

碱提灵芝多糖的分离纯化、结构表征及免疫活性评价

顾菲菲¹, 李 佳¹, 杨晨东¹, 胡明华², 范罗嫡², 郝杰杰¹, 李国云¹, 蒋 昊¹, 于广利¹, 蔡 超^{1*}

1. 海洋药物教育部重点实验室, 山东省糖科学与糖工程重点实验室, 中国海洋大学医药学院, 山东 青岛 266003

2. 无限极(中国)有限公司, 广东 广州 510600

摘要: **目的** 从赤芝 *Ganoderma lucidum* 中提取、分离和纯化获得碱提多糖组分, 在表征其基本理化性质和精细结构的基础上, 对其体外免疫调节活性进行研究。**方法** 赤芝子实体干燥粉碎后, 利用碱提醇沉法提取粗多糖, 经 Q-Sepharose Fast Flow 离子交换色谱柱纯化得到灵芝多糖组分(LZJ-0.15)。采用 PMP 柱前衍生-高效液相色谱法(HPLC)及高效凝胶渗透色谱-十八角度激光光散射联用法(HPGPC-MALLS)测定 LZJ-0.15 的单糖组成及相对分子质量特征, 并通过核磁共振氢谱(¹H-NMR)、碳谱(¹³C-NMR)及二维谱(¹H-¹H COSY 和 ¹H-¹³C HSQC)对 LZJ-0.15 的精细结构进行表征。采用小鼠巨噬细胞 RAW264.7 吞噬中性红实验对灵芝多糖 LZJ-0.15 进行免疫活性评价。**结果** LZJ-0.15 的相对分子质量、分子半径及 *M_w/M_n* 分别为 24 700、46.6 nm 和 1.019, 其单糖组成分析显示以葡萄糖为主(92.3%), 核磁谱图显示 LZJ-0.15 为 →3) Glc (β1→及→6) Glc (β1→连接为主的葡聚糖。RAW264.7 细胞吞噬中性红实验显示 LZJ-0.15 具有较好的免疫调节活性。**结论** 赤芝碱提灵芝多糖相较于水提多糖组分具有较优的免疫活性, 有望开发成重要的免疫调节剂。

关键词: 赤芝; 灵芝多糖; 碱提; 结构表征; 免疫调节活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)08-2359-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.08.017

Fractionation, structural characterization, and immunomodulatory activity of polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum*

GU Fei-fei¹, LI Jia¹, YANG Chen-dong¹, HU Ming-hua², FAN Luo-di², HAO Jie-jie¹, LI Guo-yun¹,
JIANG Hao¹, YU Guang-li¹, CAI Chao¹

1. Key Laboratory of Marine Drugs, Ministry of Education, Shandong Provincial Key Laboratory of Glycoscience and Glycotechnology, School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

2. Infinite Pole (China) Co., Ltd., Guangzhou 510600, China

Abstract: Objective To extract, separate, and purify polysaccharide from *Ganoderma lucidum* with alkali from the residue after water extraction, characterize the basic physicochemical properties and structural features in detail, and study the immunomodulatory activity *in vitro*. **Methods** The polysaccharide LZJ-015 was isolated and purified from the dry fruiting bodies of *G. lucidum* by alkaline extraction and ethanol precipitation following Q-Sepharose Fast Flow ion exchange chromatography column. Monosaccharide composition and molecular weight of LZJ-0.15 was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) with PMP precolumn derivatization and high performance gel permeation chromatography-multiple angle laser (HPGPC-MALLS), respectively. The detailed structure of polysaccharide LZJ-0.15 was characterized by ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹H-¹H COSY, and ¹H-¹³C HSQC spectrum. The immunomodulatory activity of *G. lucidum* polysaccharide was test by RAW264.7 cells phagocytose neutral red experiment. **Results** The molecular weight, molecular radius, and *M_w/M_n* of LZJ-0.15 were determined to be 24 700, 46.6 nm, and 1.019, respectively. The monosaccharide composition was confirmed to be mainly composed of glucose (92.3%). LZJ-0.15 was →3) Glc (β1→and→6) Glc (β1→linked glucan indicated by NMR spectrum. Moreover, *G. lucidum* polysaccharide exhibited good immunomodulatory activity in our study. **Conclusion** *G. lucidum* polysaccharide LZJ-0.15 from alkaline extraction showed better immune activity than the polysaccharide extracted from water, which would be potentially developed as an effective immunomodulatory agent.

