

# 高纯度碱提灰树花发酵菌丝体 $\beta$ -葡聚糖的免疫活性研究

王宝琴<sup>1</sup>, 徐泽平<sup>2</sup>, 杨传伦<sup>2</sup>

(1 滨州学院 生命科学系, 滨州市食品安全重点实验室, 山东 滨州 256600;

2 山东京博控股股份有限公司技术中心, 山东 滨州 256500)

【摘 要】 【目的】探讨高纯度碱提灰树花菌株 GF-932 发酵菌丝体  $\beta$ -葡聚糖的免疫活性, 以期为灰树花菌的开发利用提供依据。【方法】以碱提、酶解的方法, 从灰树花菌株 GF-932 发酵菌丝体中提取  $\beta$ -葡聚糖, 经过超滤和 Q Sepharose FF 凝胶柱层析纯化冻干得高纯度  $\beta$ -葡聚糖, 采用分子排阻法测定该  $\beta$ -葡聚糖的相对分子质量和分子质量分布宽度, 以 HPLC 法测定其  $\beta$ -葡聚糖含量; 根据人体口服推荐剂量每 kg 体质量 2.5 mg/d, 分别设低剂量组(12.5 mg/d)、中剂量组(25.0 mg/d)、高剂量组(75.0 mg/d), 对 SPF 小鼠连续经口灌胃纯化的  $\beta$ -葡聚糖 30 d, 以灌胃灭菌蒸馏水作对照, 通过迟发型变态反应、碳粒廓清和抗体生成细胞检测试验, 观测灰树花  $\beta$ -葡聚糖对 SPF 小鼠吞噬细胞的足跖肿胀度、吞噬指数、溶血空斑数及小鼠体质量和脏器指数的影响。【结果】每 100 g 灰树花菌丝体中可得 0.89 g  $\beta$ -葡聚糖纯品, 其相对分子质量为 136.43 ku, 分子质量分布宽度为 1.64。经口给予 SPF 小鼠不同剂量的灰树花  $\beta$ -葡聚糖 30 d 后, 与对照组相比, 各组动物体质量均呈增长状态, 但差异不显著( $P>0.05$ )。高纯度碱提灰树花  $\beta$ -葡聚糖能提高 SPF 小鼠吞噬细胞的足跖肿胀度、吞噬指数、抗体生成细胞数和脏器指数, 即能增强小鼠吞噬细胞的吞噬功能及细胞、体液和免疫器官的免疫功能。【结论】高纯度碱提灰树花  $\beta$ -葡聚糖能显著提高小鼠的细胞吞噬功能及特异性免疫和非特异性免疫功能。

【关键词】 灰树花; 菌丝体;  $\beta$ -葡聚糖; 免疫活性

【中图分类号】 S567.3<sup>+</sup>90.99; R979.5

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)07-0141-06

## Study on immunology activities of high purified $\beta$ -glucan alkali extracted from fermented mycelia of *Grifola frondosa*

WANG Bao-qin<sup>1</sup>, XU Ze-ping<sup>2</sup>, YANG Chuan-lun<sup>2</sup>

(1 Department of Life Science, Binzhou University, Key Laboratory for Food Safety of Binzhou, Binzhou, Shandong 256600, China;

2 Shandong Chembroad Holding Co., Ltd, Binzhou, Shandong 256500, China)

**Abstract:** 【Objective】The immunology activities of highly purified  $\beta$ -glucan extracted with alkali from fermented mycelia of *Grifola frondosa* strain GF-932 were tested. 【Method】The mycelia of *G. frondosa* was extracted with alkali and the crude polysaccharides were hydrolyzed with enzyme. Through the ultrafiltration, Sepharose column chromatography and lyophilization, the highly purified  $\beta$ -glucan was obtained. Size exclusion chromatography, liquid chromatography and software were used to determine and calculate relative molecular weight (RMW) and molecular weight distribution width of the  $\beta$ -glucan from mycelium, and the HPLC to assay the content of glucan. According to the recommended dose 2.5 mg/d of body mass (kg) per day in human, the *G. frondosa*  $\beta$ -glucan was formulated as a solution with sterile distilled water

\* 【收稿日期】 2010-11-29

【基金项目】 国家重点新产品计划项目(2007GRC60031); 山东省自然科学基金项目(ZR2009DL002); 山东省高等学校科技计划项目(J09LC55)

