



血红柳钉菇多糖对RAW264.7巨噬细胞免疫调节作用研究

豆甲泰, 刘友昊, 梁启超, 吴宜艳

Immunoregulatory effect of polysaccharides derived from *chroogomphus rutilus* on macrophage cell line RAW264.7

DOU Jiatai, LIU Youhao, LIANG Qichao, WU Yiyao

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.1006-0111.202102005>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

中药防治新型冠状病毒肺炎概述

Prevention and treatment of COVID-19 with Traditional Chinese Medicine

药 学 实 践 杂 志. 2020, 38(3): 202-206, 210 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202003098

巨噬源性泡沫细胞中p62蛋白上调作用和机制的研究

A study on the role and mechanism of upregulated p62 protein in macrophage-derived foam cells

药 学 实 践 杂 志. 2019, 37(5): 400-405, 426 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.05.004

益母草碱抑制NLRP3炎症小体过度激活调控巨噬细胞M1/M2表型分化

Effect of leonurine on peritoneal macrophages M1/M2 phenotypic differentiation via inhibiting overactivation of NLRP3 inflammasome

药 学 实 践 杂 志. 2021, 39(2): 143-147 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202101003

黄芪甲苷抑制U937巨噬细胞CCL18表达及其作用机制研究

Research on the effect and mechanism of astragalus IV (AS-IV) on the expression of CCL18 in U937 macrophages

药 学 实 践 杂 志. 2019, 37(1): 32-36, 41 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.01.008

玉屏风多糖组分对皮肤角质形成细胞的作用研究

Study of the effect of polysaccharides from Yupingfeng on keratinocytes

药 学 实 践 杂 志. 2019, 37(1): 51-54 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.01.012

枸骨茎抗炎活性成分研究

Anti-inflammatory chemical constituents from the stem of *Ilex cornuta* Lindl. et Paxt

药 学 实 践 杂 志. 2018, 36(4): 358-361, 368 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.04.016



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 研究报告 ·

血红铆钉菇多糖对 RAW264.7 巨噬细胞免疫调节作用研究

豆甲泰^{1,2}, 刘友昊³, 梁启超¹, 吴宜艳¹ (1. 牡丹江医学院药理学系, 黑龙江 牡丹江 157011; 2. 陆军第78集团军医院, 牡丹江 157011; 3. 牡丹江医学院红旗医院, 牡丹江 157011)

[摘要] 目的 研究血红铆钉菇多糖对 RAW264.7 小鼠单核巨噬细胞的免疫调节作用。方法 将小鼠的巨噬细胞进行复苏培养, 制备细胞悬液, 设置空白对照组以及不同质量浓度的血红铆钉菇多糖(CRPS25-Ⅱ)组(1、20、40、80 和 160 $\mu\text{g/ml}$)。采用 MTT 法测定血红铆钉菇多糖对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的细胞毒性; 采用 RT-PCR 法检测血红铆钉菇多糖对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 分泌免疫调节因子 IL-6 和 TNF- α 的影响; 采用 Western-blot 法检测血红铆钉菇多糖对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的 NF- κB 信号通路中 p-P65 蛋白表达的影响。结果 实验证明血红铆钉菇多糖在 1~160 $\mu\text{g/ml}$ 的范围内没有明显的细胞毒性, CRPS25-Ⅱ 质量浓度在 1~160 $\mu\text{g/ml}$ 可提高细胞因子的分泌量, 从而促进细胞因子 IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 表达; CRPS25-Ⅱ 可促进 p-P65 蛋白的磷酸化, 激活 NF- κB 信号通路从而促进细胞的免疫调节作用, 1~160 $\mu\text{g/ml}$ 浓度范围内均可促进 p-P65 蛋白的增加, 1~40 $\mu\text{g/ml}$ 呈上升趋势, 40~160 $\mu\text{g/ml}$ 促进作用逐渐减弱。结论 血红铆钉菇多糖对小鼠巨噬细胞无毒性, 且可以促进炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的分泌以及激活 NF- κB 信号通路, 从而起到免疫调节作用。

[关键词] 血红铆钉菇多糖; 巨噬细胞; 免疫调节

[中图分类号] R967

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2021)05-0449-05

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202102005

Immunoregulatory effect of polysaccharides derived from *chroogomphus rutilus* on macrophage cell line RAW264.7

