

研究报告

人工栽培灵芝中多糖的部分理化性质及免疫调节作用

熊川¹ 罗强² 金鑫¹ 陈诚³ 李强¹ 陈祖琴¹ 黄文丽^{1*}

(1. 四川省农业科学院生物技术核技术研究所 四川 成都 610061)

(2. 重庆医科大学附属第二医院 感染病分子重点实验室 肝炎研究所 重庆 400010)

(3. 四川省农业科学院植物保护研究所 四川 成都 610066)

摘要:【背景】灵芝是一种广受关注的药食两用真菌，在中国作为传统药材和健康食品已有几千年历史，近年来中国人工栽培灵芝规模扩展迅速，而多糖被认为是灵芝中最主要的活性成分。【目的】分离和纯化人工栽培灵芝子实体多糖，并对其结构和免疫调节活性进行研究。【方法】采用水提醇沉法提取灵芝子实体多糖(GLP)，采用 DE-52 纤维素柱和 Sephadex G-100 进行多糖的分离纯化，高效凝胶渗透色谱法测定多糖分子量，1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮(PMP)柱前衍生法测定单糖组成，红外光谱进行结构分析，噻唑蓝(MTT)比色法测定多糖对小鼠脾细胞增殖的影响，同时评价其对 RAW 264.7 细胞吞噬能力和细胞因子分泌能力的促进作用。【结果】GLP 平均分子量为 1.93×10^4 Da，单糖组成包含葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)及甘露糖(Man)，占比为 Glc:Gal:Man=3.3:1.3:1.0。红外光谱显示，GLP 的异头碳为 β 构型。GLP 能直接促进脾细胞的增殖，且能显著增强刀豆蛋白 A (ConA) 诱导的 T 淋巴细胞和脂多糖(LPS)诱导的 B 淋巴细胞的增殖。此外，对于 RAW 264.7 细胞的吞噬能力及细胞因子分泌具有一定的促进作用。【结论】灵芝多糖可作为一个潜在的免疫调节药物而开发利用。

关键词: 灵芝，多糖提取，分离纯化，免疫调节

Physiochemical properties immunoregulatory effects of the polysaccharides from *Ganoderma lingzhi*

XIONG Chuan¹ LUO Qiang² JIN Xin¹ CHEN Cheng³ LI Qiang¹
CHEN Zu-Qin¹ HUANG Wen-Li^{1*}

(1. Biotechnology and Nuclear Technology Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu, Sichuan 610061, China)

(2. Institute for Viral Hepatitis, Key Laboratory of Molecular Biology for Infectious Diseases (Ministry of Education), The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

(3. Institute of Plant Protection, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu, Sichuan 610066, China)

Abstract: [Background] *Ganoderma lingzhi* Sheng H. Wu, Y. Cao & Y.C. Dai. is a widely regarded

Foundation item: Science and Technology Support Project of Sichuan Province (2016GZ0355)

*Corresponding author: Tel: 86-28-84592187; E-mail: wenlih11@126.com

Received: June 09, 2017; Accepted: October 12, 2017; Published online (www.cnki.net): October 23, 2017
基金项目: 四川省科技支撑计划(2016GZ0355)

*通信作者: Tel: 86-28-84592187; E-mail: wenlih11@126.com

收稿日期: 2017-06-09; 接受日期: 2017-10-12; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-10-23

medicinal and edible fungus. Spectacularly, it was used as a traditional medicine and health food in China for thousands of years and the cultivation of *G. lingzhi* has been expanding rapidly recent years. Polysaccharides are considered to be the most important active ingredient in *G. lingzhi*. **[Objective]** This article focused on the extraction, purification, structure and immunoregulatory effects of a novel polysaccharide purified from the fruit bodies of *G. lingzhi*. **[Methods]** The polysaccharides of *G. lingzhi* (GLP) were extracted with boiling water and purified by DEAE cellulose-52 column and Sephadex G-100 column. The high performance gel permeation chromatography (HPGPC), PMP derivatization and FT-IR method were used to analysis molecular weight, monosaccharide composition and backbone structure, respectively. The splenocyte proliferation was analysed by MTT assay. The potency of polysaccharides on the phagocytosis and cytokine secretion of RAW 264.7 cells was determined by commercial kit. **[Results]** The molecular weight of GLP was 1.93×10^4 Da, the monosaccharide composition of GLP was mainly composed of glucose, galactose and mannose, with a ratio of 3.3:1.3:1.0. The anomeric carbon of GLP has a β configuration. GLP resulted in a significant increase of lymphocyte proliferation and could also enhance the effect of Con A-induced T lymphocyte proliferation and the stimulation index of LPS-induced B lymphocytes. In addition, the phagocytosis and cytokine secretion of RAW 264.7 cells can be promoted by GLP. **[Conclusion]** GLP may be developed as a potential immunoregulatory drug.

Keywords: *Ganoderma lingzhi*, Extraction of polysaccharide, Isolation and purification, Immunoregulation

灵芝 (*Ganoderma* sp.) 隶属于担子菌纲 (Basidiomycetes) 多孔菌目 (Polyporales) 多孔菌科 (Polyporaceae) 灵芝属 (*Ganoderma*), 是一种重要的药用真菌, 在传统中医中被广泛应用, 其药理作用多有论述^[1-2]。现代研究表明, 灵芝的生物活性成分种类多样且含量较为丰富, 因此其具有多种保健功效。研究证实, 灵芝在抗肿瘤、免疫调节、抗氧化、对放射性损伤及化学治疗药物损伤的保护等方面作用效果明显^[3-4]。灵芝的主要生物活性物质为灵芝多糖及灵芝三萜。灵芝多糖通过免疫调节发挥抗肿瘤作用, 其能促进小鼠腹腔巨噬细胞肿瘤坏死因子 (TNF- α) 分泌并增强其 RNA 的表达, 同时可促进体外培养的小鼠脾细胞分泌干扰素 (IFN- γ), 此外还能刺激正常小鼠脾细胞产生白细胞介素 (IL-2), 增加老年小鼠脾细胞 IL-2 的分泌^[5-6]。另外, 灵芝多糖通过强化外周免疫器官, 可促进细胞因子分泌实现抗肿瘤的效果。灵芝三萜化合物可以不同程度地减轻癫痫对大脑的损伤^[7]。药理研究表明, 灵芝三萜还具有解毒、保肝、抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗组织胺释放、抑制血管紧张素、调节免疫力等功效^[8-9], 目前国内外研究人员已分离出 100 多种三萜成分^[10]。

中国灵芝资源十分丰富且分布广泛, 发表并定名的至少有 80 种^[11-12]。灵芝的人工栽培进展迅速, 栽培规模逐年扩大。近年来的分子生物学研究表明, 我国大面积人工栽培的灵芝是模式产地属于中国的灵芝新种 *Ganoderma lingzhi* S.H. Wu, Y. Cao & Y.C. Dai, 其生物学活性有待深入研究^[13]。

