

鳞柄小奥德蘑多糖对巨噬细胞免疫功能的调节作用

王晶^{1,2,3*},史琪¹,隋晶晶¹,常世民^{1,2,3},杜娟²,闫训友^{1,2,3}

¹廊坊师范学院生命科学学院; ²河北省食药用菌资源高值利用技术创新中心;

³廊坊市细胞工程与应用研究重点实验室,廊坊 065000

摘要:研究鳞柄小奥德蘑多糖对小鼠巨噬细胞的免疫调节作用。采用灌洗腹腔法收集小鼠巨噬细胞,建立其体外培养体系;采用鸡血红细胞法、荧光探针标记、总一氧化氮检测和酶联免疫吸附试验等方法分别检测巨噬细胞吞噬能力、NO合成量、肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-1、白细胞介素-6 和白细胞介素-12 等的分泌量。结果显示,与空白对照组相比,鳞柄小奥德蘑多糖能显著增强体外培养和腹腔内巨噬细胞的吞噬能力和 NO 合成量,增加体外培养的小鼠巨噬细胞对肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-1、白细胞介素-6 和白细胞介素-12 等细胞因子的分泌量。因此,鳞柄小奥德蘑多糖可能通过提高细胞对 NO 和多种免疫相关信号分子的分泌量,增强细胞的吞噬能力,进而调节小鼠巨噬细胞的免疫功能。

关键词:鳞柄小奥德蘑;多糖;巨噬细胞;细胞因子;免疫调节

中图分类号:TS201.4;S646.9

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)5-0845-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.5.018

Immunomodulatory effect of polysaccharide from *Oudemansiella furfuracea* on murine macrophages

WANG Jing^{1,2,3*}, SHI Qi¹, SUI Jing-jing¹, CHANG Shi-min^{1,2,3}, DU Juan², YAN Xun-you^{1,2,3}

¹College of Life Sciences, Langfang Normal University;

²Technical Innovation Center for Utilization of Edible and Medicinal Fungi in Hebei Province;

³Langfang Key Laboratory of Cell Engineering and Application, Langfang 065000, China

Abstract: To investigate the immunomodulatory effects of polysaccharide from *Oudemansiella furfuracea* on murine macrophages *in vivo* and *in vitro*. Peritoneal macrophages were collected using peritoneal lavage method and the culture system was established. Chick red blood cell phagocytosis test, fluorescent probe technique, total nitric oxide assay and enzyme-linked immunosorbent assay were carried out to measure phagocytic activity, the content of nitric oxide, the levels of tumor necrosis factor- α , interleukin-1, interleukin-6 and interleukin-12 in culture supernatant, respectively. The results showed that polysaccharide from *O. furfuracea* in the range of certain concentration enhanced the phagocytosis ability and NO content of murine macrophages *in vivo* and cultured *in vitro*, and improved the secretion level of tumor necrosis factor- α , interleukin-1, interleukin-6 and interleukin-12 in culture supernatant, compared with control group. So, the immune function of murine macrophages could be modulated by polysaccharide from *O. furfuracea* at a certain concentration.

Key words: *Oudemansiella furfuracea*; polysaccharide; murine macrophages; cytokine; immunomodulation

多糖 (polysaccharide), 又称为多聚糖, 是指由 10 个以上的单糖分子缩合的多聚物^[1]。在自然界

中广泛分布于动物、植物和微生物中, 并在真菌细胞壁中约占 90%^[1]。近年来研究发现, 多糖具有多种重要的生物学功能, 如免疫调节^[2]、抗氧化^[3,4]和抗肿瘤^[5]等。

鳞柄小奥德蘑 (*Oudemansiella furfuracea*) 归属蘑菇目膨瑚菌科狭义小奥德蘑属^[6], 其口味鲜美, 营养丰富, 经济价值较高, 主要种植于北京、河北、山东、江苏等华北地区。目前对该物种的研究主要集中

收稿日期:2020-02-14 接受日期:2020-04-27

基金项目:河北省自然科学基金青年科学基金(C2018408059);河北省高等学校科学技术研究项目重点项目(ZD2019068);大学生创新创业训练计划(201910100036)