DOU Jiatai^{1,2}, LIU Youhao³, LIANG Qichao¹, WU Yiyan¹ (1. School of pharmacy, Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157011, China; 2. The 78th Group Army Hospital of the PLA, Mudanjiang 157011, China; 3. Hongqi Hospital of Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157011, China)

[Abstract] **Objective** To study the immunomodulatory effect of polysaccharides (CRPS25-Ⅱ) derived from *Chroogomphus rutilus* on mouse mononuclear macrophages, RAW264.7 cells. **Methods** RAW264.7 cells were resuspended and cultured, cell suspension was prepared. The blank control group and CRPS25-Ⅱ groups with different mass concentrations (1, 20, 40, 80 and 160 $\mu\text{g/ml}$) were set up. MTT assay was used to determine the cytotoxicity of CRPS25-Ⅱ on RAW264.7 cells. RT-PCR was used to detect the effects of CRPS25-Ⅱ on the secretion of immune regulatory factors IL-6 and TNF- α from RAW264.7 cells. Western blot was used to detect the effects of CRPS25-Ⅱ on the expression of p-P65 protein in NF- κB pathway of RAW264.7 cells. **Results** The results showed that CRPS25-Ⅱ (1–160 $\mu\text{g/ml}$) had no obvious cytotoxicity. CRPS25-Ⅱ (1–160 $\mu\text{g/ml}$) increased the secretion of cytokines, and thus promoted the mRNA expression of IL-6 and TNF- α . CRPS25-Ⅱ increased the phosphorylation of p-P65 protein and activated the NF- κB signaling pathway, and thus promoted the immune regulation of cells. CRPS25-Ⅱ (1–160 $\mu\text{g/ml}$) could increase the p-P65 protein, and the promoting effects of CRPS25-Ⅱ showed an upward trend in the concentration range of 1–40 $\mu\text{g/ml}$ and gradually weakened in the concentration range of 40–160 $\mu\text{g/ml}$. **Conclusion** Polysaccharides derived from *chroogomphus rutilus* had no cytotoxicity to mouse macrophages, and could promote the secretion of inflammatory factors IL-6 and TNF- α and activate the NF- κB signaling pathway, thus playing an immunomodulatory role.

[Key words] CRPS25-Ⅱ; RAW264.7 cells; immune regulation

血红铆钉菇 [*Chroogomphus rutilus* (Schaeff.) O.K. Mill.], 属担子菌亚门伞菌目铆钉菇科铆钉菇

属^[1]。菌体铆钉状且菌肉为酒红色, 故名血红铆钉菇。分布于中国北方及西南多省, 以及日本、欧洲及北美多国, 主要生于松林中地上的杂草丛林之间, 是一种与油松、樟子松、马尾松、赤松共生的外生菌根真菌, 群生、散生或单生, 营养价值极高, 深受人们喜爱^[2]。研究表明, 血红铆钉菇富含蛋白

[作者简介] 豆甲泰, 硕士生, 主管药师, 研究方向: 免疫药理学, Email: doujiatai@126.com

[通信作者] 吴宜艳, 硕士生导师, 教授, 研究方向: 免疫药理学, Email: wuyi6582222@163.com

质、多糖、黄酮、香豆素及甾醇^[3-8]等多种活性物质,具有极高的食用和药用价值。随着人民生活水平的提高和科学技术的不断进步,糖化学及其活性研究正在经历着飞速的发展,越来越多的动物多糖、植物多糖、真菌多糖被开发利用。多糖作为食用菌重要的活性成分,具有抗肿瘤、抗氧化、抗疲劳、免疫调节、神经保护、降血糖、降血脂^[9-13]等诸多药理作用。目前,各类真菌多糖的免疫调节作用研究已广泛开展^[14-23]。然而,迄今关于血红铆钉菇多糖开发的研究较少,对其免疫调节作用的研究报道亦少,本文探讨血红铆钉菇多糖对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的细胞毒性、免疫调节因子释放、NF- κ B 信号通路激活等一系列的免疫调节作用,以期对血红铆钉菇进一步的开发利用提供依据。

1 材料与仪器

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株

RAW264.7 细胞购自中国科学院上海细胞库,储藏于牡丹江医学院医药研究中心-80℃冰箱中,经复苏后,置于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中培养。

