞,在宿主防御系统中有着重要作用,不仅能够启动先天免疫应答,还能够

参与细胞免疫应答^[29-30]。巨噬细胞被激活后可以吞噬致病微生物,加工呈递抗原,同时合成和分泌趋化因子和细胞因子,增强机体的免疫防御功能,可以用来评价机体的非特异性免疫状态^[31-32]。

如图 11 所示,模型组吞噬指数较空白组降低了 18.1%,表明 CPA 对巨噬细胞的吞噬功能造成了一定的影响。而与模型组相比,PPRR 以浓度依赖方式增强了巨噬细胞的吞噬作用。当 PPRR 浓度达 6 mg/mL 时,吞噬指数可达模型组的 1.09 倍。与 PPRR 各剂量组相比,CM-PPRR 各剂量组的吞噬指数都有所上升,其中 CM-PPRR 高剂量组吞噬指数极显著上升($P<0.01$)。上述结果表明,PPRR 及 CM-PPRR 均可提高巨噬细胞活力,增强其吞噬能力,且多糖经过羧甲基化修饰后效果更佳。

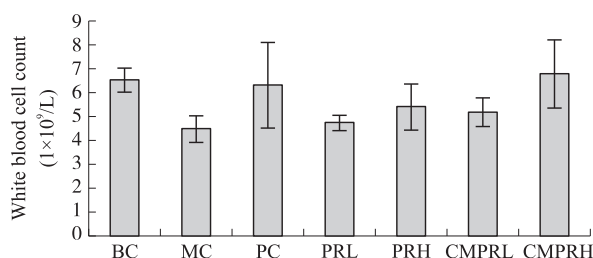


图 8 红须腹菌多糖及羧甲基多糖对小鼠外周白细胞数量的影响($n=6$)

Fig. 8 Effect of PPRR and CM-PPRR on the number of peripheral white blood cell (WBC) in mice ($n=6$)

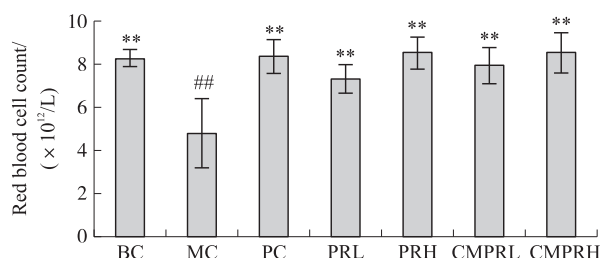


图 9 红须腹菌多糖及羧甲基多糖对小鼠外周红细胞数量的影响($n=6$)

Fig. 9 Effect of PPRR and CM-PPRR on the number of peripheral red blood cell (RBC) in mice ($n=6$)

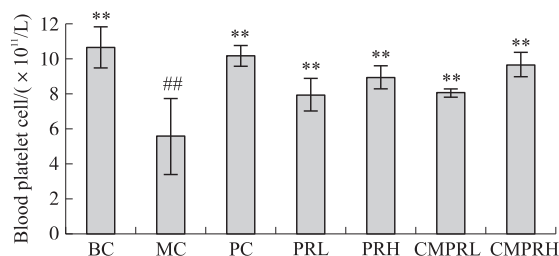


图 10 红须腹菌多糖及羧甲基多糖对小鼠外周血小板数量的影响($n=6$)

Fig. 10 Effect of PPRR and CM-PPRR on the number of peripheral blood platelet (PLT) in mice ($n=6$)

#表示与空白组对比,*表示与模型对照组相比,##和**表示 $P<0.01$ 。

BC:空白对照组;MC:模型对照组;PC:阳性对照组;PRL:PPRR 低剂量组;PRH:PPRR 高剂量组;CMPRL:CM-PPRR 低剂量组;CMPRH:CM-PPRR 高剂量组。