本实验从野外采集灵芝, 人工驯化栽培收获子实体, 采用水提醇沉法获得多糖 (Water-soluble polysaccharide isolated from the fruit body of *G. lingzhi*, GLP), 通过 HPGPC、PMP 柱前衍生法及红外分析明确其部分理化性质; 通过评估灵芝多糖对小鼠脾细胞的增殖作用及对巨噬细胞 RAW 264.7 细胞因子分泌的促进作用来验证其免疫调节作用, 为人工栽培灵芝的药理作用研究提供数据。

1 材料与方法

1.1 材料

野生灵芝采集自四川省攀枝花市仁和区, 凭证标本存放于四川省农业科学院生物技术核技术研究所微生物标本保藏中心 (保藏号: SLZ-3)。采用 PDA 培养基组织分离获得母种, 在成都市德阳食用菌专家大院段木栽培出灵芝 (图 1)。



图 1 驯化栽培的灵芝

Figure 1 *Ganoderma lingzhi* collected from the experimental field

1.2 主要试剂

葡萄糖、鼠李糖、果糖、甘露糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖等单糖标准品、青霉素、链霉素, 美国 Sigma 公司; RAW 264.7 (小鼠单核巨噬细胞系, ATCC No.: TIP71) 细胞, ATCC 菌种保藏中心; 胎牛血清、DMEM 培养液, Thermo Scientific 公司; 一氧化氮检测试剂盒, 南京建成生物工程研究所; TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 细胞因子检测试剂盒, 美国 BD 公司; 其余试剂均为分析纯级。

1.3 主要仪器

高效液相色谱, 美国 PerkinElmer 公司; 高速离心机, BECKMAN 公司; CO₂ 细胞培养箱, 美国 Thermo 公司; 紫外分光光度计, 美国 Molecular Devices 公司; 真空冷冻干燥机, 美国 VirTis 公司; 旋转蒸发器, 德国 Büchi 公司; 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; 凝胶成像仪、酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司; 傅立叶红外光谱仪分析, 美国 Nicolet 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 人工栽培灵芝种属鉴定

选用真菌通用引物对人工栽培灵芝子实体 DNA 进行扩增, 引物序列为: ITS1 (5'-TC CGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCC GCTTATTGATATGC-3')。PCR 反应体系(30 μ L): Mix 缓冲液 15 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L, 模板 DNA 1 μ L, ddH₂O 补足至 30 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C

1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。完成后用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 电压 100 V, 电泳时间 20 min。PCR 产物检测合格后将目的条带进行切胶纯化, 纯化样品送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将人工栽培灵芝样品的测序结果在美国生物技术研究中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库中进行 BLAST 比对, 在 GenBank 中寻找相似性最大的序列, 以树舌灵芝(*Ganoderma applanatum*) 作为外参, 采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

1.4.2 灵芝粗多糖提取

采用水提醇沉法获得灵芝粗多糖^[14]。新鲜采集的灵芝子实体于 37 $^{\circ}$ C 下烘干。取 200 g 灵芝子实体经粉碎后加入 95% 乙醇(2 L)脱脂。24 h 后室温 5 000 r/min 离心 10 min 去除乙醇, 样品自然干燥。干燥样品溶于 20 倍体积纯水中, 于 95 $^{\circ}$ C 水浴 6 h, 重复操作 3 次。室温、6 000 r/min 离心 15 min 收集上清, 然后减压蒸馏浓缩, 无水乙醇醇沉浓缩产物, 获得的醇沉产物 6 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀, 沉淀用 100 mL 纯水溶解, 采用 Savage 法除蛋白。样品中加入 5 倍体积 Savage 试剂(氯仿:正丁醇=4:1, 体积比)剧烈振荡, 静置分层并收集上层溶液, 重复应用 Savage 法操作除尽蛋白。最后 6 000 r/min 离心 10 min 去除产物中残留的 Savage 试剂, 减压蒸馏浓缩与醇沉。

收集沉淀并溶解, 采用透析袋(截留分子量 7 500 Da)对灵芝多糖进行透析。透析袋于 EDTA 中沸水浴 5 min, 冷却后用透析袋专用夹封闭一端, 加入已除尽蛋白的多糖溶液, 封闭透析袋另一端, 流水透析 48 h。最后通过双蒸水透析除去单糖及小分子无机盐等杂质, 获得灵芝粗多糖。

1.4.3 粗多糖分级纯化

配制 10% 的灵芝粗多糖溶液, 预处理并平衡 DEAE cellulose-52 离子交换柱(4.5 cm \times 80 cm), 每次上样 10 mL 粗多糖溶液(上样 5 次, 即 5 g 灵芝粗多糖), 洗脱液为 0.5 mol/L NaCl, 洗脱速

度为 1.0 mL/min, 每管收集 3 mL, 采用苯酚硫酸法检测, 合并洗脱峰洗脱液进行浓缩, 透析, 冷冻干燥, 得到灵芝多糖半纯品^[15]。

称取灵芝多糖半纯品 1 g, 溶解于蒸馏水中, 8 000 r/min 离心 10 min 除去沉淀, 上清液上样到 Sephadex G-100 凝胶柱(2.6 cm×100 cm)进行分离, 用 0.1 mol/L NaCl 溶液洗脱, 控制洗脱速度为 1.0 mL/min, 采用苯酚硫酸法检测收集液, 收集各洗脱峰洗脱液, 浓缩、透析、冷冻干燥得到灵芝多糖(GLP)纯品。

1.4.4 GLP 分子量测定

采用高效凝胶渗透色谱法(High performance gel permeation chromatography, HPGPC)测定 GLP 的分子量。HPGPC 的条件如下: Waters 2695 高效液相色谱系统, 配备 410 示差检测器, 采用 TSKPWXL 4000-3000 串联柱, 流动相采用 0.3 mol/L 的 NaNO₃ 和 0.1 mol/L 的 NaH₂PO₃ (pH 7.0)。柱温预设 30±1 °C, 流速设定为 0.6 mL/min。

1.4.5 GLP 单糖组成测定

通过 PMP-柱前衍生法分析 GLP 的单糖组成^[16]。准确称取 GLP 20 mg, 加入到具塞试管中, 之后加入 2 mol/L 的硫酸溶液 2 mL, 在 110 °C 条件下水解 6 h, 获得 GLP 水解样品。水解样品通过 4 mol/L 氢氧化钠水溶液调整 pH 至中性, 用纯水将中性水解样品稀释至 5 mL, 6 000 r/min 离心 5 min 收集上清液。1.5 mL 离心管中加入 GLP 水解样品液 200 μL (单糖标品操作相同), 加入浓度为 0.5 mol/L 的 PMP 甲醇溶液 100 μL 和浓度为 0.3 mol/L 的氢氧化钠溶液 100 μL, 振荡后 70 °C 水浴 30 min, 之后室温放置 10 min。加入盐酸溶液(0.3 mol/L, 100 μL)调整 pH 至中性。摇匀, 加入等体积的乙酸异戊脂萃取, 弃去有机层。水相中加入乙酸异戊脂萃取, 再加入等体积的氯仿, 振荡后 6 000 r/min 离心 10 min, 弃去氯仿相, 保留上层水相。定容水相至 1.0 mL, 0.45 μm 滤膜过滤, 收集滤液进行 HPLC 分析。色谱条件: 流动相组成为 0.1 mol/L 磷酸盐 (KH₂PO₄-NaOH, pH 6.8) 缓冲液: 乙腈(84:16, 体积