1.1.2 血红铆钉菇多糖

血红铆钉菇经 25% 乙醇沉淀后,通过 DEAE-52 纤维柱洗脱出多糖组分 CRPS25-II,实验室自制。

1.2 主要仪器

κ Z-II 匀浆仪(Servicebio); κ Z-II 酶标仪(Rayto);D3024R 台式高速冷冻型微量离心机、D1008E 台式高速冷冻离心机(DRAGONLAB);Stepone plus 荧光定量 PCR 仪(ABI);SW-CJ-1FD 超净工作台(苏净安泰);NanoDrop2000 超微量分光光度计(Thermo);G0203-150G 化学发光仪(CLINX);FBZ2001-up-p 标准试剂型纯水仪(青岛富勒姆科技有限公司)。

1.3 试剂及耗材

RNA 提取液(批号:G3013)、引物、RIPA 裂解液(批号:G2002)、PMSF(100mM,批号:G2008)、磷酸化蛋白酶抑制剂(批号:G2007)、 β -肌动蛋白(批号:GB12001)、GAPDH(批号:GB12002)、Histone H3(批号:GB11026)、HRP 标记山羊抗兔(批号:GB23303)、HRP 标记驴抗山羊(批号:GB23404)、HRP 标记山羊抗小鼠(批号:GB23301)、HRP 标记山羊抗大鼠(批号:GB23302)、转移缓冲液(批号:G2017)、电泳缓冲液(批号:G2018)、TBS 缓冲液(批号:G0001-2L)均购自 Servicebio 公司;三氯甲烷、异丙醇、无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 MTT 法检测血红铆钉菇多糖对淋巴细胞存活率的影响

收集对数期 RAW264.7 细胞,制成单细胞悬液,RAW264.7 细胞以 1×10^6 个细胞/孔接种于 96 孔板中,随后,置于恒温培养箱(37℃,5% CO₂)中培养 24 h(边缘孔用无菌 PBS 填充),培养完成后去除原有培养基,加入浓度梯度分别为 25、50、100、200、400 μ g/ml 的血红铆钉菇多糖溶液(各设置 6 个复孔)于恒温箱中培养 12 h。弃去孔内原有培养液,每孔加入配制好的 MTT 溶液 20 μ l,连续培养 4 h 后,弃去原有 MTT 溶液。每孔加入 150 μ l DMSO,于恒温箱中孵育 10 min 后,用锡纸包裹避光,操作轻盈防震,使结晶物充分溶解。孵育完成后,置于 490 nm 处测定吸光度(A)值。计算细胞增殖活力:细胞增殖活力=[(试验组 OD 均值-对照组 OD 均值)/对照组 OD 均值] \times 100%。实验表明血红铆钉菇多糖 CRPS25-II 在 25~400 μ g/ml 的范围内无明显的细胞毒性,见图 1。

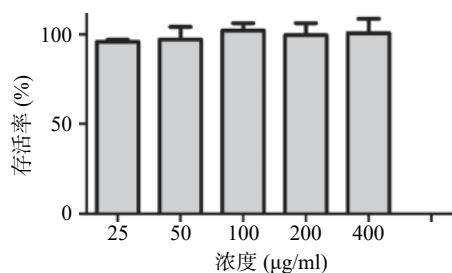


图 1 血红铆钉菇多糖对巨噬细胞毒性的影响

2.2 RT-PCR 方法测定血红铆钉菇多糖对 IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 表达水平的影响

2.2.1 总 RNA 抽提

收集对数期 RAW264.7 细胞,制成单细胞悬液,随后以每孔 1×10^6 个细胞接种于六孔培养板中,加入 1 ml 的 DMEM 完全培养基,并于恒温培养箱(37℃,5% CO₂)中培养 24 h。设置不同浓度梯度的血色铆钉菇多糖溶液 1、20、40、80、160 μ g/ml 及空白对照组,于恒温培养箱中孵育 12 h。弃去原培养基,PBS 清洗 2 次,加入 1 ml 的 Trizol 试剂(冰上操作)。12000 r/min 离心 10 min 取上清。加入 250 μ l 三氯甲烷,颠倒离心管 15 s,充分混匀,静置 3 min。4℃ 下 12000 r/min 离心 10 min。将上清转移到一新的离心管中,加入 0.8 倍体积的异丙醇,颠倒混匀。-20℃ 放置 15 min,4℃ 下 12000 r/min 离心 10 min,管底的白色沉淀即为 RNA。吸除液体,加入 75% 乙醇 1.5 ml 洗涤沉淀。4℃ 下 12000 r/min

