

雪灵芝粗多糖对小鼠免疫细胞增殖与功能的体外激活作用

高笑笑,王刚*,张华,贾霜凯,张海燕,连紫宛

青海大学医学院,西宁 810001

摘要:为观察雪灵芝粗多糖(*Arenaria kansuensis* crude polysaccharide, AKCP)对体外培养的小鼠脾淋巴细胞、NK细胞和腹腔巨噬细胞增殖与功能的影响。以不同浓度AKCP作用于体外培养的上述细胞48 h,采用中性红吞噬实验及NO释放实验检测巨噬细胞功能,MTT法检测脾淋巴细胞增殖及NK细胞杀伤活性,流式细胞术检测脾淋巴细胞CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺亚群,ELISA法检测脾细胞培养上清中IL-2和IFN- γ 水平。结果显示,AKCP各浓度组小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬活性和NO释放量、脾淋巴细胞刺激指数及培养上清中IFN- γ 水平、NK细胞杀伤活性均高于空白对照组($P < 0.05$);AKCP中浓度组脾淋巴细胞CD3⁺、CD4⁺亚群及培养上清中IL-2水平也明显升高($P < 0.05$)。提示AKCP对小鼠免疫细胞的增殖与功能具有体外激活作用。

关键词:雪灵芝;多糖;免疫;激活;体外

中图分类号:R282.71

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.7.019

Activation Effect of Crude Polysaccharide from *Arenaria kansuensis* on Proliferation and Function of Murine Immunocyte *in vitro*

GAO Xiao-xiao, WANG Gang*, ZHANG Hua, JIA Shuang-kai, ZHANG Hai-yan, LIAN Zi-wan

Medical College of Qinghai University, Xining 810001, China

Abstract: To investigate the effects of crude polysaccharide from *Arenaria kansuensis* (AKCP) on the proliferation and function of murine immunocyte *in vitro*. After mice peritoneal macrophages and spleen lymphocytes were cultured *in vitro* and be treated by different concentrations of AKCP for 48 hours, the lymphocyte proliferation and NK killing activity were detected by MTT method, the CD3⁺/CD4⁺/CD8⁺ subsets in spleen lymphocytes were analyzed by FCM, and the levels of IL-2 and IFN- γ in spleen cell culture supernatant were tested by ELISA. The results showed that after high, middle and low concentrations AKCP treatment, the phagocytic and NO secreting activities of peritoneal macrophages, the proliferation index as well as IFN- γ secretion level of lymphocytes, and the NK killing activity were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$). In middle AKCP group, the CD3⁺, CD4⁺ subset in spleen lymphocytes, the level of IL-2 secreted by lymphocytes was obviously increased ($P < 0.05$). These results collectively indicated that AKCP had abilities to activate the proliferation and function of murine immunocyte *in vitro*.

Key words: *Arenaria kansuensis*; polysaccharide; immune; activation; *in vitro*

雪灵芝(*Arenaria kansuensis*)藏药名阿仲,民间又称旋花草,是生长于海拔3500 m以上高山草垫和雪线附近砾石带的石竹科蚤缀属垫状草本植物。在年均温度低、昼夜温差大、日照充足、空气洁净的高原独特环境下,该植物生命力顽强,具有光合作用强,生长缓慢,生物活性成分积累高的特点。雪灵芝作为藏药资源,《四部医典》和《秘诀遗补》等藏医典籍记载其具有“治疗胃肠之溃疡、膨胀、瘰疬,并具

健胃助消功效”,《全国中草药汇编》记载其性味功能“甘寒、滋阴养血、益肾壮骨”^[1]。藏族民间用旋花草水煮液进行药浴治疗类风湿性关节炎。随着近年来藏药研究的日渐兴起,雪灵芝成分与作用方面的研究也开始逐渐见诸于国内报道:药化研究方面,雪灵芝含有多糖、三萜皂苷、黄酮等生物活性物质^[2-5];药物作用方面,雪灵芝提取物具有免疫调节、抗氧化、促消化等作用^[6-8]。本研究组前期开展的体内外研究显示,雪灵芝水溶性提取物对小鼠脾淋巴细胞增殖、Th1细胞因子表达等具有促进作用^[9,10]。在此基础上,本研究通过不同浓度AKCP作用于体外培养的小鼠腹腔巨噬细胞和脾淋巴细胞,观察

