

何首乌多糖的结构表征及其免疫调节活性研究

王 娅¹, 闫丽娜¹, 孙甜甜¹, 郝杰杰¹, 李 佳¹, 胡明华², 范罗嫡², 蔡 超¹, 于广利^{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 从何首乌 *Polygonum multiflorum* 中提取分离多糖, 对其结构进行表征, 并评价其免疫调节活性。方法 采用水提-醇沉法从何首乌中提取粗多糖, 经 Q-Sepharose Fast Flow 强阴离子交换色谱柱分离纯化得到何首乌多糖(PMT)。利用高效凝胶渗透色谱-十八角度激光光散射联用法(HPGPC-MALLS)测定 PMT 的绝对分子量, 采用 PMP 柱前衍生-高效液相色谱法(HPLC)测定单糖组成。采用二维核磁共振波谱(2D-NMR)对 PMT 的结构进行表征。采用四甲偶氮唑盐(MTT)法、中性红比色法和 Griess 法分别检测 PMT 对小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 的生长、吞噬活性和释放一氧化氮(NO)能力的影响。结果 PMT 是一种 α -1,4-葡聚糖, 其绝对分子量为 3.96×10^5 。PMT 可显著促进 RAW264.7 细胞的增殖, 促进细胞的吞噬能力, 增加 NO 的释放量。结论 何首乌来源的 α -1,4-葡聚糖具有显著的免疫调节活性, 具有药物开发潜力。

关键词: 何首乌; 何首乌多糖; α -1,4-葡聚糖; 结构表征; 免疫活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)10-2290-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.10.006

Structural characterization of polysaccharide from *Polygonum multiflorum* and its immunomodulatory activity

WANG Ya¹, YAN Li-na¹, SUN Tian-tian¹, HAO Jie-jie¹, LI Jia¹, HU Ming-hua², FAN Luo-di², CAI Chao¹, YU Guang-li¹

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. Infinitus (China) Company Ltd., Guangzhou 510600, China

Abstract: Objective To extract and separate a polysaccharide from *Polygonum multiflorum*, characterize its structural features and study its immunomodulatory activity. **Methods** The polysaccharide from *P. multiflorum* (PMT) was isolated and purified by water extraction and ethanol precipitation following Q-Sepharose Fast Flow ion exchange chromatography column. Molecular weight of PMT was determined by high performance gel permeation chromatography-multiple angle laser light scattering (HPGPC-MALLS), and monosaccharide composition was analyzed by HPLC with PMP (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone) pre-column derivatization, respectively. The structure of PMT was characterized by proton nuclear magnetic resonance spectrum (2D-NMR). The immunomodulatory activities were tested by MTT, neutral red colorimetric assay and Griess method. **Results** PMT was a kind of α -1,4-glucan, and its molecular mass was 3.96×10^5 . PMT promoted the proliferation and phagocytosis of RAW 264.7 cells, and significantly induced the increase of NO production in a dose-dependent manner. **Conclusion** The polysaccharide from *P. multiflorum* is a linear α -1,4-glucan with potent immunomodulatory activity, which would be potentially developed as an effective drug.

Key words: *Polygonum multiflorum* Thunb.; polysaccharide from *Polygonum multiflorum*; α -1,4-glucan; structural characterization; immunomodulatory activity

何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb., 又名多首乌是中国传统的中药, 性微温, 味苦、甘、涩, 花蓼、紫乌藤等, 是蓼科多年生缠绕草本植物。何《本草纲目》记载: “此物性温味苦, 苦补肾, 温补

收稿日期: 2019-01-25

作者简介: 王 娅(1993—), 女, 在读硕士, 研究方向为糖化学与糖生物学。Tel: (0532)82031790 E-mail: yawangouc@163.com

*通信作者 于广利(1964—), 男, 教授, 主要从事糖化学与糖药理学研究。Tel: (0532)82031609 E-mail: glyu@ouc.edu.cn