离心 5 min。将液体吸除干净,将离心管置于超净台上吹 3 min。加入 15 μ l 无 RNA 酶的水溶解 RNA。55 $^{\circ}$ C 孵育 5 min。使用 Nanodrop 2000 检测 RNA 浓度及纯度:仪器空白调零后取 2.5 μ l 待测 RNA 溶液于检测基座上,放下样品臂,开始吸光值检测。将浓度过高的 RNA 进行适当比例的稀释,使其终浓度为 100 ~ 500 ng/ μ l。

2.2.2 反转录

取一 PCR 管,加入含 10 μ l RNA 的溶液。加入 0.5 μ l Oligo (dT)18 底物和 0.5 μ l 随机六聚体引物。用无核糖核酸酶的去离子水补足至 15 μ l。于 PCR 仪上 65 $^{\circ}$ C 保温 5 min,迅速置冰上冷却。依次加入 4 μ l \times 5 反应缓冲液,1 μ l RT 酶混合物,用移液器抽吸混匀。于 PCR 仪上 42 $^{\circ}$ C 保温 60 min,结束后 70 $^{\circ}$ C 保温 5 min 灭活反转录酶。

2.2.3 定量 PCR

①取 0.2 ml PCR 管,配制如下反应体系,每个反转录产物配制 3 管:2 \times 荧光定量 PCR 试剂 10 μ l; 2.5 μ mol/L 基因引物 2 μ l; 反转录产物 2 μ l; 双蒸水 6 μ l。

②PCR 扩增:预变性 95 $^{\circ}$ C, 10 min; 循环 (40 次)95 $^{\circ}$ C, 15 s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C, 60 s; 熔解曲线 60 $^{\circ}$ C \rightarrow 95 $^{\circ}$ C, 每 15 s 升温 0.3 $^{\circ}$ C

2.2.4 数据处理

使用 SPSS 25.0 统计软件进行单因素方差分析和 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。结果表明,血红铆钉菇多糖 CRPS25-II 在 1 ~ 160 μ g/ml 范围内对细胞炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 表达均有促进作用,其中在 40 μ g/ml 时达到峰值,80 ~ 160 μ g/ml 呈逐渐减弱的趋势,见图 2。

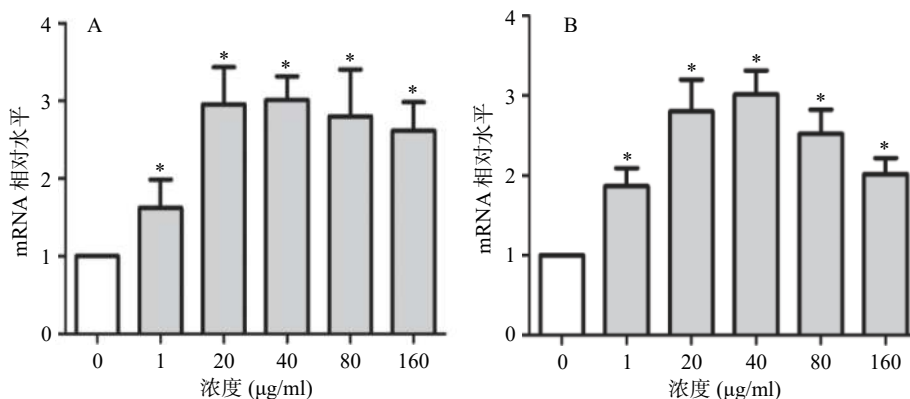


图 2 血红铆钉菇多糖对 RAW264.7 细胞炎症因子 IL-6 和 TNF- α mRNA 表达的影响

A. IL-6; B. TNF- α ; * $P < 0.05$, 与空白组比较

2.3 Western-blot 法检测血红铆钉菇多糖对 p-P65 蛋白表达量 (β -肌动蛋白作内参)的影响

2.3.1 细胞总蛋白提取

收集对数期 RAW264.7 细胞,制成单细胞悬液,随后以每孔 1×10^6 个细胞接种于六孔培养板中,加入 1 ml 的 DMEM 完全培养基,并于恒温培养箱 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2) 中培养 24 h。设置不同浓度梯度的血色铆钉菇多糖溶液 1、20、40、80、160 μ g/ml 及空白对照组,于恒温培养箱中孵育 12 h,用 PBS 冲洗细胞 2 ~ 3 次,最后一次清洗完成,倒掉 PBS,用移液器尽量吸干残留液体;加入适当体积的 RIPA 裂解液(使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂)于培养板/培养瓶内 3 ~ 5 min。期间反复晃动培养板/瓶,使试剂与细胞充分接触;用细胞刮刀将细胞刮下,转移到 1.5 ml 离心管中;冰上裂解 30 min,期间用移液器反复吹打,确保细胞完全裂解。12000 r/min, 4 $^{\circ}$ C, 离心 10 min,收集上清,即为总