*通信作者 Tel:86-316-2188391; E-mail:wangjing@lfnu.edu.cn, ouc-flora@163.com

中在栽培和活性物质提取等方面^[3,7]。

巨噬细胞是机体非特异性免疫的重要组成部分,可产生肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、NO等炎症有关的细胞因子(cytokine)或信号分子,在天然免疫和获得性免疫中执行重要功能^[2,7]。本文通过体内实验和体外实验研究了初步分离纯化的鳞柄小奥德蘑多糖对小鼠巨噬细胞吞噬能力和细胞因子分泌量等免疫功能的影响,为其进一步开发利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鳞柄小奥德蘑(*Oudemansiella furfuracea*)购自河北廊坊,由河北省食药用菌资源高值利用技术创新中心完成菌种鉴定^[3]。ICR小鼠为斯贝福(北京)生物技术有限公司产品(许可证号SCXX(京)2016-0002),雄性,5~6周龄,体重25 g左右;F12K培养基为美国Sigma公司产品;特级胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)为天津灏洋生物制品科技有限公司产品;DAF-FM双乙酸盐(DAF-FM DA)一氧化氮(NO)荧光探针、总一氧化氮检测试剂盒和双辛丁酸法(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒为上海碧云天生物技术有限公司产品;小鼠TNF- α 、IL-1、IL-6和白细胞介素-12(interleukin-12, IL-12)检测试剂盒为青岛海德诚生物工程有限公司产品;脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、MD44透析袋(截留分子量3.5 kD)和24孔板用细胞爬片为北京索莱宝科技有限公司产品。实验所需其它试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

Milli-Q超纯水机为美国Millipore公司产品;ALPHA 1-2冷冻干燥机为德国Martin Christ公司产品;CKX41SF倒置显微镜(装有数码显微照相装置DP71)和BX53荧光显微镜(装有数码显微照相装置DP73)为日本Olympus公司产品;MCO-20AIC二氧化碳培养箱为日本SANYO公司产品;iMark酶标仪为美国Bio-Rad公司产品。

1.3 方法

1.3.1 鳞柄小奥德蘑多糖的提取和纯化

参考Wang等^[3]方法,将鳞柄小奥德蘑子实体置于50℃恒温干燥箱中烘干,粉碎机粉碎、铜网过滤、95%乙醇除脂、低温烘干后,采用热水浸提、离心、除蛋白、透析和真空冷冻干燥等方法,得到鳞柄

小奥德蘑多糖(polysaccharide from *O. furfuracea*, OFP)样品。将多糖样品用0.09 g/L氯化钠溶液(生理盐水)配成母液,孔径为0.22 μm的无菌针头滤器抽滤后冷藏备用。

多糖含量和蛋白质含量测定分别采用苯酚-硫酸法和BCA法(蛋白质浓度测定试剂盒)。

1.3.2 巨噬细胞的收集

灌洗腹腔法。参考Zhang等^[8]方法并稍改进,将小鼠处死后,75%医用酒精中浸泡2 min,重复2次转入超净工作台,取F12K培养液5 mL注入小鼠腹腔,轻柔腹部,吸取腹腔液,离心,将沉淀用F12K培养液(含10% FBS)悬浮后按 5×10^6 个/mL的细胞密度,接种至培养板中,5% CO₂培养箱中37℃培养^[9]。

1.3.3 多糖处理

体内实验。将ICR小鼠适应性饲养3天后,随机分为空白对照组、多糖处理组和阳性对照组,各组设5个重复,自由摄食和饮水。阳性对照组腹腔注射20 mg/L的LPS溶液1 mL,多糖处理组分别腹腔注射50、100和200 mg/L的鳞柄小奥德蘑多糖溶液1 mL,空白对照组腹腔注射1 mL无菌生理盐水,正常饲养24 h后,按“1.3.2”方法收集巨噬细胞,鸡血红细胞吞噬法测定巨噬细胞的吞噬能力,荧光探针法测定细胞中NO含量。