肝,涩能收敛精气”^[1]。何首乌全株均可入药,尤以根部为佳^[2]。其块根细长,末端肥大,外表红或暗褐色,是名贵的中药材,也是食疗保健的佳品。临床应用上有生首乌和制首乌之别,生首乌、制首乌性味相同而主治功效不同^[3]。何首乌中含有多糖类、蒽醌类和卵磷脂类等多种活性成分^[4],许多药理研究和临床实践证明,何首乌在治疗各种疾病和医学病症,如肝损伤^[5]、癌症^[6]、脱发、动脉粥样硬化^[7]和神经退行性疾病^[8]等方面具有良好的生物学活性。近年的研究表明,多糖作为一种新型的、无毒副作用的天然活性成分已成为医药界研究开发的热点^[9]。何首乌多糖由于其良好的抗氧化^[10]、抗衰老^[11]和抗老年痴呆等活性而引起关注^[12]。本实验以水提、醇沉法提取的何首乌多糖为研究对象,在对其进行理化性质和结构分析基础上,进一步评价其对小鼠单核巨噬细胞RAW 264.7的免疫调节活性,以期为何首乌多糖的药用开发提供理论基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

何首乌由无限极(中国)公司提供,经中国海洋大学刘红兵教授鉴定为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根;各种单糖标准品(经HPLC测定质量分数均>99.9%):葡萄糖醛酸(GlcA)、半乳糖醛酸(GalA)、葡萄糖(Glc)、甘露糖(Man)、木糖(Xyl)、半乳糖(Gal)、岩藻糖(Fuc)、鼠李糖(Rha)、阿拉伯糖(Arb)及1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、牛血清白蛋白(BSA)等购自美国Sigma-Aldrich公司;DMEM高糖培养基、青霉素、链霉素及胰酶购自美国HyClong公司;胎牛血清购自美国Gibco公司;中性红染液、一氧化氮(NO)检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;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Thermo Scientific公司;Agilent 1260型高效液相色谱仪、Agilent DD2 500 MHz 超导核磁共振波谱仪,美国Agilent公司;DAWN HELEOS II型十八角度激光光散射仪,美国Wyatt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

将何首乌药材充分干燥,粉碎后过40目筛,取粗粉100 mg,按料液比1:10加入蒸馏水,于80℃提取2次,每次2 h,离心(4 500 r/min, 10 min),合并收集上清,50℃真空减压浓缩至500 mL。加入4倍体积的无水乙醇,4℃放置8 h,离心(10 000 r/min, 10 min),收集沉淀复溶冻干,得到何首乌粗多糖。

2.2 多糖的分离纯化

将得到的何首乌粗多糖经Q-Sepharose Fast Flow(QFF)强阴离子交换色谱柱分离纯化。将QFF填料装填于250 mL分离柱中,先用蒸馏水冲洗2个柱体积(CV),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200 mg粗多糖,加水10 mL溶解,离心(10 000 r/min, 10 min),取上清液上样。分别用水和0.2 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,装入截留相对分子质量为7 000的透析袋中透析48 h,浓缩后复溶冻干,得到纯化后的何首乌多糖(PMT)。

2.3 总糖含量测定

总糖含量采用改良的硫酸-苯酚法^[13]进行测定。以0.5 mg/mL的葡萄糖溶液为标准液,分别取标准液0、10、20、30、40、50 μL加双蒸水补足至100 μL,再分别加入6%苯酚溶液200 μL,快速加入浓H₂SO₄ 1.5 mL,混合均匀。置于100℃的水浴锅加热10 min,取出冷却后,取200 μL加入96孔板,490 nm波长下检测吸光度(A)值,以标准品葡萄糖含量为横坐标,A值为纵坐标绘制标准曲线。

2.4 纯度及绝对分子质量测定

采用高效凝胶渗透色谱-十八角激光光散射法联用测定绝对分子质量^[14],取5 mg多糖样品,用1 mL流动相溶解。

色谱条件:色谱柱为OHpak SB HQ 804(300 mm×8.0 mm, 10 μm)与OHpak SB HQ 802.5(300 mm×8.0 mm, 6 μm)串联,示差检测器与十八角度激光散射仪联用检测,流动相为0.1 mol/L Na₂SO₄水溶液,体积流量0.6 mL/min;柱温35℃,进样量100 μL。通过软件计算绝对分子质量。

2.5 单糖组成分析

采用PMP柱前衍生高效液相色谱法测定单糖组成^[15]。取多糖样品5 mg,置于安瓿瓶中,加入1 mL 2

mol/L 三氟乙酸, 封口, 105 °C 水解 6 h。取全水解液 100 μ L, 碱性条件下进行 PMP 衍生, 衍生后除掉多余的 PMP, 进行高效液相色谱 (HPLC) 分析。

色谱条件: 色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 检测器为紫外检测器; 检测波长 245 nm; 流动相为 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.7)-乙腈 (83:17); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 10 μ L。

