

# 白囊耙齿菌多糖结构及抗肾小球系膜细胞的增殖活性研究

高苗苗<sup>1</sup>, 李士伟<sup>2</sup>, 祝洪艳<sup>1\*</sup>, 徐多多<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>吉林农业大学 中药材学院, 长春 130118; <sup>2</sup>长春中医药大学 吉林省人参研究院, 长春 130117

**摘要:**为表征白囊耙齿菌多糖结构并筛选出具有抗肾小球系膜细胞(GMC)增殖作用的活性多糖,研究活性多糖对GMC异常增殖及细胞外基质分泌的影响。实验采用碱提醇沉法提取粗多糖(PC),经离子交换色谱柱纯化、SePhadex G-50凝胶柱分离得到耙齿菌多糖PCP-1、PCP-2。通过苯酚硫酸法、BCA法等测定其含量,甲基化、IR分析进行结构表征。采用MTT法、ELISA法考察对GMC增殖的影响。结果表明,PCP-1和PC-2的总糖含量分别为98.05%、96.92%,酸性糖及蛋白质含量几乎为零;PCP-1主要由Man、Glc和Gal组成,具有多分枝结构,包含吡喃糖类型的结构,具备 $\alpha$ 和 $\beta$ 两种构型;而PCP-2仅由Glc组成,没有分支,为 $\alpha$ -构型吡喃聚糖。具有抗GMC增殖活性的均一多糖为PCP-1,可保护LPS诱导的GMC增殖,减少LN、FN蛋白的释放。

**关键词:**白囊耙齿菌;多糖;活性部位;肾小球系膜细胞

中图分类号:R93

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)11-1954-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.11.015

## Structure of polysaccharide and its resistance to GMC proliferation activity from *Irpex lacteus*

GAO Miao-miao<sup>1</sup>, LI Shi-wei<sup>2</sup>, ZHU Hong-yan<sup>1\*</sup>, XU Duo-duo<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, china;

<sup>2</sup>Jilin Provincial Ginseng Research Institute, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, china

**Abstract:** To characterize the polysaccharide structure of *Irpex lacteus* and screen active polysaccharides with anti-proliferation effect on glomerular mesangial cells (GMC), the effects of active polysaccharides on abnormal GMC proliferation and extracellular matrix secretion were studied. Crude polysaccharide (PC) was extracted by alkali extraction and alcohol precipitation method, and PCP-1 and PCP-2 were obtained by purification by ion exchange chromatography column and separation by sephadex g-50 gel column. The physical and chemical properties, methylation and IR analysis of the polysaccharides were determined by phenol sulfuric acid method and BCA method. MTT assay was used to investigate the effect on the proliferation of glomerular mesangial cells (GMC). As a result, the total sugar content of PCP-1 and PC-2 was 98.05% and 96.92%, respectively. PCP-1 is mainly composed of Man, Glc and Gal, and the Gal content is the highest. While PCP-2 only consists of Glc, the homopolysaccharide with anti-GMC proliferative activity is PCP-1, which can protect the GMC value-added induced by LPS and reduce the release of LN and FN proteins.

**Key words:** *Irpex lacteus*; polysaccharide; active site; glomerular mesangial cell

多糖具有抗肿瘤、抗病毒、抗凝血、降血糖、免疫调节等活性<sup>[1-4]</sup>,且作为药物毒副作用低,不良反应少,已成为天然药物及保健品研发中的重要组成部分。白囊耙齿菌(以下简称耙齿菌)是一种重要的药用真菌,属于担子纲非褶菌目多孔菌科耙齿菌属,

又被叫做白囊孔、耙齿菌。在我国白囊耙齿菌主要分布于吉林省的长白山、黑龙江、河北等省区。耙齿菌发酵物的活性成分为多糖类物质。近年来研究表明,耙齿菌多糖具有抗肿瘤、抗炎等活性<sup>[5]</sup>。但是,国内外对耙齿菌的研究很少,且多糖类物质的分子量较大,结构非常复杂,因此对耙齿菌多糖的研究相对滞后。本实验通过分离制备耙齿菌发酵物中不同的多糖片段,得到两种均一多糖,表征其结构。为耙齿菌多糖结构的系统研究和明确其结构与功能之间

