

# 裂褶菌多糖对小鼠免疫活性作用的研究

杨娜, 王鸿飞, 董栓泉, 许凤, 邵兴锋, 李和生

(宁波大学食品科学与工程系, 浙江宁波 315211)

**摘要:** 本文以裂褶菌多糖为研究对象, 通过超声波辅助水提法提取裂褶菌多糖, 对小鼠腹腔注射环磷酰胺 (Cy) 建立免疫低下模型, 灌胃不同剂量的裂褶菌多糖, 从非特异性免疫、细胞免疫和体液免疫三种途径来研究裂褶菌多糖的免疫活性作用。同时采用 MTT 法研究了裂褶菌多糖抑制体外小鼠巨噬细胞及结肠癌细胞增殖的作用。试验结果表明, 裂褶菌多糖对免疫低下小鼠的胸腺、脾脏器官具有一定的恢复作用; 对小鼠足趾注射绵羊红细胞致敏, 足趾具有一定的肿胀度; 通过测定小鼠血清中血清溶血素、IgG、IgA、IL-2, 裂褶菌多糖的各剂量与免疫低下的模型组相比均有不同程度的提高; 裂褶菌多糖可增强小鼠巨噬细胞的吞噬能力, 当浓度为 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 对结肠癌细胞增殖的抑制率可达到 45.32%。

**关键字:** 裂褶菌; 裂褶菌多糖; 免疫调节

**文章篇号:** 1673-9078(2014)8-1-5

## Immunological Effects of *Schizophyllum commune* Polysaccharides in Mice

YANG Na, WANG Hong-fei, DONG Shuan-quan, XU Feng, SHAO Xing-feng, LI He-sheng

(Department of Food Science and Engineering, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** In this study, polysaccharide from *Schizophyllum commune* was obtained by ultrasound-assisted water extraction and an immunocompromised mouse model was established by intraperitoneal injection of cyclophosphamide. Immunological effects of different doses of *S. commune* polysaccharides administered to mice intragastrically were investigated in terms of non-specific immunity, cell-mediated immunity, and humoral immunity. The inhibitory effects of *S. commune* polysaccharides on the *in vitro* proliferation of mouse macrophages and colon carcinoma were evaluated by MTT assay. The results showed that *S. commune* polysaccharides had a certain recovery effect on the thymus and spleen as well as caused sensitization in mice injected with sheep red blood cells in their footpads, leading to swelling. In mice injected with different doses of *S. commune* polysaccharides, serum levels of hemolysin, IgG, IgA, and IL-2 increased to varying degrees as compared to the immunocompromised mice group. In addition, *S. commune* polysaccharides could increase phagocytosis by murine macrophages and at 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentration, showed up to 45.32% inhibition of colon carcinoma cells.

**Key words:** *Schizophyllum commune*; *Schizophyllum commune* polysaccharides; immune regulation

裂褶菌 (*Schizophyllum commune*), 又名白参、树花、白花等, 其子实体是药食同源的大型真菌, 是一种的优质食用菌, 广泛分布于我国云南、四川等地。其性平、味甘, 富含人体所需要的多种氨基酸, 并含有多种微量元素以及多糖, 对小儿盗汗、头昏耳鸣等有较好的疗效。同时, 由于其木质化程度低, 菌菇体质嫩, 味道鲜美, 具有较好的使用价值, 在我国西南等地区常用裂褶菌子实体和鸡蛋炖汤, 可治疗女性白带、对分娩后的孕妇可促进其乳汁的分泌等功效<sup>[1]</sup>。裂褶菌多糖 (Schizophyllan) 是从裂褶菌的子实体、

菌丝体与菌丝发酵液中提取分离出来的, 由醛糖或酮糖通过糖苷键连接起来的一类天然大分子碳水化合物, 其结构为以 $\beta$ - (1-3) 糖苷为主链,  $\beta$ - (1-6) 糖苷为侧链的葡聚糖, 是可溶于水的电中性多糖, 主要存在于裂褶菌的细胞壁中。有研究报道, 裂褶菌多糖能有效抑制胃癌、直肠癌等消化道癌细胞的生长, 能够降低血压、血脂、血糖, 抵抗血栓, 能提高细胞免疫功能, 促进免疫球蛋白的形成、刺激单核吞噬细胞系统的活性、增强巨噬细胞的吞噬和消化功能等多种生理活性<sup>[2]</sup>。