收稿日期:2016-11-29 接受日期:2017-02-20

基金项目:青海省科技厅基础研究项目(2016-ZJ-782)

* 通信作者 E-mail:wanggangqh@163.com

AKCP 对上述细胞增殖及功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物与细胞

清洁级昆明小鼠, 雄性, 4~6 周龄, 体重(20 ± 1.5)g, 购自青海省地方病研究所实验动物中心, 生产许可证号 SYXK 青 2012-001; Yac-1 细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 主要试剂与仪器

雪灵芝全草购自青海九康医药保健品有限公司, 本室参照文献^[2,3] 提取雪灵芝粗多糖, 经 sevag 法脱蛋白和流水透析除杂, 制备精制 AKCP 冻干粉剂, 苯酚-硫酸法测总糖含量为 47%; 注射用香菇多糖(lentinan LNT) (南京绿叶思科药业有限公司); RPMI1640 培养基(Gibco 公司); 胎牛血清(天杭生物科技有限公司); 刀豆蛋白(Con A, Sigma 公司); 红细胞裂解液(碧云天生物技术研究所); NO 试剂盒(南京建成生物工程研究所); 小鼠 IL-2 与 IFN- γ 的 ELISA 试剂盒(深圳市达科为生物技术有限公司); CD3⁺ FITC、CD4⁺ PE、CD8⁺ PerCP(BioLegend 公司); 细胞培养箱(HF-90 型, 美国 Forma 公司); 酶标仪(xMark-10483 型, 日本 Bio-rad 公司); 流式细胞仪(BD FACSCalibur TM)。

1.2 方法

1.2.1 中性红吞噬实验法及 NO 释放实验法检测小鼠腹腔巨噬细胞功能

实验小鼠 5 只, 每只给予 6% 的淀粉肉汤 1 mL ip, 3 d 后颈椎脱臼处死小鼠, 用 75% 乙醇消毒小鼠皮肤后腹腔注射 5 mL 生理盐水, 按揉腹部后从侧腹壁吸出液体, 收集于离心管中, 4 °C 1500 rpm 离心 5 min 后弃上清, 用 RPMI1640 完全培养液重悬, 调整细胞密度为 1×10^5 cells/mL, 按 180 μ L/孔接种于 96 孔培养板, 置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养 3 h 后吸弃上层培养液, 用培养液洗涤 2 次, 去除未贴壁细胞。按空白对照组, LNT 组, AKCP 低、中、高浓度组进行细胞分组, 每组每样本细胞设 3 复孔。除空白对照组外, LNT 组加入终浓度为 5 μ g/mL 的 LNT, AKCP 低、中、高浓度组分别加入终浓度为 50、100、200 μ g/mL 的 AKCP, 置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养 44 h, 吸取上清按 NO 一步法试剂盒说明书, 检测小鼠腹腔巨噬细胞 NO 的生成量; 各细胞培养孔用 PBS 洗涤后加入 0.1% 的中性红生理盐水 100 μ L,

继续培养 30 min, 吸弃上清并用 PBS 洗涤 3 次, 各孔加入细胞裂解液(1:1 乙酸-无水乙醇)100 μ L, 4 °C 过夜裂解细胞, 酶标仪测 540 nm 处吸光度, 以吸光度值判定小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能。

1.2.2 小鼠脾淋巴细胞悬液制备

实验小鼠 5 只, 处死后无菌条件下分离小鼠脾脏, 剔除脾脏的脂肪和结缔组织, 置研钵中研碎, 用 0.9% 氯化钠溶液混悬后过滤, 收集滤液, 1 000 rpm 离心 5 min, 加入 3 倍体积红细胞裂解液, 置冰上裂解 10 min, 4 °C 离心后弃上清液, PBS 洗涤离心细胞两次, 用 2 mL 完全培养液重悬, 台盼蓝染色, 计数活细胞, 调整细胞密度为 2×10^6 cells/mL。

1.2.3 MTT 法检测小鼠脾淋巴细胞体外增殖活性

小鼠脾淋巴细胞悬液按 180 μ L/孔接种于 96 孔细胞培养板。按 1.2.1 方法分组、给药, 置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养 44 h, 加入 20 μ L/孔的 MTT (5 mg/mL), 继续孵育 4 h, 收集上清液以备下一步 ELISA 法检测 IFN- γ 之用。加入 150 μ L/孔的 DMSO 震荡溶解 10 min, 酶标仪检测 490 nm 波长 OD 值, 结果以刺激指数(SI)表示: SI = OD 刺激孔/OD 对照孔。

