

姬松茸多糖 ABD 的结构表征及抗炎活性研究

刘玮¹, 杨继国^{1,2}, 任杰², 张登辉², 宁正祥¹

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (2. 华南协同创新研究院, 广东东莞 523808)

摘要: 本文研究了从姬松茸子实体中提取的水溶性多糖 ABD 的结构和抗炎活性。水提姬松茸多糖溶液通过 seavage 法除蛋白, 以 85%乙醇沉淀, 经过 DEAE-sepharose Fast Flow 层析柱纯化得到多糖 ABD。通过紫外全波长扫描证明其中不含蛋白质和核酸等杂质; 通过刚果红试验证明其不具有三螺旋结构; 通过凝胶色谱分析得出, ABD 的分子量 (Mw) 为 2.058×10^3 ku; 通过高效液相色谱分析, 其单糖组成为葡萄糖、半乳糖、甘露糖和岩藻糖 (比例为 83.59:5.46:0.59:1.04); 通过 MTT 实验证明, 在 62.5~1000 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 多糖 ABD 对小鼠腹腔巨噬细胞 (RAW264.7) 没有明显的毒性; 通过脂多糖诱导的小鼠体外炎症模型, 测定了肿瘤坏死因子 (TNF- α) 和一氧化氮 (NO) 两种细胞因子的分泌情况, 结果证明多糖 ABD 对这两种细胞因子的分泌呈现抑制作用, 并且呈现浓度依赖性, 表现出抗炎活性。

关键词: 姬松茸多糖; 巨噬细胞 (RAW264.7); 抗炎活性

文章编号: 1673-9078(2017)5-27-32

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.5.005

Structure Characterization and Anti-inflammatory Activity of Polysaccharide ABD from *Agaricus blazei* Murill

LIU Wei¹, YANG Ji-guo^{1,2}, REN Jie², ZHANG Deng-hui², NING Zheng-xiang¹

(1. College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. South China Institute of Collaborative Innovation, Dongguan 523808, China)

Abstract: The structure and anti-inflammatory activity of the water-soluble polysaccharide ABD extracted from the fruit body of *Agaricus blazei* Murill were studied in this paper. After the proteins were removed using the Sevage method, the polysaccharide ABD was obtained by precipitating with 85% ethanol (final concentration) and purifying using the DEAE-sepharose Fast Flow chromatography column. Analysis of UV full-wavelength spectral scans showed that the ABD polysaccharide did not contain impurities, such as proteins and nucleic acids, and did not have a triple helix structure based on the result of Congo red test. The molecular weight was determined to be 2.058×10^3 ku by gel-permeation chromatography. The monosaccharide composition of ABD was evaluated by HPLC, and ABD was found to consist of glucose (83.59%), galactose (5.46%), mannose (0.59%), and fucose (1.04%). The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay proved that the ABD polysaccharide had no obvious toxicity to macrophages (RAW264.7) within the concentration range of 62.5~1000 $\mu\text{g/mL}$. The secretion of nitric oxide and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) was determined using a mouse model of lipopolysaccharide-induced inflammation *in vitro*. The results demonstrated that polysaccharide ABD had a dose-dependent inhibitory effect on the secretion of both nitric oxide and TNF- α , and exhibited excellent anti-inflammatory activity.

Key words: *Agaricus blazei* Murill polysaccharide; RAW264.7 macrophages; anti-inflammatory activity

姬松茸又称巴西蘑菇 (*Agaricus Blazei murill*), 是一种药食两用的真菌, 属担子菌亚门层菌纲伞菌目蘑菇 (黑伞) 科蘑菇 (黑伞) 属, 含有丰富的蛋白质和多糖^[1]。在过去, 人们从姬松茸的子实体和菌丝中提取多糖进行研究, 发现它们有抗肿瘤作用^[2]并做了广泛的研究。近些年的一些发现表明, 姬松茸多糖还具有抗病毒、抗氧化和免疫调节等多方面的功效^[3-5]。真菌多糖中香菇多糖、灰树花多糖和猴头菇多糖在免疫调节方面都有大量的研究也得到了较好的结果^[6-8], 而关于姬松茸多糖的研究较少, 主要通过小鼠体内实验和体外细胞实验。王丽娟^[9]等通过对灌胃姬松茸多糖的幼鼠的胸腺和脾脏等器官的重量测量得出, 姬松茸多糖可以使这些免疫器官增长, 具有提高免疫力、增强免疫调节的功能。Marina M. Padilha 等用水提和碱提的姬松茸多糖灌胃小鼠, 证明可以抑制由霉菌素引