体外实验。按“1.3.2”方法收集和接种ICR小鼠巨噬细胞,待细胞贴壁后,吸弃上层培养基,添加不含血清的F12K培养液,并将细胞分为阳性对照组、多糖处理组和空白对照组。阳性对照组添加终浓度为20 mg/L的LPS,多糖处理组分别添加终浓度为50、100和200 mg/L的无菌鳞柄小奥德蘑多糖溶液,空白对照组添加等量的无菌生理盐水,继续培养24 h后,分别收集细胞和培养上清。鸡血红细胞吞噬法测定巨噬细胞的吞噬能力,荧光探针法测定细胞中NO含量,酶联免疫吸附实验测定细胞培养上清中TNF- α 、IL-1、IL-6和IL-12的浓度。

1.3.4 细胞吞噬能力测定

鸡血红细胞吞噬法。参考Wang等^[8,10]方法稍改进,收集细胞至洁净载玻片上(体内实验)或吸弃细胞培养板中培养液(体外实验),添加1%(体积比)鸡血红细胞悬液,经37℃孵育、磷酸缓冲溶液漂洗、4%多聚甲醛固定、吉姆萨染液(工作液)染色、流水冲洗后镜检。巨噬细胞的吞噬能力用吞噬百分率(%)来评价,以吞噬鸡血红细胞的巨噬细胞

数量和巨噬细胞总数的比值表示^[10]。

1.3.5 NO 含量的检测

荧光探针法^[7]检测巨噬细胞内 NO 含量。按“1.3.3”方法收集腹腔注射多糖处理 24 h 的巨噬细胞, 离心后加入适量荧光探针。或按“1.3.2”方法收集小鼠巨噬细胞, 接种至培养板(内置细胞爬片)中, 添加不同浓度多糖处理后, 取出细胞爬片, 细胞面朝上置于湿盒中, 加入适量荧光探针^[7]。参照 DAF-FM DA 试剂盒说明, 用稀释 400 倍的探针, 孵育细胞 30 min, 洗涤 2 次后, 荧光显微镜拍照, 软件 IPP(Image-Pro Plus)分析和测定平均光密度值(相对值)^[7]。

用硝酸盐还原酶还原硝酸盐为亚硝酸盐后, Griess 法检测巨噬细胞培养上清中总一氧化氮浓度。按照试剂盒说明, 用超纯水配制 2 mmol/L NADPH, 并将试剂盒中 NaNO₂ 标准品稀释成 0、2、5、10、20 和 40 μmol/L。实验前将 Griess reagent I 和 II, 室温放置 30 min, 在 96 孔细胞培养板中依次加入标准品或巨噬细胞培养上清 60 μL、2 mmol/L NADPH 5 μL、FAD 10 μL 和 Nitrate reductase 5 μL, 混匀, 37 °C 孵育 30 min; 依次加入 LDH Buffer 10 μL、LDH 10 μL, 混匀, 37 °C 孵育 30 min; 加入 Griess reagent I 50 μL 和 Griess reagent II 50 μL, 混匀后室温孵育 10 min。每组设 3 个重复。酶标仪测定 A_{540 nm}, 根据 NaNO₂ 浓度标准曲线计算各实验组 NO 浓度。

1.3.6 TNF-α、IL-1、IL-6 和 IL-12 分泌量的测定

酶联免疫吸附实验(双抗体夹心法)^[9]。参照试剂盒说明操作, 并根据各标准品的浓度曲线计算培养上清中 TNF-α、IL-1、IL-6 和 IL-12 浓度。

1.4 数据统计分析

实验结果以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,

SPSS 20.0 软件进行单因素 ANOVA, 新复极差检验(Duncan 法)进行组间差异性比较(多重比较), $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 鳞柄小奥德蘑多糖含量

