

# 正红菇多糖的抗癌和免疫调节活性研究

陈健, 申超群, 贺婷, 颜盛繁

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 本文选用人宫颈鳞癌细胞 SiHa 进行体外抗肿瘤活性试验, 并通过划痕实验对其抗肿瘤活性进行验证; 同时选用昆明小鼠脾脏细胞的体外增殖试验和小鼠腹腔巨噬细胞 RAW264.7 吞噬中性红以及刺激巨噬细胞产生 NO 和 IL-6 的试验, 探讨正红菇子实体多糖 (HAP-I) 的抗癌和免疫调节活性。结果显示, 正红菇多糖在 125~2000  $\mu\text{g/mL}$  的范围内对 SiHa 细胞的增殖抑制作用随着浓度的增大而增大, 并有一定的剂量依赖性; 通过癌细胞划痕实验, 证实其对癌细胞 SiHa 增殖有抑制作用。多糖浓度在 10~500  $\mu\text{g/mL}$  范围内能够促进淋巴细胞的增殖, 且能协同 LPS 和 ConA 显著促进淋巴细胞的增殖, HAP-I 协同 LPS 在 50  $\mu\text{g/mL}$  和 100  $\mu\text{g/mL}$  浓度时增殖作用显著 ( $p < 0.05$ ), HAP-I 协同 ConA 在 100  $\mu\text{g/mL}$  浓度时协同效果最佳。HAP-I 能增强巨噬细胞吞噬中性红的能力, 并且促进巨噬细胞分泌 NO 和 IL-6, 表明正红菇多糖有较好的免疫活性。

**关键词:** 正红菇; 多糖; 抗肿瘤; 免疫活性; 巨噬细胞

文章编号: 1673-9078(2016)11-16-21

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.11.003

## Anticancer and Immunoregulation Activities of a Polysaccharide from *Russula vinosa*

CHEN Jian, SHEN Chao-qun, HE Ting, YAN Sheng-fan

(School of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Human cervical squamous cell carcinoma (SiHa) cells were chosen to study the *in vitro* antitumor activities of a *Russula vinosa* polysaccharide (HAP-I), and the results were confirmed using the scratch assay. Furthermore, an *in vitro* proliferation test with spleen cells from Kunming mice, neutral red uptake experiments, and analyses of the secretion of nitric oxide (NO) and interleukin-6 (IL-6) by RAW264.7 macrophages were conducted to study the anticancer and immunomodulatory activities of HAP-I. The results showed that in a concentration range of 125~2000  $\mu\text{g/mL}$ , the inhibitory effect of HAP-I on SiHa was increased with increasing concentration and was dose-dependent to some extent. The scratch assay also demonstrated the inhibitory effect of HAP-I on the proliferation of SiHa. HAP-I could promote the proliferation of spleen cells from Kunming mice over a concentration range of 10~500  $\mu\text{g/mL}$ , and this proliferation was dramatically promoted by the synergistic effect of concanavalin A (ConA) and lipopolysaccharide (LPS). The combination of HAP-I (at a concentration of 50  $\mu\text{g/mL}$  or 100  $\mu\text{g/mL}$ ) and LPS had a significant effect on the proliferation; the optimal synergistic effect of HAP-I with ConA was found at 100  $\mu\text{g/mL}$ . HAP-I not only enhanced the ability of macrophages for neutral red uptake, but also increased the secretion of NO and IL-6 by macrophages, indicating that HAP-I has strong immunological activities.

**Key words:** *Russula vinosa*; polysaccharide; antitumor activity; immunological activity; macrophage

正红菇(*Russula vinosa*)是一种外生菌根菌, 属菌物界(*Fungi communitas*), 担子菌门(*Basidiomycota*), 伞菌纲(*Agaric Gang*), 红菇目(*Russulales*), 红菇科(*Russulaceae*)。正红菇子实体颜色鲜艳, 肉质鲜嫩, 营养丰富。大量研究表明, 红菇多糖具有很多生物活性, 如抗肿瘤、免疫调节、抗氧化和抑菌等。多糖发挥抗肿瘤作用主要通过两种途径: 一种是直接作用于肿瘤细胞, 通过杀伤肿瘤细胞或诱导其凋亡而达到抗

收稿日期: 2015-11-23

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (2014A030313242)