比), 柱温保持 30 °C, 检测波长设定为 250 nm, 体积流量设定为 0.8 mL/min, 样品进样量 10 μL。

1.4.6 GLP 红外光谱分析

通过傅立叶红外光谱仪分析 GLP 的功能基团。取 GLP 冻干样品 5 mg 放入研钵中, 加入 1 g 溴化钾充分研磨后压片, 上机扫描。扫描参数: 扫描范围 4 000–400 cm⁻¹, 扫描 32 次, 分辨率为 4 cm⁻¹。

1.4.7 GLP 对脾细胞的增殖作用

无菌取脾, 置于盛有适量(3–5 mL)无菌 Hank's 液平皿中, 并在脾上面放置一块纱布, 用大号注射器内芯轻轻将脾磨碎, 制成单个细胞悬液。经 200 目筛网过滤, 用 Hank's 液洗 2 次, 每次 1 000 r/min 离心 10 min。然后将细胞悬浮于 2 mL 的完全培养液中, 用全自动细胞计数仪计数脾细胞, 调整细胞浓度为 3×10⁶ 个/mL。

(1) GLP 对静息期脾细胞增殖的影响。将细胞悬液分 2 孔加入 24 孔培养板中, 每孔 1 mL, 加入培养液配置的不同浓度灵芝多糖(0.05、0.10、0.50、1.00 mg/mL) 100 μL, 以培养液替代 GLP 作为阴性对照, 未加细胞的孔作为空白对照。置 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 72 h。培养结束前 4 h, 每孔轻轻吸去上清液 0.7 mL, 加入 0.7 mL 不含小牛血清的 DMEM 培养液, 同时加入 MTT (5 mg/mL) 50 μL/孔, 继续培养 4 h。培养结束后, 每孔加入 1 mL 酸性异丙醇, 超声振荡(2 s)混匀, 使紫色结晶完全溶解。然后分装到 96 孔培养板中, 每个孔分装 3 孔作为平行样, 用酶联免疫检测仪以 570 nm 波长测定 OD₅₇₀ 值。

(2) GLP 对 ConA 诱导的小鼠 T 淋巴细胞增殖的影响。将细胞悬液分 2 孔加入 24 孔培养板中, 每孔 1 mL, 每孔加 75 μL ConA 液(相当于 7.5 μg/mL), 其余操作同上。

(3) GLP 对 LPS 诱导的小鼠 B 淋巴细胞增殖的影响。将细胞悬液分 2 孔加入 24 孔培养板中, 每孔 1 mL, 每孔加 40 μL LPS (相当于 4 μg/mL), 其余操作同上。

1.4.8 GLP 的免疫调节作用

采用 RAW 264.7 细胞株吞噬中性红评价 GLP 的促巨噬细胞吞噬能力。RAW 264.7 细胞以浓度 2×10^4 个/mL 铺 96 孔板, 每孔 100 μ L。对照组(CK)设定为 100 μ L 细胞悬液+100 μ L DMEM 细胞培养液; 实验组设定为 100 μ L 细胞悬液+80 μ L DMEM 细胞培养液+20 mL GLP, 最终保证 GLP 终浓度分别为 25、50、100 和 200 μ g/mL, 阳性对照设定终浓度为 10 μ g/mL 的 LPS, 每组均设立 8 个重复。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内培养 24 h, 用 PBS 洗涤 3 次, 之后加入中性红溶液 100 μ L 使其终浓度为 1 mg/L, 继续培养 30 min。吸弃中性红溶液, 洗涤 3 次, 加入裂解液(冰醋酸:无水乙醇=1:1, 体积比) 200 μ L, 静置过夜, 待完全裂解细胞后 540 nm 波长下测定吸光度值。

采用 Griess 试剂法测定 GLP 对 RAW 264.7 细胞分泌 NO 的影响。RAW 264.7 细胞用 DMEM 培养基稀释成 1×10^5 个/mL, 加入到 24 孔板中。加入不同量的 GLP, 保证每孔中 GLP 的终浓度分别为 25、50、100 和 200 μ g/mL, 阳性对照 LPS 终浓度为 10 μ g/mL。培养 72 h, 每隔 24 h 测定一次 NO 含量。采用 Griess 试剂法的 NO 试剂盒测定, 操作步骤按说明书进行, 以标准品浓度为横坐标, 对应 OD₅₇₀ 值为纵坐标, 绘制出标准品线性回归曲线, 拟合得出回归方程, 按曲线方程计算各样品中的浓度值。

RAW 264.7 细胞(1×10^5 个/mL)接种到 24 孔板 (1 mL/孔)中进行培养, 实验设置同上。培养结束后取上清液, 使用小鼠白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒测定其中的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 细胞因子浓度, 操作步骤参照试剂盒说明书。用酶标仪或紫外分光光度计在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值)。以标准品浓度为横坐标, 对应 OD₄₅₀ 值为纵坐标, 绘制出标准品拟合线性回归曲线, 得出回归方程, 按曲线方程计算各样品中的浓度值。

2 结果与分析

2.1 人工栽培灵芝的种属鉴定

人工栽培灵芝的 ITS (Internal transcribed spacer) 序列聚类结果见图 2。目的菌株 SLZ-3 与 *Ganoderma lingzhi* 聚成一个分支, 与 *Ganoderma sichuanense* 和赤芝 *Ganoderma lucidum* 具有较近的亲缘关系。相关报道显示, 上述 3 种灵芝是我国目前主要的栽培品种, 本实验的鉴定结果与报道一致^[13]。SLZ-3 与松杉灵芝 *Ganoderma tsugae* 和树舌灵芝 *Ganoderma applanatum* 遗传距离较远。通过系统发育树鉴定, 本实验选用的人工栽培灵芝品种为模式产地属于中国的灵芝新种 *Ganoderma lingzhi* S.H. Wu, Y. Cao & Y.C. Dai。

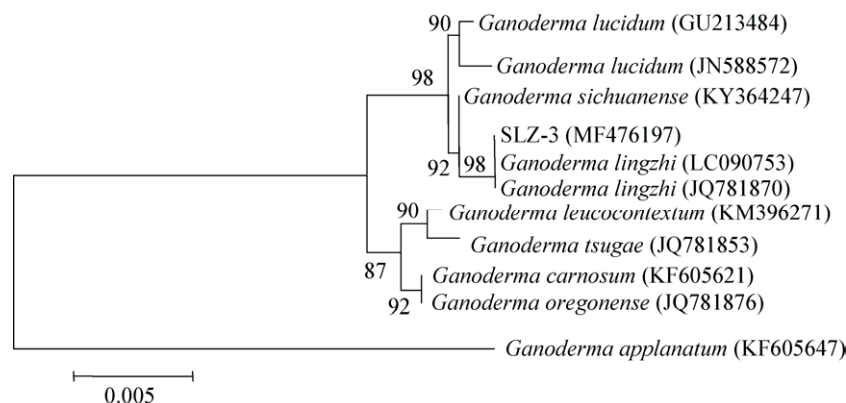


图 2 基于 ITS 序列构建的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree constructed based on ITS sequence