收稿日期: 2016-07-05

基金项目: 十二五科技支撑计划子课题 (2012BAD33B11)

作者简介: 刘玮 (1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学

通讯作者: 杨继国 (1977-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品生物化学

起的组织水肿,具有明显的抗炎作用^[10]。贾薇等人^[11]通过实验得出姬松茸多糖可以刺激小鼠淋巴细胞分泌免疫球蛋白和细胞白介素 6 (IL-6)、干扰素 (IFN) 等增强免疫能力的细胞因子,可以提高小鼠的免疫能力。巨噬细胞是免疫效应细胞,具有多种免疫调节功能,因此常被作为一种理想的模型来评价一些生物活性物质的免疫调节性能^[12]。Haitian Fu 等^[13]提取了一种 536Kd 的姬松茸多糖,测定了它对小鼠腹腔巨噬细胞 (RAW264.7) 的免疫调节作用,结果证明它可以刺激肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的分泌,其他研究者也测定过姬松茸多糖对于 IL-6、IL-10、IFN- γ 等分泌情况,结果证明对这些细胞因子都有促进的作用^[14],能够增强机体免疫功能。当机体中存在过量的 LPS 时,它会过度刺激巨噬细胞释放 TNF- α 、NO、ILs 等炎症介质,进而引发机体的炎症反应^[15],而要消除炎症反应,就需要将这些细胞因子的含量降低。Tingyu Wang 等人利用小鼠巨噬细胞来证明了白花丹素可以抑制 LPS 诱导的炎症模型中细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的分泌,并研究了它抗炎的作用机理^[16]。

本文采用常用的水提醇沉法,采用与文献不同的醇沉浓度,以期得到一种新的多糖并对其做了各种结构表征。另外,本文从姬松茸多糖研究较少的抗炎活性入手,以小鼠巨噬细胞 RAW264.7 为研究对象,首先测定了 ABD 多糖对巨噬细胞的毒性情况,其次研究了在脂多糖 (LPS) 诱导形成炎症的条件下,两种主要的炎症因子 TNF- α 和 NO 分泌的情况,以检验提取的姬松茸多糖 ABD 的抗炎活性和为进一步的机理研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

姬松茸干货福建古田;单糖标品(葡萄糖、半乳糖、岩藻糖、鼠李糖、木糖、核糖、阿拉伯糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸、甘露糖、果糖) Sigma 公司; DEAE-sepharose Fast Flow 上海源叶生物科技有限公司; MTT (B.R.) 美国 sigma 公司; LPS (B.R.) 美国 sigma 公司; 刚果红; 1-苯基-3-甲基-5 吡唑啉酮 (PMP) 美国 Acros Organics 公司; 乙腈色谱纯; NO 试剂盒南京建成生物有限公司; TNF- α 酶联免疫反应试剂盒欣博盛生物科技有限公司; RAW264.7 细胞株广州中医药大学提供。

1.2 仪器与设备

CO₂ 培养箱: HERACELL 赛默飞世尔科技(中国)

有限公司; 酶联免疫测试仪 Varioskan Flash: 美国 Thermo 公司; 红外光谱仪 Vector 33 型: 德国 Bruck 公司; 高效液相色谱仪 Waters 1525: 美国 Waters 公司; 紫外可见分光光度计 UV 1800: 日本岛津公司。

1.3 实验方法

1.3.1 ABD 多糖的提取与纯化

将购买的姬松茸(干货)打粉,按料液比 1:20 加去离子水,沸水浴加热 2 h,过滤后取滤渣重复操作,将滤液合并。浓缩滤液,按 1:1 加入 *sevage* (氯仿:正丁醇=4:1) 试剂,在 100 r/min 条件下震荡 25 min,之后 4000 r/min 离心 15 min,取上层溶液重复该操作至蛋白层不再有蛋白析出为止,加入 95% 乙醇使得最终乙醇浓度为 85%,沉淀 12 h,离心取沉淀冻干,得到姬松茸粗多糖。将粗多糖经过 DEAE-sepharose Fast Flow 层析柱,以蒸馏水为洗脱液,流速 1 mL/min,以每管 5 mL 收集洗脱出的溶液,用硫酸苯酚法测量多糖含量,绘制洗脱曲线并确定收集管数。最后将收集到的多糖溶液浓缩并冻干,即得到纯化多糖 ABD。