2.6 核磁共振波谱分析

取样品 25 mg, 用 500 μ L 的 D₂O (99.9%) 溶解, 冷冻干燥 3 次, 样品用 500 μ L 的 D₂O (99.96%) 溶解, 装入核磁管中, Agilent DD 500 MHz 超导核磁共振波谱仪, 加入氘代 DMSO 作为内标, 25 °C 下测定 PMT 的 ¹H-NMR 谱、¹³C-NMR、¹H-¹H COSY 谱和 ¹H-¹³C HSQC 谱。

2.7 MTT 法检测 RAW 264.7 细胞增殖

Raw 264.7 细胞于含 10% 胎牛血清, 1% 双抗的高糖 DMEM 培养基中培养 (37 °C, 5% CO₂), 取对数生长期细胞, 胰酶消化后, 10⁴ 个/孔接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L, 同时设 3 个复孔。待细胞贴壁后, 加入适量的 PMT, 使实验 (PMT) 组的质量浓度为 25、50、100、200 μ g/mL, 培养基终体积 200 μ L, 36 °C 培养 24 h。培养结束后, 弃培养基, 每孔加入 20 μ L MTT 溶液 (5 mg/mL), 继续孵育 4 h。4 h 后弃 MTT 溶液, 每孔加 150 μ L DMSO, 于 36 °C 放置 15 min 后轻摇混匀, 492 nm 处检测 *A*, 计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.8 中性红比色法检测 RAW 264.7 细胞吞噬活性

实验分组同上, PMT 处理细胞 24 h 后, 每孔吸弃培养基, 加入 100 μ L 中性红溶液 (0.065%), 继续培养 30 min, 弃上清, PBS 洗涤细胞 3 次后, 每孔加入 100 μ L 细胞裂解液 (乙醇-冰醋酸 1:1), 待细胞溶解后, 在酶标仪上测定 560 nm 处 *A*, 计算吞噬率。

$$\text{吞噬率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.9 Griess 法测定 RAW 264.7 细胞 NO 的含量

采用 Griess 法^[16]测定 NO 含量。将 RAW 264.7 细胞以每孔 5×10^5 个细胞加入到 24 孔板, 加入不同质量浓度 (25、50、100、200 μ g/mL) 的何首乌多糖和脂多糖 (LPS, 1 μ g/mL) 作用 24 h, 取细胞培养上清, 按照 50 μ L/孔, 加入 96 孔板, 同时设置空白对照; 每孔加入 50 μ L 室温 Griess I, 轻混匀; 每孔加入 50 μ L 室温 Griess II, 轻混匀; 酶标仪 540 nm 测 *A* 值。

3 结果与讨论

3.1 何首乌多糖理化性质分析

通过 QFF 离子交换色谱柱分离纯化何首乌多糖 PMT, 收集 0.2 mol/L NaCl 洗脱组分, 采用硫酸-苯酚法对洗脱液进行检测, 结果如图 1 所示, 水洗组分产率较低, 0.2 mol/L NaCl 洗脱组分产率较高。硫酸-苯酚法测定 PMT 中总糖质量分数为 59.38%。采用凝胶色谱法与十八角度激光散射仪联用技术测定 PMT 的绝对分子质量为 3.96×10^5 。经 HPLC 检测, PMT 只有 1 种单糖, 即葡萄糖。