本文以裂褶菌为原料, 通过超声波辅助提取裂褶菌多糖, 通过对小鼠腹腔注射环磷酰胺 (Cyclophamide) 建立免疫低下模型, 灌胃不同剂量的裂褶菌多糖一定天数, 从非特异性免疫、细胞免疫和体液免疫三种途径, 通过对免疫低下小鼠的胸腺、脾脏器官、脚趾肿胀度、血清中血清溶血素、IgG、IgA、

收稿日期: 2014-03-18

基金项目: 国家自然科学基金 (31301574); 宁波市自然科学基金 (2013A610159); 宁波大学学科项目 (xk11344); 宁波大学人才引进项目 (ZX2012000031)

作者简介: 杨娜(1989-), 女, 硕士生, 研究方向: 食品科学

通讯作者: 王鸿飞(1964-), 男, 教授, 研究方向: 食品科学研究方向

IL-2 等指标来研究裂褶菌多糖的免疫活性作用。同时采用 MTT 法研究了裂褶菌多糖抑制体外小鼠巨噬细胞及结肠癌细胞增殖的作用,为裂褶菌多糖的开发利用提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

原料:裂褶菌多糖;阳性对照品:茯苓多糖口服液,湖南补天药业有限公司,批号:20070901;小鼠巨噬细胞 RAW264.7,产地:武汉博士德生物工程有限公司;结肠癌细胞 HT-29,产地:上海 ATCC 公司。

ICR 级小鼠:体重 16~18 g,雌雄各半,由宁波大学医学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(甬)2013-0002,合格证号:0051028,饲养于宁波大学实验动物中心 ICR 级动物房。

主要试剂:注射用环磷酰胺,江苏恒瑞医药股份有限公司;绵羊红细胞(SRBC)、豚鼠血清,广州未来生物科技有限公司;DMEM 培养液、0.25%胰蛋白酶、牛胎血清, Gibco 公司;MTS 一步法细胞增殖检测试剂盒, Promega 公司。

氯化钠、乙酸乙酯等其它试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

DK-S22 电热恒温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司;UH-500B 超声波细胞粉碎仪,天津奥特赛恩斯仪器有限公司;Cary-50 紫外分光光度计,美国 VARIAN 公司;PB-10pH 计、BP-211D 电子天平,德国 sartorius 公司;WH-861 旋涡混合器,太仓市科教器材厂;H-1650 高速台式离心机,长沙湘仪离心机设备有限公司;DNP-9162 型电热恒温培养箱,宁波江南仪器厂;infinite200 酶标仪,TECAN 公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 裂褶菌多糖的制备

取一定量的裂褶菌粉末,按照一定的液料比加水,通过超声波辅助法进行水提,结束后离心,取其上清液,在 50 °C 条件下进行旋转蒸发,浓缩至原体积的四分之一左右。通过 seavage 法除蛋白,醇沉 24 h 左右,冷冻干燥,得到裂褶菌粗多糖<sup>[3]</sup>。

#### 1.3.2 小鼠免疫功能实验

##### (1) 试验动物分组及剂量设置

将小鼠随机分为 6 组,每组 10 只,雌雄各半。A 组为正常对照组, B 组为模型对照组, C 组为多糖低剂量, D 组为多糖中剂量, E 组为多糖高剂量, F 组

为茯苓多糖口服液。其中 C、D、E 组为 100 mg/(kg·d)、200 mg/(kg·d)和 400 mg/(kg·d)三种剂量,分别相当于人体推荐摄入量 20 mg/(kg·d)的 5 倍、10 倍和 20 倍。阳性对照品茯苓多糖口服液 F 组,原药液 16 mg/mL,成人 30 mL/(60 kg·d),即 0.5 mL/(kg·d),相当于 8 mg/(kg·d),小鼠按成人剂量的 10 倍计,为 80 mg/(kg·d)。小鼠给药体积按 0.2 mL/10g 计<sup>[4]</sup>。

(2) 细胞免疫指标的测定-迟发型超敏反应(DTH)(足跖增厚法)<sup>[5]</sup>

每日灌胃 1 次,连续 30 d。试验第 3 d,除正常对照组外,腹腔注射环磷酰胺 30 mg/kg,隔天一次,共四次,造成免疫功能低下模型,正常对照组腹腔注射等体积生理盐水。试验第 27 d,各组小鼠腹腔注射 2% SRBC 0.25 mL/10g 免疫每只小鼠。试验第 30 d,用游标卡尺测量右后足跖厚度,然后在测量部位皮下注射 0.02 mL 2% (V/V) SRBC。24 h 后测量右后足跖厚度。同一部位测量三次,取平均值,以攻击前后足跖厚度的差值来表示 DTH 的程度。