收稿日期:2019-05-27 接受日期:2019-10-11

基金项目:吉林省科技厅项目(2019030418YY)

\*通信作者 Tel:86-018043016507; E-mail: popzhy@163.com, czxuduoduo

@163.com

的联系提供了科学依据。耙齿菌多糖粗提取物是吉林省多个药品生产企业生产的品种--益肾康胶囊的原料,主要用于治疗肾小球肾炎引起腰痛、浮肿、尿少、血压升高等症。在民间,耙齿菌多糖治疗肾炎的应用非常的广泛。虽然在临床上治疗慢性肾小球肾炎具有良好的应用基础,但治疗肾炎的活性成分及机制却尚不清楚,相关的国内外对此方面的研究报道也很少,因此,耙齿菌治疗肾炎缺乏相应的理论支撑,这一现状,将会严重的限制耙齿菌的在临床的合理使用,益肾康胶囊也难以确定合理的工艺,无法建立有效的质量控制方法,难以保证其安全性及有效性。为了明确耙齿菌治疗慢性肾小球肾炎的有效成分,我们以在肾炎疾病中的发生发展中起到关键作用的肾小球系膜细胞(GMC)作为筛选模型,观察耙齿菌多糖对GMC的异常增殖及FN, LN等相关因子释放的影响,筛选出活性多糖,为多糖治疗慢性肾炎的构效关系这一科学问题,提供有益的借鉴和依据。

## 1 材料及仪器

耙齿菌固体发酵物,由通化吉通药业股份有限公司提供。肾小球系膜细胞(ATCC);PRMI1640培养基(美国 hyclone 公司);717型阴离子交换树脂、732型阳离子交换树脂(上海绿宝树脂厂);脂多糖(美国 sigma 公司);葡萄糖等单糖标品(美国 Sigma 公司);噻唑蓝(MTT)(上海碧云天生物试剂有限公司);胎牛血清 FBS(Gibco);苯酚、浓硫酸、二甲基亚砷、氢氧化钠,等均为国产分析纯。

酶标仪 MK3(Thermo(上海)仪器有限公司);N1000 旋转蒸发仪(日本东京理化仪器有限公司);6890N-5973MSD 气-质联用仪、1100-6320 MS 液-质联用仪(美国 Agilent 公司);TDL-5-A 离心机(上海安亭科学仪器厂)。

## 2 方法

### 2.1 耙齿菌粗多糖的提取

采用多糖传统的提取方法--水提醇沉法。耙齿菌发酵物,加水加热使溶解,滤除不溶物,浓缩至一定体积,加入无水乙醇,不断搅拌,至乙醇浓度为80%,离心,沉淀挥干乙醇后加水溶解。采用 Sevage 法除去蛋白,离心除去沉淀,上清回收,冻干,即得耙齿菌粗多糖(PC)。

### 2.2 PC 的分离纯化

称取粗多糖 30 g,用 150 mL 水溶解,通过 717 + 732 混合床离子交换树脂纯化,收集 8 个柱体积水洗脱液,浓缩至小体积,干燥,得到 PCP。通过

SePhadex G-50 凝胶柱分离 PCP,分别称取葡萄糖和蓝色葡聚糖对照品 10 mg,混合加 5 mL 蒸馏水溶解,经过上述中压柱,流速为 1 mL/min,每管收集 10 mL,隔管以苯酚-硫酸法监测中性糖,以收集的洗脱液的管数为横坐标,对应的吸光度值作为纵坐标绘制洗脱图,测定内水( $V_e$ )和外水体积( $V_0$ )。称取 PCP20 mg,用 5 mL 水溶解,经过上述中压柱,流动相为水,每管收集 10 mL。隔管以苯酚-硫酸法监测中性糖,以收集的洗脱液的管数为横坐标,对应的吸光度值作为纵坐标绘制洗脱图。按照洗脱图合并组分,分别得到 PCP-1 和 PCP-2。

### 2.3 PCP-1、PCP-2 理化性质的测定

采用苯酚-硫酸法<sup>[6]</sup>测定总糖含量,间羟基联苯法<sup>[7]</sup>测定酸性糖含量,BCA 法<sup>[8]</sup>测定蛋白含量。