1.2.4 MTT 法检测 NK 细胞杀伤活性

实验小鼠 6 只, 处死后按 1.2.2 方法制备脾细胞悬液(细胞密度 2×10^6 cells/mL), 以此为效应细胞, 按 160 μ L/孔接种于 96 孔细胞培养板中, 按效-靶比 25:1 的比例加入对数生长期靶细胞(Yac-1, 小鼠淋巴瘤细胞)20 μ L, 同时设效应细胞对照孔、靶细胞对照孔。按 1.2.1 方法分组、给药, 置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养 44 h, 按前述 MTT 法检测各孔 OD 值, NK 细胞杀伤活性 = [1 - (效-靶细胞 OD 值 - 效应细胞 OD 值) / 靶细胞 OD 值] \times 100%。

1.2.5 流式细胞术检测小鼠脾淋巴细胞亚群

取 1.2.4 制备的小鼠脾淋巴细胞悬液, 按 4.5 mL/瓶接种于细胞培养瓶, 加入终浓度 0.2 μ g/mL 的 Con A, 按 1.2.1 方法分组(每组每样本细胞不设复孔)给药, 置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养 48 h, 收集培养上清以备下一步 ELISA 法检测 IL-2 之用。Hank's 调整脾淋巴细胞浓度至 1×10^7 cells/mL, 吸取 100 μ L 细胞悬液, 加入到流式检测管, 分别加入 CD3⁺/CD4⁺/CD8⁺ 单克隆抗体各 2 μ L, 振荡混匀后 4 °C 避光静置 30 min, Hank's 液洗涤离心 2 次, 弃上清, 用 Hank's 重悬细胞后上机检测。FlowJo 软件分析各细胞亚群百分率, 并计算 CD4⁺/CD8⁺ 比值。

1.2.6 ELISA 双抗体夹心法检测 IL-2 和 IFN- γ 水平

取前述步骤收集的脾淋巴细胞培养上清, 每组每样本检测 3 个复孔, 按 ELISA 试剂盒说明书进行 IL-2 和 IFN- γ 水平检测。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计学软件进行分析, 数据以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 LSD 法进行显著性检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

表 1 AKCP 对体外培养小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Table 1 The effect of AKCP on the function of mice peritoneal macrophages *in vitro* ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	吞噬活性 Pinocytotic activity (A_{540})	一氧化氮含量 Content of NO ($\mu\text{mol/L}$)
空白对照 Control	0	0.207 \pm 0.008	0.372 \pm 0.108
香菇多糖 LNT	5	0.226 \pm 0.012	4.156 \pm 0.303 *
AKCP 低浓度 AKCP-L	50	0.312 \pm 0.041 * #	9.530 \pm 2.478 * #
AKCP 中浓度 AKCP-M	100	0.288 \pm 0.037 * #	9.758 \pm 1.982 * #
AKCP 高浓度 AKCP-H	200	0.305 \pm 0.016 * #	9.758 \pm 1.258 * #

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与香菇多糖组比较, # $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$; Compared with LNT group, # $P < 0.05$.

2.2 AKCP 对小鼠脾淋巴细胞体外增殖活性的影响

MTT 检测结果显示, AKCP 各浓度组及 LNT 组小鼠脾淋巴细胞刺激指数均高于空白对照组 ($P < 0.05$), 其中 AKCP 中、高浓度组和 LNT 组小鼠脾淋巴细胞刺激指数高于 AKCP 低浓度组 ($P < 0.05$) (图 1)。

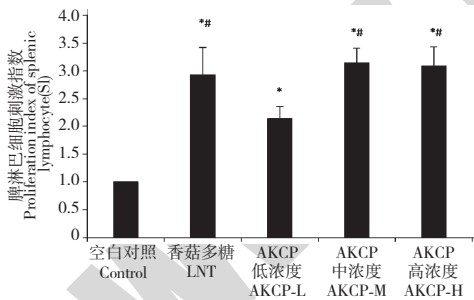


图 1 AKCP 对体外培养小鼠脾淋巴细胞增殖水平的影响 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Fig. 1 Effects of AKCP on the level of lymphocyte proliferation *in vitro* ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与雪灵芝多糖低浓度组比较, # $P < 0.05$