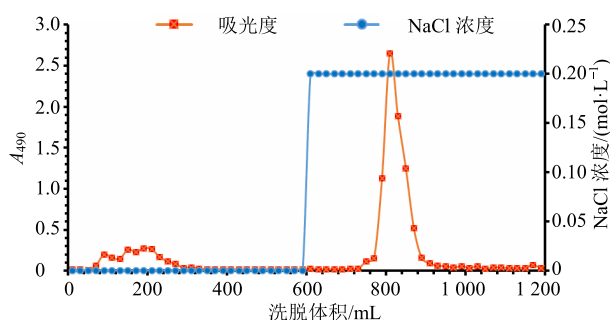


图 1 何首乌多糖 QFF 分离图

Fig. 1 QFF chromatogram of polysaccharide from *P. multiflorum*

3.2 何首乌多糖的结构解析

根据核磁共振波谱分析, 由单糖组成的测定结果可知, PMT 主要由葡萄糖组成, 其摩尔百分比为 98%, 表明 PMT 为葡聚糖。¹H-¹H COSY、¹H-¹³C HMQC 谱图分别见图 2、3。经核磁谱图的比较分析可知, ¹H-NMR 中异头 H 的化学位移为 δ 5.38, ¹³C-NMR 中异头 C 的化学位移为 δ 100.32, 表明糖环为 α 构型^[17]。结合文献报道^[18], 从 ¹H-¹H COSY 的异头 H (δ 5.38) 出发可依次找到 H-2、3、4、5、6 的信号, 对应的化学位移依次为 δ 3.64、3.93、3.62、3.82、3.89。从 ¹H-¹³C HMQC 谱图中可以找到与之对应的碳信号, 分别为 C-1 (δ 100.32), C-2 (δ 73.70), C-3 (δ 74.27), C-4 (δ 77.32), C-5 (δ 72.05), C-6 (δ 60.99)。PMT 的碳氢信号归属见表 1。由以上核磁共振分析结果可初步推断, PMT 是由 1 $\rightarrow$ 4 连接的 α -D-葡萄糖构成。

3.3 免疫活性分析

巨噬细胞为非特异性免疫细胞, 是机体非特异性免疫的重要组成部分。活化的巨噬细胞可以直接杀伤病原微生物与肿瘤细胞, 也可以通过分泌 NO 等细胞因子间接杀死病原体, 发挥免疫调节作用^[19]。

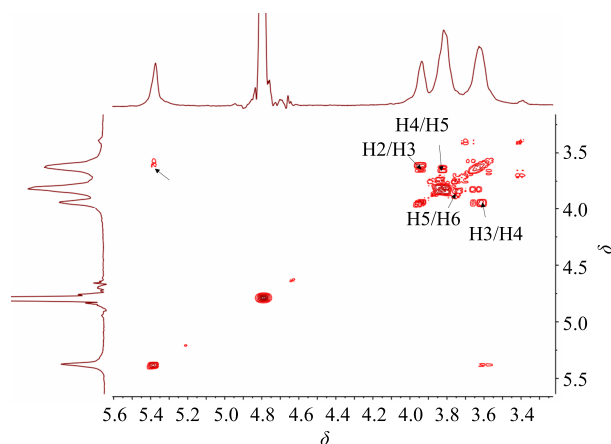


图 2 PMT 的 ^1H - ^1H COSY 谱图
Fig. 2 ^1H - ^1H COSY spectrum of PMT

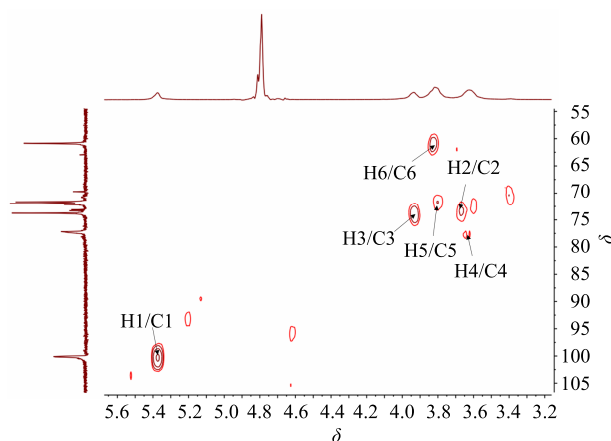


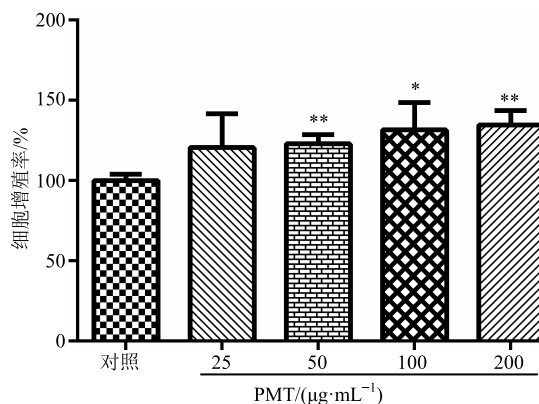
图 3 PMT 的 ^1H - ^{13}C HMQC 谱图
Fig. 3 ^1H - ^{13}C HMQC spectrum of PMT

表 1 PMT 的碳氢信号归属
Table 1 ^1H -NMR and ^{13}C -NMR chemical shifts of PMT

碳/氢信号	δ
C1/H1	100.32/5.38
C2/H2	73.70/3.64
C3/H3	74.27/3.93
C4/H4	77.32/3.62
C5/H5	72.05/3.82
C6/H6	60.99/3.89

