

蜜蜂巢脾多糖理化性质及其对免疫抑制小鼠的免疫调节和抗氧化作用分析

殷玲¹, 吉挺², 战旭梅¹, 李冠华¹

(1. 江苏农牧科技职业学院食品科技学院, 江苏泰州 225300) (2. 扬州大学动物科技学院, 江苏扬州 225009)

摘要: 本文分析了蜜蜂巢脾多糖的理化性质、急性毒性及其对免疫抑制小鼠的免疫调节和抗氧化作用。高效液相色谱及光谱法等检测其理化性质, 结果表明, 巢脾多糖总糖含量 75.77%, 蛋白质含量 13.82%, 糖醛酸含量 0.19%, 还原糖含量 4.20%, 主要由阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖等单糖组成, 不含多酚类物质。巢脾多糖雌、雄性小鼠经口耐受剂量 >10000 mg/kg, 属实际无毒级别。构建了免疫抑制小鼠模型, 以灌胃方式给予不同剂量巢脾多糖, 结果显示, 与模型组相比, 巢脾多糖四个剂量对小鼠血清溶血素水平、丙二醛 (MDA) 含量、超氧化物歧化酶 (SOD) 及过氧化氢酶 (CAT) 活性影响显著 ($p < 0.05$), 其中中剂量组 (100 mg/kg) 差异极显著 ($p < 0.01$), 此剂量下, 小鼠血清 OD 值、SOD 及 CAT 活性分别提高至 0.09、125.07 U/mgprot、13.85 U/mL, MDA 含量降低至 4.89 nmol/mL。表明巢脾多糖可有效提高免疫抑制小鼠免疫功能及抗氧化能力, 在医药和食品领域具有较好的开发潜力。

关键词: 巢脾多糖; 理化性质; 急性毒性; 免疫调节; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2018)02-32-37

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.2.006

Physicochemical Properties of Polysaccharides from HoneyComb and their Immunomodulatory and Anti-oxidative Effects on Immunosuppressed Mice

YIN Ling¹, JI Ting², ZHAN Xu-mei¹, LI Guan-hua¹

(1. School of Food Science and Technology, Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China)

(2. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: In this study, physicochemical properties, acute toxicity, immunomodulatory and anti-oxidative effects of polysaccharides isolated from honeycomb on the immunosuppressed mice were analyzed. Physicochemical properties of polysaccharides isolated were investigated by the high performance liquid chromatography and spectrophotometry. The results showed that honeycomb polysaccharides contained 75.77% total sugar, 13.83% protein, 0.19% uronic acid, 4.20% reducing sugar, and they did not contain polyphenols. The composition of honeycomb polysaccharides mainly includes arabinose, glucose, galactose and so on. The oral acute toxicity test revealed that the oral tolerance dose of honeycombe polysaccharides for both male and female mice was larger than 10000 mg/kg, which belonged to the actual non-toxic level. Immunosuppressive mice model was established, and immunosuppressed mice were administrated at different doses of honeycomb polysaccharides. The results showed that compared with the model group, all the different doses of polysaccharides could significantly increase the content of hemolysin and the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), and also significantly decrease the level of malondialdehyde (MDA) in serum. The medium-dose group showed significant differences compared to the model group ($p < 0.01$). In this dosage, the OD value, the activity of SOD and CAT in serum were increased to 0.09, 125.07 U/mgprot and 13.85 U/ml respectively. In addition, the content of MDA decreased to 4.89 nmol/ml. This result indicated that the honeycomb polysaccharides could effectively antagonize cyclophosphamide-induced immune suppression and enhance antioxidant function in immunosuppressed mice, had good development potential in the field of medicine and food.