Key words: *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.; *Ganoderma lucidum* polysaccharide; alkaline extraction; structural characterization; immunomodulatory activity

收稿日期: 2018-02-12

作者简介: 顾菲菲(1993—), 女, 在读硕士, 研究方向为多糖化学。Tel: (0532)82031790 E-mail: 507268932@qq.com

*通信作者 蔡 超(1983—), 男, 副教授, 中国海洋大学“青年英才工程”计划资助获得者。Tel: (0532)82032030 E-mail: caic@ouc.edu.cn

灵芝为多孔菌科植物赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. 或紫芝 *Ganoderma sinense* Zhao, Xu et Zhang 的干燥子实体。早在两千多年以前, 灵芝就开始作为滋补的上品用作治病保健^[1-2], 《神农本草经》记载“灵芝味甘温, 保神益精, 坚筋骨, 好颜色, 久服轻身不老延年。^[3]”《本草纲目》记载其“疗虚劳”。现代研究表明, 灵芝的主要活性成分有多糖类、核苷酸类、呋喃类、甾醇类、生物碱类、三萜类、氨基酸类等^[4-6]。其中灵芝多糖具有调节免疫^[7]、降血糖、调血脂、抗氧化^[8]、抗衰老以及抗肿瘤^[9-11]等多种生物活性^[6]。常见的灵芝多糖的提取方法有水提醇沉法、超声波辅助提取法以及微波辅助提取法等, 产物以水溶性多糖为主, 因此研究主要集中在水溶性多糖的结构表征与活性评价方面。本实验对粉碎后赤芝子实体的水提残渣开展深入研究, 采用碱提醇沉的方法获得了较高产率的多糖碱提组分, 经结构解析确定为 $\rightarrow 3)$ Glc ($\beta 1 \rightarrow$ 及 $\rightarrow 6)$ Glc ($\beta 1 \rightarrow$ 连接为主的葡聚糖, 该组分展现出良好的体外免疫调节活性, 为充分发挥赤芝的生物利用度及多糖类免疫调节药物的开发提供重要借鉴。

1 仪器与材料

1.1 材料

灵芝由无限极(中国)有限公司提供, 由中国海洋大学刘红兵教授鉴定为多孔菌科植物赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.。各种单糖标准品: 甘露糖(Man)、鼠李糖(Rha)、葡萄糖醛酸(GlcA)、半乳糖醛酸(GalA)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、木糖(Xyl)、阿拉伯糖(Ara)及1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)等购自美国Sigma-aldrich公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

DD-04 粉碎机, 大德中药机械有限公司; LABOFUGE 400 R 型离心机, 美国 ThermoScientific 公司; Agilent 1260 型高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; DAWN HELEOS II 型, 美国 Wyatt 公司; Agilent DD2 500 MHz 超导核磁共振波谱仪, 美国 Agilent 公司; Nexus 470 傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR), 美国 Nicolet 公司; Elx808 型酶标仪, 美国 BioTek 公司。

2 方法

2.1 多糖的提取

赤芝粉碎过 60 目筛, 即得药材粗粉。称取药材

粗粉 200 g, 按料液比 1:10 加入蒸馏水, 80 °C 加热提取 2 次, 每次 2 h, 离心(4 500 r/min, 20 min)合并收集上清液, 50 °C 真空减压浓缩至 200 mL。加入 3 倍体积的 95%乙醇水, 室温放置 48 h, 离心(10 000 r/min, 10 min), 收集沉淀复溶冻干, 将其命名为 LZ。残渣继续加 0.25 mol/L NaOH 2 L, 60 °C 加热提取 1 h, 提取 2 次, 离心(4 500 r/min, 20 min)合并收集上清液, 加 1 mol/L HCl 中和上清液, 50 °C 真空减压浓缩至 200 mL。加入 3 倍体积的 95%乙醇水, 室温放置 48 h, 离心(10 000 r/min, 10 min), 收集沉淀复溶冻干。即得赤芝碱提多糖粗品, 将其命名为 LZJ。