PMP 柱前衍生化 HPLC 法<sup>[9]</sup>分析组成糖。色谱条件:  $C_{18}$  色谱柱(5  $\mu$ m, 250  $\times$  4.6 mm);柱温 40  $^{\circ}$ C;检测波长 250 nm;流速 0.8 mL/min;流动相 A 为 0.025 mol/L 磷酸盐缓冲溶液( $KH_2PO_4$ -NaOH, PH6.8)-乙腈(85:15),流动相 B 为 0.025 mol/L 磷酸盐缓冲液( $KH_2PO_4$ -NaOH, PH6.8)-乙腈(60:40)。

### 2.4 PCP-1、PCP-2 分子量测定

采用高效凝胶分子排阻色谱法<sup>[10]</sup>测定 PCP-1、PCP-2 分子量。

色谱条件:色谱柱为 Shodex OhPak SB-802.5 HQ(8 mm  $\times$  300 mm)凝胶柱,流动相为 0.7% 硫酸钠溶液,柱温 35  $^{\circ}$ C,流速为 0.5 mL/min,进样量 20  $\mu$ L,示差折光检测器。

### 2.5 耙齿菌多糖 PCP-1 和 PCP-2 的化学结构的研究

#### 2.5.1 PCP-1、PCP-2 的 IR 分析

IR 是多糖结构分析的一种辅助手段,主要用于确定苷键的构型,观察特征的官能团。PCP-1、PCP-2 经 KBr 压片,在 4 000 ~ 400  $cm^{-1}$  范围内进行红外光谱扫描,得 IR 光谱图。

#### 2.5.2 甲基化

甲基化是多糖结构研究中非常重要的一种手段。它可以提供多种信息,如糖残基的种类及各糖残基的数目。本实验采用改良的 Hakomori 法,该方法以 DMSO 为溶剂,用 DMSO 与 NaOH 的反应产物甲基亚磺酰负离子  $CH_3SOCH_2^-$  为强碱,因  $CH_3SOCH_2^-$  易与氧、水或二氧化碳反应而降解,所以整个过程应在氮气保护和无水条件下进行。将样品

PCP-1 和 PCP-2 进行甲基化<sup>[11]</sup>。经甲基化,水解还原乙酰化,得到部分甲基化的糖醇乙酸酯衍生物,进行 GC-MS 分析。

分析条件:DB-1 MS 石英毛细管柱(30 m×0.32 mm),进样口温度为 200 ℃,离子源温度为 250 ℃。升温程序:140 ℃保持 7.5 min,以 2 ℃/min 程序升温至 250 ℃,保持 20 min。流速为 1 mL/min,进样量 1 μL,分流比为 50:1。

## 2.6 耙齿菌多糖抗 GMC 增殖活性

### 2.6.1 建立 LPS 诱导 GMC 细胞增殖的模型

取 GMC 细胞种于 96 孔培养板中,调细胞浓度为  $1 \times 10^5$  个/mL,接种 24 h 后,细胞贴壁,此时将培养液吸出,用无血清的培养基继续培养 24 h,使细胞同步于 G<sub>0</sub> 期。采用不同浓度的 LPS 培养不同的时间考察细胞的增殖。按照以下方式分组:空白组;LPS(10、20、30 μg/mL)分别培养 12 和 24 h;采用噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)比色法检测细胞增殖情况,在酶标仪上测定 490 nm 处的吸光度值 A。

### 2.6.2 PCP-1、PCP-2 对 LPS 诱导的 GMC 细胞增殖的影响

取对数生长期细胞,以  $1.0 \times 10^4$  个/mL 的浓度,分别接种于 96 孔板,培养 12 h 后弃去培养基,各孔加入无血清培养基同步培养 24 h。培养基弃去,将细胞分为空白组、模型组、PCP-1 组、PCP-2 组。10 μg/mL LPS、10 μg/mL LPS + PCP-1(10、50、100 μg/mL)组、10 μg/mL LPS + PCP-2(10、50、100 μg/mL)组(均以无血清的 RAMI-1640 配制)。培养 24 h 后进行 MTT 法测定。

### 2.6.3 活性多糖对 GMC 增殖相关因子的影响

ELISA 法测定各组细胞上清液中 LN、FN 蛋白,将 GMC 细胞传代于 5 瓶 25T 透气培养瓶后用含 10% 血清培养液 5 mL 培养 24 h,弃去培养液用不含