作者简介: 陈健 (1967-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物化学

肿瘤的效果; 另一种是通过提高机体免疫力, 激发自身潜能, 间接发挥抗肿瘤作用。

孙忠伟等<sup>[1]</sup>提取得到的红菇多糖经体内实验研究证明具有抗肿瘤活性。邢增威<sup>[2]</sup>用 MTT 法检测得出三种红菇多糖对 HeLa 肿瘤细胞有抑制作用, 当红菇多糖的浓度为 800  $\mu\text{g/mL}$  时, 对 HeLa 肿瘤细胞的抑制率为 65%。陈旭健等<sup>[3]</sup>研究了红菇多糖的提取及其降血糖、血脂作用, 通过注射四氧嘧啶和饲喂高脂饲料建立糖尿病及高脂血症小鼠模型, 然后用红菇多糖给药处理, 检测血糖、血脂各项指标的变化情况, 实验结果表明, 红菇多糖有降血糖、血脂的药理效果。Sun

Zhong-wei 等<sup>[4]</sup>研究的红菇多糖 RVP-1 表现出比维生素 C 有更好的清除氧自由基、羟基自由基作用,清除率比维生素 C 分别高出 5%和 6.6%。李惠珍等<sup>[5]</sup>采用热水提取的正红菇提取液具有一定的抑菌效果。贺婷<sup>[6]</sup>优化了正红菇多糖的提取工艺,并对 HAP-I 的结构进行了分析,如下所示:糖液经脱色、脱蛋白与醇沉步骤,得到正红菇子实体粗多糖 HAP; HAP 经 DEAE-52 柱层析分离,采用蒸馏水洗脱,水洗多糖经 100 ku 超滤膜后得到均一多糖 HAP-I。GC 结果显示, HAP-I 由鼠李糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成, 4 种单糖摩尔比为 1:8.29:7.45:18.13。红外结果表明, HAP-I 含有  $3401\text{ cm}^{-1}$  处的 O-H 伸缩振动,  $2930\text{ cm}^{-1}$  处的 C-H 伸缩振动以及  $1641\text{ cm}^{-1}$  处的羧基的伸缩振动, 这些均是多糖的特征吸收。高碘酸氧化和 Smith 降解结果分析得出 HAP-I 中含有 1→2、1→3 糖苷键。NMR 的图谱表明 HAP-I 是以(1→6)糖苷键为主链, (1→3)- $\beta$ -D-葡聚糖为支链构成的多糖,糖链中含有  $\alpha$ 、 $\beta$  两种糖苷构型,结构较为复杂。

目前,正红菇的使用主要是直接食用,由于产品科技含量较低,在市场上缺乏良好的竞争力。因此,对正红菇多糖 HAP-I 的免疫和抗肿瘤活性进行深入研究,可为将来更好地开发和利用正红菇资源提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要材料与仪器

主要实验材料:正红菇,购于广州一德路干货市场;DMSO、磷酸盐缓冲液(PBS)、高糖 DMEM 培养基、R/MINI-1640 培养基和胰蛋白酶-EDTA 消化液, Gibco 公司;脂多糖(LPS)、刀豆球蛋白 A (ConA)、5-氟尿嘧啶和 MTT 试剂, Sigma 公司;胎牛血清和杭州四季青,美国 Gibco 公司;双抗、中性红和 NO 试剂盒,碧云天有限公司;IL-6 酶联免疫反应试剂盒,南京建成生物有限公司;人宫颈鳞癌细胞 SiHa 和昆明小鼠脾淋巴细胞由暨南大学医学院提供;小鼠腹腔巨噬细胞 RAW 264.7 购买于中山大学细胞库。

主要实验仪器:倒置显微镜 CK40-F 200,日本 Olympus 公司;恒温培养箱 3543, Thermo scientific, 产于美国;酶标仪 TECAN Infinite 200, TECAN/瑞士;振荡器 MSI minishaker, IKA;低速离心机 KDC-4, 科大创新股份有限公司;鼓风干燥箱 DHG-9023A, 上海精宏实验设备有限公司。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 正红菇多糖对人宫颈鳞癌细胞 SiHa 增殖的抑制作用