2.2 多糖的分离纯化

将 QFF 填料装填于 250 mL 的分离柱中, 首先用蒸馏水冲洗 2 个柱体积, 然后用 2 mol/L NaCl 冲洗 2 个柱体积, 再用蒸馏水冲洗 2 个柱体积即可上样。称取 300 mg LZJ, 加水 10 mL 溶解, 离心, 吸取上清液上样。上样后静置 30 min, 分别选用水和 0.15 mol/L NaCl 洗脱, 采用硫酸-苯酚法检测洗脱液中糖含量, 收集样品。装入 7 000 透析袋中透析 2 d, 浓缩后复溶冻干, 即得多糖 LZJ-0.15。

2.3 总糖含量测定

以改良的硫酸苯酚法对灵芝多糖中的总糖含量进行测定^[12]。以 0.5 mg/mL 的葡萄糖溶液为标准液, 分别量取标准液 0、10、20、30、40、50 μ L 加双蒸水补足至 100 μ L 作为工作液, 向工作液中加入 6%苯酚溶液 200 μ L, 快速加入浓 H₂SO₄ 1.5 mL, 混合均匀。放置于 100 °C 的水浴锅中, 加热 10 min, 取出冷却后, 量取 200 μ L 加入 96 孔板中, 在 490 nm 波长下进行扫描。以标准品葡萄糖含量为横坐标, 吸光度值为纵坐标绘制标准曲线。

样品液的配制: 称取 LZJ-0.15 样品 1 mg, 加双蒸水 1 mL, 配制为 1 mg/mL 的多糖溶液, 分别取 30 μ L, 加双蒸水补足至 100 μ L, 后续操作同标准品的处理方法。

2.4 相对分子质量及分子半径测定

采用高效凝胶渗透色谱-十八角激光光散射法(HPGPC-MALLS)联用技术^[13]测定 LZJ-0.15 相对分子质量及分子半径。

液相色谱条件: 色谱柱为 Shodex OHpak SB HQ 804/802.5 (300 mm $\times$ 8 mm, 6 μ m); 流动相为 0.1 mol/L Na₂SO₄; 体积流量为 0.6 mL/min; 柱温为 35 °C; 进样量为 100 μ L。

样品溶液的处理: 称取 LZJ-0.15 样品 2 mg, 加流动相 400 μL , 配制成 5 mg/mL 的溶液, 过 0.22 μm 的微孔滤膜, 即得。

2.5 单糖组成测定

采用柱前 PMP 衍生-高效液相色谱法对灵芝多糖样品的单糖组成进行测定^[14]。称取 LZJ-0.15 样品 1 mg, 加入 200 μL 双蒸水溶解, 转移至安瓿瓶中, 再加入 200 μL 的 4 mol/L 三氟乙酸 (TFA), 酒精喷灯加热封口, 在 110 $^{\circ}\text{C}$ 加热降解 6 h, 降解完毕氮吹仪吹干, 加入 500 μL 甲醇, 再用氮吹仪吹干, 重复 3 次, 除去 TFA。降解完的单糖样品中加入 200 μL 双蒸水进行溶解, 取出 100 μL , 加入 0.3 mol/L 的 NaOH 100 μL , 120 μL PMP, 在 70 $^{\circ}\text{C}$ 避光加热 1 h 进行衍生, 衍生完毕后, 加入 0.3 mol/L 的 HCl 105 μL 中和样品, 之后用三氯甲烷萃取 3 次, 除去 PMP。过 0.22 μm 的微孔滤膜转移至液相瓶备用。