【作者简介】 王宝琴(1970—), 女, 青海贵德人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事生物活性物质研究。

E-mail: wangbaoqin1999@126.com

and administered to Specific Pathogen Free (SPF) mice at low-dose group (12.5 mg/d), middle-dose group (25.0 mg/d), high-dose group (75.0 mg/d) by gavage for 30 days. Control animals received equal volumes of sterile distilled water via the same administration. The influences of the  $\beta$ -glucan on the phagocytic indices phagocyte, the degree of paw swelling and the hemolysis plaque numbers by the test of clearance rate of carbon particles, delayed hypersensitivity test, and the antibody-producing cells assay was carried out respectively. The body mass and viscera index of mice was also measured. 【Result】 The RMW and molecular weight distribution width of the high purified  $\beta$ -glucan was 136.43 ku and 1.64 respectively. Gavigated at different doses of  $\beta$ -glucan for 30 days, the body mass of mice in every group increased, but there were no differences ( $P > 0.05$ ) between any of the treatment groups and the control. The highly purified alkali extracted  $\beta$ -glucan from *G. frondosa* can enhance the phagocytic indices of phagocyte, the degree of paw swelling and the hemolysis plaque numbers of mice, and increase the viscera index in mice. This indicates that the  $\beta$ -glucan has the function of raising the phagocytic ability of phagocyte, the function of cellular immunity and humoral immunity, and increasing the immunologic function of immune organ. 【Conclusion】 The highly purified alkali extracted *G. frondosa*  $\beta$ -glucan can enhance evidently the immunocompetence of mice, including the phagocytic ability of phagocyte, the functions of the specific immunity and the non-specific immunity.

**Key words:** *Grifola frondosa*; fermented mycelium;  $\beta$ -glucan; immunocompetence

药食两用真菌具有多种生物活性,其中最重要的是免疫调节和抑制肿瘤活性<sup>[1-2]</sup>。药食两用真菌的主要活性成分为多糖类物质,其中  $\beta$ -葡聚糖是多糖成分中发挥免疫调节作用和抗肿瘤活性的物质<sup>[3-4]</sup>。多糖抗肿瘤活性的基础是通过机体免疫系统对外来免疫活性物质产生免疫应答反应,间接地对肿瘤产生抑制作用,即通过免疫系统的一系列反应使肿瘤生长受到抑制<sup>[5]</sup>。

灰树花(*Grifola frondosa*)为担子菌亚门多孔菌属真菌,是我国部分地区的习用食用菌,有长期食用历史且未发现有毒害作用。自日本学者 Ohno 等<sup>[6]</sup>报道灰树花多糖具有抗肿瘤活性以来,关于灰树花多糖生物活性的研究日渐增多,特别是对灰树花多糖的免疫调节和抑制肿瘤的作用机理及其临床应用的研究甚为活跃。研究证明,灰树花多糖有显著的抗肿瘤<sup>[7]</sup>、抗动脉粥样硬化<sup>[8]</sup>、抗肝炎、抗病毒<sup>[9]</sup>及改善免疫系统功能等作用<sup>[10-11]</sup>。美国食品与药物管理局(FDA)将灰树花多糖作为癌症的有效抑制剂,直接用于Ⅱ期临床试验<sup>[12]</sup>。已报道的有关灰树花多糖免疫调节活性的研究,多以粗多糖(*Grifola frondosa* Polysaccharides, GFP)<sup>[13-14]</sup>或以热水提取的子实体多糖经柱层析纯化后的水提多糖为试材<sup>[15]</sup>。本研究以灰树花菌株 GF-932 的发酵菌丝体为原料,经热碱提取、酶解、超滤、层析纯化制备高纯度的  $\beta$ -葡聚糖,按照《中华人民共和国药典》<sup>[16]</sup>和国家卫生部《保健食品检验与评价技术规范》<sup>[17]</sup>中的