##### (3) 体液免疫指标的测定

血清溶血素的测定试验<sup>[6]</sup>:每日灌胃 1 次,连续 30 d。试验第 3 d,除正常对照组外,腹腔注射环磷酰胺 30 mg/kg,隔天一次,共四次,造成免疫功能低下模型,正对照组腹腔注射等体积生理盐水。试验第 27 天,各组小鼠腹腔注射 2% SRBC 0.25 mL/10g 进行致敏。试验第 31 d,称取小鼠体重后摘眼球放血,取全血于离心管中,2000 r/min 离心 10 min,收集血清。取上清 10 μL,加入 990 μL 生理盐水、6% SRBC 1 mL、1:10 豚鼠补体 1 mL 于试管中,混匀,为待测样品;以生理盐水为空白样品。各样品管置 37 °C 水浴 30 min,然后置冰水中 10 min 使反应终止。之后,2000 r/min,离心 10 min,取上清 250 μL,以空白样品调零,用酶标仪在 540 nm 波长处测定待测样品 OD 值。

血清 IgG、IgA 和白介素-2 的测定<sup>[7]</sup>:按照试剂盒说明书,取实验小鼠血液分离血清,测定各组小鼠血清中 IgG、IgA 和白介素-2 的含量。

##### (4) 免疫器官指数的测定<sup>[8]</sup>

取做血清溶血素的 10 只小白鼠编号并称重,然后断颈处死,迅速取其免疫器官胸腺和脾脏,用滤纸吸去血渍,去除周围组织和脂肪等,称其湿重。计算免疫器官的指数,公式如下:

脾脏指数=脾脏重量(mg)/小白鼠体重(10g)

胸腺指数=胸腺重量(mg)/小白鼠体重(10g)

#### 1.3.3 裂褶菌多糖对小鼠巨噬细胞吞噬能力的影响

细胞的复苏<sup>[9]</sup>:从 -80 °C 冰箱中取出冻存好的细

胞, 将冻存管于 37 °C 水浴锅中快速解冻, 将含细胞的冻存液转移到 2 mL 无菌的 EP 管中, 1000 r/min 离心 5 min, 除去管中上清, 加入 1 mL 含 10% 的胎牛血清的 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 培养基重悬细胞, 将重悬的细胞移入培养皿中, 加入 2 mL 培养基, 混匀, 置于含 5% 的 CO<sub>2</sub> 的 37 °C 培养箱中培养。

细胞的计数: 使用血球计数板计数, 使其浓度为  $3.5 \times 10^6$  /mL。

细胞的传代<sup>[9]</sup>: 将细胞取出, 于倒置显微镜下观察细胞形态; 在超净工作台上吹打细胞, 吸弃泡沫及旧的培养液, 加入胰蛋白酶消化液 1 mL, 于 37 °C 细胞培养箱中消化 3~5 min, 于倒置显微镜上观察细胞, 待细胞变圆有松动时, 加入 2 mL 左右的含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 轻轻吹打细胞, 将贴壁细胞吹打下来打散成细胞悬液, 细胞计数, 添加适量的含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 送入 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 细胞培养箱中培养。

细胞的增殖活性<sup>[10]</sup>: 通过试剂盒检测细胞活性。取对数生长期的细胞悬液 10 μL 按每孔  $3.5 \times 10^6$  个细胞加入到 96 孔细胞培养板中, 加入 190 μL 的培养液, 37 °C 培养 24 h 至细胞生长汇集度约为 80%。次日加入浓度为 200 μg/mL、400 μg/mL、600 μg/mL、800 μg/mL、1000 μg/mL 的裂褶菌多糖溶液 50 μL, 孵育 4 h 后, 弃去培养液, 用 PBS 洗 3 遍, 再加入 MTS 溶液, 继续培养 4 h, 用酶联免疫检测仪在 490 nm 处测量各孔的吸光值。

### 1.3.4 裂褶菌多糖对结肠癌细胞增殖抑制作用

体外抗肿瘤实验采用 MTT 法<sup>[11]</sup>。细胞的复苏、传代等参照步骤 1.3.3 中方法。

### 1.3.5 数据处理

数据以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 用 SPSS17.0

统计软件进行方差分析, 用 Duncan 法比较组间差异,  $p < 0.05$  为有显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 细胞免疫指标的测定-裂褶菌多糖对小鼠迟发型变态反应 (DTH) 的影响