以葡萄糖为标准糖, 采用苯酚-硫酸法测定鳞柄小奥德蘑多糖样品中糖含量, 得到葡萄糖浓度 x 与吸光度值 A 的直线回归曲线为 $y = 0.0168x + 0.0316$; 决定系数^[11] $r^2 = 0.9980$, 表示糖浓度与吸光度值之间具有良好的线性正相关关系, 经计算, 鳞柄小奥德蘑多糖样品中糖含量为 88.75% ± 1.24%, 考虑到多糖提取工艺中的多次透析过程和透析袋的截留的分子量(3.5 kD)大小, 认为鳞柄小奥德蘑多糖样品中多糖含量为: 88.75% ± 1.24%。以牛血清白蛋白 BSA 为标准蛋白, 采用 BCA 法测定鳞柄小奥德蘑多糖样品中蛋白质含量, 得到蛋白质浓度 x 与吸光度值 A 的直线回归曲线为 $y = 0.7439x + 0.0079$; 决定系数 $r^2 = 0.9918$, 表示蛋白质浓度与吸光度值之间具有良好的相关关系, 经计算, 鳞柄小奥德蘑多糖样品中蛋白质含量为 0.96% ± 0.05%。说明, 提取的鳞柄小奥德蘑多糖中的蛋白质已被有效去除。

2.2 体外培养的小鼠巨噬细胞

采用 F12K 培养液灌洗腹腔、离心收集和无菌接种等方法, 启动小鼠巨噬细胞的原代培养。结果显示, 体外培养的小鼠巨噬细胞透光性较好, 接种培养板 24 h 后, 绝大多数细胞已贴壁或半贴壁, 贴壁牢固, 呈不规则形态(见图 1), 这与 Ni^[12] 和 Yu^[13] 等分离和体外培养的巨噬细胞生长状态相似。巨噬细胞为终末分化细胞, 体外无法增殖, 为防止胎牛血清(FBS)中免疫相关蛋白或细胞因子对实验结果的影响, 体外接种培养 24 h 后, 将含 10% FBS 的 F12K

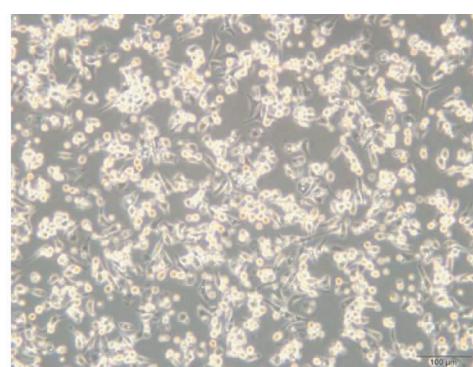


图 1 接种培养 24 h 后的小鼠巨噬细胞(标尺 = 100 μm)

Fig. 1 Murine peritoneal macrophages cultured *in vitro* for 24 h (scale = 100 μm)

培养液更换为不含血清的 F12K 培养液。结果显示,短期无血清培养不会影响细胞的 RNA 的转录和蛋白质的合成^[14],但时间过长(超过 24 h)会导致培养细胞的大量死亡^[15],故本实验将鳞柄小奥德蘑多糖处理的时间控制在 24 h。

2.3 多糖对小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响

巨噬细胞由血液循环中的单核细胞进入组织后分化而来,能够吞噬和清除凋亡细胞及非功能性的胞外成分^[16]。本实验采用鸡血红细胞吞噬法检测了多糖处理前后小鼠巨噬细胞吞噬能力的变化。结果显示,与空白对照组相比,20 mg/L LPS 处理组和 200 mg/L 鳞柄小奥德蘑多糖处理组巨噬细胞的吞噬能力显著增强(见图 2)。

2.4 多糖对小鼠巨噬细胞合成 NO 的影响

NO 是在外界信号刺激下,由巨噬细胞、血管内

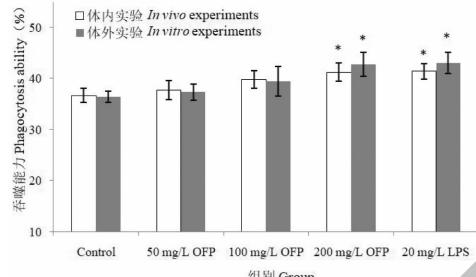


图 2 鳞柄小奥德蘑多糖对小鼠巨噬细胞吞噬能力的影响

Fig. 2 Effect of OFP on phagocytic activity of murine peritoneal macrophages.