2.2 GLP 分离纯化结果

200 g 灵芝子实体热水浸提得到灵芝粗多糖 28.8 g, 得率为 14.4%。5 g 灵芝粗多糖经过 DE-52 纤维素柱(4.5 cm×80 cm)分离, 在 0.5 mol/L NaCl 洗脱时得到 GLP 半纯品 1 452 mg。再经过分子筛柱 Sephadex G-100 (4.5 cm×100 cm)分离纯化过后, 得到 GLP 纯品 397 mg, GLP 纯品得率 1.14%。经 GPC 测定, GLP 平均分子量 1.93×10^4 Da, 分散度为 1.14 (图 3)。

经 PMP 柱前衍生分析, GLP 主要由甘露糖(保留时间约 12 min)、葡萄糖(保留时间约 30 min)以及半乳糖(保留时间 36.8 min)组成, 占比为 Glc:Gal:Man=3.3:1.3:1.0 (图 4)。

2.3 GLP 红外光谱分析

GLP 的特征吸收峰主要出现在 $3\ 365$ 、 $2\ 925$ 、 $1\ 618$ 、 $1\ 430$ 、 $1\ 120$ 、 $889\ \text{cm}^{-1}$ 处, 这些都是明显的多糖的特征吸收峰(图 5)。 $3\ 365\ \text{cm}^{-1}$ 处出现的宽峰是由 O-H 的伸缩振动引起; $2\ 925\ \text{cm}^{-1}$ 左右出现的峰是由 C-H 的伸缩振动引起, 与 $1\ 430\ \text{cm}^{-1}$ 处出现的峰综合表明有 $-\text{CH}_2$ 和 $-\text{CH}_3$ 基团存在; 而 $1\ 618\ \text{cm}^{-1}$ 处出现的较强峰是由 C=O 引起; $1\ 120\ \text{cm}^{-1}$ 是 C-O-C 伸缩振动的特征吸收峰; $889\ \text{cm}^{-1}$ 左右较小的吸收峰是典型的吡喃葡聚糖和 β -型糖苷键连接特征吸收峰。该结果表明 GLP 的异头碳为 β 构型。

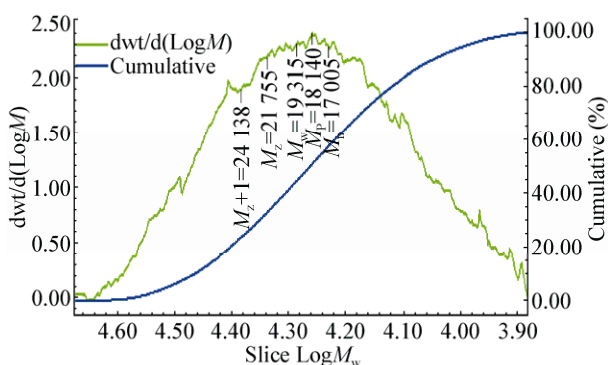


图 3 灵芝多糖分子量测定

Figure 3 High performance gel permeation chromatography of GLP

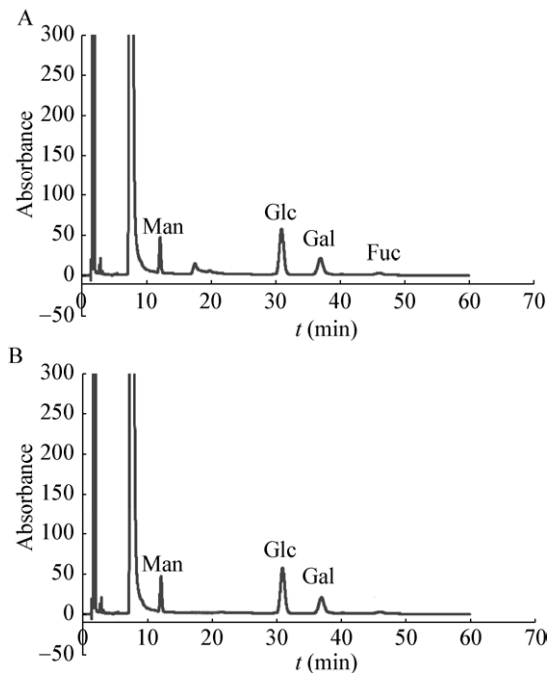


图 4 样品 PMP 衍生化产物色谱图

Figure 4 Chromatograms of PMP derivatization for the samples

注: A: 6 种单糖-PMP 衍生物色谱分离图; B: GLP-PMP 衍生物色谱分离图。

Note: A: Chromatograms of PMP derivatization for 6 monosaccharides reference substances; B: Chromatograms of PMP derivatization for GLP.

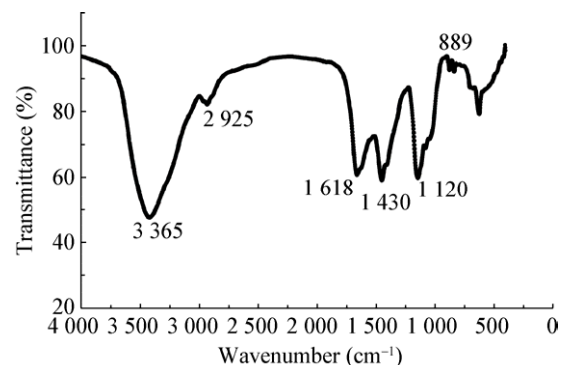


图 5 灵芝多糖红外光谱吸收图谱

Figure 5 Infrared absorption spectra of GLP

2.4 GLP 对免疫细胞的增殖作用

GLP 对于静息期脾细胞的促增殖作用明显, 当 GLP 浓度为 $0.5\ \text{mg/mL}$ 时, 脾细胞为 0.281, 明显高于对照组 0.231 (表 1)。在实验设定范围内, 随着 GLP 浓度的增高, 其对脾细胞的增殖作用越强。GLP 对 ConA 活化的 T 淋巴细胞的促增殖作用较弱, 呈现

表 1 灵芝多糖对免疫细胞增殖的影响

Table 1 Effect of *Ganoderma lingzhi* polysaccharides on the proliferation of immune cells

细胞 Cell	对照 CK	灵芝多糖浓度 Concentration of GLP (mg/mL)			
		0.05	0.10	0.50	1.00
静息期脾细胞 Unprimed splenocytes	0.231±0.004a	0.237±0.011a	0.251±0.008b	0.281±0.012c	0.284±0.013c
ConA 活化的 T 细胞 T lymphocyte activated by ConA	0.196±0.003b	0.206±0.005b	0.231±0.009c	0.203±0.011b	0.176±0.006a
LPS 活化的 B 细胞 B lymphocytes activated by LPS	0.211±0.004a	0.276±0.013d	0.281±0.009d	0.247±0.01c	0.188±0.008b

注: 数值为 3 个重复的平均值±标准误, 不同字母表示组内 5% 差异显著性水平。

Note: Data were expressed as mean±SD (n=3). Values with the different superscript letters were significantly different from each other in same group at $P<0.05$.