1.3.2 ABD 多糖的一些理化性质

以硫酸-苯酚法测定纯化后的 ABD 多糖中总糖含量,以考马斯亮蓝法测定其中蛋白质含量,以硫酸-吡唑啉法测定其中糖醛酸含量。

1.3.3 ABD 多糖的紫外扫描以及分子量分布测定

将 ABD 多糖配制成 1 mg/mL 的溶液,用紫外可见分光光度计在 200~800 nm 波长范围内扫描。

分子量测定的方法:本实验采用美国 Water 公司的高效凝胶渗透色谱法测定姬松茸多糖 ABD 的分子量分布,色谱条件为 TSK G-5000 PWXL column (7.8×300 mm) 和 TSK G-3000 PWXL column (7.8×300 mm) 串联,流动相为 0.02 mol/L 的 KH₂PO₄ 缓冲溶液,流速为 0.6 mL/min, waters 2414 示差检测器,柱温 35 °C,测量时间为 45 min。

1.3.4 ABD 多糖的单糖组成测定

称取 10 mg ABD 多糖样品,加入 4 L、2 mol/L 的三氟乙酸溶液转移到安培瓶中,鼓吹氮气并用酒精喷灯封口,在烘箱中 110 °C 水解 6 h,得到的溶液用氮气吹干,加入甲醇 3 mL 旋蒸至干,重复 3~4 次,除去多余的三氟乙酸。最后将水解样溶于 1 mL 水中,制备得多糖的水解样品。

称取 D-葡萄糖、D-阿拉伯糖、D-甘露糖、D-半乳糖、L-岩藻糖、L-鼠李糖、D-葡萄糖醛酸、D-半乳糖醛酸、D-木糖、D-核糖和 D-果糖各 5 mg,用去离子水溶解配置成 5 mg/mL 浓度的标准品溶液。

吸取标准品溶液和样品水解液各 200 μL ，依次加入 200 μL 、0.5 mol/L 的 PMP 甲醇溶液和 200 μL 、0.3 mol/L 的 NaOH 溶液，70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 60 min。冷却至室温后加入 200 μL 、0.3 mol/L 的 HCl 溶液，加去离子水补充至 2 mL，分三次加入三氯甲烷 5 mL 并涡旋震荡均匀，3000 r/min 离心 5 min 后弃去下层，重复三次至三氯甲烷层无颜色，上层溶液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤后供 HPLC 进样。

HPLC 分析条件为色谱柱：Dionex Acclaim 120 C18 (4.6 \times 250 mm, 5 μm)；流动相：0.1 M (pH=6.7) PBS:乙腈=81:19(V/V)，流速 1.0 mL/min；柱温：30 $^{\circ}\text{C}$ ；检测波长：250 nm；进样量 10 μL 。

1.3.5 ABD 多糖的红外光谱扫描

取适量多糖样品混合 100 mg KBr 于玛瑙研钵中，干燥条件下研磨均匀并压片，将压好的片放在红外光谱测试仪中 4000 cm^{-1} 到 400 cm^{-1} 扫描，对扫描结果进行分析。

1.3.6 ABD 多糖的三螺旋结构分析

称取 5 mg ABD 多糖，加入 2.0 mL 的蒸馏水溶解，再加入 2.0 mL 的刚果红试剂 (80 $\mu\text{mol/L}$)；取 2.0 mL 蒸馏水和 2.0 mL 刚果红试剂混合，作为空白；同时用已知有三螺旋结构的多糖 Curdlan 溶液与 2.0 mL 刚果红试剂混合作为对照。向三种溶液中加入 1 mol/L 的 NaOH 溶液，使得碱的浓度分别为 0、0.10、0.15、0.20、0.30、0.40、0.50 mol/L，并且测量它们在 200–800 nm 之间的吸收情况，记录最大吸收波长。以 NaOH 的浓度为横坐标，以最大吸收波长为纵坐标做图分析。

1.3.7 ABD 多糖的细胞毒性实验

将处于对数生长期的 RAW264.7 小鼠巨噬细胞用胰酶消化，配成 2×10^5 个/mL 的细胞悬液，反复吹打后均匀地接种在 96 孔板中，每个孔 100 μL ，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h，待到细胞贴壁之后将上清液吸出，加入 100 μL 不同浓度的多糖溶液 (1000 $\mu\text{g/mL}$ 、500 $\mu\text{g/mL}$ 、250 $\mu\text{g/mL}$ 、125 $\mu\text{g/mL}$ 和 62.5 $\mu\text{g/mL}$)，阴性对照组分别加入 100 μL DMEM 培养基，阳性对照组加入 100 μL 、50 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS，每个样品设三个平行。继续培养 24 h，将培养液吸出，每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL 继续培养 4 h，最后再加入 150 μL DMSO，37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡 10 min，在 490 nm 处测量 OD 值。

$$I(\%) = (\text{OD}_{\text{样品}} - \text{OD}_{\text{板空白}}) / (\text{OD}_{\text{阴性对照}} - \text{OD}_{\text{板空白}}) \times 100\%$$