标准品制备: 取提前配制好的 5 mg/mL 的标准品溶液各 6 μL , 加双蒸水补足至 100 μL , 后续衍生及处理方法同多糖样品。

液相色谱条件: 色谱柱为 Angilent C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为 PBS-乙腈 (83:17); 体积流量 1 mL/min; 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量为 10 μL 。

2.6 核磁共振谱图分析

取 20 mg LZJ-0.15, 加 500 μL D₂O 溶解, 冻干, 重复 3 次。然后用 500 μL D₂O 溶解, 加入核磁管中, Agilent DD 500 MHz 超导核磁共振波谱仪, 以氘代 DMSO 作为内标, 25 $^{\circ}\text{C}$ 下测定其 ¹H-NMR 谱、¹³C-NMR 谱、¹H-¹H COSY 谱和 ¹H-¹³C HSQC 谱。

2.7 对 RAW264.7 细胞吞噬中性红的影响

培养 RAW264.7 细胞, 接种 96 孔板, 每孔细胞数为 2×10^4 , 加药培养 24 h。24 h 后, 弃上清, PBS 洗细胞 3 次, 每孔加入 0.075% 中性红 100 μL ,

孵育 20 min 后, 弃上清, PBS 洗细胞 3 次, 每孔加入细胞裂解液 200 μL , 540 nm 处测各孔吸光度 (*A*) 值。同时 MTT 法测受试物对 RAW264.7 细胞增殖的作用。吞噬能力以 RAW264.7 细胞吞噬中性红实验 *A* 值与 MTT 法测细胞增殖实验 *A* 值的比值表示。

3 结果与分析

3.1 基本理化性质分析

用 Q-Sepharose Fast Flow 离子交换色谱柱分离纯化灵芝多糖, 分别收集纯水洗脱和 0.15 mol/L NaCl (LZJ-0.15) 洗脱 2 个组分, 采用硫酸-苯酚法对洗脱液进行检测, 结果如图 1-A 所示, 水洗组分产率较低, 0.15 mol/L NaCl 洗脱组分的产率为 10.2%。采用硫酸-苯酚法测定 LZJ-0.15 组分中总糖含量, 标准曲线如图 1-B 所示, 根据标准曲线计算 LZJ-0.15 的总糖含量为 90.1%, 后续围绕该组分开展精细结构和免疫活性研究。

3.2 相对分子质量以及分子半径分析

采用凝胶色谱法与十八角度激光散射仪联用技术测定 LZJ-0.15 的相对分子质量、分子半径及分散系数 (*M_w/M_n*), 示差信号图谱如图 2 所示, 由图 2 可以看出 LZJ-0.15 这个组分从 22 min 开始被洗脱出来, 到 30 min 左右结束, 30 min 之后的峰为盐峰。LZJ-0.15 的相对分子质量为 24 700, 分子半径为 46.6 nm, *M_w/M_n* 为 1.019, *M_w/M_n* 越接近于 1 表明相对分子质量越均一^[15], 并且可以看出图 2 中示差信号峰形比较对称, 所以 LZJ-0.15 是一个相对分子质量相对均一的多糖组分。

3.3 单糖组成分析

采用 PMP 柱前衍生 HPLC 法对 LZJ-0.15 的单糖组成进行测定, 结果如图 3 所示, LZJ-0.15 的单糖组成主要为 Glc, 其摩尔百分比为 92.3%, 另外含有少量的 GlcA、Man 和葡萄糖胺 (GlcN)。已有