观察裂褶菌多糖对免疫功能低下小鼠迟发型变态反应 (DTH) 的影响, 以研究其对小鼠细胞免疫功能的作用, 结果详见表 1。

表 1 裂褶菌多糖对小鼠迟发型变态反应的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	剂量/[mg/(kg·d)]	足趾肿胀度差值/mm
A 组	10	等体积蒸馏水	0.34±0.12 <sup>a</sup>
B 组	9	等体积蒸馏水	0.07±0.01 <sup>c</sup>
C 组	8	100	0.22±0.07 <sup>b</sup>
D 组	9	200	0.16±0.03 <sup>bc</sup>
E 组	9	400	0.20±0.10 <sup>b</sup>
F 组	10	80	0.19±0.09 <sup>bc</sup>

注: 同列数据不同字母代表差异显著 ( $P < 0.05$ )。

由表 1 可知, 模型对照组与正常对照组相比, 足趾肿胀度差值显著下降 ( $p < 0.05$ ), 表明建模成功。与对照组比较, 各剂量组足趾肿胀度均有显著差异 ( $p < 0.05$ ), 即裂褶菌多糖的三个剂量组和阳性对照组的样品对小鼠的足趾肿胀度影响显著, 说明受试物对免疫低下的小鼠迟发型超敏反应有显著影响。

### 2.2 体液免疫指标的测定

通过测定小鼠血清溶血素、IgG、IgA、IL-2 等指标以研究其对体液免疫功能的作用, 试验结果详见表 2。

表 2 裂褶菌多糖对小鼠体液免疫功能的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effect of Schizophyllan on body fluid immunity in mice

组别	只数	剂量 /[mg/(kg·d)]	血清溶血素 540nmOD 值	IgG /(g/L)	IgA /(mg/L)	IL-2 /(pg/mL)
A 组	10	等体积蒸馏水	0.55±0.03 <sup>a</sup>	2.40±0.17 <sup>a</sup>	3.59±0.09 <sup>a</sup>	4.26±0.13 <sup>a</sup>
B 组	9	等体积蒸馏水	0.30±0.02 <sup>c</sup>	1.17±0.14 <sup>b</sup>	2.38±0.64 <sup>c</sup>	3.29±0.21 <sup>d</sup>
C 组	8	100	0.37±0.02 <sup>d</sup>	1.93±0.72 <sup>ab</sup>	2.80±0.50 <sup>bc</sup>	3.95±0.11 <sup>b</sup>
D 组	9	200	0.43±0.04 <sup>b</sup>	1.60±0.38 <sup>ab</sup>	2.87±0.25 <sup>bc</sup>	3.63±0.26 <sup>c</sup>
E 组	9	400	0.39±0.04 <sup>cd</sup>	2.30±1.25 <sup>a</sup>	3.04±0.71 <sup>ab</sup>	3.64±0.23 <sup>c</sup>
F 组	10	80	0.42±0.06 <sup>bc</sup>	2.03±0.55 <sup>ab</sup>	3.20±0.45 <sup>ab</sup>	3.48±0.10 <sup>cd</sup>

注: 同列数据不同字母代表差异显著 ( $P < 0.05$ )。

由表 2 可知, 各组的模型对照组与正常对照组相比, 其数值显著下降 ( $p < 0.05$ ), 表明建模成功。在血

清溶血素试验中, 与模型对照组比较, 各剂量组的 OD 值均显著提高 ( $p < 0.05$ ), 其中剂量组 OD 值较高, 说明



受试物对免疫低下的小鼠血清溶血素含量有一定的影响。血清IgG含量试验中,与模型对照组比较,各剂量组IgG含量均有显著差异 ( $p<0.05$ ),其高剂量含量较高,裂褶菌多糖的三个剂量组和阳性对照组的样品对小鼠血清IgG含量影响显著。血清IgA含量试验中,与模型对照组比较,各剂量组IgA的含量均有显著差异 ( $p<0.05$ ),其阳性对照组含量较高,裂褶菌多糖的三个剂量组和阳性对照组的样品对小鼠血清IgA含量影响显著。IL-2含量试验中,与模型对照组比较,各剂量组IL-2含量均有显著差异 ( $p<0.05$ ),低剂量含量较高裂褶菌多糖的三个剂量组和阳性对照组的样品对小鼠血清IL-2含量影响显著。由此说明,受试物对免疫低下的小鼠体液免疫功能有一定的提高作用。