收稿日期: 2017-08-23

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31502020); 江苏农牧科技职业技术学院重点科研课题 (NSFR1401); 江苏农牧科技职业技术学院科研课题 (NSFPT201521); 校企合作课题 (00010115004); 农业部产业技术蜂体系 (CARS-45-SYZ6)

作者简介: 殷玲 (1983-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 蜂产品活性及产品开发

Key words: honeycomb polysaccharide; physicochemical properties; acute toxicity; immune modulation; antioxidation

蜜蜂发育会经过卵、幼虫、蛹到成虫的一系列过程。由于蜕皮激素与保幼激素的作用,蜜蜂在每个发育阶段必然经历若干次的蜕皮过程,蜕下的茧衣紧紧依附于巢房的内壁,蜜蜂成虫后会残留下蛹退下的茧衣和一些排泄的物质;同时巢房也是蜜蜂贮存食物的场所,蜂蜜、蜂胶、花粉和王浆等物质也残留在巢房中。因此,巢脾成分十分复杂,研究显示蜜蜂巢脾含有大量的生物活性成分,如多糖、有机酸、生物碱、鞣质以及苷类等^[1-3]。蜜蜂巢脾具有抑菌杀菌,杀虫攻毒,祛风镇痛,降血压,降血脂,抗氧化等多种生物学及药理学价值^[4-6]。我国是世界第一养蜂大国,养蜂生产淘汰下来的巢脾数量相当可观,但巢脾常被用来提取蜂蜡,而其中的其它活性物质却被丢弃,造成了极大的资源浪费。同时由于对巢脾的基础性研究、药理学研究十分匮乏,巢脾的深加工推广应用还有很多问题,制约了巢脾制品的规模产业化。近年来,随着人们对天然多糖研究的深入,天然多糖所具有的调节人体免疫、抗氧化、抗肿瘤和降低固醇等各种生理功能逐渐为人们所重视^[7-10],多糖已经开始在食品、功能性保健品和药物等领域进行开发应用^[11,12]。蜜蜂巢脾多糖(下文简称巢脾多糖)是蜜蜂巢脾中的主要功效成分,有着重要的开发价值和广阔的应用空间,而目前对于蜂巢多糖的生物活性及开发应用仍处于空白。本试验对初步纯化后的巢脾多糖进行理化性质、急性毒性及对免疫抑制小鼠的免疫调节和抗氧化作用进行分析,以期对蜜蜂巢脾多糖的生物活性及开发应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

西方蜜蜂老巢脾(使用三年以上)。

氯仿、正丁醇、乙酸乙酯、吡啶、溴化钾、乙腈、甲醇、磷酸二氢钠均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司;三氟乙酸(TFA)、1-苯基-3-甲基-5-吡啶酮(PMP)、单糖标准品均为色谱纯,购自上海源叶生物科技有限公司。

绵羊红细胞,南京森贝伽生物科技公司;小鼠免疫球蛋白IgG试剂盒,上海远慕生物科技公司;豚鼠血清(补体)上海远慕生物科技公司。

丙二醛(MDA)测定试剂盒、总超氧化物歧化酶(T-SOD)测定试剂盒、过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒均购自南京建成生物制药研究所。

1.2 仪器与设备

紫外可见分光光度计 T6,北京普析通用仪器有限公司;双光束紫外可见分光光度 TU-1901,北京普析通用仪器有限公司;高效液相色谱 1260,德国安捷伦公司;显微红外光谱仪 670,美国 Varian 公司;全波长扫描式多功能读数仪,美国 Thermo 公司。

1.3 实验动物

SPF 级 KM 小鼠,雌雄各半,共 100 只,6~8 周龄,体重 18~22 g,购自扬州大学实验动物中心,许可证号:SCXK(苏)2012-0004。使用小鼠全价颗粒饲料饲喂,饮用无菌水,环境安静,室温维持在 20℃左右,通风良好。

1.4 方法

1.4.1 提取蜜蜂巢脾多糖

粉碎的蜜蜂巢脾→按 1:15 比例加入蒸馏水→50℃水浴锅水浴 90 min→120 目纱布过滤→重复三次→浓缩至→冷却离心→1:4 无水乙醇→4℃静置过夜→取沉淀离心→蜜蜂巢脾粗多糖→去色素→去蛋白→滤去离子等小分子杂质→蜜蜂巢脾多糖

1.4.2 多糖基本理化性质的测定

1.4.2.1 基本组成测定

分别采用费林试剂反应及硫酸-苯酚法测定蜜蜂巢脾多糖中还原糖及总糖含量;利用三氯化铁反应及碘-碘化钾反应分别检测多羟基酚类物质及淀粉;考马斯亮蓝法检测蛋白质含量;硫酸-吡啶法检测糖醛酸含量;pH 计在室温下测其 pH 值;不同极性溶液检测其溶解性。