本实验通过考察何首乌多糖 PMT 对 RAW264.7 细胞增殖作用、吞噬功能及 NO 释放的影响来判断其是否具有免疫调节活性。

3.3.1 MTT 法检测 PMT 对 RAW 264.7 细胞活力的影响 采用 MTT 法检测 PMT 对 RAW 264.7 细胞增殖的影响^[20]。由图 4 可知, PMT 对 RAW 264.7 细胞作用 24 h 以后, 与对照组相比, PMT 在质量浓



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as below

图 4 PMT 对 RAW 264.7 细胞的增殖活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 4 Effect of PMT on proliferation of RAW 264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

度为 50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 时均可显著促进巨噬细胞 RAW 264.7 的增殖 ($P < 0.05$ 、0.01)。当其质量浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时, 促进 RAW264.7 细胞增殖的作用最大; 当其质量浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 时, 促进巨噬细胞的增殖作用不显著 ($P > 0.05$)。可见在一定的质量浓度范围内, 随着 PMT 质量浓度的增大, 促进 RAW 264.7 细胞增殖的作用越强。

3.3.2 PMT 对 RAW 264.7 细胞吞噬中性红的影响 为了检测 PMT 对 RAW 264.7 细胞吞噬活性的影响, 本实验采用中性红吞噬实验检测巨噬细胞的吞噬功能^[21]。由图 5 可知, 与对照组相比, 经 PMT (50、100、200 $\mu\text{g/mL}$) 处理后的巨噬细胞, 其吞噬指数均有不同程度的提高, 说明其吞噬能力增强, 并且吞噬能力随着 PMT 样品质量浓度的增加而增加,

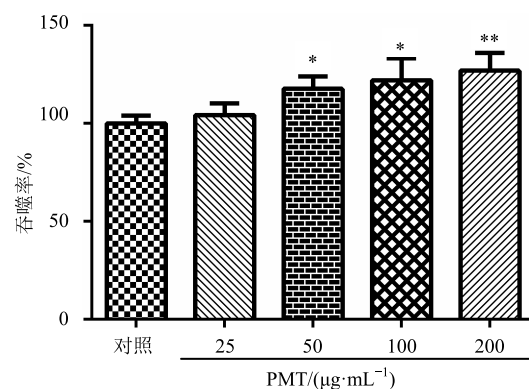


图 5 PMT 对 RAW 264.7 细胞吞噬中性红的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 5 Effect of PMT on phagocytosis of neutral red by RAW 264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

呈明显的浓度依赖性。

3.3.3 PMT 对 RAW 264.7 细胞培养上清中 NO 的含量的影响 NO 是巨噬细胞杀伤肿瘤细胞, 参与抵抗细菌、真菌及寄生虫等感染的炎症反应的重要因子, 近年的研究表明^[22], 巨噬细胞在受到刺激后产生 NO, 在免疫过程中起到重要的作用。采用 Griess 法检测细胞培养上清液中亚硝酸盐的含量来间接反映 NO 的含量^[16]。通过测定的标准曲线计算得到细胞培养上清中 NO 的含量, 结果见图 6。与对照组相比, PMT 能够显著增强 RAW 264.7 细胞释放 NO 的能力, 在其质量浓度为 50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 时具有显著性差异, 并呈现一定的浓度依赖性。说明 PMT 对巨噬细胞的免疫活性具有正向的促进作用。

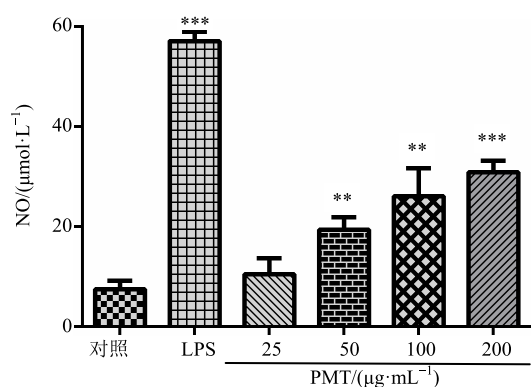


图 6 PMT 对 RAW 264.7 细胞释放 NO 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of PMT on nitric oxide (NO) production of RAW 264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

本实验通过水提、醇沉法从何首乌中提取多糖, 并通过 QFF 离子交换色谱柱有效纯化何首乌多糖, 收集 0.2 mol/L NaCl 洗脱组分, 得到纯化后的多糖 PMT, 基本理化性质分析表明, PMT 单糖组成只有 Glc; 其绝对分子质量为 3.96×10^5 。经核磁共振波谱等对 PMT 结构进行表征, 证明其由 1→4 连接的 α -D-葡萄糖组成。细胞实验证明 PMT 能够显著促进 RAW 264.7 细胞的增殖, 并且能够增强 RAW 264.7 细胞吞噬中性红的能力和释放 NO 的能力, 且具有浓度依赖性, 呈现显著的免疫调节活性。本实验为何首乌中药资源的深入开发利用和中药多糖类药物的研发提供了参考。

参考文献

[1] 李时珍. 本草纲目 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1792.