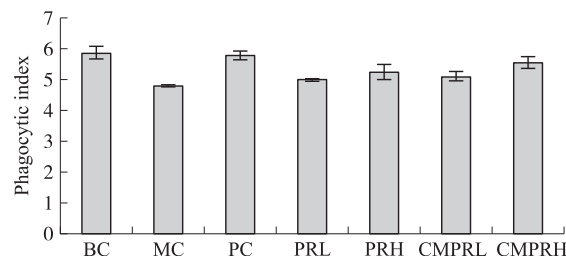


图 11 红须腹菌多糖及羧甲基多糖对小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能的影响($n=3$)

Fig. 11 Effect of PPRR and CM-PPRR on phagocytosis of monocyte-macrophage in mice ($n=3$)

#表示与空白组对比,*表示与模型对照组相比,##和**表示 $P<0.05$,##和**表示 $P<0.01$ 。

BC:空白对照组;MC:模型对照组;PC:阳性对照组;PRL:PPRR 低剂量组;PRH:PPRR 高剂量组;CMPRL:CM-PPRR 低剂量组;CMPRH:CM-PPRR 高剂量组。

3 结论

本研究采用超声波辅助热水浸提法提取出红须腹菌多糖,并通过水媒法对其进行了羧甲基化的修饰,测得红须腹菌多糖总糖含量为 92.06%。PPRR 及 CM-PPRR 都具有较好的免疫调节活性,二者均能显著提高免疫抑制型小鼠血清中细胞因子含量和血细胞数量,显著提升单核巨噬细胞的吞噬能力,且能在一定程度上恢复 CPA 对小鼠脾脏和胸腺造成的损伤,其中 CM-PPRR 的免疫活性更佳。

[参考文献]

- [1] 才晓玲. 常见食用菌简介[M]. 北京:中国农业出版社,2018:180-181.
- [2] 刘江英. 锁阳多糖体外免疫活性及多糖提取工艺优化研究[D]. 内蒙古:内蒙古大学,2019.
- [3] 罗婷. 苹果渣多糖的羧甲基化修饰及其抗氧化活性研究[D]. 西安:陕西科技大学,2019.
- [4] 江连洲,张巧智,关嘉琦,等. 羧甲基化大豆水酶法膳食纤维的制备及其性能研究[J]. 农业机械学报,2017,48(10): 330-337.