液相色谱条件^[13],色谱柱:ZORBAX Eclipse XDB-C18, 250 mm×4.6 mm×5 μm;流动相:0.1 mol/L 磷酸二氢钾(pH 6.7)缓冲液-乙腈(0~18 min 体积比为 82:18, 18~40 min 体积比为 83:17);柱温:25℃;检测波长:250 nm;流速:1 mL/min;进样体积:20 μL。检测器:DAD。

1.4.2.2 光谱分析

采用紫外光谱和红外光谱判断蜜蜂巢脾的多糖结构。巢脾多糖样品(0.05 mg/mL)置于紫外可见分光光度计中 190 nm~380 nm 波长处进行扫描。巢脾多糖(充分干燥粉末)少许,加入少许溴化钾晶体,在红外灯照射下于玛瑙研钵中轻轻研磨至极细,用压片机压制成透明薄片,经显微红外光谱仪 400~4000 cm⁻¹

中红外区扫描。

1.4.3 小鼠经口急性毒性实验^[14]

1.4.3.1 霍恩氏法

按照 GB 15193.3-2014 进行急性经口毒性试验。采用霍恩氏法进行预实验,选取 SPF 级 KM 小鼠 12 只,分为三组,每组 4 只,雌雄各半。试验用巢脾多糖低剂量组为 100 mg/kg,中剂量组 1000 mg/kg,高剂量组 10000 mg/kg。实验组给药设为 24 h 内 2~4 次灌胃一次,灌胃量为 20 mL/kg,实验过程中禁食不禁水 5 h 后灌胃,连续观察 24 h 动物的活动状态,呼吸,采食和分泌物。实验中若出现小鼠死亡,则按照动物死亡的情况进行霍恩氏法实验测定 LD₅₀,若无死亡则采用限量法继续实验。

1.4.3.2 限量法

SPF 级 KM 小鼠,按性别分别称体重,随机分为实验组和对照组,每组十只,雌雄各半,实验前禁食不禁水 6 h。以巢脾多糖浓度 10000 mg/kg,按照 20 mL/kg 的给药量,24 h 内灌胃给药。对照组采取同样方法给予相同剂量的蒸馏水。每隔 2 d 测定小鼠体重,连续观察 14 d,记录给药后动物活动、饮食情况、精神状态、不良反应情况、动物死亡数和死亡时间。实验结束室,眼眶取血检查血液常规指标,尸检动物观察各脏器有无异常。

1.4.4 动物的分组与处理

SPF 级 KM 小鼠 70 只,雌雄各半,将小鼠随机分组,分别为空白对照组、模型对照组、阳性对照组及巢脾多糖高剂量组(200 mg/kg)、中剂量组(100 mg/kg)、中低剂量组(50 mg/kg)以及低剂量组(25 mg/kg)。除空白对照组外,各组小鼠第 1、2、3 d 腹腔注射环磷酰胺 80 mg/kg,建立免疫抑制小鼠模型。给免疫抑制的小鼠连续 7 d 灌胃巢脾多糖,阳性对照组灌胃盐酸左旋咪唑(40 mg/kg),在实验结束前 3 d 免疫动物,每只腹腔注射 2%的绵羊红细胞 0.2 mL,3 d 后用眼眶取血法采血,放入 4 °C 冰箱中保存,隔天取上层血清备用。

1.4.5 血清溶血素与免疫球蛋白 IgG 检测

将小鼠血清 1:100 稀释于 96 孔细胞培养板内各 100 μL,与加入 5%的绵羊红细胞 50 μL 和 10%补体 50 μL 混匀,置于 37 °C 温水育 30 min 后,冰水终止反应,以不加补体的空白管作对照,取上清液 540 nm 测 OD 值(A₅₄₀),数据进行 t 检验^[15]。酶联免疫法检测血清中免疫球蛋白 IgG。

1.4.6 血清抗氧化能力检测

按照试剂盒方法测定血清中 MDA、T-SOD 及 CAT。

1.5 统计方法

采用 spss 19.0 对数据进行差异显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 蜜蜂巢脾多糖理化性质鉴定