相关方法和要求,确定该  $\beta$ -葡聚糖的相对分子质量和相对分子质量分布宽度,对其免疫增强作用进行检测,评价其免疫活性,以期为灰树花菌的开发利用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试材与试剂 灰树花菌株 GF-932,由灰树花  $\beta$ -葡聚糖研究课题组从野生环境中的天然菌株中分离筛选及长期驯化后得到,经中国科学院微生物研究所鉴定为灰树花 *Grifola frondosa* (Dicks ex Fr.) S F Gray,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为 CGMCC No. 1709<sup>[18]</sup>。 $\beta$ -葡聚糖是由该菌株的液体发酵菌丝体提取并纯化,经 HPLC 法测定其  $\beta$ -葡聚糖含量为 96.8%(批号 200809312),由山东仁和生物有限公司提供。Hank's 液、SA 缓冲液、琼脂糖、印度墨汁、RPMI 1640 培养液等为市购;中性蛋白酶购自宁夏和氏璧生物技术有限公司。Q Sepharose FF 凝胶为美国 GE 公司产品。NaOH、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 为分析纯。系列葡聚糖标准(Shodex STANDARD P-82 标准品,相对分子质量分别为 5.9, 11.8, 22.8, 47.3, 112.0, 212.0, 404.0 ku)。

1.1.2 试验动物 SPF 级健康雌性昆明种小白鼠,体质量 18~22 g,生产许可证号:SCXK(京)2004-0001,由中国医学科学院实验动物研究所提供;饲养

环境屏障级,实验动物使用许可证号:SYXK(鲁)2003-0006;实验动物标准饲料由山东省实验动物中心提供,许可证号:SCXK(鲁)2004-0014。

1.1.3 仪器与设备 1700 型紫外可见分光光度计,苏州岛津公司;FA2004 电子天平,上海分析天平厂;E0531 型数显游标卡尺(精密度 0.1 mm),上海航利实业有限公司;HHCP-CRW 型  $\text{CO}_2$  培养箱,配有红外线  $\text{CO}_2$  传感器,南京莱步科技实业有限公司;TGL-18000-CR 高速冷冻离心机,上海安亭科学仪器厂;HH-S6 数显恒温水浴锅,江苏金坛医疗仪器厂。另外还有美国 Agilent 的 1100 型高压液相色谱仪、G1362A 型示差折光检测器、Agilent 公司的 GPC 软件。

## 1.2 灰树花 $\beta$ -葡聚糖的提取纯化

将灰树花发酵菌丝体用体积分数 80% 乙醇浸提脱脂过夜,对脱脂后的固、液混合物,用 30 倍体积的热水提取去除高分子杂多糖,低温冷 NaOH 提取去除低分子葡聚糖,再经热 NaOH 提取,提取液经酸中和,5 000 r/min 离心 20 min,去除酸性多糖,上清液用蛋白酶水解,超滤膜超滤脱盐并浓缩,冷冻干燥,得灰树花  $\beta$ -葡聚糖;灰树花  $\beta$ -葡聚糖用去离子水复溶,Q Sepharose FF 凝胶柱层析,冷冻干燥,得灰树花  $\beta$ -葡聚糖纯品。

## 1.3 灰树花 $\beta$ -葡聚糖相对分子质量、分子质量分布宽度的测定

以分子排阻法测定灰树花  $\beta$ -葡聚糖的相对分子质量和分子质量分布宽度<sup>[16,19]</sup>。

## 1.4 免疫调节活性的测定<sup>[17]</sup>

灰树花  $\beta$ -葡聚糖的人体口服推荐剂量为每 kg 体质量 2.5 mg/d,分别以推荐剂量的 5,10 和 30 倍作为小鼠的试验剂量,即设低剂量组(剂量为 12.5 mg/d)、中剂量组(剂量为 25.0 mg/d)和高剂量组(剂量为 75.0 mg/d),用灭菌蒸馏水配制后经口灌胃,并以蒸馏水处理作为空白对照。每组 12 只小鼠。连续经口灌胃 30 d,在试验期间的第 10,20,30 天,称量每只小鼠的体质量,观察体质量变化情况;连续经口灌胃 30 d 后,通过以下试验测定灰树花  $\beta$ -葡聚糖对小鼠免疫活性的影响。

1.4.1 迟发型变态反应(DHT) 绵羊红细胞(SRBC)的制备:绵羊颈静脉取血,将羊血放入装有玻璃珠的灭菌锥形瓶中,朝一个方向摇动以脱除纤维,4℃冰箱保存备用(2 周内使用)。

经小鼠静脉注射体积分数 2% SRBC,每鼠 0.2 mL(约 1 亿个 SRBC),免疫后 4 d,测量左后足跖厚

度;在测量部位皮下注射体积分数 20% SRBC,每鼠 0.02 mL(约 1 亿个 SRBC)。于注射后 24 h 测量左后足跖厚度;同一部位测量 3 次,取平均值。以攻击前、后的足跖厚度差值(足跖肿胀度)表示 DHT 的程度。