注：I 为细胞存活率。

1.3.8 ABD 多糖的抗炎活性实验

将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞消化，配制

成 10^6 个/mL 的细胞悬液，然后按毒性试验中的操作接种在 96 孔板中，培养 24 h 使细胞贴壁生长。加入不同浓度的多糖溶液 100 μL ，两小时后加入 50 μL LPS (最终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$) 每个浓度设置三个平行；空白组加入 150 μL DMEM 培养液；阳性对照组加入 150 μL 、50 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS，培养 24 h，吸取细胞培养液，根据 ELISA 试剂盒和 NO 快速检测盒的说明测定 TNF- α 和 NO 含量。

1.3.9 数据统计分析

采用 Origin 8.5 和 SPSS 10.0 对本文数据进行处理和分析，每组均重复 3 次，数据表示为平均值 \pm 标准偏差。

2 结果与分析

2.1 ABD 的一些理化性质

根据 1.3.2 中的方法测定出 ABD 多糖中总糖含量为 $83.47\pm 1.14\%$ ，蛋白质含量为 $0.02\pm 0.0014\%$ ，糖醛酸含量为 $0.05\pm 0.0016\%$ 。

2.2 ABD 的紫外扫描与分子量分布的测定

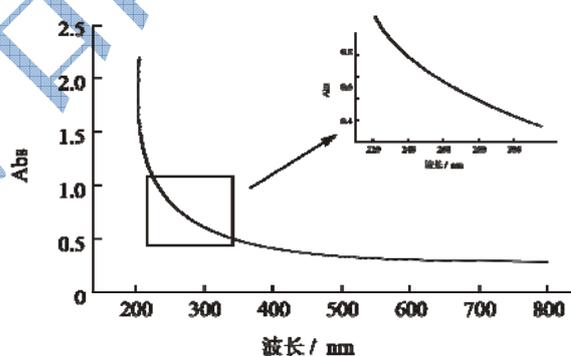


图1 ABD 多糖的紫外吸收光谱图

Fig.1 UV absorption spectrum of ABD

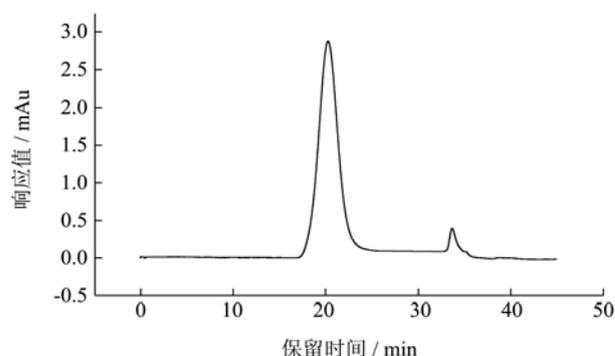


图2 ABD 多糖的高效凝胶渗透色谱谱图

Fig.2 High-performance gel permeation chromatography (HPGPC) analysis of ABD

采用 1.3.3 中方法测定提取的 ABD 多糖的紫外光

谱和分子量, 结果如图 1 和图 2 所示。

图 1 中在 260 nm、280 nm 处没有明显的紫外吸收, 说明在经过 sewage 试剂处理后 ABD 多糖中并不含有蛋白质和核酸等杂质, 与 2.1 中结果相符合。

通常所说的多糖纯品是指分子量均匀分布在一定范围内的一系列多糖混合物, ABD 多糖的反相凝胶色谱显示洗脱出的多糖形成一个对称的单峰, 说明样品中存在一种多糖纯品, 通过 Breeze GPC 软件分析得到峰位置 ($R_t=20.300$ min), 其中数均分子量 M_n 为 703 ku, 重均分子量 M_w 为 2058 ku, 它们的多分散系数为 α 为 2.92, 是一种分子量相对较大且分子量分布范围较广的多糖。而在 $R_t=32.500$ min 处小峰为溶剂峰。