2.1.1 蜜蜂巢脾多糖基本组成

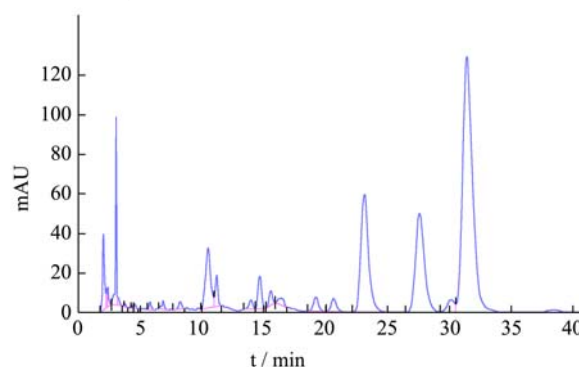


图 1 巢脾多糖水解样品-PMP 衍生化产物的 HPLC 谱图

Fig.1 HPLC spectrum of PMP derivative products of comb polysaccharide

经计算巢脾多糖中总糖含量为 75.77%,蛋白质的含量为 13.82%,糖醛酸的含量为 0.19%,还原糖的含量为 4.20%,不含淀粉及多酚类物质。该多糖的 pH 值为 7.06,呈中性。可溶于水、稀酸及稀碱,不溶于乙醇、丙酮、乙酸乙酯等有机溶液。

HPLC 分析结果如图 1 所示,巢脾多糖中含有甘露糖、氨基葡萄糖、核糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、氨基半乳糖、葡萄糖、半乳糖、木糖和阿拉伯糖,其摩尔比为:0.08:0.09:0.11:0.05:0.03:0.08:1.00:0.84:0.11:3.04。其中阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖含量最高,半乳糖醛酸含量最低(表 1)。

表 1 巢脾多糖的单糖组成

Table 1 Monosaccharide composition of comb polysaccharide				
保留时间/min	峰面积/(mAU*s)	含量/(mg/L)	单糖名称	单糖摩尔分数
11.19	251.97	13.4	甘露糖	0.08
13.98	98.86	15.51	氨基葡萄糖	0.09
14.68	330.04	15.41	核糖	0.11
15.57	140.02	9.09	鼠李糖	0.05
19.22	193.01	5.75	半乳糖醛酸	0.03
20.65	197.86	15.14	氨基半乳糖	0.08
23.15	2566.51	165.58	葡萄糖	1.00
27.6	2473.48	138.28	半乳糖	0.84
30.16	246.74	14.86	木糖	0.11
31.42	7176.73	419.66	阿拉伯糖	3.04