1.4.2 小鼠碳粒廓清试验 将印度墨汁原液用灭菌生理盐水按体积比 1:3 稀释,制成注射用墨汁。取 0.1 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,加灭菌蒸馏水至 100 mL,配制  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液。

从小鼠尾静脉注入稀释的印度墨汁(100 mL/kg),立即计时;注入 2 和 10 min 后,分别从内眦静脉丛取血 20  $\mu\text{L}$ ,加入到 2 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液中,用紫外可见分光光度计于 600 nm 波长处测光密度(OD),以  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液作空白对照。处死小鼠,取肝脏、脾脏,用滤纸吸干表面血污,分别称质量。以吞噬指数表示小鼠碳粒廓清的能力。吞噬指数  $a$  按下式计算:

$$a = \frac{\text{体质量}}{\text{肝脏质量} + \text{脾脏质量}} \times \sqrt[3]{K},$$
$$K = \frac{\lg OD_1 - \lg OD_2}{t_2 - t_1}。$$

式中: $K$  为廓清指数, $OD_1$ 、 $OD_2$  分别为  $t_1$ 、 $t_2$  时的光密度, $t_1$  为给墨汁后第 1 次取血的时间, $t_2$  为给墨汁后第 2 次取血的时间。

1.4.3 小鼠脏器/体质量值 经小鼠腹腔注射体积分数 2% SRBC 5 d 后,脱颈椎处死,取胸腺、脾脏,用滤纸吸干表面血污,分别称质量,计算胸腺、脾脏质量(g)与体质量(100 g)的比值(脏器/体质量)。同时制备脾细胞悬液,进行抗体生成细胞测定。

1.4.4 抗体生成细胞检测 通过溶血空斑形成细胞试验(FPC)进行检测。

补体制备:采集 5 只以上豚鼠的混合血液,分离血清,将 1 mL 压积 SRBC 加入到 5 mL 豚鼠血清中,4℃冰箱中放置 30 min,期间振荡 5 次,然后再 1 000 r/min 离心 10 min,取上清液分装,-70℃保存,使用时按补体与 SA 缓冲液 1:10 的体积比稀释。

玻片涂膜:在清洁玻片上刷一层琼脂糖(0.5 g 琼脂糖加双蒸水至 100 mL,加热熔解),干燥备用。

免疫动物:取脱纤维羊血,灭菌生理盐水离心洗涤 3 次,2 000 r/min,离心 10 min,计数细胞,将压积 SRBC 配制成体积分数 2% 的细胞悬液,每鼠腹腔注射 0.2 mL。

脾细胞悬液的制备:将用 SRBC 免疫 5 d 的小

鼠脱颈椎处死,取脾,在盛有 Hank's 液的平皿中研碎成脾细胞悬液,经 0. 075  $\mu\text{m}$  筛网过滤,1 000 r/min离心 10 min,用 Hank's 液洗 2 次,将细胞悬浮在 5 mL RPMI 1640 培养液中,计数细胞,并将细胞浓度调整至  $5\times 10^6$  个/mL。溶血空斑测定参照文献[17]的方法进行。

### 1.5 数据分析

试验数据采用 Excel 和 SPSS 软件进行均数标准差的计算和方差分析,数据以“均数 $\pm$ 标准差”( $\bar{x}\pm s$ )的形式表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 灰树花 $\beta$ -葡聚糖的提取与纯化

以灰树花发酵菌丝体为原料,经脱脂、水提、碱

提、酶解、超滤、柱层析等过程,每 100 g 菌丝体得灰树花  $\beta$ -葡聚糖纯品 0. 89 g。

### 2.2 灰树花 $\beta$ -葡聚糖相对分子质量与分子质量分布宽度的测定

经用分子排阻法测定,灰树花  $\beta$ -葡聚糖的相对分子质量为 136. 43 ku,相对分子质量分布宽度为 1. 64。

### 2.3 灰树花 $\beta$ -葡聚糖的免疫调节活性

2.3.1 迟发型变态反应(DHT) SRBC 刺激 T 淋巴细胞增殖成致敏淋巴细胞,4 d 后,再以 SRBC 攻击时,攻击部位出现肿胀,其肿胀程度反映了迟发型变态反应的程度。灰树花  $\beta$ -葡聚糖对小鼠 DHT 的影响结果见表 1。