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$; Compared with AKCP-L group, # $P < 0.05$

2.3 AKCP 对小鼠 NK 细胞杀伤活性的影响

MTT 检测结果显示, AKCP 各浓度组及 LNT 组

2 实验结果

2.1 AKCP 对小鼠腹腔巨噬细胞体外吞噬中性红及释放 NO 功能的影响

结果显示, AKCP 各浓度组小鼠腹腔巨噬细胞中性红吞噬活性及 NO 释放水平均高于空白对照组和 LNT 组; LNT 组 NO 释放水平高于空白对照组 ($P < 0.05$) (表 1)。

小鼠 NK 细胞杀伤活性均高于空白对照组 ($P < 0.05$), 其中 AKCP 中浓度组小鼠 NK 细胞杀伤活性高于 LNT 组 ($P < 0.05$) (图 2)。

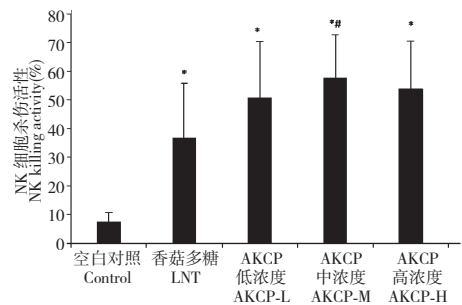


图 2 AKCP 对小鼠 NK 细胞杀伤活性的影响 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Fig. 2 Effects of AKCP on NK killing activity of mice ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与香菇多糖组比较, # $P < 0.05$

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$; Compared with LNT group, # $P < 0.05$

2.4 AKCP 对体外培养小鼠脾淋巴细胞亚群的影响

流式细胞术检测结果显示, AKCP 中浓度组 CD3⁺ 及 CD4⁺ 淋巴细胞亚群高于空白对照组和 AKCP 低、高浓度组 ($P < 0.05$), LNT 组 CD3⁺ 及 CD4⁺ 淋巴细胞亚群高于 AKCP 高浓度组 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 AKCP 对体外培养小鼠脾淋巴细胞亚群的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)Table 2 The effect of AKCP on spleen lymphocyte subpopulation of mice *in vitro* ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	浓度 Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
空白对照 Control	0	24.42 \pm 1.93	14.98 \pm 2.68	6.68 \pm 1.93	2.42 \pm 1.16
香菇多糖 LNT	5	29.05 \pm 3.24 #	17.93 \pm 2.48 #	7.66 \pm 1.22	2.38 \pm 0.42
AKCP 低浓度 AKCP-L	50	22.88 \pm 6.92	13.57 \pm 4.18	7.13 \pm 1.75	1.92 \pm 0.47
AKCP 中浓度 AKCP-M	100	31.55 \pm 3.13 *	19.95 \pm 2.64 *	9.56 \pm 3.70	2.25 \pm 0.58
AKCP 高浓度 AKCP-H	200	22.70 \pm 3.88	13.11 \pm 3.16	7.79 \pm 1.15	1.67 \pm 0.22

注:与空白对照组及雪灵芝多糖低、高浓度组比较, * $P < 0.05$; 与雪灵芝多糖高浓度组比较, # $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control group, AKCP-L and AKCP-H groups, * $P < 0.05$; Compared with AKCP-H group, # $P < 0.05$.

2.5 AKCP 对小鼠脾淋巴细胞分泌 IL-2 和 IFN- γ 水平的影响

ELISA 检测结果显示, AKCP 中浓度组及 LNT 组小鼠脾淋巴细胞培养上清 IL-2 水平, 明显高于空白对照组和 AKCP 低、高浓度组 ($P < 0.05$); AKCP

各浓度组及 LNT 组小鼠脾淋巴细胞培养上清 IFN- γ 水平均明显高于空白对照组 ($P < 0.05$), 同时 AKCP 高浓度组小鼠脾淋巴细胞培养上清 IFN- γ 水平高于 LNT 组和 AKCP 低、中浓度组 ($P < 0.05$) (表 3)。