- [5] 朱亚男,徐崧阳,丁慧敏,等. 白玉菇多糖对免疫抑制型小鼠的免疫调节作用[J]. 食品工业科技,2020,41(7):295-300,308.
- [6] LI X,GAO J,YU Z,et al. Regulatory effect of anwulignan on the immune function through its antioxidation and anti-apoptosis in D-galactose-induced aging mice[J]. Clinical interventions in aging,2020,15:97-110.
- [7] 陈栅,冯润芳,袁野,等. 酸枣多糖羧甲基化修饰及活性研究[J]. 中国食品学报,2022,22(4):55-66.
- [8] HUANG S Y,HUANG G L. Extraction, structural analysis and activities of rice bran polysaccharide[J]. Chemical biology & drug design,2021,98(4):631-638.
- [9] 卜丹丹. 玉米皮多糖羧甲基化和硫酸酯化改性的活性研究[D]. 天津:天津科技大学,2016.
- [10] 许春平,孙懿岩,白家峰,等. 怀山药多糖的羧甲基化修饰及保润性能[J]. 河南科技大学学报(自然科学版),2019,40(6):70-74,78-79.
- [11] DUAN S,ZHAO M,WU B,et al. Preparation, characteristics, and antioxidant activities of carboxymethylated polysaccharides from blackcurrant fruits[J]. International journal of biological macromolecules,2020,155:1114-1122.
- [12] XU X J,CHEN P,ZHANG L N,et al. Chain structures of glucans from Lentinus edodes and their effects on NO production from RAW 264.7 macrophages[J]. Carbohydrate polymers,2012,87:1855-1862.
- [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] CHEN Y G,SHEN Z J,CHEN X P. Evaluation of free radicals scavenging and immunity-modulatory activities of Purslane polysaccharides[J]. International journal of biological macromolecules,2009,45(5):448-452.
- [15] LI X,GAO J,YU Z,et al. Regulatory effect of anwulignan on the immune function through its antioxidation and anti-apoptosis in D-galactose-induced aging mice[J]. Clinical interventions in aging,2020,15:97-110.
- [16] WU X,LIU Z,LIU Y,et al. Immunostimulatory effects of polysaccharides from Spirulina platensis *in vivo* and *in vitro* and their activation mechanism on RAW264.7 macrophages[J]. Marine drugs,2020,18(11):538.
- [17] FU Y F,JIANG L H,ZHAO W D,et al. Immunomodulatory and antioxidant effects of total flavonoids of Spatholobus suberectus Dunn on PCV2 infected mice[J]. Scientific reports,2017,7(1):8676.
- [18] 石和元,桑红灵,谭爱华,等. 山茱萸多糖对免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J]. 现代免疫学,2022,42(6):482-488.
- [19] 王趁芳,邓娟,韩玉皎,等. 猴头菇多糖对免疫应激小鼠胸腺和脾脏显微结构、免疫功能及细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国食品卫生杂志,2022,34(3):482-490.
- [20] GUO M Z,MENG M,FENG C C,et al. A novel polysaccharide from Craterellus cornucopioides enhances immunomodulatory activity on immunosuppressive mice models by regulation of TLR4-NF- κ B pathway[J]. Food & function,2019,10(8):4792-4801.
- [21] LIANG R J. Orthogonal test design for optimization of the extraction of polysaccharides from Phascolosoma esulenta and evaluation of its immunity activity[J]. Carbohydrate polymers,2008,73(4):318-325.
- [22] YANG G K,LIANG X M,HU J H,et al. Feeding tea polysaccharides affects lipid metabolism, antioxidant capacity and immunity of common carp(Cyprinus carpio L.)[J]. Frontiers in immunology,2022,13:1074198.
- [23] ZHOU B X,NGUYEN A D,SHEN J Y,et al. Effects of Caulerpa lentillifera polysaccharides on immune function *in vitro* and *in vivo*[J]. Journal of food processing and preservation,2022,46(12):e17260.
- [24] 黄娟,黄金莉,孙佳悦,等. 岩藻多糖对免疫低下小鼠模型免疫功能和肠道菌群的调节作用[J]. 中国食品学报,2022,22(5):92-102.
- [25] 刘思美,赵鹏,张婷婷,等. 地黄硒多糖的合成、表征及免疫活性分析[J]. 中国中药杂志,2022,47(11):2938-2946.
- [26] XU X F,YAN H D,TANG J,et al. Polysaccharides in lentinus edodes: isolation, structure, immunomodulating activity and future prospective[J]. Critical reviews in food science and nutrition,2013,54(4):474-487.
- [27] 吴雨龙,朱华,张艺麟,等. 菊苣多糖对免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J]. 食品工业科技,2021,42(3):284-289,337.
- [28] 黄振华,邓向亮,张凯敏,等. 枸杞多糖对免疫抑制小鼠红细胞免疫功能的影响[J]. 中国免疫学杂志,2018,34(2):214-217.
- [29] 甘霓,许海林,吴小勇,等. 黑木耳多糖 AAP-10 对免疫抑制小鼠的免疫调节作用[J]. 食品科学,2018,39(19):196-200.
- [30] 高笑笑,王刚,杨歆睿,等. 雪灵芝粗多糖对环磷酰胺致免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J]. 免疫学杂志,2017,33(3):191-196.
- [31] WANG Y,JIN H,YU J,et al. Quality control and immunological activity of lentinan samples produced in China[J]. International journal of biological macromolecules,2020,159:129-136.
- [32] CHEN X,NIE W,FAN S,et al. A polysaccharide from Sargassum fusiforme protects against immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice[J]. Carbohydrate polymers,2012,90(2):1114-1119.

[责任编辑:杜忆忱]