2.1.2 光谱分析

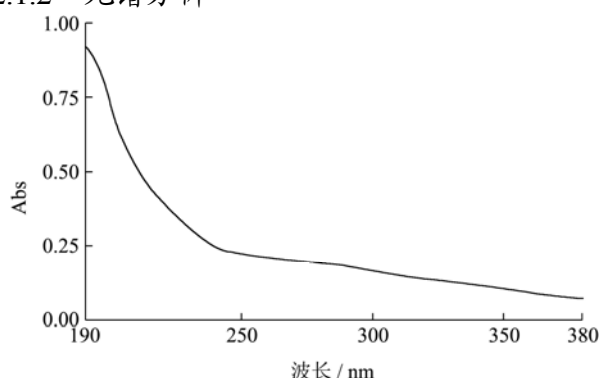


图2 巢脾多糖的紫外光谱图

Fig.2 Ultraviolet spectrum of comb polysaccharide

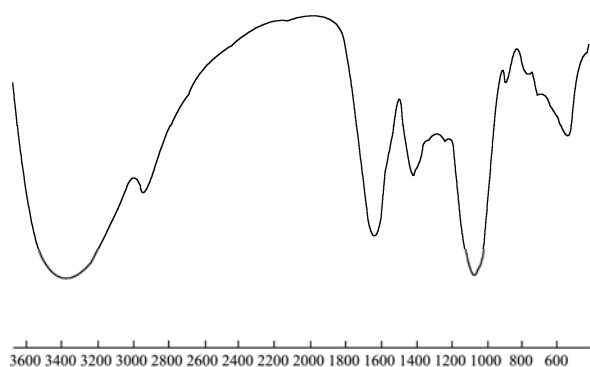


图3 巢脾多糖的红外光谱图

Fig.3 Infrared spectrum of comb polysaccharide

紫外光谱扫描结果见图2:在波长380 nm~190 nm中,未出现明显的特征吸收峰,吸光度值随着波长的缩短而增大,直至190 nm处出现最大吸收值。

红外光谱是一种有效研究分子官能团特征的手段。用来检测化合物结构的红外光谱通常指波数在

4000~400 cm⁻¹之间的中红外光谱。其具有高度的特征性,能够测定分子内部原子间的相对振动和分子转动等信息,是研究聚合物结构和化学键,表征或鉴别不同化合物的常用手段之一。由于多糖的结构具有一定的相似性,所以多糖的红外光谱具有某些相同的特征吸收峰。通过对一些特征峰的分析,对于多糖结构中是否含有这些残基或大致判断结构类型还是有一定的帮助的。巢脾多糖的红外光谱图如图3所示,结果显示巢脾多糖具有典型的多糖特征吸收峰(3387.3 cm⁻¹, 2934.4 cm⁻¹, 1413.4 cm⁻¹, 772.3 cm⁻¹)^[16]。在3387.3 cm⁻¹处出现的宽峰为分子间和分子内羟基(O-H)伸缩振动特征峰^[17], 2934.4 cm⁻¹处吸收峰为糖链中饱和甲基或亚甲基(C-H)伸缩振动峰^[18], 1413.4 cm⁻¹处吸收峰为N-H的变角振动峰, 772.3 cm⁻¹处吸收峰为C-X伸缩振动^[19]。此外,1630.2 cm⁻¹处吸收峰为C=O伸缩振动峰,表明该多糖为糖蛋白缀合物^[20,21]。而在1700 cm⁻¹~1775 cm⁻¹范围内无明显吸收峰,表明样品中不含羧基,即该多糖是一种中性糖^[18]。1075.9 cm⁻¹处吸收峰可能是吡喃糖环的特征吸收峰^[19], 891.3 cm⁻¹处有吸收说明该多糖存在β型吡喃糖苷^[17]。

2.2 蜜蜂巢脾多糖急性毒性

2.2.1 预实验

24 h内各预试验组小鼠均存活,小鼠表征无明显变化,因此不需测定LD₅₀,改为进行限量法实验测定MTD值。

2.2.2 限量法实验

观察期内小鼠体重变化情况如表1所示。

表2 巢脾多糖对实验小鼠体重的影响

Table 2 Effects of comb polysaccharide on the body weights of mice

组别	动物/只	初始体重/g	给药后体重/g			
			第3 d	第7 d	第10 d	第14 d
实验组	10	20.45±1.19	21.70±1.28	22.87±0.10	24.02±0.10	25.50±0.84
空白对照组	10	19.88±1.09	21.35±1.03	22.42±0.98	23.86±0.10	25.08±0.76
<i>p</i> 值		0.156	0.257	0.685	0.126	0.162

由上图得知两组小鼠给药前后体重变化, *p*>0.05,无统计学差异。且在喂食期间,小鼠活动如常,被毛洁白光泽紧贴皮肤,眼红明亮,肌肉紧张有力丰满,尿便正常,无小鼠死亡。本实验按照限量法以剂量10000 mg/kg连续灌胃14 d,观察期内在此剂量下小鼠无任何不良反应,认为巢脾多糖的MTD值大于10000 mg/kg,此剂量相当于500 g/人,据此按照GB 15193.5-2014可判定巢脾多糖为无毒物质^[14]。