2.3 ABD 的单糖组成分析

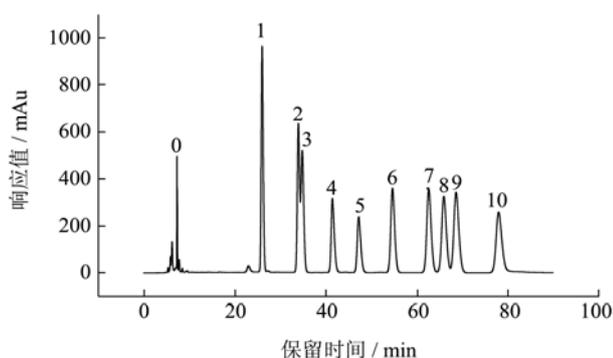


图 3 各种单糖样品的高效液相色谱图

Fig.3 HPLC analysis of monosaccharide standards

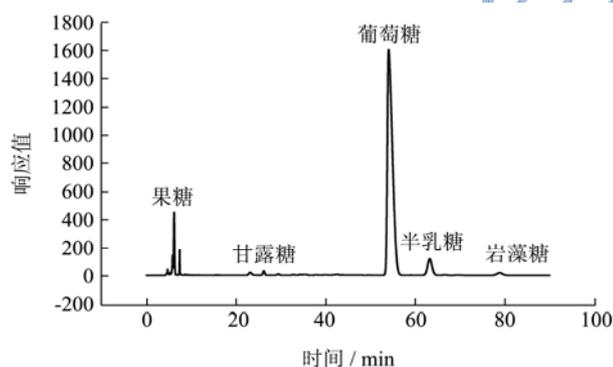


图 4 ABD 多糖水解物的高效液相色谱图

Fig.4 HPLC analysis of ABD hydrolysis products

采用 1.3.4 中方法处理各种单糖标准品和 ABD 多糖, 对得到的高效液相谱图分析, 图 3 中得到了各种单糖标准品的出峰顺序, 图 4 中得到 ABD 中的单糖组成。

图 3 中 0 号为内标 D-果糖, 序号 1~10 分别为 D-甘露糖、D-核糖、L-鼠李糖、D-葡萄糖醛酸、D-半乳糖醛酸、D-葡萄糖、D-半乳糖、D-木糖、D-阿拉伯糖和 L-岩藻糖。在图 4 中根据与标准品出峰顺序比较可以得出, ABD 多糖中主要含有葡萄糖、半乳糖、甘露

糖和岩藻糖等四种单糖, 根据软件自动对峰面积积分和内标法计算得到它们的含量比例为 83.59:5.46:0.59:1.04。单糖组成中葡萄糖含量较高, 目前未见相同文献报道。

2.4 ABD 的红外光谱分析

采用 1.3.5 中方法对 ABD 进行红外光谱分析, 得到图谱如图 5 所示。

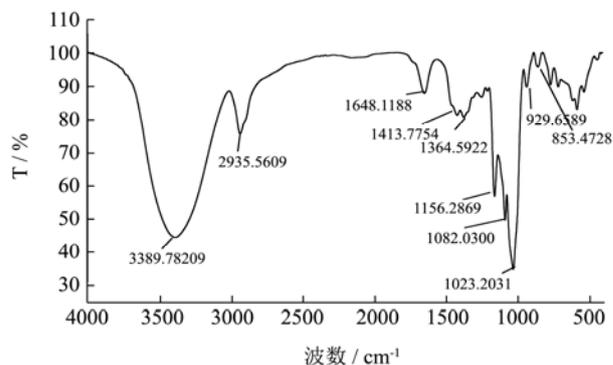


图 5 ABD 多糖的红外光谱图

Fig.5 Infrared spectrum of ABD

由图 5 可以看出, 在 4000~650 cm^{-1} 范围内呈现典型的多糖吸收峰, ABD 样品在 3389 cm^{-1} 处有一宽而强的吸收, 此处是 -OH 的伸缩振动吸收峰; 2935 cm^{-1} 处的吸收峰代表 CH_2 或者 CH_3 中的 C-H 伸缩振动吸收; 1648 cm^{-1} 处的吸收可能为酰胺羰基 C=O 的伸缩振动峰^[17-20]; 1300~1000 cm^{-1} 范围的吸收可能是吡喃糖环 C-O-C 的吸收峰, 其中 1156 cm^{-1} 、1023 cm^{-1} 和 1082 cm^{-1} 处是吡喃糖的特征吸收峰; 853 cm^{-1} 处为 α -D-吡喃葡萄糖的吸收峰; 在 1750~1700 cm^{-1} 之间没有吸收, 说明样品中不含糖醛酸^[21], 与高效液相结果一致。