#### 1.2.1.1 MTT 法<sup>[7]</sup>

SiHa 细胞以  $5 \times 10^4$  个/mL 的浓度接种到 96 孔板,在  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的 DMEM 完全培养基中培养。24 h 后,加入浓度为 125、250、500、1000 和 2000  $\mu\text{g/mL}$  的 HAP-I 多糖溶液,继续培养 24 h,每孔加入 20  $\mu\text{L}$  的 MTT 溶液(5 mg/mL),在培养箱中培养 4 h。培养结束后,除去上清液,加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO,避光振荡 10 min。酶标仪上于 570 nm 处检测 OD 值。

5-氟尿嘧啶(5-Fu)作为阳性对照。

细胞抑制率  $\text{IR} = (1 - A/A_0) \times 100\%$

注:A 为试验组平均吸光度值,  $A_0$  为空白对照组平均吸光度值。

#### 1.2.1.2 划痕实验<sup>[8]</sup>

将对数期细胞消化稀释后接种于 24 孔板中,在  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养,待每孔细胞密度达到 70~80%时,用枪头制作伤口模型。PBS 漂洗 3 次。加入 500  $\mu\text{L}$  HAP-I 多糖浓度分别为 125  $\mu\text{g/mL}$ 、500  $\mu\text{g/mL}$  和 2000  $\mu\text{g/mL}$  的完全培养液,继续培养 24 h 和 48 h,观察划痕宽度及细胞形态。

### 1.2.2 正红菇多糖对昆明小鼠脾淋巴细胞的增殖作用<sup>[9]</sup>

#### (1) 溶液的配制

红细胞裂解液的配制:80.20 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 8.40 g  $\text{NaHCO}_3$ , 3.70 g EDTA 二钠,加水至 900 mL,然后用 1 mol/L 的 HCl 或 1 mol/L 的 NaOH 调节至 pH 为 7.4,最后定容至 1 L。

工作液的配制:在使用前稀释 10 倍。

酸性异丙醇的配制:称取 10.00 g 十二烷基硫酸钠,用蒸馏水溶解,加入 5 mL 异丙醇和 0.1 mL (12 mol/L 盐酸),定容至 100 mL。

#### (2) 制备脾细胞悬液

小鼠眼球放血后,颈椎脱臼处死,将其浸没在 75% 的乙醇中 1~2 min。无菌条件下分离其脾脏,并置于 PBS 溶液中,在 200 目纱布上碾磨。以 1000 r/min 离心 5 min 以沉淀脾细胞,弃去上清液,加入 2 mL 裂解液,吹打 60 s 后加入 4 mL PBS。细胞悬液于 1000 r/min 下离心 5 min,弃去上清液后用 RPMI-1640 完全培养液(含 10%胎牛血清)重悬,得单个脾细胞悬液。

#### (3) 脾细胞的增殖

将脾淋巴细胞浓度为调整为  $1 \times 10^7$  个/mL,以 50

$\mu\text{L}$ /孔加入 96 孔板。HAP-I 多糖样品以 40  $\mu\text{L}$ /孔加入细胞孔内(HAP-I 终浓度分别为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。各多糖的不同剂量设 12 个复孔, 其中 6 孔加入 10  $\mu\text{L}$  培养液作为实验组, 另外 6 孔加入 10  $\mu\text{L}$  的 ConA (终浓度为 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )作为 HAP-I-ConA 实验组。以培养液代替 HAP-I 溶液, 分别加入 10  $\mu\text{L}$  培养液或 ConA 作为空白对照组或 ConA 对照组。LPS 协同组方法同上, LPS 终浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将培养板置培养箱中培养 68 h, 每孔加入 5 mg/mL MTT 的 PBS 溶液 20  $\mu\text{L}$ 。培养 4 h 后, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  酸性异丙醇, 放置 12 h。570 nm 处测各孔 OD 值。

### 1.2.3 正红菇多糖对小鼠腹腔巨噬细胞 RAW264.7 的影响

#### 1.2.3.1 正红菇多糖对巨噬细胞吞噬中性红能力的影响<sup>[10]</sup>

将浓度为  $5 \times 10^4$  个/mL 巨噬细胞以 100  $\mu\text{L}$ /孔接种到 96 孔板中, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。24 h 后弃去旧培养基, 加入含有 HAP-I 的新鲜培养基 100  $\mu\text{L}$ 。继续培养 24 h 后去除上清液, 加入 0.07% 中性红溶液 150  $\mu\text{L}$ 。培养 1 h 后用 PBS 清洗 1 次, 加 150  $\mu\text{L}$  裂解液, 4  $^{\circ}\text{C}$  放置避光过夜, 用酶标仪检测 550 nm 处的 OD 值。