出低浓度无效、中浓度微弱刺激、高浓度抑制的关系。而 GLP 对于 LPS 活化的 B 淋巴细胞的促增殖作用较强, 仅 0.05 mg/mL 的 GLP 就能够带来极显著的促进作用, 但是高浓度的 GLP (1 mg/mL) 对于活化的 B 淋巴细胞的增殖依旧具有抑制作用。

2.5 GLP 对 RAW 264.7 细胞吞噬能力的影响

采用中性红实验对 GLP 促进 RAW 264.7 细胞的吞噬能力进行评价, 结果如图 6 所示, GLP 对 RAW 264.7 细胞吞噬中性红的能力有明显的促进作用。给予最低剂量的 GLP (25 $\mu\text{g/mL}$) 处理后, RAW 264.7 细胞的吞噬作用较空白对照提升了近

1 倍。50 $\mu\text{g/mL}$ GLP 的促进作用与阳性对照(LPS, 10 $\mu\text{g/mL}$)接近。100 $\mu\text{g/mL}$ GLP 促吞噬作用相比较阴性对照呈现出了极显著差异($P<0.01$), 强于阳性对照组 LPS。

2.6 GLP 对 RAW 264.7 细胞分泌 NO 的影响

绘制标准曲线: 取 Griess 试剂法的 NO 测定试剂盒中的标准品, 配制成不同浓度的标品溶液, 标品浓度为横坐标, 测定其在 540 nm 下的吸光度值为纵坐标, 绘制 NO 测定标准曲线, 建立回归方程如下: $Y=0.032 2X+0.096 8$, $R^2=0.996 2$ (X 为所测标准品浓度, Y 为所测吸光值), 该回归方程适用的吸光度范围: 0–3.3。根据标准曲线的回归方程, 计算得出各剂量组作用下 RAW 264.7 细胞培养上清液中的 NO 浓度, 其结果如图 7 所示。研究发现 GLP 对 RAW 264.7 细胞在培养过程中能非常显著地刺激 RAW 264.7 细胞分泌 NO, 并在最低剂量组 25 $\mu\text{g/mL}$ 就与阴性对照组呈现出极显著差异($P<0.01$), 且高剂量组(100 $\mu\text{g/mL}$ 和 200 $\mu\text{g/mL}$)与阳性对照组 LPS 效果相当。此外, 研究发现 GLP 与 RAW 264.7 细胞共同培养 48 h, NO 的含量达到最高, 超过 48 h 开始下降, 说明 GLP 对 RAW 264.7 细胞分泌 NO 在一定时间内起促进作用。

2.7 GLP 对 RAW 264.7 细胞分泌细胞因子的影响

GLP 能显著提高 RAW 264.7 细胞中 TNF- α 的含量水平, 在实验范围内呈现剂量依赖关系。GLP 浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞中 TNF- α 的含量达到

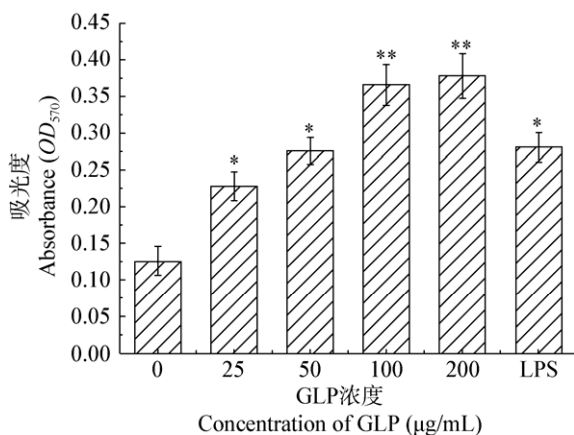


图 6 灵芝多糖促进 RAW 264.7 细胞吞噬中性红

Figure 6 Enhanced phagocytosis of RAW 264.7 cells by GLP

注: 数值为 3 个重复的平均值±标准误. 与空白对照组比较. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$. 下同.

Note: Data were expressed as mean±SD (n=3). *: $P<0.05$; **: $P<0.01$. The same below.

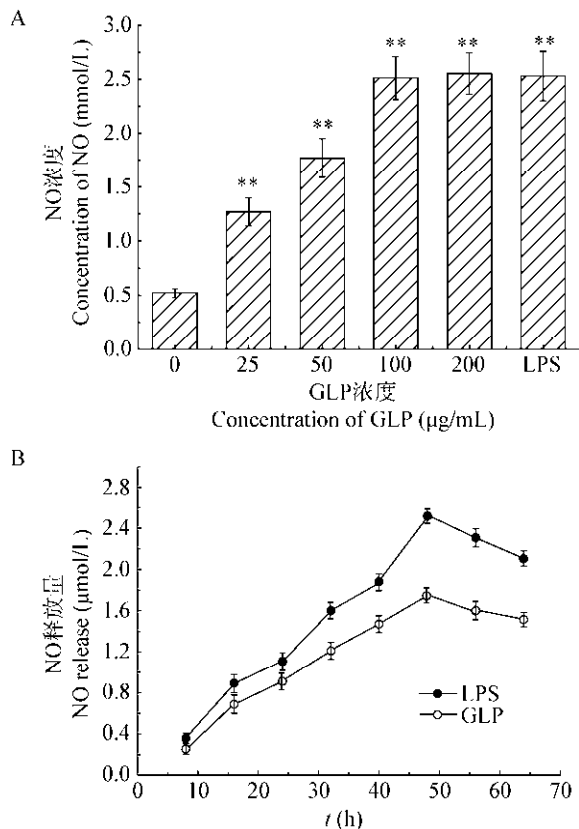


图 7 灵芝多糖促进 RAW 264.7 细胞产生 NO 作用(A)和 RAW 264.7 细胞产生 NO 时间点(B)
Figure 7 GLP stimulated RAW 264.7 cells NO production (A) and its point in time (B)

59.4 pg/mL, 与对照组相比呈现极显著差异。GLP 浓度为 100 μg/mL 时, 细胞中 TNF-α 的含量超过阳性对照(10 μg/mL 的 LPS)。GLP 也能不同程度地提高 RAW 264.7 细胞 IL-1β 和 IL-6 含量水平, 且对 IL-6 的促进作用更明显(图 8)。

3 讨论与结论

3.1 灵芝多糖的构效关系

由于灵芝多糖是由单一或多种单糖聚合而成的高分子聚合物, 明确其单糖组成是探究其功效的第一步。已有学者探索了灵芝(*Ganoderma lucidum*)多糖的单糖组成, 来源于深层发酵液的灵芝多糖由阿拉伯糖、木糖、葡萄糖及半乳糖组成^[17], 来源于子实体的由 D-葡萄糖、D-半乳糖、木糖、鼠李糖