2.5 ABD 的三螺旋结构分析

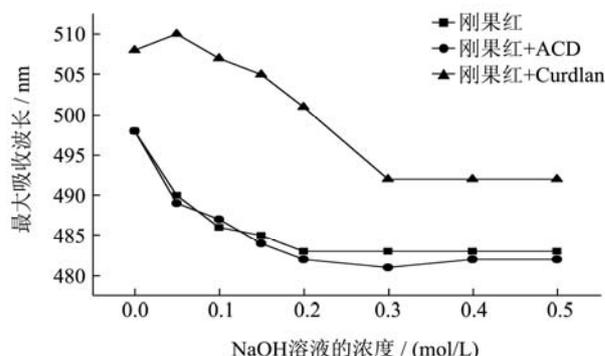


图 6 ABD 多糖的刚果红复合物最大吸收波长变化

Fig.6 Changes in the maximum absorption of ABD-Congo red complex in solution with various concentrations of sodium hydroxide

采用 1.3.6 中方法测定多糖与刚果红在不同 NaOH 浓度下的最大吸收波长变化, 得到结果如图 6 所示。

多糖中存在很多羟基, 它们之间可以通过氢键缔合, 从而形成螺旋结构, 氢氧化钠可以破坏这种螺旋结构。从图 6 中看出, 在没有 NaOH 的情况下, 有螺旋结构的 Curdlan 与刚果红结合后, 发生了明显的红移现象^[22], 而 ABD 与刚果红的结合物没有红移现象; 随着 NaOH 浓度的增大, 多糖与刚果红的结合物最大吸收波长都呈下降趋势, 并且在 NaOH 浓度达到 0.3 mol/L 之后结合物最大吸收波长都趋于稳定, 但是在整个过程中, 刚果红溶液的最大吸收波长与 ABD 与刚果红结合物的最大吸收波长相比, 没有明显的变化, 而与 Curdlan 和刚果红结合物的最大吸收波长相比, 明显偏小, 说明 ABD 多糖不存在三螺旋结构。

2.6 ABD 的细胞毒性实验

采用 1.3.7 中的方法测定不同浓度 ABD 对巨噬细胞的毒性, 结果如图 7。

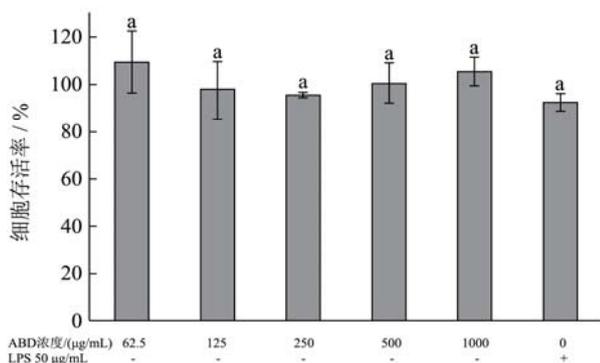


图 7 不同浓度 ABD 多糖的 MTT 实验结果

Fig.7 MTT assay results with various concentrations of ABD

MTT 实验是检测多糖溶液对于巨噬细胞是否有毒性作用, 根据图 7 可以看出, 在浓度范围 62.5 µg/mL~1000 µg/mL 内, 巨噬细胞的存活率都在 90% 以上, 未对细胞造成明显的毒性影响, 并且在 62.5 µg/mL 和 1000 µg/mL 时, 存活率分别为 109.33±13.26%和 105.37±6.13%, 表现出一定程度的增殖。在抗炎试验中做为阳性对照的 LPS 对细胞也没有明显的毒性, 存活率为 92.26±3.99%。试验各组之间并没有显著性差异 ($p>0.05$)。说明试验浓度范围的多糖溶液和 LPS 都不会对细胞的增殖造成明显的改变, 也证明进一步测定细胞因子分泌情况不会受细胞增殖影响。