注: * 与空白对照组相比, $P < 0.05$ 。Note: * Compared with control group, $P < 0.05$.

皮细胞或神经细胞等多种细胞合成的、可跨质膜自由扩散的信号分子^[17]。细胞内的 NO 可使用荧光探针 DAF-FMDA 检测,荧光的强弱间接反映细胞中 NO 的含量^[7,9];细胞培养上清中 NO 含量可使用总 NO 测定试剂盒(硝酸盐还原酶 + Griess 法)检测^[7,9]。实验结果显示,与空白对照组(生理盐水组)相比,腹腔注射 50 ~ 200 mg/L 鳞柄小奥德蘑多糖处理 24 h,小鼠巨噬细胞中荧光探针的平均光密度值均显著增强($P < 0.05$),细胞培养上清中总 NO 浓度显著增加($P < 0.05$)(见表 1),具有浓度依赖性(见图 3 和图 5);体外培养体系中添加终浓度为 50 ~ 200 mg/L 鳞柄小奥德蘑多糖处理 24 h,巨噬细胞中荧光探针的平均光密度值亦显著增强($P < 0.05$),细胞培养上清中总 NO 浓度显著亦增加($P < 0.05$)(见表 1),具有浓度依赖性(见图 4 和图 5);相同浓度的多糖内外处理 24 h 对小鼠巨噬细胞 NO 的合成无显著性差异。说明,鳞柄小奥德蘑多糖处理 24 h 可促进巨噬细胞细胞质中 NO 的合成量。

2.5 多糖对小鼠巨噬细胞 TNF- α 、IL-1、IL-6 和 IL-12 分泌量的影响

为进一步研究鳞柄小奥德蘑多糖对巨噬细胞免疫功能相关的细胞因子分泌量的影响,收集体外实验的巨噬细胞培养上清,并参照试剂盒说明进行酶联免疫吸附实验。结果显示,原代培养的小鼠巨噬细胞可分泌 TNF- α 、IL-1、IL-6 和 IL-12(见表 1),其中 TNF- α 、IL-1 和 IL-6 的浓度较高,分别为 64.40 ±

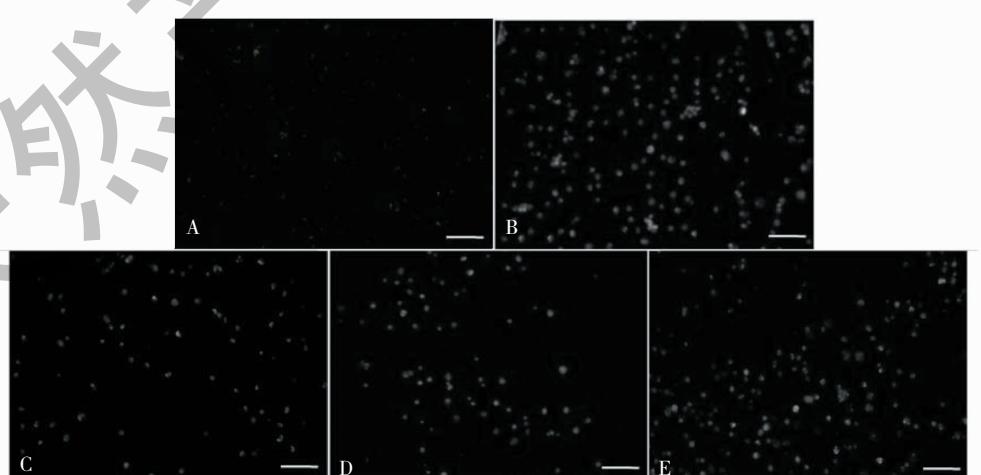


图 3 NO 荧光探针标记的体内实验的小鼠巨噬细胞(标尺 = 100 μ m)

Fig. 3 Murine peritoneal macrophage treated by OFP *in vivo* and stained by NO fluorescence probe (scale = 100 μ m)

注:A:空白对照组;B:20 mg/L LPS 处理组;C ~ E:50,100,200 mg/L 鳞柄小奥德蘑多糖处理组;下同。Note: A: Control; B: Treated with 20 mg/L LPS; C ~ E: Treated with 50, 100 and 200 mg/L OFP, respectively; The same below.