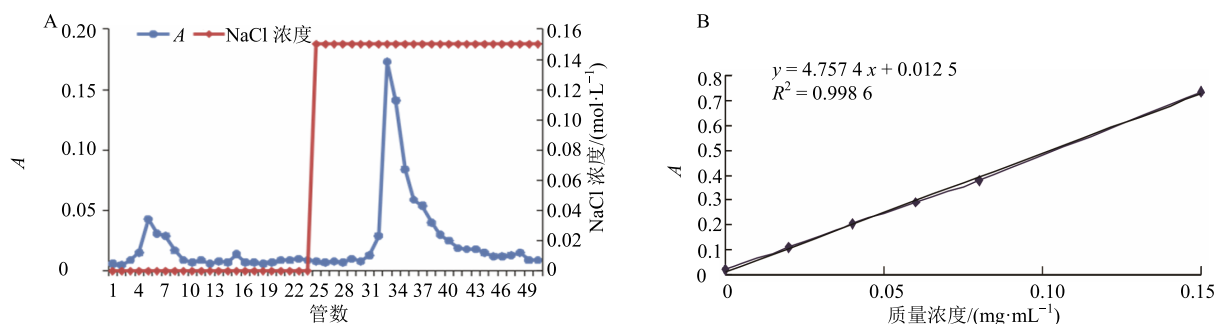


图1 灵芝碱提多糖 QFF 分离图 (A) 和硫酸-苯酚法标准曲线 (B)

Fig. 1 QFF chromatogram of LZJ (A) and standard curve of Phenol-sulfuric acid method (B)

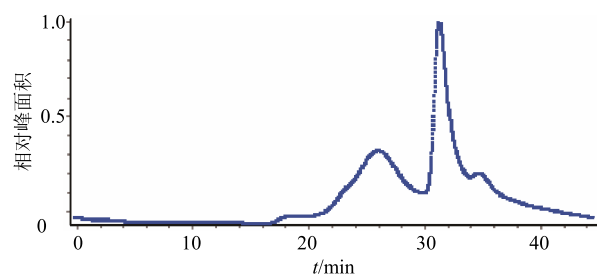


图2 LZJ-0.15的HPGPC分析
Fig. 2 HPGPC analysis of LZJ-0.15

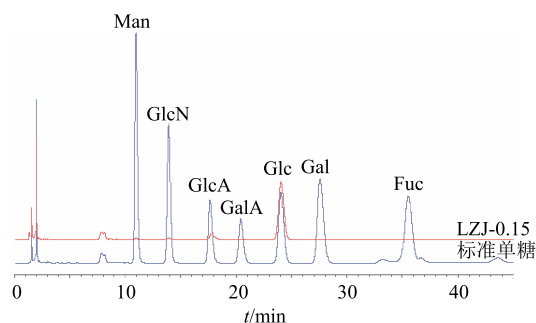


图3 LZJ-0.15单糖组成HPLC分析
Fig. 3 Monosaccharide composition analysis of LZJ-0.15 by HPLC

文献报道^[16-17], 水提灵芝多糖主要为 $\rightarrow 3)$ Glc ($\beta 1 \rightarrow$ 及 $\rightarrow 6)$ Glc ($\beta 1 \rightarrow$ 连接的葡聚糖)。本实验结果显示, 碱提灵芝多糖同样以葡聚糖为主。

3.4 核磁共振谱图分析

LZJ-0.15核磁共振谱图如图4所示。根据 ^1H -和 ^{13}C -NMR谱(图4-A、B)中, 异头氢的化学位移分别为 δ 4.4和 δ 4.7(被水峰覆盖), 异头碳的化学位移为 δ 102.5, 推断LZJ-0.15主要以 β 糖苷键连接的吡喃型葡萄糖构成。结合文献报道^[18-19]以及 ^1H - ^1H COSY谱和 ^1H - ^{13}C HSQC谱(图4-C、D), 推断LZJ-0.15主要为 β -(1 $\rightarrow$ 3)和 β -(1 $\rightarrow$ 6)连接的葡聚糖, 残基片段主要包括3种形式, A: β -(1 $\rightarrow$ 3)-Glc_p, B: β -(1 $\rightarrow$ 3)-Glc_p, C: β -T-Glc_p。3种葡萄糖残基的化学位移值归纳如表1所示, 在 ^1H - ^{13}C HSQC谱中可以清晰地找到异头氢和异头碳的偶合信号, A: C1-H1 (102.56/4.41), B: C1-H1 (102.53/4.68), C: C1-H1 (102.56/4.44)。葡萄糖残基片段A的另外5个氢碳偶合信号分别为C2/H2 (73.13/3.21)、C3/H3 (74.75/3.41)、C4/H4 (69.54/3.31)、C5/H5 (71.3/3.59)、