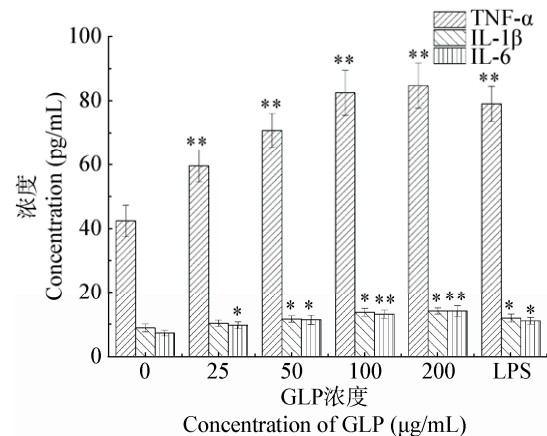


图 8 灵芝多糖促进 RAW 264.7 细胞产生细胞因子作用

Figure 8 Effects of GLP stimulated cytokines secretion in RAW 264.7 cells

组成^[18], 此外, 不同提取及测定方法获得的单糖组成有一定的差异, 一般葡萄糖、半乳糖、甘露糖所占比例稍大, 同时还含有少量木糖、岩藻糖、阿拉伯糖等。本实验获得的灵芝多糖单糖组成为甘露糖、葡萄糖和半乳糖, 与现有研究相符。

组成多糖的单糖间的连接方式是多糖一级结构的重要特征, 其侧链的种类和结构也影响多糖的生物活性^[19]。研究表明, 真菌 β-葡聚糖是机体天然免疫和获得性免疫的有效调节剂^[20]。通过红外光谱分析, GLP 的异头碳为 β 构型, 因此从结构上分析可知 GLP 具有较好的免疫调节活性。已有学者报道, 灵芝(*Ganoderma lucidum*)多糖大都是 β-(1,3)-D 葡聚糖, 而且活性与其分支度和分子量有关^[21]。目前报道的灵芝多糖的分子量介于 2×10^4 – 2×10^6 Da 之间^[22], 变化较大。GLP 分子量为 1.93×10^4 Da, 略小于现有的报道。大的分子量不利于多糖跨越多重细胞膜障碍进入生物体内发挥生物学活性, 因此, 较小的分子量可能使 GLP 的溶解性、与胞外受体结合活性等获得提高, 具有更好的生理活性。

有关真菌多糖的构效关系研究一直是生命科学的热点之一。真菌多糖可增强免疫、抗肿瘤活性与其结构密切相关。糖苷键显著影响多糖活性, 对葡聚多糖而言, α-葡聚糖一般没有生物活性, 大多

数具有抗肿瘤活性的多糖具有 β -(1,3)-D 葡聚糖主链结构, 香菇多糖、猪苓多糖、裂褶菌多糖都具有 β -(1,3)-D 葡聚糖主链结构, 本文涉及的灵芝多糖也是 β 构型, 在抗肿瘤活性上具有广阔的应用前景。支链的分支度和长度同样影响多糖抗肿瘤活性, 通常情况下直链且无过长支链的多糖具有更好的抗肿瘤活性。研究发现, 真菌多糖具有最适的分支度, 在一定范围内, 分支度越低则抗肿瘤活性越强。因此, 灵芝多糖更精细的结构有待进一步测定, 以精确评估及改良其抗肿瘤活性。

3.2 真菌多糖的抗肿瘤活性

真菌多糖不仅是真菌不可缺少的结构组成部分, 而且能够履行一系列不同的生理功能。真菌多糖具有抗氧化、抗肿瘤、神经保护、降血脂等作用, 在真菌功效研究领域广受关注。其中, 真菌多糖的抗肿瘤及免疫调节作用研究较多。实验表明, 部分真菌多糖可以抑制肿瘤细胞生长。云芝多糖 (*Trametes versicolor*) 可抑制结肠癌细胞增殖, 将肿瘤细胞生长阻滞于细胞周期 S 期和 G2/M 期^[23]。香菇多糖 (*Lentinus edodes*) 可通过上调 p21 和下调细胞周期蛋白 D1 表达而发挥抑制肿瘤细胞增殖的作用, 且呈现出剂量和时间依赖性^[24]。大多数真菌多糖的抗肿瘤作用是作为生物反应调节剂, 通过增强宿主免疫调节功能来实现的。相关学者证实, 把灵芝水提物或灵芝多糖直接与 S180 肉瘤或者 HL60 细胞株一起培养无直接的细胞毒作用; 而采用灌胃等操作, 则能显著抑制荷瘤小鼠的肿瘤生长^[23]。因此, 灵芝多糖通过强化免疫来发挥肿瘤抑制功效, 即宿主主导抗肿瘤活性。进一步研究发现, 真菌多糖可通过多条途径、多个层面对免疫系统发挥调节作用。

3.3 灵芝多糖的免疫调节活性

脾脏是人体最大的外周免疫器官, 为免疫活性细胞定居的部位, 是进行免疫应答及产生免疫效应物质的重要基地。GLP 能有效促进脾淋巴细胞的增殖, 并与 ConA、LPS 对 T、B 淋巴细胞的增殖有协同刺激作用。Con A 是 T 淋巴细胞的有丝分裂原,

可促进 T 淋巴细胞活化, 进而使细胞因子合成、细胞因子受体表达、细胞分化及细胞增殖等变化^[25]。巨噬细胞存在于机体的几乎所有组织中, 在先天性免疫和获得性免疫中发挥中心作用, 是机体免疫防御阵线的关键成员^[26]。其主要生理功能是吞噬能力, 它能够吞噬外来的病原体、细胞残片和其他小分子。此外, 巨噬细胞能够递呈抗原、分泌生物活性物质, 如细胞因子, 从而调控局部微环境, 抵御外界不良因素的侵害。实验表明, GLP 能够有效促进 RAW 264.7 细胞的吞噬能力, 表明 GLP 具有提高先天免疫反应的能力。相关报道显示, 真菌多糖通过强化免疫发挥抗肿瘤活性。黑灵芝 (*Ganoderma atrum*) 多糖能够显著促进 T、B 淋巴细胞增殖, 最大增殖比例分别为 16.0% 和 15.7%^[27], 灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 多糖对于淋巴细胞具有一定的促进作用, 最大增殖比例为 25.2%^[28]。GLP 对于脾细胞增殖的促进作用接近 20%, 作用较为明显。对于 B 细胞的活化作用极其显著, 最大增殖比例为 33.18%, 且作用浓度较低 (0.1 mg/mL), 说明 GLP 对于体液免疫的增强作用较为显著。