#### 1.2.3.2 正红菇多糖对巨噬细胞产生 NO 的影响<sup>[11]</sup>

将浓度为  $5 \times 10^4$  个/mL 巨噬细胞以 100  $\mu\text{L}$ /孔的体积接种到 96 孔板中, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h。去掉旧培养基, 加入含有 HAP-I 样品的培养基 100  $\mu\text{L}$ 。继续培养 24 h 后, 取上清液 50  $\mu\text{L}$ , 依次加入等体积的 Griese-I 试剂和 Griese-II 试剂, 酶标仪在 450 nm 处测定 OD 值。

**NO<sub>2</sub> 含量标准曲线的绘制:** 将 NaNO<sub>2</sub> 标准品等倍数稀释成 100~0  $\mu\text{mol}/\text{L}$  之间的浓度。取不同浓度的标准品溶液 50  $\mu\text{L}$  加入到 96 孔板中, 然后依次加入等体积的 Griese-I 试剂和 Griese-II 试剂, 避光, 用酶标仪在 450 nm 处检测 OD 值。

#### 1.2.3.3 正红菇多糖对巨噬细胞产生 IL-6 的影响<sup>[12]</sup>

按照 IL-6 试剂盒的操作说明进行试验。

## 2 结果与讨论

### 2.1 正红菇多糖 HAP-I 对人宫颈鳞癌细胞

#### SiHa 增殖的抑制作用

正红菇多糖对人宫颈鳞癌细胞 SiHa 增殖的抑制作用见图 1, 从图 1 中得知在 125~2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的范围

内, 正红菇多糖 HAP-I 对 SiHa 的增殖抑制作用随着浓度的增大而增大, 呈线性相关性, 并有一定的剂量依赖性。其浓度为 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 增殖抑制效果强于 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度的阳性对照物。正红菇多糖 HAP-I 表现出较好的抗肿瘤活性。

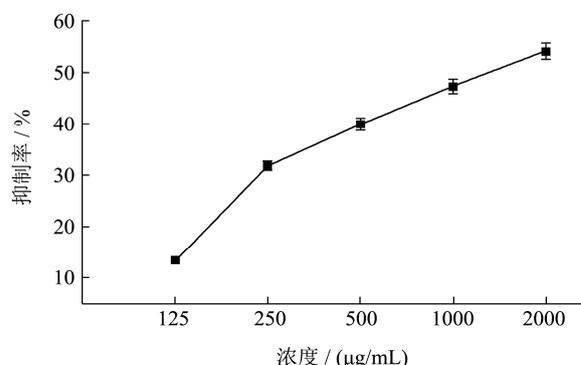


图 1 HAP-I 对 SiHa 细胞的影响 ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ,  $n=3$ )

Fig.1 Effect of HAP-I on SiHa cells ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ,  $n=3$ )

表 1 HAP-I 对 SiHa 细胞的抑制作用 ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ,  $n=3$ )

Table 1 Inhibitory effect of HAP-I on SiHa cells ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ,  $n=3$ )

组别	浓度/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	HAP-I (抑制率/%)
空白对照	0	-
HAP-I	125	10.28±0.088 <sup>a</sup>
	150	31.81±0.038 <sup>a</sup>
	500	39.78±0.048 <sup>a</sup>
	1000	47.31±0.031 <sup>a,d</sup>
	2000	54.17±0.03 <sup>a,c</sup>
5-Fu	125	39.18±0.009

注: 经方差分析, 与空白组比较, a:  $p < 0.01$ , b:  $p < 0.05$ ; 与 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 5-Fu 比较, c:  $p < 0.01$ , d:  $p < 0.05$ 。