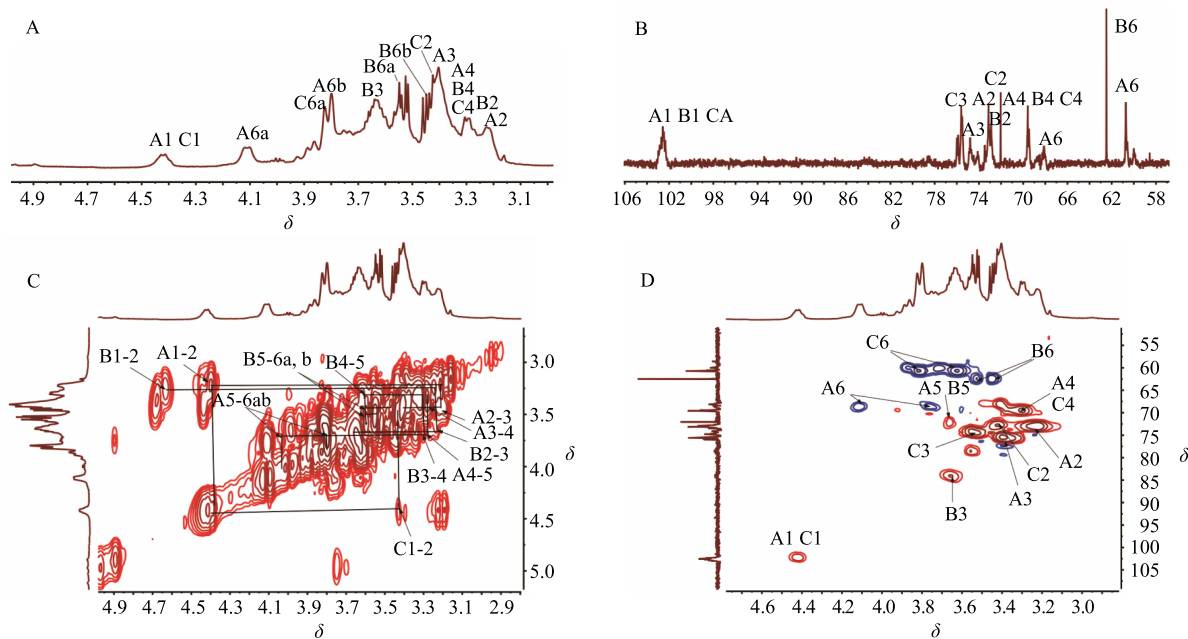


图4 LZJ-0.15的 ^1H -NMR谱图(A)、 ^{13}C -NMR谱图(B)、 ^1H - ^1H COSY谱图(C)以及 ^1H - ^{13}C HSQC谱图(D)
Fig. 4 ^1H -NMR spectrum (A), ^{13}C -NMR spectrum (B), ^1H - ^1H COSY spectrum (C), and ^1H - ^{13}C HSQC spectrum (D) of LZJ-0.15

表1 LZJ-0.15的 ^1H -和 ^{13}C -NMR化学位移值(D_2O , 295 K)

Table 1 ^1H - and ^{13}C -NMR chemical shifts of LZJ-0.15 in D_2O at 295 K

片段	残基	C1/H1	C2/H2	C3/H3	C4/H4	C5/H5	C6/H6a, b
A	β -1,6-Glc _p	102.56/4.41	73.13/3.21	74.75/3.41	69.54/3.31	71.3/3.59	68.38/4.13, 3.80
B	β -1,3-Glc _p	102.53/4.68	72.85/3.28	84.19/3.65	69.54/3.31	71.3/3.59	62.71/3.53, 3.47
C	β -T-Glc _p	102.56/4.44	71.80/3.42	75.12/3.55	69.54/3.32	71.3/3.62	60.51/3.83, 3.83