表 3 AKCP 对小鼠脾淋巴细胞分泌 IL-2 及 IFN- γ 的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)Table 3 The effects of AKCP on IL-2 and IFN- γ production of mice spleen lymphocytes ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	浓度 Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	白介素 2 IL-2 (pg/mL)	干扰素 γ IFN- γ (pg/mL)
空白对照 Control	0	13.73 \pm 6.43	3.52 \pm 2.73
香菇多糖 LNT	5	23.47 \pm 6.76 * #	96.28 \pm 22.34 *
AKCP 低浓度 AKCP-L	50	12.15 \pm 5.41	87.83 \pm 11.32 *
AKCP 中浓度 AKCP-M	100	24.58 \pm 6.42 * #	98.25 \pm 15.47 *
AKCP 高浓度 AKCP-H	200	11.13 \pm 6.77	187.59 \pm 35.21 * *

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与雪灵芝多糖低、高浓度组比较, # $P < 0.05$; 与香菇多糖组及雪灵芝多糖低、中浓度组比较, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$; Compared with AKCP-L and AKCP-H groups, # $P < 0.05$; Compared with LNT group, AKCP-L and AKCP-H groups, * $P < 0.05$.

3 讨论与结论

多糖是多个单糖通过糖苷键聚合形成的一类大分子糖类物质, 具有免疫调节、抗肿瘤、抗氧化等生物活性。目前被发现和研究的多糖数以百计, 其中一些具有良好免疫增强作用的多糖如香菇多糖、猪苓多糖及云芝多醣等, 被开发为临床抗肿瘤、抗病毒的辅助治疗药物。香菇多糖 (lentinan, LNT) 是以 β -葡聚糖为一级结构, 分子量 50 万左右的均一组分多糖, 具有提高巨噬细胞吞噬功能、体外促进 T 淋巴细胞增殖及 NK 细胞杀伤活性, 提高 IL-2、IL-12 及 IFN- γ 水平等免疫增强作用^[11-13]。本文以 LTN 为阳性对照, 观察 AKCP 对体外培养小鼠脾淋巴细胞增殖、腹腔巨噬细胞及 NK 细胞功能的影响, 结果显示 AKCP 与 LNT 对上述细胞均表现出明显的促进作用。

首先, AKCP 具有体外增强小鼠腹腔巨噬细胞吞噬活性和 NO 生成水平、增强 NK 细胞杀伤活性的作用; 同时, AKCP 可明显提高体外培养的小鼠脾淋巴细胞增殖水平并一定浓度下增加 CD3⁺、CD4⁺ T 亚群细胞数量; 提示 AKCP 对体外培养的小鼠固有性和适应性免疫功能均具有明显的促进作用。其二, 细胞因子是参与机体免疫调节的重要介质, IFN- γ 和 IL-2 是 Th1 产生的两种主要的正性免疫调节因子。IFN- γ 不仅可增强 T 细胞功能, 而且具有诱导骨髓来源巨噬细胞向 M1 型巨噬细胞极化, 并促进其合成 NO 发挥杀伤作用^[14]。在本研究中, AKCP 可使脾细胞培养上清中 IFN- γ 水平呈浓度依赖性升高, 提示 AKCP 不仅可直接性激活巨噬细胞, 并可通过上调 IFN- γ 水平间接性地增强巨噬细胞吞噬、杀伤功能; IL-2 可促进 T 细胞增殖活化和 NK 细胞杀伤活性。本研究结果中, 脾细胞培养上

清中 IL-2 水平、脾淋巴细胞增殖、CD3⁺ 与 CD4⁺ T 细胞亚群、NK 细胞杀伤活性等项指标,在量效关系上具有一致性,即均表现为中浓度 AKCP 促进作用最强。尤其是 IL-2 水平与 CD3⁺、CD4⁺ T 细胞亚群数量,在 AKCP 中浓度组明显升高,而 AKCP 高、低浓度组此 2 项指标与对照组比较无差别,造成这种非浓度依赖性效应,是否与丝裂原 Con A 共刺激的情况下,多糖类物质通过双向免疫调节而避免免疫细胞的过度激活^[15]有关,有待进一步研究。其三,本文的体外研究结果与我们同期开展的通过 AKCP 灌胃给药对环磷酰胺致免疫低下小鼠免疫功能具有恢复作用的体内研究结果(另文报道)具有一致性,二者不仅相互印证了 AKCP 的免疫增强作用,而且提示 AKCP 体外给药与 AKCP 灌胃给药(经胃肠道吸收、体内代谢),其作用成分的构效关系可能未发生明显的变化。