2.7 ABD 的抗炎活性实验

采用 1.3.8 的方法, 测定炎症因子 TNF- α 和 NO 的浓度变化, 结果如图 8、9 所示。

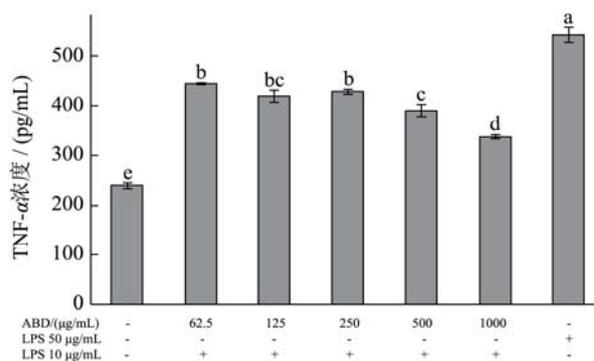


图 8 不同浓度 ABD 多糖对 TNF- α 抑制能力

Fig.8 Effect of ABD on TNF- α secretion

注: 图中 a、b、c、d 和 e 不同的字母表示显著性差异 ($p<0.05$); 相同的字母表示没有显著性差异 ($p>0.05$)。

从图 8 中可以看出, 实验组和 LPS 诱导组与空白对照组的 TNF- α 分泌量相比都存在显著差异 ($p<0.01$), 说明 LPS 可以明显激活巨噬细胞产生 TNF- α , 炎症模型可以成功构建; 实验组内部相比较, ABD 多糖在较低浓度 (62.5、125、250 µg/mL) 下 TNF- α 的分泌量分别为 445.20±1.08 pg/mL、419.07±13.10 pg/mL 和 429.82±4.87 pg/mL ($p>0.05$), 表明对 TNF- α 的抑制效果并不明显, 而在高浓度 (250、500、1000 µg/mL) 各组间呈现明显的剂量效应关系 ($p<0.05$)。

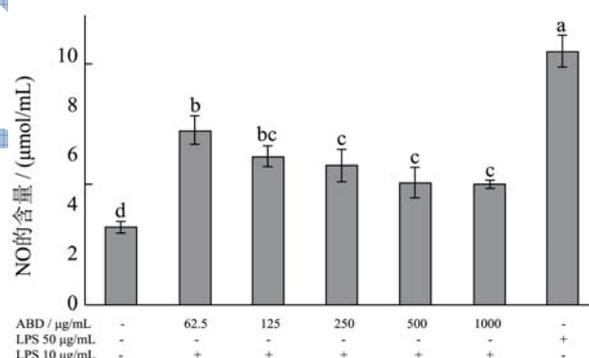


图 9 不同浓度 ABD 多糖对 NO 的抑制能力

Fig.9 Effect of ABD on nitric oxide secretion

注: 图中 a、b、c、d 和 e 不同的字母表示显著性差异 ($p<0.05$), 相同的字母表示没有显著性差异 ($p>0.05$)。

从图 9 中看出, LPS 诱导组和实验组与空白对照组相比较, NO 分泌量有明显的提升 ($p<0.05$), 说明 LPS 已经诱导出了炎症模型; 在实验组内, 随着多糖含量的增加, NO 的分泌量逐渐减少分别为 7.13±0.71 µmol/L、6.12±0.45 µmol/L、5.75±0.69 µmol/L、5.03±0.66 µmol/L 和 4.98±0.19 µmol/L, 但浓度从 250 µg/mL 开始 NO 的分泌浓度并无显著性差异 ($p>0.05$)。

TNF- α 可以促进 T 细胞产生各种炎症因子促进炎症反应, NO 可以调节巨噬细胞吞噬病原微生物和破

坏致病生物大分子, 它们都是主要的炎症因子。在抗炎活性试验中, 随着 ABD 多糖浓度的增加, TNF- α 和 NO 的分泌量都呈现减少趋势。可能是因为 ABD 多糖抑制了巨噬细胞的吞噬作用和活化, 或者是下调了 TNF- α 的 mRNA 和 iNOS 表达水平产生的抗炎效果, 具体原因都有待于进一步的研究。

3 结论

通过以上的研究显示, 水提醇沉的多糖 ABD 在 sewage 法除蛋白后不再含有蛋白质、核酸等杂质; 是一种分子量比较大的多糖 (2.058×10^3 ku), 目前未见相同的文献报道。与当前人们研究的姬松茸多糖相比, ABD 多糖中没有三螺旋结构, 单糖组成中葡萄糖含量更高, 为 83.59%, 其他单糖含量较少, 与文献报道不同。活性实验中证明姬松茸多糖 ABD 对巨噬细胞没有明显的毒性作用, 可以在今后开展相关的功能性食品研究。体外 RAW264.7 细胞炎症模型中的结果表明, ABD 多糖可以抑制细胞因子 TNF- α 和 NO 的过度分泌, 并随着多糖浓度的增加, 抑制效果都呈现增强趋势, 这些表明 ABD 多糖具有抗炎活性; 但是对 TNF- α 的抑制作用在较高浓度时更为明显, 而对 NO 的抑制作用在低浓度时比较明显。