2.3 蜂巢多糖对免疫抑制小鼠免疫调节影响

血清溶血素高低反映了被绵羊红细胞免疫后的小鼠特异性体液免疫功能^[15]。与正常对照组相比较,模型组中溶血素抗体含量显著降低(*p*<0.01),表明造模成功;与模型组相比,阳性对照组和巢脾多糖各剂量组溶血素抗体含量显著升高(*p*<0.01或*p*<0.05),其中巢脾多糖灌胃剂量100 mg/kg时,溶血素抗体含量极显著升高(*p*<0.01),其OD值达0.09。表明巢脾多糖能够提高免疫抑制小鼠血清中溶血素抗体的含量,从而增强免疫低下小鼠的免疫功能。在体液免疫中,B细胞在抗原刺激下转化为浆细胞,合成免疫球蛋白,

免疫球蛋白 (Immunoglobulin, Ig) 分为 IgG、IgM、IgA、IgE、IgD 五类。IgG 是最典型的抗体, 亲和力高, 分布广, 是机体重要的抗菌、抗病毒、抗毒素抗体^[22]。但实验结果显示巢脾多糖对免疫抑制小鼠免疫球蛋白 IgG 无显著影响, 巢脾多糖对免疫抑制小鼠免疫调节作用机理还需要进一步研究。

表3 巢脾多糖对免疫抑制小鼠溶血素抗体及 IgG 生成的影响
($\bar{x} \pm s$, n=10)

Table 3 Effects of comb polysaccharide on the level of hemolysir and IgG in serum of immunosuppressive mice

组别	剂量/(mg/kg)	OD 值(平均值)	IgG OD 值
空白对照组	-	0.12±0.01**	0.39±0.04**
模型对照组	-	0.01±0.00	0.13±0.01
阳性对照组	-	0.10±0.01*	0.34±0.04**
低剂量组	25	0.03±0.01*	0.13±0.01
中低剂量组	50	0.07±0.01*	0.13±0.01
中剂量组	100	0.09±0.01**	0.13±0.01
高剂量组	200	0.05±0.01*	0.12±0.01

注: * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$ 。

2.4 巢脾多糖对免疫抑制小鼠血清中抗氧化

表4 巢脾多糖对小鼠血清中 SOD、CAT 及 MDA 的影响($\bar{x} \pm s$, n= 10)

Table 4 Effects of comb polysaccharide on the level of SOD, CAT and MDA in serum of immunosuppressive mice ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

组别	剂量/(mg/kg)	SOD 含量/(U/mgprot)	CAT 含量/(U/mL)	MDA 含量/(nmol/mL)
空白组	-	148.39±1.69**	17.01±1.57**	3.88±0.23**
模型对照组	-	94.57±0.57	4.08±0.01	6.72±0.03
阳性对照组	-	132.01±1.19**	15.81±1.36*	5.83±0.20*
低剂量组	25	100.69±0.39*	4.67±0.15*	6.03±0.92
中低剂量组	50	109.40±1.82*	5.87±0.26*	5.47±0.89*
中剂量组	100	125.07±0.52**	13.85±0.66**	4.89±0.96**
高剂量组	200	118.53±1.38**	7.83±0.40*	5.08±0.92**

注: * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$ 。

3 结论

本研究结果显示, 巢脾总糖含量为 75.77%, 蛋白质含量为 13.82%, 糖醛酸含量为 0.19%, 还原糖含量 4.20%, 该多糖由甘露糖、硫酸氨基葡萄糖、核糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、氨基半乳糖、葡萄糖、半乳糖、木糖和阿拉伯糖组成, 是一种不含淀粉和多酚类物质的多糖, 是无毒物质。同时初步证实蜜蜂巢脾多糖能显著降低环磷酰胺对小鼠的免疫抑制作用, 通过提高小鼠血清中 SOD 和 CAT 的活性, 并降低 MDA 的含量来提高环磷酰胺所致的免疫损伤小鼠的抗氧化能力, 剂量为 100 mg/kg 的巢脾多糖的作用最为显著。本研究为巢脾多糖的开发利用提供理论依据和参考, 而