血清培养基培养 24 h。将培养瓶分为 5 组,分别为空白组,模型组,PCP-1 给药组。将 5 瓶中分别加入培养基,10 μg/mL LPS, LPS + PCP-1(10、50、100 μg/mL),培养 24 h 后,细胞备用。细胞培养液按试剂盒要求的步骤进行操作,测定各组细胞上清液中 LN、FN 的含量。

## 3 结果

### 3.1 PCP 经 SePhadex G-50 凝胶柱洗脱结果

耙齿菌经水提醇沉,除蛋白后得到粗多糖(PC),收率为 30.24%。PC 经离子交换树脂纯化后得 PCP,颜色由原来的浅褐色变成灰白色,除去了大量的杂质,总糖含量明显提高,蛋白质含量明显降低,收率可到达 70.36%。PCP 经 SePhadex G-50 凝胶柱洗脱,绘制洗脱图,见图 1。如图 1 可知,PCP 经过凝胶色谱的分离,得到两个部分,分别收集,命名为 PCP-1 和 PCP-2。

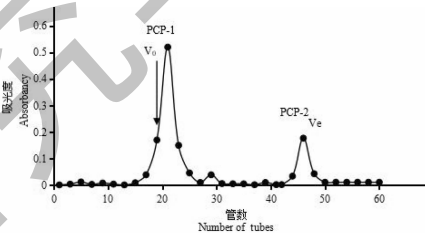


图 1 PCP 经 SePhadex G-50 洗脱图

Fig. 1 PCP eluted by SePhadex G-50

注:Ve 为内水体积, V<sub>0</sub> 为外水体积。Note: Ve is the volume of internal water, V<sub>0</sub> is the volume of external water.

### 3.2 PCP-1、PCP-2 理化性质的测定

理化性质结果见表 1。结果显示,PCP 经过凝胶柱分离后,得到的 PCP-1、PCP-2 总糖含量分别为 98.05%、96.92%,酸性糖、蛋白质几乎没有。PCP-1 含有 Man、Glc 和 Gal,且 Gal 的含量最高,摩尔比例为 2.3:1.2:3.3;而 PCP-2 只含有 Glc。

表 1 PCP-1、PCP-2 中性糖、酸性糖、蛋白质含量和组成糖的测定结果

Table 1 Determination of PCP-1, PCP-2 neutral sugar, acid sugar, protein content and composition sugar

样品 Sample	总糖含量 Total sugar contents (%)	酸性糖含量 Acid sugar content (%)	蛋白含量 Protein content (%)	组成糖及摩尔比 Composition sugar to molar ratio		
				甘露糖 Man	葡萄糖 Glc	半乳糖 Gal
PCP-1	98.05	0.05	0	2.3	1.2	3.3
PCP-2	96.92	0.02	0	-	1.00	-

### 3.3 PCP-1、PCP-2 分子量测定

样品按 2.3 中色谱条件进样,得到色谱图如图 2 所

示。根据供试品的保留时间计算样品各组分重均分子量,PCP-1、PCP-2 分子量分别为 30 000 和 8 000 Da。

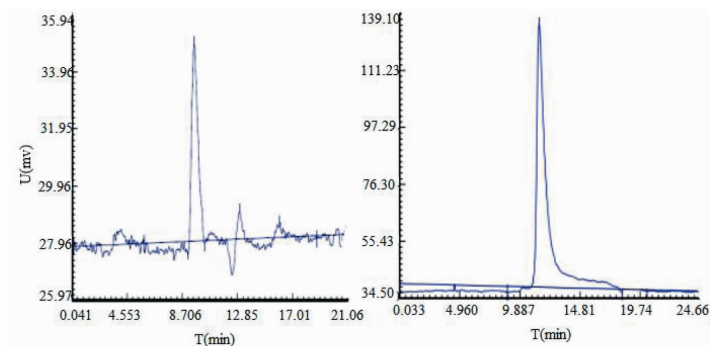


图2 PCP-1、PCP-2 GPC 色谱图

Fig. 2 PCP-1, PCP-2 GPC chromatogram

注:左:PCP-2;右:PCP-1;Note:left:PCP-2;Right:PCP-1

### 3.4 PCP-1、PCP-2 化学结构

#### 3.4.1 IR 分析结果

由图3,PCP-1 光谱图可知,宽峰  $3330\text{ cm}^{-1}$  是 O-H 的伸缩振动,是多糖类化合物的特征吸收; $2930\text{ cm}^{-1}$  为 C-H 的伸缩振动峰; $1610\text{ cm}^{-1}$  为 C-O 的伸缩振动峰; $1408\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰是 C-H 的变角振动; $1025\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰表明 PCP-1 包含吡喃糖类型的结构;另外,是多糖中的 C-O、C-O-C 的伸缩振