蛋白溶液。

2.3.2 蛋白变性

将蛋白溶液按照 4 : 1 的比例加入 5 \times 还原型蛋白上样缓冲液,沸水浴变性 15 min,置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

2.3.3 SDS-PAGE 电泳转膜

清洗玻璃板;制胶与上样,放入制胶器,插入斜插板将玻璃板固定,检查底部是否对齐,避免漏胶;将分离胶灌到适当的高度,将纯水缓慢均匀加入到分离胶上层,直至加满。大约 30 min 后待分离胶凝固即可倒去分离胶上层水并用吸水纸将剩余水吸干;配制 5% 的浓缩胶,加入四甲基乙二胺后立即混合均匀,灌胶,开始电泳;电泳至溴酚蓝里最底部大约 1 cm 即可终止电泳,进行转膜。将转印完的膜放入装有 TBST 的孵育槽中,快速涮洗一次,然后加上脱脂牛奶,放置脱色摇床上,室温下封闭 30 min;按照抗体说明书,进行一抗稀释,配制好

后,倒掉孵育槽中的封闭液,加入配制好的一抗,4℃孵育摇床过夜;回收一抗,用TBST快速涮洗膜3次,然后加入TBST,放置脱色摇床上快速洗脱,每次5min,洗3次;将二抗用TBST按照1:5000的比例进行稀释,然后加入孵育槽中,放置摇床上慢摇,室温下孵育30min;用TBST快速涮洗膜3次,然后再加入TBST,放置脱色摇床上快速洗脱,每次5min,洗3次。

2.3.4 化学发光

在暗室中将ECL A液和ECL B液两种试剂在离心管中等体积混合,在曝光匣上贴双层PE手套或者其他透明薄膜,将聚偏二氟乙烯膜的蛋白面朝上放在曝光匣两层薄膜之间,加入混合好的ECL溶液充分反应,1~2min后,去尽残液,盖上层薄膜开始压胶片。压完的胶片用显影、定影试剂进行显影和定影。

2.3.5 图像分析和数据处理

胶片扫描存档,PhotoShop整理去色,Alpha软件处理系统分析目标带的光密度值,使用SPSS 25.0统计软件进行单因素方差分析和t检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。结果表明,血红铆钉菇多糖CRPS25-II在1~160 μg/ml范围内对细胞p-P65蛋白的表达有促进作用,其中在40 μg/ml时达到峰值,80~160 μg/ml呈逐渐减弱的趋势,见图3。

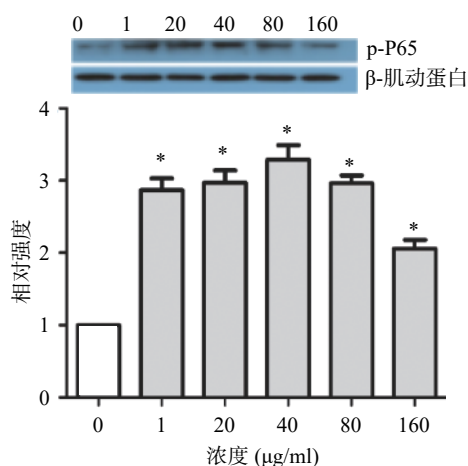


图3 血红铆钉菇多糖对RAW264.7细胞p-P65蛋白表达量的影响
* $P < 0.05$,与空白组比较

3 讨论

本文对血红铆钉菇多糖进行了研究,在实验室通过水提醇沉的方法制备出血红铆钉菇多糖,通过DEAE纤维素-52柱层析精制得到CRPS25-II,而后将CRPS25-II溶液按1~800 μg/ml浓度分别

加入细胞悬液中,按照6、12、24h进行培养,考察多糖浓度和孵育时间对巨噬细胞RAW264.7的影响,最终发现1~400 μg/ml浓度范围孵育12h细胞生长状态良好,适于实验研究。