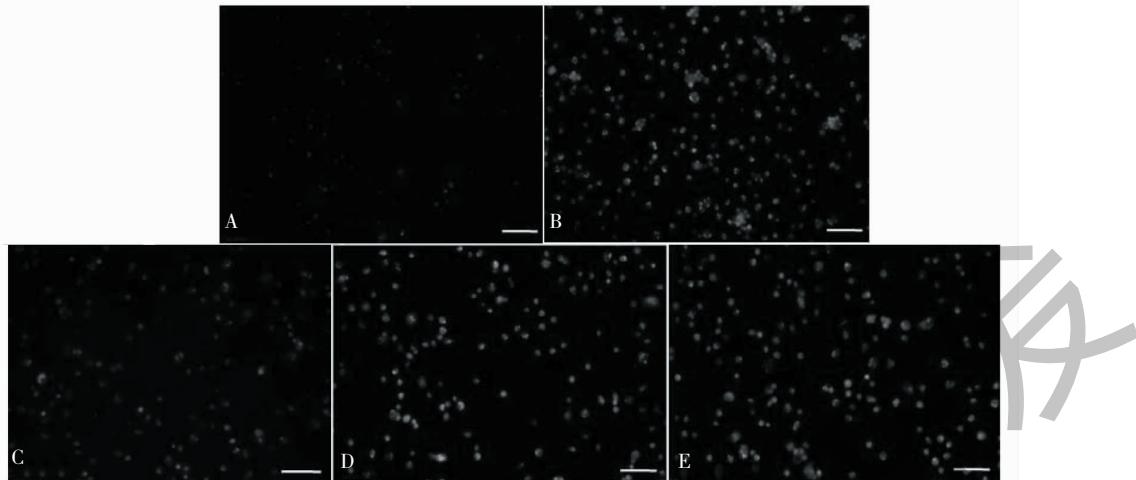


图 4 NO 荧光探针标记的体外培养的小鼠巨噬细胞(标尺=100 μm)

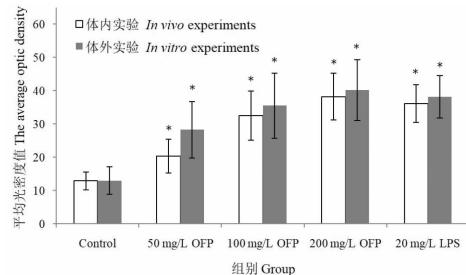
Fig. 4 Murine peritoneal macrophages cultured *in vitro*, treated by OFP and stained by NO fluorescence probe (scale = 100 μm).

图 5 各组小鼠巨噬细胞中 NO 荧光的平均光密度值

Fig. 5 The average optic density of NO fluorescence in murine peritoneal macrophages in different groups.

注: * 与空白对照组相比, $P < 0.05$ 。Note: * Compared with control group, $P < 0.05$.

1. 50、62. 60 ± 1. 75 和 96. 33 ± 2. 13 ng/L(见表 1), IL-12 浓度较低, 只有 3. 76 ± 0. 04 ng/L(见表 1)。与空白对照组相比, 鳞柄小奥德蘑多糖处理可不同程度的影响小鼠巨噬细胞对 TNF-α、IL-1、IL-6 和 IL-12 的分泌量。其中, 终浓度为 50 ~ 200 mg/L 的鳞柄小奥德蘑多糖处理 24 h 可极显著提高巨噬细胞对 IL-6 和 IL-12 的分泌量($P < 0.01$)(见表 1), 终浓度为 100 ~ 200 mg/L 的鳞柄小奥德蘑多糖可显著提高巨噬细胞对 TNF-α、IL-1 的分泌量($P < 0.05$)(见表 1)。

3 讨论和结论

目前, 对鳞柄小奥德蘑多糖的生物学活性的研究

表 1 鳞柄小奥德蘑多糖对小鼠巨噬细胞 NO、TNF-α、IL-1、IL-6、IL-12 分泌量的影响

Table 1 Effects of OFP on the secretion of NO、TNF-α、IL-1、IL-6、IL-12 of murine macrophages.