NO 被认为是一种重要的活性介质, 免疫系统产生的 NO 分子在宿主免疫防御、组织修复等生理活动中发挥重要的作用^[29]。巨噬细胞合成释放的 NO 具有细胞毒作用, 不仅可杀伤侵入机体的微生物, 而且还能够阻止癌细胞的繁殖, 阻止肿瘤细胞扩散。用 Griess 法测定 NO 生成量, 结果表明 GLP 能显著提高巨噬细胞的 NO 释放, 且共培养 48 h 后刺激作用达到峰值。NO 的合成主要受一氧化氮合酶的调节。为进一步确认 GLP 对巨噬细胞产生 NO 的诱导作用, 后续研究可以通过 RT-PCR 等方法检测 iNOS mRNA 的表达情况。

细胞因子是由多种细胞产生的多肽分子, 通过调节细胞分化、生长和凋亡控制整个机体的动态平衡, 对天然免疫和适应性免疫均有调控作用^[30]。TNF- α 是一种主要由巨噬细胞和淋巴细胞分泌的细胞因子, 在宿主防御机制中发挥重要作用, 对肿瘤具有直接溶解和抑制增殖的作用。已有报道称浓度

为 400 $\mu\text{g/mL}$ 的灵芝孢子粉多糖对腹腔巨噬细胞产生 TNF- α 的促进率为 50%，本实验中 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 GLP 就可以达到 50% 的促进率，说明人工栽培的灵芝对于腹腔巨噬细胞产生 TNF- α 的促进作用较强^[28]。IL-1 β 和 IL-6 是由活化的巨噬细胞所产生，在刺激参与免疫反应的细胞增殖、分化并提高其功能中起重要作用。实验表明，GLP 能显著促进 RAW 264.7 细胞的细胞因子分泌，对巨噬细胞具有免疫调节活性。相关研究证实，激活巨噬细胞是先天和适应性免疫防御病原体的一个关键事件，因此，后续实验应集中于介导巨噬细胞激活的一系列信号转导途径展开研究，以探索精细的作用通路。

REFERENCES

- [1] Meng LZ, Xie J, Lv GP, et al. A comparative study on immunomodulatory activity of polysaccharides from two official species of *Ganoderma* (*Lingzhi*) [J]. *Nutrition and Cancer*, 2014, 66(7): 1124-1131
- [2] Gowrie SU, Chathurdevi G, Rani K. Evaluation of bioactive potential of basidiocarp extracts of *Ganoderma lucidum* [J]. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*, 2014, 3(1): 36-46
- [3] Jia HY, Wang YT, Zhang ZH, et al. Determination of triterpenoids in *Ganoderma lingzhi* from different areas and species by HPLC [J]. *Microbiology China*, 2017, 44(1): 238-244 (in Chinese)
贾红岩, 王亚涛, 张芝华, 等. 高效液相色谱法测定不同产地及品种灵芝三萜类成分的含量 [J]. *微生物学通报*, 2017, 44(1): 238-244
- [4] Li NS, Yan CY, Hua DH, et al. Isolation, purification, and structural characterization of a novel polysaccharide from *Ganoderma capense* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 57: 285-290
- [5] Lei LS, Lin ZB. Effect of *Ganoderma* polysaccharides on T cell subpopulations and production of interleukin 2 in mixed lymphocyte response [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1992, 27(5): 331-335
- [6] Zhang QH, Lin ZB. Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides B on TNF α and IFN γ production and their mRNA expression [J]. *Journal of Beijing Medical University*, 1999, 31(2): 179-183 (in Chinese)
张群豪, 林志彬. 灵芝多糖(GL-B)对肿瘤坏死因子 α 和 γ 干扰素产生及其 mRNA 表达的影响 [J]. *北京医科大学学报*, 1999, 31(2): 179-183
- [7] Zhao S, Jiang LH, Wang JP, et al. Neuroprotective effect of exogenous GM1 combined with ganoderma triterpenein on the brain damage caused by epilepsy [J]. *Modern Preventive Medicine*, 2017, 44(4): 701-705 (in Chinese)
赵爽, 蒋利和, 王居平, 等. 外源性神经节苷脂联合灵芝三萜化合物对癫痫脑损伤神经保护作用 [J]. *现代预防医学*, 2017, 44(4): 701-705
- [8] Huang YJ, Xiao GL. The progress of pharmacology on ganoderma triterpene [J]. *Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2008, 14(9): 87-88,97 (in Chinese)
黄艳娟, 肖桂林. 灵芝三萜药理学作用研究进展 [J]. *中医药导报*, 2008, 14(9): 87-88,97
- [9] Xu JW, Zhao W, Zhong JJ. Biotechnological production and application of ganoderic acids [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(2): 457-466
- [10] Lin ZB. *Modern Research of Ganoderma Lucidum* [M]. 3rd ed. Beijing: Medical Publishing House of Peking University, 2007: 199-244 (in Chinese)
林志彬. 灵芝的现代研究 [M]. 3 版. 北京: 北京大学医学出版社, 2007: 199-244
- [11] Cao Y, Wu SH, Dai YC. Species clarification of the prize medicinal *Ganoderma* mushroom "Lingzhi" [J]. *Fungal Diversity*, 2012, 56(1): 49-62
- [12] Cao Y, Yuan HS. *Ganoderma mutabile* sp. nov. from southwestern China based on morphological and molecular data [J]. *Mycological Progress*, 2013, 12(1): 121-126
- [13] Dai YC, Cao Y, Zhou LW, et al. Notes on the nomenclature of the most widely cultivated *Ganoderma* species in China [J]. *Mycosystema*, 2013, 32(6): 947-952 (in Chinese)
戴玉成, 曹云, 周丽伟, 等. 中国灵芝学名之管见 [J]. *菌物学报*, 2013, 32(6): 947-952
- [14] Li Z, Chen J, Wang M, et al. Parts of physical and chemical properties of the polysaccharides from *Catathelasma ventricosum* (Pk.) Sing. *Armillaria ventricosa* Peck and their inhibitory effect on S-180 tumor [J]. *Microbiology China*, 2013, 40(12): 2272-2279 (in Chinese)
李张, 陈洁, 汪森, 等. 梭柄松苞菇多糖组分的部分理化性质及对 S-180 瘤抑制活性研究 [J]. *微生物学通报*, 2013, 40(12): 2272-2279
- [15] Luo Q, Yan L, Wu LS, et al. Monosaccharide compositions and antioxidant activity of water-soluble polysaccharide isolated from *Tuber indicum* [J]. *Food Science*, 2010, 31(23): 51-56 (in Chinese)
罗强, 颜亮, 吴俐莎, 等. 印度块菌水溶性多糖的单糖组成与抗氧化活性研究 [J]. *食品科学*, 2010, 31(23): 51-56
- [16] Ma YH, Zheng L, Yang JH, et al. Analysis on monosaccharide composition of fungal polysaccharides by HPLC with pre-column derivatization [J]. *Food Science and Technology*, 2012, 37(1): 254-259,263 (in Chinese)
马耀宏, 郑岚, 杨俊慧, 等. 柱前衍生化 HPLC 法分析真菌多糖的单糖组成 [J]. *食品科技*, 2012, 37(1): 254-259,263
- [17] Huang JH, Aisikaer A, Mao J. Purification and structural identification of a bioactive polysaccharide fraction from *Ganoderma lucidum* [J]. *Food Science*, 2011, 32(12): 301-304 (in Chinese)
黄静涵, 艾斯卡·艾拉提, 毛健. 灵芝多糖的分离纯化及结构鉴定 [J]. *食品科学*, 2011, 32(12): 301-304
- [18] Zheng J, Han HY, Chang NT, et al. Purification and