能力的影响

机体的抗氧化能力与机体的免疫功能密切相关, 某些内源性自由基反应能通过自由修饰免疫细胞膜上的受体、细胞分化和活性相关的微管系统, 可逆地抑制免疫功能^[23]。有研究表明, 使用抗氧化剂可以提高免疫细胞微管系统的工作能力, 提高机体细胞免疫与体液免疫^[24]。多糖对物理、化学及生物来源的多种活性氧具有清除作用, 提高抗氧化酶活性及机体抗氧化能力。巢脾多糖对免疫抑制小鼠血清中抗氧化能力的影响结果如表 4 所示。与模型组相比, 巢脾多糖各剂量组小鼠血清的 SOD、CAT 值明显的提高、MDA 值显著降低($p < 0.01$ 或 $p < 0.05$), 中剂量组 (100 mg/kg) 小鼠血清抗氧化能力提高最为明显, 此剂量下小鼠血清 SOD 活性提高到 125.07 U/mg prot, CAT 活性提高到 13.85 U/mL, MDA 活性降低至 4.89 nmol/mL, 与模型组相比存在极显著差异($p < 0.01$)。本实验结果显示, 巢脾多糖能显著提高免疫抑制小鼠血清中 SOD 和 CAT 的活性, 并降低 MDA 的含量, 表明其能提高机体抗氧化能力, 有效预防机体的脂质过氧化, 同时促进了免疫抑制小鼠的免疫力恢复和提高。

巢脾多糖对免疫抑制小鼠的免疫调节的构效关系及其活性作用机理有待于进一步探索。

参考文献

- [1] 匡邦玉, 匡海鸥. 蜜蜂生物学[M]. 昆明: 云南科学技术出版社, 2003
KUAN Bang-yu, KUANG Hai-ou. Bee biology [M]. Kunming: Yunnan Science and Technology Press, 2003
- [2] 褚亚芳. 蜜蜂巢脾抗氧化、抑菌和抗炎活性以及抗生素残留研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2010
ZHU Ya-fang. Antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities and antibiotic residue of honeycomb [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2003