C6/H6a, b (68.38/4.13, 3.80)。葡萄糖残基片段 B 的 5 个氢碳耦合信号分别为 C2-H2 (72.85/3.28)、C3-H3 (84.19/3.65)、C4-H4 (69.54/3.31)、C5-H5 (71.3/3.59)、C6-H6a, b (62.71/3.53, 3.47)。葡萄糖残基片段 C 的 5 个氢碳耦合信号分别为 C2/H2 (71.8/3.42)、C3/H3 (75.12/3.55)、C4/H4 (69.54/3.32)、C5/H5 (71.3/3.62)、C6/H6a, b (60.51/3.83, 3.83)。以上核磁共振分析结果表明, LZJ-0.15 为 β -(1 $\rightarrow$ 3) 和 β -(1 $\rightarrow$ 6) 连接的葡聚糖。

3.5 灵芝多糖对 RAW264.7 细胞吞噬中性红的影响

MTT 法用于检测活细胞的数量^[20], RAW264.7 细胞吞噬中性红活力是反应免疫调节活性的一项重要指标。本实验以 RAW264.7 细胞吞噬中性红实验所得 A 值与 MTT 法测细胞增殖实验所得 A 值的比值 (吞噬指数) 表示其吞噬活性。结果见表 2, 可以看出水提灵芝多糖 (LZ) 在 25 μ g/mL 时具有显著的促进 RAW264.7 细胞吞噬中性红作用, 其吞噬指数为 (2.638 $\pm$ 0.113)。LZJ-0.15 在 25、50、100 μ g/mL 时均具有显著的促进 RAW264.7 细胞吞噬中性红作用, 其吞噬指数分别为 (3.007 $\pm$ 0.124)、(3.120 $\pm$ 0.125)、(3.165 $\pm$ 0.218)。从吞噬指数分析, 可以看出碱提灵芝多糖组分与水提多糖组分相比具有更好的促进 RAW264.7 细胞吞噬中性红的能力, 并且碱提灵芝多糖组分在 25~100 μ g/mL 的质量浓度范围内都具有较高免疫调节活性, 与水提灵芝多糖组分相比具有更广的浓度范围。

4 结论

本实验从水提后的赤芝残渣中进一步采用碱提醇沉法提取灵芝多糖, 并且通过 Q-Sepharose Fast

Flow 离子交换色谱柱有效纯化碱提灵芝多糖, 获得 0.15 mol/L NaCl 洗脱纯化多糖组分 LZJ-0.15, 对 LZJ-0.15 的相对分子质量分布特征以及单糖组成进行分析, 发现其是一种相对分子质量为 24 700, 分子半径为 46.6 nm 的均一葡聚糖, 进一步通过核磁一维氢谱、碳谱以及二维谱图进行分析, 证明 LZJ-0.15 是一种 β -(1 $\rightarrow$ 3) 和 β -(1 $\rightarrow$ 6) 连接的葡聚糖。通过 RAW264.7 细胞吞噬中性红实验, 初步探究了水提灵芝多糖及碱提灵芝多糖组分的免疫调节活性, 发现碱提多糖组分展现出更好的免疫调节活性。本研究为赤芝中药资源的深入开发利用和中草药类多糖药物的研发提供了重要基础。

参考文献

- [1] Zhang J, Liu Y J, Park H S, *et al.* Antitumor activity of sulfated extracellular polysaccharides of *Ganoderma lucidum* from the submerged fermentation broth [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 87(2): 1539-1544.
- [2] Furusawa E, Chou S C, Furusawa S, *et al.* Antitumour activity of *Ganoderma lucidum*, an edible mushroom, on intraperitoneally implanted Lewis lung carcinoma in syngenic mice [J]. *Phytother Res*, 1992, 6(6): 300-304.
- [3] Lin S B, Li C H, Lee S S, *et al.* Triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest [J]. *Life Sci*, 2003, 72(21): 2381-2390.
- [4] Kohda H, Tokumoto W, Sakamoto K, *et al.* The biologically active constituents of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. Histamine release-inhibitory triterpenes [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33(4): 1367-1374.
- [5] Boh B, Berovic M, Zhang J S, *et al.* *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds [J]. *Biotechnol Annual Review*, 2007, 13(7): 265-301.
- [6] Koyama K, Imaizumi T, Akiba M, *et al.* Antinociceptive components of *Ganoderma lucidum* [J]. *Planta Med*, 1997, 63(3): 224-227.
- [7] Shi M, Zhang Z Y, Yang Y N. Antioxidant and immunoregulatory activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide (GLP) [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 95(1): 200-206.
- [8] Jia J, Zhang X, Hu Y S, *et al.* Evaluation of in vivo antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in STZ-diabetic rats [J]. *Food Chem*, 2009, 115(1): 32-36.
- [9] Xu Z T, Chen X P, Zhong Z F, *et al.* *Ganoderma lucidum*