表 1 灰树花  $\beta$ -葡聚糖的免疫调节活性( $n=12$ )

Table 1 Immunology activities of  $\beta$ -glucan from *G. frondosa*

| 处理<br>Treatment        | 足跖肿胀度/mm<br>Degree of paw swelling | 吞噬指数<br>Phagocytic index | 脾脏/体质量<br>Spleen index | 胸腺/体质量<br>Thymus index |
|------------------------|------------------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|
| 对照组 Control group      | 0. 23 $\pm$ 0. 11                  | 4. 60 $\pm$ 0. 62        | 0. 65 $\pm$ 0. 15      | 0. 26 $\pm$ 0. 05      |
| 低剂量组 Low-dose group    | 0. 35 $\pm$ 0. 15 *                | 5. 40 $\pm$ 0. 11 *      | 0. 64 $\pm$ 0. 10      | 0. 27 $\pm$ 0. 06      |
| 中剂量组 Middle-dose group | 0. 32 $\pm$ 0. 09 *                | 5. 40 $\pm$ 0. 73 **     | 0. 65 $\pm$ 0. 13      | 0. 29 $\pm$ 0. 06      |
| 高剂量组 High-dose group   | 0. 34 $\pm$ 0. 07 *                | 6. 30 $\pm$ 0. 11 **     | 0. 70 $\pm$ 0. 11      | 0. 31 $\pm$ 0. 04 **   |

注: \* 表示与对照组相比差异显著( $P<0. 05$ ); \*\* 表示与对照组相比差异极显著( $P<0. 01$ )。下表同。

Note: \* means premedication difference compared with control group ( $P<0. 05$ ); \*\* indicates significant difference compared with control group( $P<0. 01$ ). The same as follow.

由表 1 可见,经口给予小鼠不同剂量的灰树花  $\beta$ -葡聚糖 30 d 后,3 个剂量组均能提高小鼠的迟发型变态反应,与对照组相比均有显著差异( $P<0. 05$ ),低、中和高剂量组的足跖肿胀度与对照组相比分别提高了 52. 17%,39. 13%和 47. 83%。

2.3.2 小鼠碳粒廓清试验 由表 1 可知,经口给予小鼠不同剂量的灰树花  $\beta$ -葡聚糖 30 d 后,3 个剂量组均能提高小鼠吞噬细胞的吞噬指数,与对照组相比,低剂量组有显著差异( $P<0. 05$ ),中、高剂量组有极显著差异( $P<0. 01$ )。

2.3.3 小鼠脏器/体质量值 灰树花  $\beta$ -葡聚糖对小鼠脏器/体质量值的影响结果见表 1。由表 1 可知,经口给予小鼠不同剂量的灰树花  $\beta$ -葡聚糖 30 d 后,仅高剂量组提高了小鼠脾脏/体质量值,但与对照组并无显著差异( $P>0. 05$ )。3 个剂量组均能提高小鼠胸腺/体质量值,但与对照组相比,低剂量组和中剂量组无显著差异( $P>0. 05$ ),而高剂量组有极显著差异( $P<0. 01$ ),较对照组提高了 19. 23%。

2.3.4 对小鼠体质量的影响 灰树花  $\beta$ -葡聚糖对小鼠体质量的影响结果见图 1 和表 2。图 1 表明,经口给予小鼠不同剂量的灰树花  $\beta$ -葡聚糖 30 d 后,