划痕实验结果见图 2。图 2 显示, 空白对照组, 细胞正常增殖, 24 h 时划痕明显变窄, 48 h 时间距几乎消失, 说明癌细胞 SiHa 具有很强的增殖能力。用正红菇多糖 HAP-I 作用于 SiHa, 三组浓度对癌细胞迁移有明显的抑制作用, 随着浓度的增大, 划痕宽度越来越大, 说明癌细胞的增殖抑制对浓度具有依赖性, 这与 MTT 实验结果一致。48 h 的划痕比 24 h 后的划痕稍有变窄, 说明癌细胞继续增殖, 但浓度为 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 划痕宽度基本不变, 这是由于高浓度多糖对癌细胞的抑制达到顶峰, 癌细胞形态发生变化, 细胞趋于死亡。5-Fu 尿嘧啶因对多种肿瘤均有一定疗效, 因此常在抗肿瘤活性中作为阳性对照品。125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 5-Fu 尿嘧啶作为阳性对照组, 与不同浓度多糖 HAP-I 的划痕进行对比, 也证明了 HAP-I 具有抑制癌细胞 SiHa 增殖的能力。一般而言, 多糖中含有  $\beta(1 \rightarrow 3)$  糖苷键是其活性前提, 多糖立体结构中  $\beta$  螺旋具有较强生物活性。HAP-I 结构中含有  $(1 \rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-葡}$

聚糖, 这可能是其具有较强的抑制肿瘤作用的主要原因<sup>[13]</sup>。

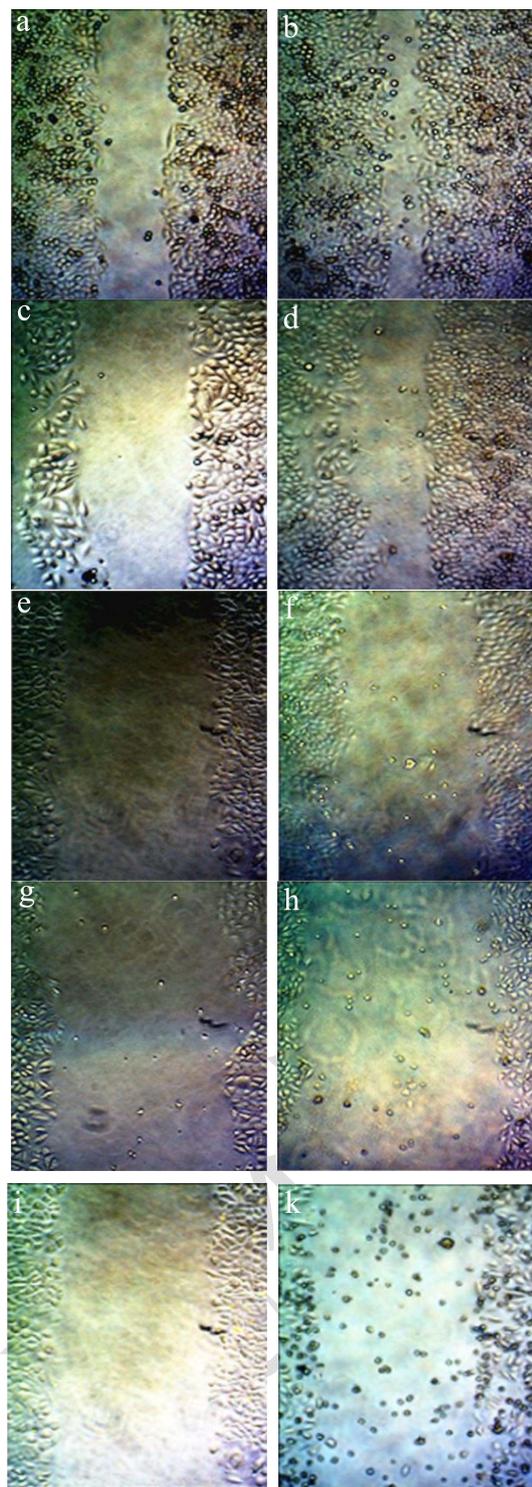


图2 HAP-I 对 SiHa 细胞增殖迁移的影响

Fig.2 Effects of HAP-I on the proliferation and migration of SiHa cells

注: a 和 b, 空白对照组; c 和 d, HAP-I 浓度为 125 μg/mL; e 和 f, HAP-I 浓度为 500 μg/mL; g 和 h, HAP-I 浓度为 2000 μg/mL; i 和 k, 5-Fu 浓度为 125 μg/mL。a、c、e、g 和 i, 培养时间为 24 h; b、d、f、h 和 k, 培养时间为 48 h