- [3] 闫亚美. 蜜蜂巢脾挥发油及其治疗 AR 的药效学研究[D]. 福州:福建农林大学,2007
YAN Ya-mei. Study on the honeycomb volatile oil and its pharmacodynamics to AR [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2007
- [4] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京:化学工业出版社,2005
National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of People Republic of China [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005
- [5] 赵红霞, 黄文忠, 陈华生, 等. 蜜蜂巢脾提取物对小鼠免疫调节作用的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(1): 125-130
ZHAO Hong-xia, HUANG Wen-zhong, CHEN Hua-sheng, et al. Immune regulation effect of honeybee comb extracts in mice [J]. Natural Products Research and Development, 2016, 28(1): 125-130
- [6] 朱俊彦, 喻庆禄, 邓必麟, 等. 蜂巢药效学研究[J]. 时珍国医国药, 1999, 10(3): 168-169
ZHU Jun-yan, YU Qing-lu, DENG Bi-lin, et al. Pharmacodynamics research of the honeycomb [J]. Shizhen Medicine and Materia Medica Research, 1999, 10(3): 168-169
- [7] LI Jin-wei, LIU Yan-fang, FAN Liu-ping, et al. Antioxidant activities of polysaccharides from the fruiting bodies of *Zizyphus jujuba* cv Jinsixiaozao [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84(1): 390-394
- [8] 刘苏, 姜玥, 罗建平, 等. 5 种食用菌多糖理化性质及免疫活性的比较研究[J]. 食品科学, 2015, 36(13): 252-256
LIU Su, JIANG Yue, LUO Jian-ping, et al. Physicochemical properties and immunomodulating activities of polysaccharides from five species of edible mushrooms [J]. Food Science, 2015, 36(13): 252-256
- [9] 罗凯, 黄秀芳, 周毅峰, 等. 响应面法优化复合酶法提取碎米荠多糖工艺及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2017, 38(4): 237-242
LUO Kai, HUANG Xiu-fang, ZHOU Yi-feng, et al. Optimization of multi-enzymatic extraction of polysaccharides from *Cardamine hupingshanensis* and their antioxidant activity [J]. Food Science, 2017, 38(4): 237-242
- [10] 于美汇, 赵鑫, 尹红力, 等. 碱提醇沉黑木耳多糖体外和体内降血脂功能[J]. 食品科学, 2017, 38(1): 232-237
YU Mei-hui, ZHAO Xin, YIN Hong-li, et al. In vitro and in vivo hypolipidemic effect of *Auricularia auricular* polysaccharides [J]. Food Science, 2017, 38(1): 232-237
- [11] 王恒禹, 刘玥, 姜猛, 等. 多糖在食品工业中的应用现状[J]. 食品科学, 2013, 34(21): 431-438
WANG Heng-yu, LIU Yue, JIANG Meng, et al. Application of polysaccharide in food industry [J]. Food Science, 2013, 34(21): 431-438
- [12] 张淑杰, 康玉凡. 天然活性多糖研究进展[J]. 食品工业科技, 2017, 38(2): 379-382
ZHANG Shu-jie, KANG Yu-fan. Advances in bio-active polysaccharides [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(2): 379-382
- [13] 马定远, 陈君, 李萍, 等. 柱前衍生化高效液相色谱法分析多糖中的单糖组成[J]. 分析化学, 2002, 30(6): 702-705
MA Ding-yuan, CHEN Jun, LI Ping, et al. Analysis of monosaccharide compositions in polysaccharides by pre-column derivatization high performance liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2002, 30(6): 702-705
- [14] GB 15193.3-2014, 急性经口毒性实验[S]
GB 15193.3-2014, Acute Oral Toxicity Experiment [S]
- [15] 傅圣斌, 钱建鸿, 陈乐意, 等. 黄精多糖的提取及其对小鼠免疫活性的影响[J]. 中国食品学报, 2013, 13(1): 68-72
FU Sheng-bin, QIAN Jian-hong, CHEN Le-yi, et al. Extracting of *Polygonatum* polysaccharides and effecting on the immunological activity in immunosuppressed mice [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(1): 68-72
- [16] JIA X, ZHANG C, QIU J, et al. Purification, structural characterization and anticancer activity of the novel polysaccharides from *Rhynchosia minima* root [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 132(5): 67-71
- [17] 李彬, 陈向楠, 张建法, 等. 产胞外多糖菌株的筛选及胞外多糖结构分析[J]. 生物技术通报, 2016, 32(5): 165-171
LI Bin, CHEN Xiang-nan, ZHANG Jian-fa, et al. Screening of exopolysaccharide producing strains and structural analysis of the exopolysaccharides [J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(5): 165-171
- [18] 韩丽荣, 程代, 王莉蕊, 等. 灰树花胞外多糖的结构及免疫调节活性团[J]. 生物工程学报, 2016, 32(5): 648-656
HAN Li-rong, CHENG Dai, WANG Li-rui, et al. Structure and immunomodulatory activity of extracellular polysaccharide from *Grifola frondosa* [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2016, 32(5): 648-656
- [19] CAI W, XU H, XIE L, et al. Purification, characterization and in vitro anticoagulant activity of polysaccharides from *Gentiana scab* Bunge roots [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 140(20): 308-313
- [20] 梅光明, 郝强, 张小军, 等. 酸提香菇多糖的分离纯化及结构

- 鉴定[J].现代食品科技,2014, 30(9):79-84
- MEI Guang-ming, HAO Qiang, ZHANG Xiao-jun, et al. Purification and structural analysis of a polysaccharide from *Lentinusedodes* extracted using an acid solution [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(9): 79-84
- [21] CHAI Yang-yang, ZHAO Min. Purification, characterization and anti-proliferation activities of polysaccharides extracted from *Viscum coloratum* (hom)Nakai [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 149(20): 121-130
- [22] 梁英,金迪,李丹丹,等.黄芩多糖的免疫调节活性[J].中国食品学报,2017,17(2):23-27
- LIANG Ying, JIN Di, LI Dan-dan, et al. Immunoregulatory activity of polysaccharides from *Scutellaria baicalensis georgi* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(2): 23-27
- [23] 张洪泉,余文新.中华抗衰老医药学[M].北京:科学出版社, 2000
- ZHANG Hong-quan, YU Wen-xin. Chinese anti-aging medicine [M]. Beijing: Science Press, 2000
- [24] Christopher C R, Deirdre R C, Hilary A H, et al. Anti-HIV-1 activity of chemically modified heparins: cellular correlation between binding to the V3 loop of gp120 and inhibition of HIV-1 infection in vitro [J]. Biochemistry, 1994, 33(13): 6974-6980