### 2.3 裂褶菌多糖对小鼠免疫器官的影响

免疫器官指数的测定结果见表3。

表3 裂褶菌多糖对小鼠胸腺、脾脏指数的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 3 Effect of Schizophyllan on the thymus and spleen index in mice

组别	只数	剂量 /[mg/(kg·d)]	胸腺指数 /(mg/10 g)	脾脏指数 /(mg/10 g)
A组	10	等体积蒸馏水	4.11±2.02 <sup>a</sup>	11.70±1.72 <sup>a</sup>
B组	9	等体积蒸馏水	2.38±0.89 <sup>b</sup>	7.83±0.53 <sup>c</sup>
C组	8	100	2.90±0.29 <sup>b</sup>	9.71±1.34 <sup>abc</sup>
D组	9	200	2.69±0.61 <sup>b</sup>	10.37±1.72 <sup>ab</sup>
E组	9	400	2.80±0.77 <sup>b</sup>	9.12±2.01 <sup>bc</sup>
F组	10	80	2.47±0.72 <sup>b</sup>	10.06±2.34 <sup>ab</sup>

注:同列数据不同字母代表差异显著 ( $P<0.05$ )。

由表3可知,模型对照组与正常对照组相比,其指数显著下降 ( $p<0.05$ ),表明建模成功。胸腺是T细胞分化成熟场所,在动物初生时相对最大,随着年龄增长而逐渐退化<sup>[12]</sup>。与模型对照组相比,裂褶菌多糖低、中、高剂量及阳性对照茯苓多糖口服液组均显著高于模型对照组 ( $p<0.05$ ),其组间相互比较裂褶菌多糖低剂量组胸腺指数最高。脾脏是机体最大的外周免疫器官,是发生免疫应答的重要场所,与模型对照组相比,裂褶菌多糖低、中、高剂量及阳性对照组均显著高于模型对照组 ( $p<0.05$ ),且其各组间相互比较裂褶菌多糖中剂量组脾脏指数最高。试验结果表明受试物对免疫低下的小鼠器官具有一定的影响。

### 2.4 裂褶菌多糖对巨噬细胞增殖作用

通过对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 研究裂褶菌多糖对巨噬细胞吞噬能力的影响试验结果详见图1。

由图1可知,随着裂褶菌多糖浓度的增大,对

RAW264.7 巨噬细胞的吞噬能力逐渐增强。在体内,巨噬细胞以吞噬的形式将各类病原性微生物、衰老细胞、肿瘤细胞等大颗粒抗原摄入胞内,在多种酶的作用下,将其杀灭和消化。由此说明裂褶菌多糖具有一定的免疫功能。

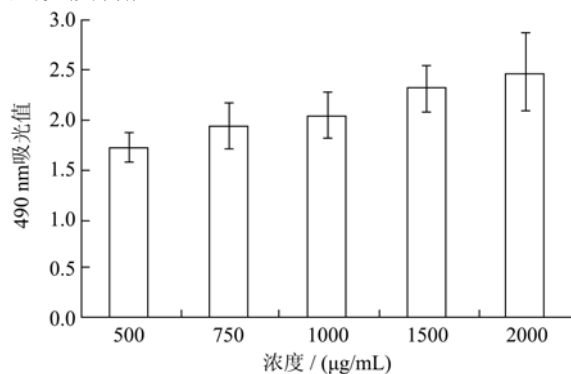


图1 裂褶菌多糖对小鼠巨噬细胞的影响

Fig.1 Effect of Schizophyllan on body fluid immunity in mice ( $\bar{x}\pm s$ )

### 2.5 裂褶菌多糖对结肠癌细胞增殖抑制作用

取浓度为 500 μg/mL、750 μg/mL、1000 μg/mL、1500 μg/mL、2000 μg/mL 裂褶菌多糖研究对结肠癌细胞增殖抑制作用,试验结果详见图2。