各组动物体质量均呈正常增长状态。由表 2 可知,与对照相比,低、中、高剂量对动物体质量的增加均无显著性差异( $P>0. 05$ )。

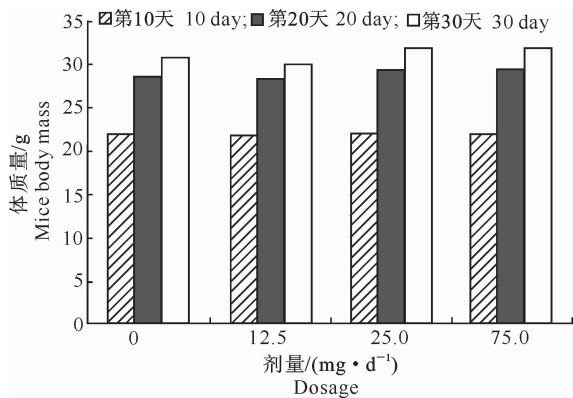


图 1 灰树花  $\beta$ -葡聚糖对小鼠体质量的影响

Fig. 1 Influences of  $\beta$ -glucan on body mass of mice

2.3.5 抗体生成细胞的检测 将经 SRBC 免疫的小鼠脾细胞悬液与一定量的 SRBC 混合,在补体参与下,使分泌抗体的脾细胞周围的 SRBC 溶解,形成肉眼可见的空斑,并以溶血空斑数反映抗体生成细胞数。由表 2 可知,经口给予小鼠不同剂量的灰树花  $\beta$ -葡聚糖 30 d 后,3 个剂量组均能提高溶血空斑

数,但与对照组相比,低、中剂量组无显著差异( $P>0.05$ ),高剂量组差异显著( $P<0.05$ ),较对照组提高了 57.73%。

表 2 灰树花 β-葡聚糖对小鼠体质量增长和  
抗体生成细胞的影响( $n=12$ )

Table 2 Influences of β-glucan on body mass and  
antibody-producing cells in mice

| 处理<br>Treatment        | 体质量增长/g<br>Live weight<br>gain | 溶血空斑数<br>(全脾×10 <sup>3</sup> )<br>Hemolysi spleaque<br>No. (total spleen) |
|------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| 对照组 Control group      | 9.0±2.7                        | 58.2±20.5                                                                 |
| 低剂量组 Low-dose group    | 8.2±1.1                        | 72.5±46.5                                                                 |
| 中剂量组 Middle-dose group | 10.0±1.1                       | 71.5±25.2                                                                 |
| 高剂量组 High-dose group   | 10.2±2.4                       | 91.8±36.2*                                                                |

3 讨 论

李小定等<sup>[15]</sup>报道,热水提取的灰树花子实体粗多糖和纯品多糖对小鼠均具有抑瘤(S180)和免疫调节作用。周昌艳等<sup>[20]</sup>采用体外免疫细胞培养法,发现稀碱提取的灰树花菌丝体多糖和子实体多糖均可显著提高小鼠淋巴细胞的转化增殖率,同时能够显著激活小鼠巨噬细胞并使之产生大量一氧化氮;而热水提取的灰树花子实体多糖与菌丝体多糖对小鼠巨噬细胞也有一定的激活作用,并可促使巨噬细胞生成一氧化氮,但其对小鼠淋巴细胞转化增殖率的提高作用并不显著。由此说明,灰树花菌丝体多糖与子实体多糖均具有免疫活性,但热水提取与热碱提取的多糖在免疫调节效果上有一定差异。

研究表明,多糖的生理活性与多糖的结构、分子质量、分子质量分布宽度等因素密切相关;采用不同的提取方法所获得的多糖,在结构、分子质量以及分支度等方面也有较大差异,从而导致其抗肿瘤及免疫增强等作用有较大差别<sup>[1]</sup>。因此,采用何种提取分离办法,直接影响着多糖药用价值的开发和利用。目前,对灰树花多糖的提取多采用水提或碱提、醇沉的工艺,但提取工序繁杂,提取的多糖粗品得率和含量较低。超滤是一种新型的膜分离技术,可利用不同的孔径截留不同分子质量物质,具有常温操作、无相态变化、可防止杂菌污染等优点。杨阳等<sup>[21]</sup>采用热水和稀碱提取灰树花子实体多糖后,分别利用乙醇沉淀法和超滤法获得了灰树花水溶性和碱溶性子实体多糖,并以小鼠脾淋巴细胞转化增殖试验,检测了不同提取和纯化方法所得多糖的免疫活性,结果发现,与传统的乙醇沉淀法相比,采用超滤法进行多糖的分级分离具有更显著的目标产物分离能力,且从水提多糖和碱提多糖中得到的多糖含量均较高。

本研究通过对灰树花发酵菌丝体多糖进行碱提、酶解、超滤、层析纯化,并按照《中华人民共和国药典》<sup>[16]</sup>的要求,确定了纯化 β-葡聚糖的含量、相对分子质量和相对分子质量宽度,克服了一般真菌多糖成分复杂,有效成分不清等缺陷,对于研究其免疫活性具有重要意义。前期的遗传毒性和毒理学研究证明,灰树花菌丝体 β-葡聚糖属实际无毒物质,无遗传毒性,对动物的生长发育无不良影响<sup>[22]</sup>。因此,高纯度的灰树花菌丝体 β-葡聚糖制剂具有更大的临床应用优势。