人体的免疫系统调控着机体健康的平衡与稳定,巨噬细胞是人体天然免疫防线的重要一员,参与机体的非特异性防卫(先天性免疫)和特异性防卫(细胞免疫)。巨噬细胞可以呈递抗原、分泌细胞因子等生物活性物质,从而调控机体微环境,达到抗炎、抗肿瘤的作用,细胞因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。

本实验是以小鼠腹腔巨噬细胞为靶细胞,研究CRPS25-II体外的免疫调节活性,探讨CRPS25-II在体内发挥免疫调节活性的作用机制。通过MTT法检测了CRPS25-II对巨噬细胞RAW264.7的细胞毒性,数据表明多糖浓度在25~400 μg/ml范围内CRPS25-II不具有细胞毒性,说明该药物应用于临床的安全性较高,具备深入研究的意义。通过RT-PCR法证实CRPS25-II可显著促进腹腔巨噬细胞释放IL-6和TNF-α等细胞因子,通过增强细胞因子的活性,达到抗炎、抗肿瘤的目的。研究表明多糖浓度在1~160 μg/ml的范围内,CRPS25-II对IL-6和TNF-α释放具有显著促进作用,其中1~40 μg/ml浓度范围呈上升趋势,40~160 μg/ml范围内随着CRPS25-II的浓度的增加对IL-6和TNF-α释放的促进作用逐渐减弱。Western blot试验显示,CRPS25-II作用于RAW264.7细胞12h后,1~160 μg/ml浓度范围内血红铆钉菇多糖均可显著诱导RAW264.7细胞中p-P65蛋白的表达,从而激活NF-κB信号通路,达到免疫调节的作用。其中1~40 μg/ml浓度范围对p-P65蛋白分泌的促进作用呈上升趋势,40~160 μg/ml范围内随着CRPS25-II的浓度的增加p-P65蛋白的促进作用逐渐减弱。

综上所述,血红铆钉菇多糖具有显著的免疫调节活性,作为一种新型的免疫调节剂,具有较为广阔的开发前景,后续工作可进行更加系统深入的研究。

【参考文献】

- [1] 戴玉成. 中国药用真菌图志[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2013
- [2] 栾庆书. 血红铆钉菇研究现状及开发利用[J]. 食用菌, 2002, 24(2): 2-3.
- [3] 岳峥嵘, 赵博, 张国财, 等. 血红铆钉菇多糖超声微波联合提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2020,