## 2.2 正红菇多糖对昆明小鼠脾淋巴细胞增殖的影响

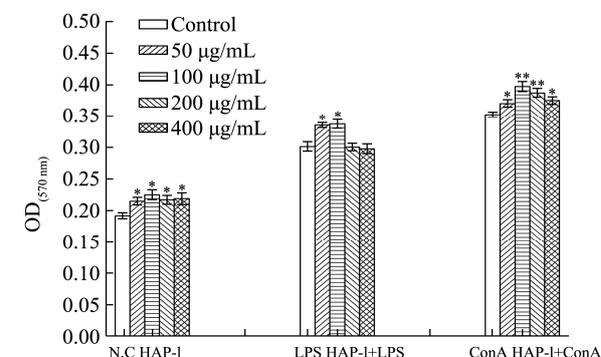


图3 HAP-I 及 HAP-I 协同 LPS 和 ConA 刺激淋巴细胞增殖活性测定

Fig.3 Effect of HAP-I and combinations of HAP-I with LPS and ConA on lymphocyte proliferation

注:  $\bar{x} \pm SD$ ; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ 。

如图3所示,与空白对照组比较,在50~400 μg/mL 浓度范围内,正红菇多糖 HAP-I 作用脾淋巴细胞后,MTT 法检测 570 nm 处 OD 值显著增加 ( $p < 0.05$ ),说明该多糖组分能促进淋巴细胞的增殖。

HAP-I 与 LPS 协同作用,与 LPS 对照组比较,样品组 OD 升高,表明正红菇多糖可以促进 LPS 诱导的 B 淋巴细胞增殖作用。HAP-I 协同 LPS 组在 50 μg/mL、100 μg/mL 浓度时增殖作用显著 ( $p < 0.05$ ),进一步提高浓度至 200 μg/mL 和 400 μg/mL,增殖作用减弱甚至消失,这可能是高浓度的 HAP-I 抑制了 LPS 刺激的淋巴细胞增殖,同时说明多糖具有双向调节增殖的作用。

HAP-I 与 ConA 协同,与 ConA 对照组比较,样品组 OD 升高,表明正红菇多糖可以促进 ConA 诱导的 T 淋巴细胞增殖作用。HAP-I 协同 ConA 组在 100 μg/mL、200 μg/mL 浓度时增殖作用极显著 ( $p < 0.01$ ),100 μg/mL 浓度时协同效果最佳。HAP-I 对 ConA 的协同作用较强。正红菇多糖 HAP-I 显示较好的免疫活性和抗肿瘤活性。

## 2.3 正红菇多糖对小鼠腹腔巨噬细胞 RAW264.7 的影响

### 2.3.1 正红菇多糖对巨噬细胞吞噬中性红能力的影响

非特异性免疫是机体免疫系统的重要组成部分,巨噬细胞的吞噬能力是衡量机体非特异性免疫功能的

标志之一。正红菇多糖 HAP-I 对小鼠巨噬细胞吞噬能力的影响见图 4。由图 4 可以看出, HAP-I 刺激小鼠腹腔巨噬细胞 24 h 后, 细胞的吞噬能力较空白对照组明显增强, 吞噬能力也明显大于 1  $\mu\text{g/mL}$  阳性对照 (LPS), 并且 HAP-I 随着浓度的增加, 吞噬能力也会显著增强。正红菇多糖在设定浓度范围内作用皆极显著 ( $p<0.01$ )。吞噬细胞的吞噬能力增强, 明显增强了免疫器官的重量, 同时能促进淋巴小结的增生, 从而促进 T、B 细胞生成, 达到增强机体免疫力的效果。

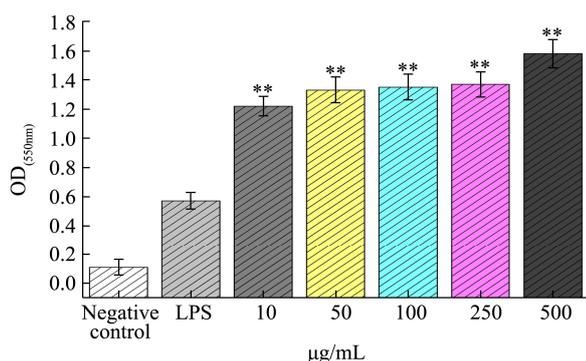


图 4 HAP-I 对巨噬细胞吞噬中性红的影响

Fig.4 Effect of HAP-I on neutral red uptake by macrophages

注:  $\bar{x}\pm\text{SD}$ ; \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ 。