为 400 $\mu\text{g/mL}$ 的灵芝孢子粉多糖对腹腔巨噬细胞产生 TNF- α 的促进率为 50%，本实验中 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 GLP 就可以达到 50% 的促进率，说明人工栽培的灵芝对于腹腔巨噬细胞产生 TNF- α 的促进作用较强^[28]。IL-1 β 和 IL-6 是由活化的巨噬细胞所产生，在刺激参与免疫反应的细胞增殖、分化并提高其功能中起重要作用。实验表明，GLP 能显著促进 RAW 264.7 细胞的细胞因子分泌，对巨噬细胞具有免疫调节活性。相关研究证实，激活巨噬细胞是先天和适应性免疫防御病原体的一个关键事件，因此，后续实验应集中于介导巨噬细胞激活的一系列信号转导途径展开研究，以探索精细的作用通路。

REFERENCES

- [1] Meng LZ, Xie J, Lv GP, et al. A comparative study on immunomodulatory activity of polysaccharides from two official species of *Ganoderma* (*Lingzhi*) [J]. *Nutrition and Cancer*, 2014, 66(7): 1124-1131
- [2] Gowrie SU, Chathurdevi G, Rani K. Evaluation of bioactive potential of basidiocarp extracts of *Ganoderma lucidum* [J]. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*, 2014, 3(1): 36-46
- [3] Jia HY, Wang YT, Zhang ZH, et al. Determination of triterpenoids in *Ganoderma lingzhi* from different areas and species by HPLC [J]. *Microbiology China*, 2017, 44(1): 238-244 (in Chinese)
贾红岩, 王亚涛, 张芝华, 等. 高效液相色谱法测定不同产地及品种灵芝三萜类成分的含量 [J]. *微生物学通报*, 2017, 44(1): 238-244
- [4] Li NS, Yan CY, Hua DH, et al. Isolation, purification, and structural characterization of a novel polysaccharide from *Ganoderma capense* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 57: 285-290
- [5] Lei LS, Lin ZB. Effect of *Ganoderma* polysaccharides on T cell subpopulations and production of interleukin 2 in mixed lymphocyte response [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1992, 27(5): 331-335
- [6] Zhang QH, Lin ZB. Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides B on TNF α and IFN γ production and their mRNA expression [J]. *Journal of Beijing Medical University*, 1999, 31(2): 179-183 (in Chinese)
张群豪, 林志彬. 灵芝多糖(GL-B)对肿瘤坏死因子 α 和 γ 干扰素产生及其 mRNA 表达的影响 [J]. *北京医科大学学报*, 1999, 31(2): 179-183
- [7] Zhao S, Jiang LH, Wang JP, et al. Neuroprotective effect of exogenous GMI combined with ganoderma triterpenein on the brain damage caused by epilepsy [J]. *Modern Preventive Medicine*, 2017, 44(4): 701-705 (in Chinese)
赵爽, 蒋利和, 王居平, 等. 外源性神经节苷脂联合灵芝三萜化合物对癫痫脑损伤神经保护作用 [J]. *现代预防医学*, 2017, 44(4): 701-705
- [8] Huang YJ, Xiao GL. The progress of pharmacology on ganoderma triterpene [J]. *Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2008, 14(9): 87-88,97 (in Chinese)
黄艳娟, 肖桂林. 灵芝三萜药理学作用研究进展 [J]. *中医药导报*, 2008, 14(9): 87-88,97
- [9] Xu JW, Zhao W, Zhong JJ. Biotechnological production and application of ganoderic acids [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(2): 457-466
- [10] Lin ZB. *Modern Research of Ganoderma Lucidum* [M]. 3rd ed. Beijing: Medical Publishing House of Peking University, 2007: 199-244 (in Chinese)
林志彬. 灵芝的现代研究 [M]. 3 版. 北京: 北京大学医学出版社, 2007: 199-244
- [11] Cao Y, Wu SH, Dai YC. Species clarification of the prize medicinal *Ganoderma* mushroom "Lingzhi" [J]. *Fungal Diversity*, 2012, 56(1): 49-62
- [12] Cao Y, Yuan HS. *Ganoderma mutabile* sp. nov. from southwestern China based on morphological and molecular data [J]. *Mycological Progress*, 2013, 12(1): 121-126
- [13] Dai YC, Cao Y, Zhou LW, et al. Notes on the nomenclature of the most widely cultivated *Ganoderma* species in China [J]. *Mycosystema*, 2013, 32(6): 947-952 (in Chinese)
戴玉成, 曹云, 周丽伟, 等. 中国灵芝学名之管见 [J]. *菌物学报*, 2013, 32(6): 947-952
- [14] Li Z, Chen J, Wang M, et al. Parts of physical and chemical properties of the polysaccharides from *Catathelasma ventricosum* (Pk.) Sing. *Armillaria ventricosa* Peck and their inhibitory effect on S-180 tumor [J]. *Microbiology China*, 2013, 40(12): 2272-2279 (in Chinese)
李张, 陈洁, 汪森, 等. 梭柄松苞菇多糖组分的部分理化性质及对 S-180 瘤抑制活性研究 [J]. *微生物学通报*, 2013, 40(12): 2272-2279
- [15] Luo Q, Yan L, Wu LS, et al. Monosaccharide compositions and antioxidant activity of water-soluble polysaccharide isolated from *Tuber indicum* [J]. *Food Science*, 2010, 31(23): 51-56 (in Chinese)
罗强, 颜亮, 吴俐莎, 等. 印度块菌水溶性多糖的单糖组成与抗氧化活性研究 [J]. *食品科学*, 2010, 31(23): 51-56
- [16] Ma YH, Zheng L, Yang JH, et al. Analysis on monosaccharide composition of fungal polysaccharides by HPLC with pre-column derivatization [J]. *Food Science and Technology*, 2012, 37(1): 254-259,263 (in Chinese)
马耀宏, 郑岚, 杨俊慧, 等. 柱前衍生化 HPLC 法分析真菌多糖的单糖组成 [J]. *食品科技*, 2012, 37(1): 254-259,263
- [17] Huang JH, Aisikaer A, Mao J. Purification and structural identification of a bioactive polysaccharide fraction from *Ganoderma lucidum* [J]. *Food Science*, 2011, 32(12): 301-304 (in Chinese)
黄静涵, 艾斯卡·艾拉提, 毛健. 灵芝多糖的分离纯化及结构鉴定 [J]. *食品科学*, 2011, 32(12): 301-304
- [18] Zheng J, Han HY, Chang NT, et al. Purification and