- 41(22): 165-171.
- [4] 李贞卓, 包海鹰. 血红铆钉菇化学成分和药理活性研究概述[J]. 菌物研究, 2015, 13(3): 181-186.
- [5] 王贺, 宋文刚, 任婷, 等. 血红铆钉菇多糖分离纯化及抗氧化活性研究[J]. 北华大学学报(自然科学版), 2019, 20(1): 64-67.
- [6] 张海悦, 杨雪, 李震, 等. 血红铆钉菇黄酮体外抗氧化活性的研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(19): 109-113.
- [7] MARTÍN M P, SIQUIER J L, SALOM J C, et al. Barcoding sequences clearly separate *Chroogomphus mediterraneus* (Gomphidiaceae, Boletales) from *C. rutilus*, and allied species[J]. *Mycoscience*, 2016, 57(6): 384-392.
- [8] LUO J, ZHOU W, CAO S, et al. Chemical constituents of *Chroogomphus rutilus* (schaeff.) o. k. mill[J]. *Biochem Syst Ecol*, 2015, 61: 203-207.
- [9] SONG S, YANG H, SU C P, et al. Ultrasonic-microwave assisted synthesis of stable reduced graphene oxide modified melamine foam with superhydrophobicity and high oil adsorption capacities[J]. *Chem Eng J*, 2016, 306: 504-511.
- [10] 李志锐, 韩淑琴. 超声-微波协同萃取玛卡多糖工艺研究[J]. 农产品加工, 2017(3): 22-23, 27.
- [11] GAO C J, WANG Z Y, SU T T, et al. Optimisation of exopolysaccharide production by *Gomphidius rutilus* and its antioxidant activities in vitro[J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 87(3): 2299-2305.
- [12] 唐超, 王清吉, 葛蔚, 等. 血红铆钉菇多糖对小鼠S₁₈₀肉瘤的抑制作用[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(6): 2966-2967.
- [13] WANG C, ZHANG J, WANG F, et al. Extraction of crude polysaccharides from *Gomphidius rutilus* and their antioxidant activities in vitro[J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 94(1): 479-486.
- [14] 李燕华, 李仲昆, 李从元, 夏洪颖. 车前草粗多糖对人巨噬细胞免疫功能的调节作用及其机制研究[J/OL]. 中药材, 2020(11): 2795-2798.
- [15] 王晶, 史琪, 随晶晶, 等. 鳞柄小奥德蘑多糖对巨噬细胞免疫功能的调节作用[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(5): 845-850, 892.
- [16] 孙林浩, 程安怡, 黄小红, 等. 黄芪多糖对大黄鱼头肾巨噬细胞的免疫调节作用[J]. 应用海洋学学报, 2020, 39(1): 27-34.
- [17] 刘肖肖, 汪雯翰, 冯婷, 等. 金针菇子实体多糖FVPB1对小鼠T细胞和巨噬细胞的免疫调节作用[J]. 食用菌学报, 2019, 26(4): 123-130.
- [18] 季瑞雪, 鹿保鑫, 王新茹, 等. 野生亚侧耳多糖的提取和对巨噬细胞RAW264.7的免疫调节作用研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(4): 271-276.
- [19] 木尼萨·迪力夏提. 阿里红多糖对RAW_{264.7}巨噬细胞免疫调节作用机制的初步研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2019.
- [20] 热西代姆·阿卜力孜, 李敏, 胡君萍. 锁阳多糖对巨噬细胞RAW_{264.7}的免疫调节作用的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(21): 5694-5698.
- [21] 张丽娟, 王珍, 廖尚高. 太子参多糖对RAW 264.7巨噬细胞免疫调节作用的初步研究[J]. 中国野生植物资源, 2018, 37(4): 14-17.
- [22] 吴静, 胡居吾, 熊伟, 等. 樟树果实多糖对巨噬细胞RAW_{264.7}的免疫调节作用[J]. 现代食品科技, 2018, 34(9): 12-18, 309.
- [23] 热孜亚木·吾甫尔, 李月红, 海力茜·陶尔大洪. 恰麻古多糖对巨噬细胞RAW_{264.7}体外免疫调节作用初探[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(1): 15-20.
- [收稿日期] 2021-02-01 [修回日期] 2021-08-22
[本文编辑] 陈盛新

(上接第 448 页)

3 讨论

3.1 测定波长的选择

取对照品溶液依法操作, 在 200 ~ 400 nm 的波长范围内扫描, 结果在 256.6 nm 处有最大吸收, 因此选择 256 nm 作为测定波长 (图 2)。

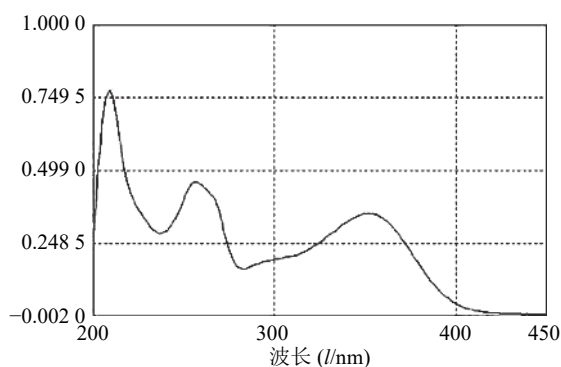


图 2 槲皮苷对照品紫外扫描图

3.2 溶剂的选择

槲皮苷易溶于甲醇、乙醇, 用甲醇作溶剂的峰形比用乙醇作溶剂的峰形好, 因此选择用甲醇作为溶剂。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [2] 邱晓静, 苏文镜. HPLC法测定红茴香注射液中芦丁的含量[J]. 海峡药学, 2008, 20(3): 70-71.
- [3] 王姿媛, 胡惠兰. HPLC法测定哥王药材中的槲皮苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(7): 127-129.
- [4] 常明泉, 潘涛. HPLC法测定氯定庆溶液中苯甲酸钠的含量[J]. 海峡药学, 2017, 29(3): 60-62.
- [5] 董丹华, 刘玉军. HPLC法测定圣愈汤冻干粉中4个指标成分的含量[J]. 中国药房, 2020, 31(5): 576-580.

[收稿日期] 2021-03-19 [修回日期] 2021-06-30
[本文编辑] 李春德