### 2.3.2 正红菇多糖对巨噬细胞产生 NO 和 IL-6 的影响

大量研究表明巨噬细胞抗肿瘤、抗病毒等作用主要通过 NO 的释放完成, 因而 NO 水平是巨噬细胞活化的一个重要指标。IL-6 是一种多效性细胞因子, 多种淋巴样和某些非淋巴样细胞均可产生 IL-6, 但主要由单核巨噬系统细胞产生。IL-6 可促进 B 细胞、CTL 分化, 促进中性粒细胞分化、活化, 促进角质细胞、肾小球细胞生长, 可以刺激 T 细胞增殖、活化与存活等作用; 因此 IL-6 的含量也是巨噬细胞活化的检测指标。

根据 Griess 法测定  $\text{NO}_2^-$  得到标曲为  $y=0.0075x+0.0084$  ( $R^2=0.9995$ ); 其中 y 为吸光度, x 为含量。

表 2 中显示, 正红菇多糖 HAP-I 有类似 LPS 的作用, 能刺激小鼠腹腔巨噬细胞生成和释放 NO。在 10~500  $\mu\text{g/mL}$  的浓度范围内, 生成的 NO 量随着浓度的增大而增大, 故在该试验范围内对巨噬细胞的激活作用与浓度成一定的正相关, 且在 50、100、250 和 500  $\mu\text{g/mL}$  浓度时皆有极显著性 ( $p<0.01$ )。

以 ELISA 法检测正红菇多糖作用小鼠巨噬细胞培养上清液中 IL-6 的水平, 结果 (表 2) 表明, 正红菇多糖 HAP-I 能刺激巨噬细胞释放 IL-6。HAP-I 样品在 10~500  $\mu\text{g/mL}$  各浓度下皆具有极显著性 ( $p<0.01$ )。当其浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$  时, 释放 IL-6 的量达到最大,

高于此浓度后释放 IL-6 的能力明显降低, 结果表明过高浓度的均一多糖 HAP-I 反而会抑制巨噬细胞产生 IL-6 的能力。

表 2 HAP-I 对巨噬细胞分泌 NO、IL-6 的影响

Table 2 Effect of HAP-I on the secretion of NO and IL-6 by

macrophages			
	浓度 /( $\mu\text{g/mL}$ )	NO 含量 /( $\mu\text{mol/mL}$ )	IL-6 含量/(pg/mL)
空白	0	1.21 $\pm$ 0.01	15.40 $\pm$ 2.94
	10	2.14 $\pm$ 0.02*	604.72 $\pm$ 20.58**
	50	2.74 $\pm$ 0.03**	630.83 $\pm$ 6.33**
	100	3.12 $\pm$ 0.01**	996.11 $\pm$ 46.64**
	250	3.45 $\pm$ 0.07**	647.31 $\pm$ 7.88**
	500	4.15 $\pm$ 0.01**	579.34 $\pm$ 12.32**
LPS	1	3.74 $\pm$ 0.03	1322.88 $\pm$ 105.47
	10	5.96 $\pm$ 0.01	1399.41 $\pm$ 72.74

注: 经方差分析, 与空白组比较, \* $p<0.01$ , \*\* $p<0.05$ 。

### 3 结论

通过体外对人宫颈鳞癌细胞 SiHa 的增殖抑制实验, 发现正红菇多糖 HAP-I 对癌细胞 SiHa 均有显著的抑制作用, 且呈一定的剂量依赖性。通过癌细胞划痕实验, 证实 HAP-I 对癌细胞 SiHa 增殖有抑制作用。通过对正红菇多糖免疫活性的研究, 表明正红菇多糖 HAP-I 能促进淋巴细胞的增殖; HAP-I 与 LPS 协同作用表明正红菇多糖可以促进 LPS 诱导的 B 淋巴细胞增殖作用, 且 HAP-I 协同 LPS 在 50  $\mu\text{g/mL}$ 、100  $\mu\text{g/mL}$  浓度时增殖作用显著 ( $p<0.05$ )。HAP-I 与 ConA 协同, 表明正红菇多糖可以促进 ConA 诱导的 T 淋巴细胞增殖作用, HAP-I 协同 ConA 在 100  $\mu\text{g/mL}$  浓度时协同效果最佳。正红菇多糖 HAP-I 能明显增强小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红的能力, 在 10~500  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围内作用皆极显著 ( $p<0.01$ ); 且 HAP-I 能促进巨噬细胞分泌 NO 和细胞因子 IL-6; 因此正红菇多糖 HAP-I 具有明显的免疫活性。