组别 Group	添加量 Dose (mg/L)	NO (μmol/L)	TNF-α (ng/L)	IL-1 (ng/L)	IL-6 (ng/L)	IL-12 (ng/L)
空白对照组 Control	0	2.79 ± 0.11	64.40 ± 1.50	62.60 ± 1.75	96.33 ± 2.13	3.76 ± 0.04
多糖处理组 Treated by OFP	50	3.32 ± 0.05 *	65.48 ± 0.60	74.65 ± 3.30	172.40 ± 1.60 **	4.77 ± 0.18 **
	100	4.34 ± 0.08 *	73.60 ± 0.00 *	81.45 ± 6.60 *	203.78 ± 5.85 **	5.13 ± 0.20 **
	200	4.56 ± 0.12 *	76.60 ± 5.56 *	96.80 ± 2.22 *	236.22 ± 4.15 **	5.83 ± 0.11 **
LPS 对照组 Treated by LPS	20	5.53 ± 0.11 *	93.45 ± 2.35 **	90.23 ± 0.43 *	123.99 ± 2.13 *	6.30 ± 0.18 **

注: 与空白对照组相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。Note: Compared with control group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

究,集中在抗氧化活性和免疫调节方面。如 Ma^[18]通过灌胃小鼠,发现一定鳞柄小奥德蘑多糖可提高实验动物 CD4⁺T 淋巴细胞含量,促进脾淋巴细胞的增殖,提高血清中 IL-2、IL-4、IFN-γ 和 TNF-α 含量。本实验室前期通过建立细胞共培养体系,研究了鳞

柄小奥德蘑多糖对其中的大鼠肺巨噬细胞系和结直肠癌细胞的影响。发现鳞柄小奥德蘑多糖可提高肺巨噬细胞系对 NO 和 TNF-α 的分泌,从而抑制结直肠癌细胞的增殖^[7]。以上研究过程和结果均未涉及鳞柄小奥德蘑多糖对体外培养的正常的巨噬细胞

免疫功能的调节作用。

研究发现,LPS或其他免疫调节剂的刺激,可引起巨噬细胞极化为M1型巨噬细胞^[19,20],表达NO^[21]、TNF- α 、IL-1和IL-6等多种细胞因子或信号分子^[22],产生活性氮或活性氧^[23,24],调节机体的免疫功能^[7]、抑制病原菌增殖^[22]和诱导细胞凋亡^[24]。

为了深入了解鳞柄小奥德蘑多糖对机体正常的巨噬细胞的影响作用,本论文采用灌洗腹腔的方法,获得了原代培养的小鼠巨噬细胞。利用巨噬细胞的体外培养体系并结合腹腔注射多糖实验,采用荧光探针标记、总一氧化氮测定和酶联免疫吸附实验等方法,较系统的研究了鳞柄小奥德蘑多糖对小鼠巨噬细胞吞噬能力、细胞中NO合成量、培养上清中NO和细胞因子分泌量的影响。结果显示,一定浓度的鳞柄小奥德蘑多糖处理可显著增强巨噬细胞吞噬能力,提高细胞对NO、TNF- α 、IL-1、IL-6和IL-12的合成和分泌。推测,鳞柄小奥德蘑多糖可刺激巨噬细胞极化为M1型,进而调节机体的免疫能力^[9]。研究结果对相关功能性食品或保健品的开发提供理论基础。