本研究按照国家卫生部《保健食品检验与评价技术规范》<sup>[17]</sup>,对从灰树花菌株 GF-932 发酵菌丝体中提取纯化的 β-葡聚糖进行了免疫调节活性分析。结果表明,分别经口给予小鼠 12.5、25.0 和 75.0 mg/d 剂量的灰树花 β-葡聚糖 30 d 后,3 个剂量组均能提高小鼠的迟发型变态反应和吞噬细胞的吞噬指数,且与对照组有显著( $P<0.05$ )或极显著差异( $P<0.01$ );3 个剂量组均能提高小鼠的胸腺/体质量值,但与对照组相比,低剂量组和中剂量组无显著差异( $P>0.05$ ),而高剂量组有极显著差异( $P<0.01$ )。30 d 试验期内,各组动物体质量均呈正常增长状态,与对照组相比,低、中、高剂量组免疫动物的体质量均无显著性差异( $P>0.05$ )。本研究所得灰树花 β-葡聚糖具有提高小鼠免疫功能的作用,但若探讨其免疫增强的机制,仍需研究该 β-葡聚糖对免疫因子,如 IL、IFN、TNF 等的影响<sup>[23]</sup>。

本研究结果表明,从灰树花菌株 GF-932 发酵菌丝体中提取的高纯度 β-葡聚糖,在提高小鼠细胞免疫、体液免疫和吞噬功能方面具有较理想的作用,既具有提高小鼠特异性免疫的功能,又具有提高小鼠非特异性免疫的功能。

[参考文献]

[1] Novak M, Vetvicka V. Beta-glucans, history, and the present: Immunomodulatory aspects and mechanisms of action [J]. J Immunotoxicology, 2008, 5(1): 47-57.

[2] Katarzyna S Z, Bozena M, Grazyna K. Biologically active compounds of fungi origin displaying antitumor activity [J]. Acta Poloniae Pharmaceutica, 2005, 62(2): 153-159.

[3] Chan G C F, Chan W K, Sze D M Y. The effects of β-glucan on human immune and cancer cells [J]. Journal of Hematology & Oncology, 2009, 2: 25.

[4] 陈春锋, 杨晓彤. 药用真菌 β-(1,3)-D-葡聚糖构效关系及检测方法研究进展 [J]. 微生物学通报, 2006, 33(5): 150-153.

Chen C F, Yang X T. Progresses in the studies of structure-activity correlation and detection methods of medicinal fungal β-