动和 C-OH 的弯曲振动特征峰; $852$  和  $744\text{ cm}^{-1}$  处于  $950\sim 700\text{ cm}^{-1}$  之间,说明具备  $\alpha$ -和  $\beta$ -两种构型。

由图3,PCP-2 光谱图可知,在  $3350$  和  $2930\text{ cm}^{-1}$  的吸收峰分别为 O-H、C-H<sub>2</sub> 的伸缩振动峰; $1610\text{ cm}^{-1}$  为糖的水化物的吸收峰; $1408\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰是 C-h 的变角振动; $1020$ 、 $1080$ 、 $1150$ 、 $851\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰是多糖中  $\alpha$ -吡喃环伸缩振动特征峰。由此可知,PCP-2 为  $\alpha$ -构型吡喃聚糖。

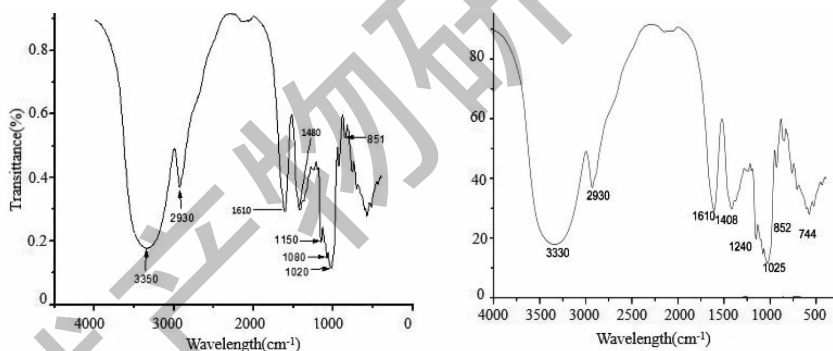


图3 PCP-1、PCP-2 FT-IR 光谱图

Fig. 3 PCP-1, PCP-2 FT-IR sPectrum

注:左:PCP-2;右:PCP-1;Note:left:PCP-2;Right:PCP-1

#### 3.4.2 甲基化 GC-MS 分析

通过与参考文献对照<sup>[12]</sup>,得甲基化分析结果,列于表2。结果显示,PCP-1 主要包含7种糖残基,其中有1个末端,2个分支点,末端和分支点之和的

数量相等且糖残基中 Man、Gal、Glc 的比例也和上述组成糖的结果一致,以上分析说明甲基化的结果是合理的。PCP-2 没有分支,为直链结构,且为1,6连接。

表2 PCP-1 和 PCP-2 甲基化结果

Table 2 PCP-1 and PCP-2 methylation results

多糖 Polysaccharide	保留时间 $t_R$ (min)	糖残基 Sugar residue	摩尔比例 Molar ratio	连接方式 Attended mode
PCP-1	17.000	2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	8.0	T- ManP-(1→
	20.151	2,4,6- Me <sub>3</sub> -Glc	6.0	→3)- GlcP-(1→
	21.424	2,4,6- Me <sub>3</sub> -Gal	1.5	→3)- GalP-(1→

续表 2

	保留时间 $t_R$ (min)	糖残基 Sugar residues	摩尔比例 Molar ratio	连接方式 Attended mode
	22.281	2,3,4- Me <sub>3</sub> - Man	1.0	→6)- ManP-(1→
	23.920	2,3,4- Me <sub>3</sub> - Gal	10.0	→6)- GalP-(1→
	26.536	2,4- Me <sub>3</sub> - Man	2.5	→3,6)- ManP-(1→
	27.855	3,4-Me <sub>2</sub> - Gal	5.0	→2,6)- GalP-(1→
PCP-2	16.720	2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	1.0	→1)- GlcP
	18.538	2,3,4- Me <sub>3</sub> -Glc	19.00	→1,6)- GlcP