参考文献

- [1] 李娜, 徐仲伟, 宁正祥, 等. 姬松茸研究现状与展望[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(7): 166-169
LI Na, XU Zhong-wei, NING Zheng-xiang, et al. Summarization and review of *Agaricus blazei Murill* [J]. The Research and Development of Food, 2009, 30(7): 166-169
- [2] Mizuo T, J Hagiwara, T Nakamura, et al. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "*Himematsutake*", the fruiting body of *Agaricus blazei Murill* [J]. Agric. Biol. Chem., 1990, 54(11): 2889-2896
- [3] Berven L, P Karppinen, G Hetland, et al. The polar high molecular weight fraction of the *Agaricus blazei Murill* extract, andosan, reduces the activity of the tumor-associated protease, legumain, in RAW 264.7 cells [J]. Journal of Medicinal Food, 2015, 18(4): 429-438
- [4] D Verçosa Júnior, V P Ferraz, E R Duarte, et al. Effects of different extracts of the mushroom *Agaricus blazei Murill* on the hematologic profile of mice with Ehrlich tumor [J]. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2015, 67(3): 679-688
- [5] 高尚龙. 三种姬松茸多糖的抗氧化、抗衰老活性与结构研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014
GAO Shang-long. Antioxidant, anti-aging activities and structure of three *Agaricus blazei* polysaccharide [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2014
- [6] Y Nishitani, L Zhang, M Yoshida, et al. Intestinal anti-inflammatory activity of lentinan: influence on IL-8 and TNFR1 expression in intestinal epithelial cells [J]. Plos One, 2013, 8(4): 624-41
- [7] C Coy, L J Standish, G Bender, et al. Significant correlation between TLR2 agonist activity and TNF- α induction in J774.A1 macrophage cells by different medicinal mushroom products [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2015, 17(8): 713-722
- [8] J S Lee, J Y Cho, E K Hong. Study on macrophage activation and structural characteristics of purified polysaccharides from the liquid culture broth of *Hericium erinaceus* [J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 78(1): 162-168
- [9] 王丽娟, 张彦青, 王勇, 等. 姬松茸多糖增强免疫作用及急性毒性研究[J]. 食品科学, 2014, 35(13): 258-261
WANG Li-juan, ZHANG Yan-qing, WANG Yong, et al. Immune-enhancing effects and acute toxicity of *Agaricus blazei* polysaccharide in mice [J]. Food Science, 2014, 35(13): 258-261
- [10] M M Padilha, A A Avila, P J Sousa, et al. Anti-inflammatory activity of aqueous and alkaline extracts from mushrooms (*Agaricus blazei Murill*) [J]. Journal of Medicinal Food, 2009, 12(2): 359-364
- [11] 贾薇, 严淑玲, 樊华. 姬松茸子实体多糖 ABMB3 对小鼠免疫功能的影响[J]. 食用菌学报, 2010, 17(1): 65-68
JIA Wei, YAN Shu-ling, FAN Hua. Effect of a polysaccharide fraction from *Agaricus blazei* fruit bodies on murine immunological functions [J]. Acta Edulis Fungi, 2010, 17(1): 65-68
- [12] S S Zhang, Li Wen-juan, S P Nie, et al. Effects of polysaccharide of *Ganoderma atrum* on the function of mouse peritoneal macrophages *in vitro* [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2010, 26(9): 1139-42
- [13] H Fu, C Deng, L Teng, et al. Immunomodulatory activities on RAW 264.7 macrophages of a polysaccharide from veiled lady mushroom, dictyophora indusiata (*Higher basidiomycetes*) [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2015, 17(2): 151-160
- [14] G Hetland, E Johnson, T Lyberg, et al. Effects of the medicinal mushroom *Agaricus blazei Murill* on immunity, infection and cancer [J]. Scandinavian Journal of Immunology, 2008, 68(4): 363-370

- [15] A H Sprague, R A Khalil. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2009, 78(6): 539-552
- [16] Ting-yu Wang, Fei-hua Wu, Zhi-gui Jin, et al. Plumbagin inhibits LPS-induced inflammation through the inactivation of the nuclear factor-kappa B and mitogen activated protein kinase signaling pathways in RAW 264.7 cells [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2014, 64(6): 177-183
- [17] Guerrero P, Kerry J P, de la Caba K. FT-IR characterization of protein-polysaccharide interactions in extruded blends [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 111(6): 598-605
- [18] Gonzaga M L C, Ricardo N M P S, Heatley F, et al. Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei Murill* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2005, 60(1): 43-49
- [19] Wu W, Zhu Y, Zhang L, et al. Extraction, preliminary structural characterization, and antioxidant activities of polysaccharides from *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87(2): 1348-1353
- [20] Zhang M, Wang G, Lai F, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Lepidium meyenii* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(9): 1921-1931
- [21] 向莹.滑子菇多糖结构和生物活性的研究[D].广州:华南理工大学,2013
XIANG Ying. Study on structure bioactivity of polysaccharide from *Pholiota nameko* [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013
- [22] H H Lee, J S Lee, J Y Cho, et al. Structural characteristics of immunostimulating polysaccharides from *Lentinus edodes* [J]. *Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 19(5): 455-461