自然界中的多糖多为分子量大小不一、单糖组成不同、结构具有差异性的混合物。对此类物质的生物活性研究,既包括药化研究方面,从粗/总多糖到多糖组分、均一组分的提取、分离纯化的渐进过程,同时也伴随着药理研究方面,从粗/总多糖层面证实活性,到各分离纯化阶段对不同多糖组分进行活性的追踪与筛选。本文与同期进行的体内研究所取得的一致性结果,不仅在雪灵芝粗多糖层面证实其具有激活免疫的生物活性,为进一步分离、纯化与筛选活性组分提供了理论依据。同时,由于体外途径较体内途径在实验研究的可控性和效率方面具有优势,因而可以考虑在之后进行的多糖组分免疫调节活性筛选过程中,以体外研究为实验平台,选择较敏感指标如腹腔巨噬细胞合成 NO 水平、脾细胞培养上清中 IFN- γ 水平等,进行快速、高效的活性检测与评价。

参考文献

- Li M (李明), Wu XX (伍贤学), Cheng L (成丽). Advances in studies on Tibetan herb *Arenaria kansuensis*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2007, 38(11): 1-3.
- Zhu Y (朱影), Wang M (旺梅), Ma RC (马荣池), et al. Optimization of the extraction process of water-soluble polysaccharides of *Arenaria kansuensis* Maxim and the establishment of its mathematical model. *World Sci-Tech Res Dev* (世界科技研究与发展), 2008, 30: 249-252.
- Wang H (王虹), Sheng Li (盛莉). Study on the extraction conditions of Ppolysaccharides from *Arenaria kansuensis* Maxim. *Guangdong Chem Ind* (广东化工), 2015, 42(21): 9-10.
- Cheng L (成丽), Wu RX (伍贤学), Huang H (黄浩), et al. Triterpenoid saponins from *Arenaria* L. plants. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(9): 1076-1079.
- Wang CT (王昌涛), Sun XT (孙啸涛), Zhou X (周雪). Optimization of extraction process for flavonoids from *Arenaria kansuensis* Maxim by response surface methodology. *Food Sci* (食品科学), 2013, 34(14): 91-95.
- Li FW (李凤文), Zhao P (赵鹏), Liu RZ (刘荣珍), et al. Studies on the DNA damage in transformed bronchial epithelial cells induced by cadmium chloride. *China Tropical Med* (中国热带医学), 2007, 7: 1999-2000.
- Fu X (付翔), Chen W (陈薇), Duan XQ (段小群), et al. Free radical scavenging and antilipoperoxidant properties of *Arenaria kansuensis* extracts. *Chin J Inf TCM* (中国中医药信息杂志), 2010, 17(7): 35-36.
- Yao SY (姚思宇), Zhao P (赵鹏), Liu RZ (刘荣珍), et al. Experimental study on promoting digestion of *Arenaria kansuensis*. *Chin J Appl Physiol* (中国应用生理学杂志), 2007, 23: 332-333.
- Wang G (王刚), Wang HY (王海燕), Zhang H (张华), et al. Effects of *Arenaria kansuensis* aqueous extract on lymphocytes proliferation and Th1 cytokine production. *Chin J Immu* (中国免疫学杂志), 2013, 29: 905-909.
- Yang XR (杨歆睿), Wang G (王刚), Ji LB (吉立宾), et al. Effects of *Arenaria kansuensis* aqueous extract on immune function of H22 tumor-bearing mice. *Cancer Res Prev Treat* (肿瘤防治研究), 2015, 42: 662-665.
- Ina K, Kataoka T, Ando T. The use of lentinan for treating gastric cancer. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013, 50: 681-688.
- Wang Y, Han X, Li YD, et al. Effects of tumor-specific antigen induced by lentinan on murine H22 hepatocellular carcinoma immunoprophylaxis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19: 4516-4524.
- Lu J (陆娟), Peng H (彭浩), Chen JF (陈俊峰), et al. Research on microwave-assisted extraction of lentinan and its immunology activity *in vitro*. *J Biol* (生物学杂志), 2011, 28(3): 50-53.
- Ruan JY (阮静瑶), Chen BC (陈必成), Zhang XL (张喜乐), et al. Progress in signaling pathways of macrophage M1/2 polarization. *Imm J* (免疫学杂志), 2015, 31: 911-917.
- Wang C, Cui H, Wang Y, et al. Bidirectional immunomodulatory activities of polysaccharides purified from *Pleurotus nebrodensis*. *Inflammation*, 2014, 37(1): 83-89.