### 3.5 耙齿菌多糖抗 GMC 增殖活性

#### 3.5.1 LPS 诱导的 GMC 增殖模型

GMS 细胞在接种后 12 小时到 72 小时内处于对数增长期。可用于细胞模型建立。由表 3 可知, LPS 作用于 GMC 细胞,可剂量依赖性地刺激膜细胞增殖。当采用 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LPS 诱导 24 h 时细胞抑制率为 50% ( $P < 0.01$ ), 以此作用时间建立氧化应激细胞模型。

表 3 LPS 诱导细胞增殖情况

Table 3 LPS induced cell proliferation

LPS 浓度 Concentration of LPS	培养时间 Incubation time (h)	吸光度 OD
空白组 Blank	12	0.219 $\pm$ 0.025
	24	0.220 $\pm$ 0.028
10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	12	0.225 $\pm$ 0.018
	24	0.325 $\pm$ 0.026 **
20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	12	0.425 $\pm$ 0.021 **
	24	0.594 $\pm$ 0.028 **
30 $\mu\text{g}/\text{mL}$	12	0.487 $\pm$ 0.036 **
	24	0.625 $\pm$ 0.038 **

注:与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

#### 3.5.2 PCP-1、PCP-2 对 LPS 诱导的 GMC 增殖的影响

由图 4 可知,模型组与空白组相比有显著性差

异,说明 LPS 造模成功。PCP-1 对 LPS 细胞增殖具有明显的保护作用,当剂量增大,呈现显著性差异,呈现明显且呈现一定的量效关系,而 PCP-2 无此作用。

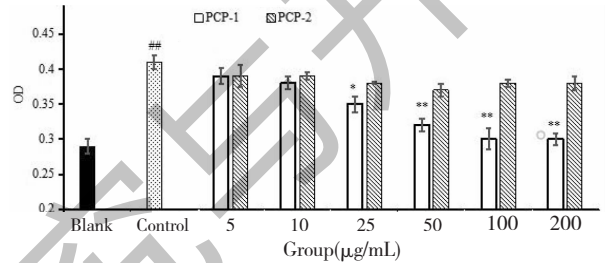


图 4 PCP-1 和 PCP-2 对 GMC 细胞活力的影响

Fig. 4 Effects of PCP-1 and PCP-2 on the activity of GMC

注:空白组相比, #  $P < 0.05$ ; ##  $P < 0.01$ , 与模型组相比, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。Note: Compared with blank, #  $P < 0.05$ ; ##  $P < 0.01$ , Compared with control, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

### 3.6 PCP-1 对 FN、LN 含量的影响

FN, LN 等蛋白围绕在 GMC 周围,构成 GMC 生存的微环境。它不仅是细胞的支架组织,还直接影响细胞的黏附、营养、代谢、增殖、分化和迁移,许多细胞因子通过 ECM 对细胞的生长、增殖和分化起调控作用。采用 ELISA 法测定 FN、LN 的含量。如图 5 所示,PCP-1 能够减少 LPS 诱导的 GMC 细胞中 FN 和 LN 蛋白的释放,并呈现量效关系。

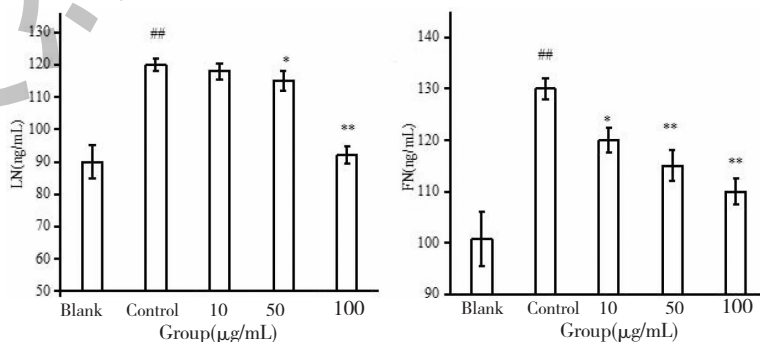


图 5 PCP-1 对 LPS 诱导的 GMC 细胞中 FN 和 LN 含量的影响

Fig. 5 Effect of PCP-1 on the content of FN and LN in GMC cells induced by LPS

注:空白组相比, #  $P < 0.05$ ; ##  $P < 0.01$ , 与模型组相比, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。Note: Compared with blank, #  $P < 0.05$ ; ##  $P < 0.01$ , Compared with control, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