- (1,3)-D-glucans [J]. Microbiology, 2006, 33(5): 150-153. (in Chinese)
- [5] 张巍, 张昆, 邵明亮. 灰树花多糖抗肿瘤作用的免疫学研究 [J]. 中国实用医药, 2009, 4(7): 127.  
Zhang W, Zhang K, Shao M L. Study immunology of polysaccharide from *Grifola frondosa* on anti-tumor function [J]. China Practical Medicine, 2009, 4(7): 127. (in Chinese)
- [6] Ohno N, Adachi Y, Suzuki I, et al. Antitumor activity of a beta-1,3-glucan obtained from liquid cultured mycelium of *Grifola frondosa* [J]. J Pharmacobiodyn, 1986, 9(10): 861-864.
- [7] Kodama N, Mizuno S, Nanba H, et al. Potential antitumor activity of a low-molecular-weight protein fraction from *Grifola frondosa* through enhancement of cytokine production [J]. J Med Food, 2010, 13(1): 20-30.
- [8] Mori K, Kobayashi C, Tomita T, et al. Antiatherosclerotic effect of the edible mushrooms *Pleurotus eryngii* (Eringi), *Grifola frondosa* (Maitake), and *Hypsizygus marmoreus* (Bunashimeji) in apolipoprotein E-deficient mice [J]. Nutr Res, 2008, 28(5): 335-342.
- [9] Chen J, Seviour R. Medicinal importance of fungal beta-(1,3)/(1,6)-glucans [J]. Mycol Res, 2007, 111(6): 635-652.
- [10] Rajewska J, Balasińska B. Biologically active compounds of edible mushrooms and their beneficial impact on health [J]. Postepy Hig Med Dosw, 2004, 58: 352-357.
- [11] 卢兆双, 王光远, 赵晨, 等. 灰树花胞内多糖提取条件的优化及提取物的抑瘤作用 [J]. 食用菌学报, 2009, 16(1): 51-54.  
Lu Z S, Wang G Y, Zhao C, et al. Extracting condition optimizing of intracellular polysaccharide from *Grifola frondosa* and suppression of tumor role of the extract [J]. Acta Edulis Fungi, 2009, 12(1): 51-54. (in Chinese)
- [12] Deng G, Lin H, Seidman A, et al. A phase I / II trial of a polysaccharide extract from *Grifola frondosa* (Maitake mushroom) in breast cancer patients: Immunological effects [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135(9): 1215-1221.
- [13] Svagelj M, Berovic M, Boh B, et al. Solid-state cultivation of *Grifola frondosa* (Dicks; Fr) S F Gray biomass and immunostimulatory effects of fungal intra-and extracellular beta-polysaccharides [J]. N Biotechnol, 2008, 25(2/3): 150-156.
- [14] 李小定, 荣建华, 吴谋成, 等. 灰树花多糖的抗肿瘤活性及对免疫功能的影响 [J]. 中药材, 2003, 26(1): 31-32.  
Li X D, Rong J H, Wu M C, et al. Anti-tumor effect of polysaccharide from *Grifola frondosa* and its influence on immunological function [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2003, 26(1): 31-32. (in Chinese)
- [15] 李小定, 吴谋成, 曾晓波, 等. 灰树花多糖粗品与纯品的抗肿瘤作用和对免疫功能的影响 [J]. 营养学报, 2003, 25(1): 7-9.  
Li X D, Wu M C, Zeng X B, et al. Effects of crude and purified polysaccharide from *Grifola frondosa* on tumor growth and immune function in mice [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2003, 25(1): 7-9. (in Chinese)
- [16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典二部 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 附录 39.  
State Pharmacopoeia Commission. The People's Republic of China pharmacopoeia (The second part) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: Appendix 39. (in Chinese)
- [17] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范 [S]. 2003-02-14.  
Ministry of Health of the People's Republic of China. Technical standards for testing & assessment of health food [S]. 2003-02-14. (in Chinese)
- [18] 徐泽平, 王宝琴. 灰树花菌株、培养方法及其应用: 中国, ZL 200610043944. 2 [P]. 2008-11-12.  
Xu Z P, Wang B Q. The cultivation method and its application of *Grifola frondosa* strain GF-932: China, ZL 200610043944. 2 [P]. 2008-11-12. (in Chinese)
- [19] 杨海, 赵峡, 于广利, 等. 高效液相色谱法测定注射用灰树花倍他葡聚糖的含量及含量均匀度 [J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(2): 81-83.  
Yang H, Zhao X, Yu G L, et al. Content and content uniformity determination of *Grifola frondosa* beta-glucan for injection by HPLC [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2007, 28(2): 81-83. (in Chinese)
- [20] 周昌艳, 唐庆九, 贾薇, 等. 不同来源灰树花多糖免疫活性初探 [J]. 食用菌学报, 2004, 11(4): 13-17.  
Zhou C Y, Tang Q J, Jia W, et al. A preliminary study on the immunocompetence of different kinds of *Grifola frondosa* polysaccharide [J]. Acta Edulis Fungi, 2004, 11(4): 13-17. (in Chinese)
- [21] 杨阳, 刘承初, 贾薇, 等. 灰树花多糖的超滤分离及免疫活性研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(9): 277-280.  
Yang Y, Liu C C, Jia W, et al. Study on ultrafiltration separation and immunocompetence of polysaccharides from *Grifola frondosa* [J]. Food Science, 2008, 29(9): 277-280. (in Chinese)
- [22] 王宝琴, 徐泽平, 杨传伦. 灰树花菌丝体  $\beta$ -葡聚糖的毒理学实验 [J]. 食品科学, 2010, 31(17): 368-372.  
Wang B Q, Xu Z P, Yang C L. Toxicological evaluation of  $\beta$ -glucan from fermented mycelia of *Grifola frondosa* [J]. Food Science, 2010, 31(17): 368-372. (in Chinese)
- [23] Lee J S, Park S Y, Thapa D, et al. *Grifola frondosa* water extract alleviates intestinal inflammation by suppressing TNF- $\alpha$  production and its signaling [J]. Experimental and Molecular Medicine, 2010, 42(2): 143-154.