参考文献

- Li MC, Xing LJ. Biology of the Fungal Cell(真菌细胞生物学)[M]. Beijing: Science Press, 2013: 78-80.
- Cao J, Tang D, Wang Y, et al. Characteristics and immune-enhancing activity of pectic polysaccharides from sweet cherry(*Prunus avium*) [J]. Food Chem, 2018, 254: 47-54.
- Wang J, Fei S, Meng YH, et al. Extraction and antioxidant activity of polysaccharides from *Oudemansiella furfuracea* [J]. Sci Tech Food Ind(食品工业科技), 2017, 38(19): 172-176.
- Song X, Tang J. Extraction optimization, preliminary characterization and bioactivities in vitro of *Ligularia hodgsonii* polysaccharides[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17: 788.
- Zhu M, Hou YL, Tang X, et al. The study of immunomodulatory activities, cytotoxicity and anti-tumor activities of polysaccharide from *Amanita caesarea*(AC-1) *in vitro*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019, 31: 1481-1490.
- Yang Z L, Zhang LF, Mueller GM, et al. A new systematic arrangement of the genus *Oudemansiella* s. str. (Physalaciaceae, Agaricales) [J]. Mycosistema, 2009, 28(1): 1-13.
- Zhang SN, Liu ZZ, Zhao M, et al. Effect of polysaccharides from *Oudemansiella furfuracea* on alveolar macrophages' growth inhibiting of colorectal adenocarcinoma cells cultured *in vitro*[J]. Southwest China J Agr Sci(西南农业学报), 2019, 32: 1340-1346.
- Zhang SL, Li SF. Separation, cultivation and identification of mouse peritoneal macrophages [J]. Hainan Med J(海南医学), 2014, 25: 2814-2815.
- Wang J, Zhang CD, Yang LM, et al. Activation effects of extracellular polysaccharides produced by *Pleurotus ferulace* Lanzi on murine macrophage [J]. Sci Tech Food Ind(食品工业科技), 2016, 37(10): 356-359.
- Wang J, Yan XY, Wang WL, et al. Effect of extracellular polysaccharides produced by *Pleurotus ferulace* Lanzi on immune function of tumor-bearing mice [J]. Food Sci(食品科学), 2014, 35(15): 268-271.
- Li CX, Jiang LN, Shao Y, et al. Biostatistics(生物统计学)[M]. Beijing: Science Press, 2013.
- Ni LG, Zhao XT, Wang XY, et al. Separation, culture and identification of Jiangquhai porcine alveolar macrophages [J]. Jiangsu Agr Sci(江苏农业科学), 2017, 45(23): 163-165.
- Yu Q, Hu JT, Lai J, et al. Comparison of the biological characteristics of primary rat macrophages extracted by three methods [J]. Chinese J Tissue Eng Res(中国组织工程研究), 2018, 22: 3863-3868.
- Zetterberg A, Sköld O. The effect of serum starvation on DNA, RNA and protein synthesis during interphase in L-cells [J]. Exp Cell Res, 1969, 57(1): 114-118.
- Kues WA, Anger M, Carnwath JW, et al. Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors [J]. Biol Reprod, 2000, 62: 412-419.
- Xi D, Lu TL. The origin and self-renewal of macrophages [J]. Curr Immuno(现代免疫学), 2016, 36: 415-419.
- Grodzki A CG, Poola B, Pasupuleti N, et al. A novel carboline derivative inhibits nitric oxide formation in macrophages independent of effects on tumor necrosis factor α and interleukin-1 β expression [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2015, 352: 438-447.
- Ma H. Research on physicochemical immunity function and protection from liver injury of polysaccharide from *Oudemansiella furfuracea* [D]. Changchun: Jilin Agricultural University(吉林农业大学), 2018.
- Ruan JY, Chen BC, Zhang XL, et al. Progress in signaling pathways of macrophage M1/2 polarization [J]. Immunol J(免疫学杂志), 2015, 31: 911-917.
- Thomas AC, Mattila JT. "Of mice and men": arginine metabolism in macrophages [J]. Front Immunol, 2014, 479-479.
- Mills CD. M1 and M2 macrophages: oracles of health and disease [J]. Crit Rev Immunol, 2012, 32: 463-488.