## 4 讨论

肾小球肾炎是我国临床上的常见的肾脏疾病,其病程长,危害大。肾小球系膜细胞(GMC)增殖和细胞外基质(ECM)增多是主要的病理改变。ECM增多是指ECM合成增多或降解减少导致的ECM蛋白组分过度积聚。ECM主要蛋白组分包括IV型胶原、纤维连接蛋白(FN)、层粘连蛋白(LN)和蛋白聚糖等。GMC是肾小球三种固有细胞成分(GMC、内皮细胞、脏层上皮细胞)中功能最活跃的细胞,GMC受到外界因素刺激后,会产生各种细胞因子,这些细胞因子相互作用,最终导致肾炎的发生及发展。GMC产生ECM的作用最强,是ECM的主要产生细胞或称效应细胞。所以,若能有效保护GMC,抑制GMC增殖,则可延缓肾小球硬化,防止肾衰的发生。耙齿菌多糖在临床上治疗肾小球肾炎有良好的应用基础,但是,国内外对白囊耙齿菌的研究很少,耙齿菌多糖的活性成分尚不清楚。本实验分离纯化得到的耙齿菌均一多糖PCP-1能有效抑制GMC的异常增殖,减少LN、FN等相关因子的释放,为耙齿菌多糖的活性成分。本研究为进一步研究耙齿菌均一多糖的结构和活性提供实验基础。为益肾康胶囊确定合理的工艺,建立有效的质量控制方法,为多糖治疗慢性肾炎的构效关系这一科学问题,提供有益的借鉴和数据。

## 参考文献

- 1 Li JE, Cui SW, Shao P, et al. Structure and biological activities of a pectic polysaccharide from *Mosla chinensis* Maxim. cv. Jiangxiangru [J]. Carbohydr Polym, 2014, 105:276-284.
- 2 Gao J, Zhang T, Zheng Y, et al. Structural characterisation, physicochemical properties and antioxidant activity of polysaccharide from *Lilium lancifolium* Thunb. [J]. Food Chem, 2015, 169:430-438.
- 3 Wei X, Qing ZB, Jiao J, et al. Anti-diabetic effects of polysaccharides from *Talinum triangulare* in streptozotocin (STZ)-induced type 2 diabetic male mice [J]. Int J Biol Macromol, 2015, 72:575-579.
- 4 Yang Z, Yao C, Qian L, et al. Preparation, characterization, and anti-*Helicobacter Pylori* activity of Bi<sup>3+</sup>-*Hericium erinaceus* polysaccharide complex [J]. Carbohydr Polym, 2014, 110:231-237.
- 5 Yang ZW, Jiang RZ, Chen YH. The extraction, isolation, physicochemical properties and anti-inflammation activity of *Irpex Lacteus* Fr. [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2005, 17:280-282.
- 6 Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Anal Chem, 2002, 28:350-356.
- 7 Nelly BK, Gustav AH. New method for quantitative determination of uronic acids [J]. Anal Biochem, 1973, 54:484-489.
- 8 Bradford MM. A rapid method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72:248-254.
- 9 Zhang JJ, Zhang QB, Wang J, et al. Analysis of the monosaccharide composition of fucoidan by precolumn derivation HPLC [J]. Chin J Ocean Limn, 2009, 27:578-582.
- 10 Needs PW, Selvendran RR. Avoiding oxidative degradation during sodium hydroxide/methyl iodide-mediated carbohydrate methylation in dimethyl sulfoxide [J]. Carbohydr Res, 1993, 245:1-10.
- 11 Wang ZF, he Y, Huang LJ, et al. An alternative method for the rapid synthesis of partially o-methylated alditol acetate standards for GC-MS analysis of carbohydrates [J]. Carbohydr Res, 2007, 342:2149-2151.
- 12 Zhang LM, Wu BB, Mei CL, et al. Effects of secreted protein acidic and rich in cysteine peptide on change of ultramicrostructure and extracellular matrix secretion of human mesangial cells cultured *in vitro* [J]. Acad J Sec Mil Med Univ (第二军医大学学报), 2007, 28(1):36-39.