### 参考文献

- [1] 孙忠伟,张丽香,王愈,等.变绿红菇子实体多糖的理化性质及其抗肿瘤活性[J].农产品加工,2009,178:77-81  
SUN Zhong-wei, ZHANG Li-xiang, WANG Yu, et al. Physical, chemical and antitumor characteristics of water-soluble polysaccharides from the fruiting bodies of *Russula Viresce* [J]. Processing of Agricultural Products, 2009, 178: 77-81
- [2] 邢增威.红菇多糖的提取及体外抗氧化抗癌性质研究[D].

- 广东广州:华南理工大学,2013
- XING Zeng-wei. Research of antioxidant activities, antitumor and extraction method of *Russula*-polysaccharide [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013
- [3] 陈旭健,张原琪.红菇多糖的提取及其降血糖、血脂作用研究[J].食品科学,2010,11(9):255-258
- CHEN Xu-jiang, ZHANG Yuan-qi. Polysaccharide extract from *Russula* and its role of lowering blood glucose and lipid [J]. Food Science, 2010, 11(9): 255-258
- [4] SUN Zhong-wei, ZHANG Li-xiang, ZHANG Bin, et al. Structural characterisation and antioxidant properties of polysaccharides from the fruiting bodies of *Russula virescens* [J]. Food Chemistry, 2010, 118: 675-680
- [5] 李惠珍,黄德鑫,许旭萍,等.正红菇的化学成分的研究[J].菌物系统,1998,17(1):68-74
- LI Hui-zhen, HUANG De-xin, XU Xu-ping, et al. Study on chemical constituents of *Russula griseocarnosa* [J]. Fungi System, 1998, 17(1): 68-74
- [6] 贺婷.正红菇多糖结构分析及其生物活性研究[D].广州:华南理工大学,2015
- HE Ting. Study on structure and bioactivity of polysaccharides from *Russula griseocarnosa* [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015
- [7] JIN Xiao-xin, SUN Ji-chun, MIAO Xiong-yong, et al. Inhibitory effect of geraniol in combination with gemcitabine on proliferation of bxp-3 human pancreatic cancer cells [J]. The Journal of International Medical Research, 2013: 993-1001
- [8] Vassou Despoina, Notas George, Hatzoglou Anastassia, et al. Opioids increase bladder cancer cell migration via bradykinin B2 receptors [J]. International Journal of Oncology, 2011: 39(3): 697-707
- [9] M A Tumanyan, A V Izvekova. Effect of bacterial polysaccharide on the number of antibody-producing cells in the spleen of irradiated and unirradiated mice [J]. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 1975, 77(7): 786-788
- [10] LV Xiao-hua, H Wang, H Han, et al. Effects of polysaccharide of *Radix Ranunculi Ternati* on immunomodulation and antioxidation [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2010: 35(14): 1862-5
- [11] Julia J Volman, Johannes P F G Helsper, Song Wei, et al. Effects of mushroom-derived  $\beta$ -glucan-rich polysaccharide extracts on nitric oxide production by bone marrow-derived macrophages and nuclear factor- $\kappa$ B transactivation in Caco-2 reporter cells: Can effects be explained by structure? [J]. Molecular Nutrition Food Research, 2010, 54(2): 268-276
- [12] GAO Yi-huai, TANG Wen-bo, DAI Xi-hu, et al. Effects of water-soluble *Ganoderma lucidum* polysaccharides on the immune functions of patients with advanced lung cancer [J]. Journal of Medicinal Food, 2005, 8(2): 159-68
- [13] Wu M B, Y Wu, J Zhou, et al. Structural characterisation of a water-soluble polysaccharide with high branches from the leaves of *Taxus chinensis* var. *Mairei* [J]. Food Chemistry, 2009, 113(4): 1020-1024