- [2] Yao S, Li Y, Kong L Y, *et al.* Preparative isolation and purification of chemical constituents from the root of *Polygonum multiflorum* by high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1115(1/2): 64-71.
- [3] Lv L S, Gu X H, Tang J, *et al.* Antioxidant activity of stilbene glycoside from *Polygonum multiflorum* Thunb *in vivo* [J]. *Food Chem*, 2007, 104(4): 1678-1681.
- [4] 罗瑞芝, 贾伟, 赵利斌, 等. 何首乌研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(7): 1097-1100.
- [5] Lin L F, Ni B, Lin H M, *et al.* Traditional usages, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Polygonum multiflorum* Thunb: A review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 159(15): 158-183.
- [6] Zong A Z, Cao H Z, Wang F S, *et al.* Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 90(4): 1395-1410.
- [7] Bounda G A, Feng Y U. Review of clinical studies of *Polygonum multiflorum* Thunb and its isolated bioactive compounds [J]. *Pharmacogn Res*, 2015, 7(3): 225-236.
- [8] Um M Y, Choi W H, Aan J Y, *et al.* Protective effect of *Polygonum multiflorum* Thunb on amyloid β -peptide 25-35 induced cognitive deficits in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 104(1/2): 144-148.
- [9] Franz G. Polysaccharides in pharmacology, current application and future concepts [J]. *Plant Med*, 1989, 55(6): 493-497.
- [10] 宋士军, 李芳, 岳华. 何首乌的抗衰老作用研究 [J]. 河北医科大学学报, 2003, 24(2): 90-91.
- [11] Lv L S, Cheng Y H, Zheng T S, *et al.* Purification, antioxidant activity and antiglycation of polysaccharides from *Polygonum multiflorum* Thunb [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 99(2): 765-773.
- [12] Chen Q, Zhang S Z, Ying H Z, *et al.* Chemical characterization and immunostimulatory effects of a polysaccharide from *Polygoni Multiflori Radix Praeparata* in cyclophosphamide-induced anemic mice [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 88(4): 1476-1482.
- [13] Bitter T, Muir H M. A modified uronic acid carbazole reaction [J]. *Anal Biochem*, 1962, 4(4): 330-334.
- [14] 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.
- [15] Shan X D, Liu X, Hao J J, *et al.* *In vitro* and *in vivo* hypoglycemic effects of brown algal fucoidans [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 82(11): 249-255.

- [16] Yang Y, Zhao X L, Li J, *et al.* A β -glucan from *Durvillaea Antarctica* has immunomodulatory effects on RAW 264.7 macrophages via toll-like receptor 4 [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 191(1): 255-265.
- [17] Jordan T, Schmidt S, Liebert T, *et al.* Molten imidazole-a starch solvent [J]. *Green Chem*, 2014, 16(4): 1967-1973.
- [18] Shi X D, Li O Y, Yin J Y, *et al.* Structure identification of α -glucans from *Dictyophora echinovolvata* by methylation and 1D/2D NMR spectroscopy [J]. *Food Chem*, 2018, 271(15): 338-344.
- [19] Beutler B. Innate immunity: An overview [J]. *Mol Immunol*, 2004, 40(12): 845-859.
- [20] Sun H X, Zhang J, Chen F Y, *et al.* Activation of RAW 264.7 macrophages by the polysaccharide from the roots of *Actinidia eriantha* and its molecular mechanisms [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 121(5): 388-402.
- [21] Fang W S, Bi D C, Zheng R J, *et al.* Identification and activation of TLR4-mediated signalling pathways by alginate-derived guluronate oligosaccharide in RAW 264.7 macrophages [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1-13.
- [22] Li M, Yan Y Y, Yu Q T, *et al.* Comparison of immunomodulatory effects of fresh garlic and black garlic polysaccharides on RAW 264.7 macrophages [J]. *J Food Sci*, 2017, 82(3): 765-771.