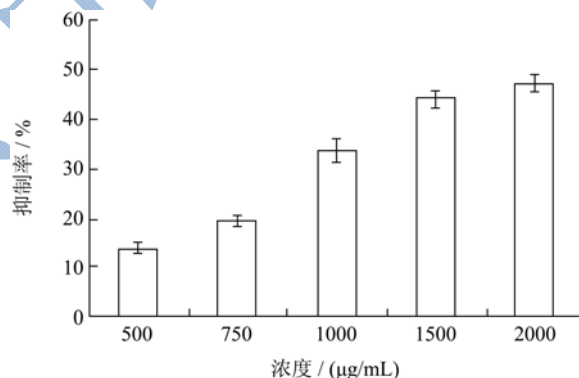


图2 裂褶菌多糖对结肠癌细胞增殖抑制作用

Fig.2 Effect of Schizophyllan on colon carcinoma ( $\bar{x}\pm s$ )

由图2可知,随着裂褶菌多糖浓度的增大,对结肠癌细胞增殖具有一定的抑制作用,当浓度为 2000 μg/mL 时其抑制率已达到 45.32%。

## 3 结论

本试验通过对免疫低下小鼠灌胃不同剂量裂褶菌多糖来研究其裂褶菌多糖对小鼠的免疫活性作用。试验结果表明:裂褶菌多糖对小鼠胸腺、脾脏器官具有一定的恢复作用;通过对小鼠足趾注射 SRBC 致敏,足趾具有一定的肿胀度;对小鼠血清中血清溶血素、IgG、IgA、IL-2 的测定,裂褶菌多糖的各剂量与免疫低下的模型组相比均有不同程度的提高;此外,裂褶

菌多糖可增强小鼠巨噬细胞的吞噬能力。同时,随着裂褶菌多糖浓度的增大对结肠癌细胞增殖抑制作用增强。

### 参考文献

- [1] Gao Li-zhong, Zhou Su-mei. Optimization of extraction technology of schizophyllan produced by solid fermentation [J]. Science and Technology of Food Industry, 2008, 29(2): 214-216
- [2] Zhang Yi-feng, Kong Hui-ling, Fang Ya-peng, et al. Schizophyllan: A review on its structure, properties, bioactivities and recent developments [J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2013, 1(1): 53-71
- [3] 戴玉成,杨祝良.中国药用真菌名录及部分名称的修订[J].菌物学报,2008,27(6): 801-824  
DAI Yu-cheng, YANG Zhu-liang. A revised checklist of medicinal fungi in China [J]. Mycosystema, 2008, 27(6): 801-824
- [4] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].第3版,北京:人民卫生出版社,2002  
XU Su-yun, BIAN Ru-lian, Chen Xiu. Experimental methodology of pharmacology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002
- [5] 马钊.洋葱多糖提取及其提高免疫力和降血脂功能性质研究[D].中国农业大学,2005  
MA Zhao. Study on the extraction, immune enhancement and hyperlipemia prevention function of onion polysaccharide [D]. Master Thesis, Agriculture University of China, 2005
- [6] 黄生权.赤灵芝多糖的提取分离、结构分析与生物活性研究[D].华南理工大学,2006  
HUANG Sheng-quan. Extraction, separation, structure characterization and bioactivities of polysaccharide from Ganoderma Lucidum [D]. PhD Dissertation, Northeast Forestry University, 2006
- [7] Kubala L J, Ruzickova K, Nickova J, et al. The effect of (1→3)-β-D-glucans, carboxymethylglucan and schizophyllan on human leukocytes in vitro [J]. Carbohydrate Research, 2003, 338(24): 2835-2840
- [8] Kwak J K, S W Park, J G Koo, et al. Enhancement of the non-specific defence activities in carp (cyprinus carpio) and flounder (paralichthys olivaceus) by oral administration of schizophyllan [J]. Acta Biotechnologica, 2003, 23(4): 359-371
- [9] 张均田,杜冠华.现代药理实验方法[M].第3版,北京:中国协和医科大学出版社,2012  
ZHANG Jun-tian, DU Guan-hua. Modern pharmacological experiments[M]. Beijing: Peking Union Medical College Press, 2012
- [10] Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assay [J]. Journal of Immunological Methods, 1983, 65(2):55-63
- [11] Kadowaki T, Ohno S, Taniguchi Y, et al. Induction of nitric oxide production in RAW264.7 cells under serum-free conditions by O-antigen polysaccharide of lipopolysaccharide [J]. Anticancer Research,2013, 7(33): 2875-2880
- [12] Lukas Kubalaa, Jana Ruzickovab, Kristina Nickova, et al. The effect of (1→3)-β-D-glucans, carboxymethylglucan and schizophyllan on human leukocytes in vitro [J]. Carbohydrate Research, 2003, 338(24): 2835-2840