表 2 LZJ-0.15 对 RAW264.7 细胞吞噬中性红的影响
Table 2 Effects of LZJ-0.15 on phagocytosis of neutral red by RAW264.7

化合物	质量浓度/(μ g $\cdot$ mL ⁻¹)	吞噬指数
对照	—	2.012 $\pm$ 0.203
LPS	10	3.507 $\pm$ 0.132**
LZ	25	2.638 $\pm$ 0.113*
	50	2.416 $\pm$ 0.198
	100	2.279 $\pm$ 0.207
LZJ	25	3.007 $\pm$ 0.124**
	50	3.120 $\pm$ 0.125**
	100	3.165 $\pm$ 0.218**

与对照组比较: * P <0.05 ** P <0.01

* P <0.05 ** P <0.01 vs control group

- polysaccharides: Immunomodulation and potential anti-tumor activities [J]. *Amer J Chin Med*, 2011, 39(1): 15-27.
- [10] Gao Y H, Tang W H, Dai X H, *et al.* Effects of water-soluble *Ganoderma lucidum* polysaccharides on the immune functions of patients with advanced lung cancer [J]. *J Med Food*, 2005, 8(2): 159-168.
- [11] Suárez-Arroyo I J, Loperena-Alvarez Y, Rosario-Acevedo R, *et al.* *Ganoderma* spp.: A Promising adjuvant treatment for breast cancer [J]. *Medicines*, 2017, 4(1): 15-38.
- [12] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Anal Chem*, 1956, 28(3): 350-356.
- [13] Zhang X, Zhao X L, Lang Y Z, *et al.* Low anticoagulant heparin oligosaccharides as inhibitors of BACE-1, the Alzheimer's β -secretase [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 151(18): 51-59.
- [14] Shan X D, Liu X, Hao J J, *et al.* *In vitro* and *in vivo* hypoglycemic effects of brown algal fucoidans [J]. *Inter J Biol Macromol*, 2016, 82(11): 249-255.
- [15] Hu T, Huang Q L, Wong K H, *et al.* Structure, molecular conformation, and immunomodulatory activity of four polysaccharide fractions from *Lignosus rhinocerotis* sclerotia [J]. *Inter J Biol Macromol*, 2017, 94(PtA): 423-430.
- [16] Sui X C, Guo Q B, Xia Y M, *et al.* Structure features of the intracellular polysaccharide from *Ganoderma lucidum* and the irrelative immune-anticancer activities of GLPs [J]. *Bioactive Carbohydr Diet Fibr*, 2016, 8(2): 43-50.
- [17] Liu Y F, Zhang J S, Tang Q J, *et al.* Physicochemical characterization of a high molecular weight bioactive β -D-glucan from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 101(3): 968-974.
- [18] Cui W, Wood P J, Blackwell B, *et al.* Physicochemical properties and structural characterization by two-dimensional NMR spectroscopy of wheat β -D-glucan comparison with other cereal β -D-glucans [J]. *Carbohydr Polym*, 2000, 41(3): 249-258.
- [19] Magnelli P, Cipollo J F, Abeijon C. A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and β -1, 6-glucan fine structure [J]. *Anal Biochem*, 2002, 301(1): 136-150.
- [20] Bao X F, Liu C P, Fang J N, *et al.* Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst [J]. *Carbohydrate Res*, 2001, 332(1): 67-74.