

红毛五加多糖单一组分 AHP-III 对巨噬细胞的免疫调节作用及其机制

许 财¹, 郭晓晓², 马 媛¹, 王麒超¹, 孟爱霞², 陈 永^{2*}

¹潍坊医学院生命科学与技术学院; ²潍坊医学院基础医学院, 潍坊 261000

摘要:探讨红毛五加多糖(*Acanthopanax giraldii* Hams polysaccharide)单一组分 AHP-III (*Acanthopanax giraldii* Hams polysaccharide III) 对小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 的激活作用及机制。不同浓度 AHP-III 作用 RAW 264.7 细胞, 中性红试验检测细胞吞噬能力; ELISA 和 Griess 法检测其 IL-6、TNF- α 和 NO 的释放量; RT-qPCR 检测 iNOS、TNF- α 和 IL-6 mRNA 相对表达水平; Western blot 检测 NF- κ B 信号通路相关蛋白磷酸化水平。在实验浓度范围内, AHP-III 可显著增强 RAW 264.7 细胞的吞噬能力 ($P < 0.05$); 促进 RAW 264.7 分泌 NO、TNF- α 和 IL-6 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$); 并显著增加 RAW 264.7 细胞中 IL-6、TNF- α 和 iNOS mRNA 的表达量, 呈剂量依赖性; Western blot 结果表明, AHP-III 作用 RAW 264.7 细胞后, NF- κ B 中的 p65、IKK β 、I κ B α 磷酸化水平明显升高。结果显示红毛五加多糖 AHP-III 对小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 具有显著激活作用。

关键词:红毛五加多糖; RAW 264.7 细胞; 免疫调节; 核转录因子 (NF- κ B)

中图分类号: Q291

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)1-0027-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.1.004

Immunomodulatory effect and its mechanism of *Acanthopanax giraldii* Hams polysaccharide III on macrophages

XU Cai¹, GUO Xiao-xiao², MA Yuan¹, WANG Qi-chao¹, MENG Ai-xia², CHEN Yong^{2*}

¹School of Life Science and Technology, Weifang Medical College;

²Basic Medical College of Weifang Medical College, Weifang 261000, China

Abstract: To study the activation and mechanism of *Acanthopanax giraldii* Hams polysaccharide III (AHP-III) on mouse macrophage RAW 264.7. After RAW 264.7 macrophages were stimulated with the different concentrations of AHP-III, the phagocytic ability was conducted by neutral red method. The release capacity of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and NO under different concentrations of AHP-III stimulation were tested by the ELISA and the Griess, and the transcription level of inducible NO synthase (iNOS), TNF- α and IL-6 was determined by RT-qPCR, then were detected by Western blot phosphorylation of NF- κ B signaling pathway related proteins. Compared with normal control group, AHP-III can significantly improve the phagocytic ability of RAW 264.7 ($P < 0.05$) within the test concentration range. Also, it can promote RAW 264.7 to secrete NO, TNF- α and IL-6 ($P < 0.05$ or $P < 0.001$). According to the result of RT-qPCR, in a dose-dependent manner, AHP-III can significantly improve the expression level of IL-6, TNF- α and iNOS. Western blot suggested that after stimulation of AHP-III, the phosphorylation level of p65, IKK β and I κ B α in NF- κ B were significantly improved. The results showed that AHP-III could significantly activate RAW 264.7 mouse macrophage.

Key words: *Acanthopanax giraldii* Hams polysaccharide; RAW 264.7 cell; immunomodulatory; NF- κ B

中药红毛五加皮为五加科植物红毛五加 (*Acanthopanax giraldii* Hams) 的茎皮, 主产于甘肃、宁夏、

青海、四川等地, 具有祛风湿, 强筋骨, 活血利水之功效^[1]。红毛五加多糖 (*Acanthopanax giraldii* Hams polysaccharide) 为其有效成分之一, 具有抗肿瘤^[2]、抗病毒^[3]、保肝^[4]、免疫调节^[5]等药理作用。

巨噬细胞广泛分布于机体不同组织中, 不但参与固有免疫反应和适应性免疫, 而且是两者间的

收稿日期: 2021-07-05 接受日期: 2021-11-10

基金项目: 国家自然科学基金 (81303198); 山东省大学生创新创业训练计划 (S202010438002)

* 通信作者 Tel: 86-536-8462531; Email: chen_y@wfmc.edu.cn.com

“桥梁细胞”^[6],活化的巨噬细胞可吞噬外来异物或直接杀死病原体和肿瘤细胞;并可通过释放肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、NO等相关细胞因子参与机体的免疫应答。已有研究表明,中药多糖可以激活巨噬细胞促进 TNF- α 、IL-6 和 NO 等细胞因子的释放^[7]。

本文以课题组前期从红毛五加皮中提取到的多糖单一组分 AHP-III^[8]为研究对象研究其对小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 细胞的活化作用,并尝试探讨其机制。

1 试剂与仪器

1.1 材料与试剂

红毛五加多糖 AHP-III(由课题组前期制备);小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7,购于中国科学院细胞库。

DMEM 高糖培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号分别为 8119461、1618862);Mouse IL-6 Uncoated ELISA Kit 和 Mouse TNF- α ELISA Kit(美国 Thermo 公司,批号分别为 229646-005、228922-007);总一氧化氮检测试剂盒和 CCK-8 检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 0827220201019、010919190704);TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus)(中国 TaKaRa 公司,批号:AJF2613A);NF- κ B p65 Rabbit mAb、phospho-NF- κ B p65 Rabbit mAb、IKK- β (D30C6) Rabbit mAb、Phospho-IKK α / β (Ser176/180) Rabbit mAb、I κ B α (L35A5) Mouse mAb、Phospho-I κ B α (Ser32) Rabbit mAb(美国 Cell Signaling 公司,批号分别为 8242、3033、8943、2697、7074、7076、4814、2859);其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器设备

HERACELL 150i 200 型 CO₂ 细胞培养箱(丹麦 Heto 公司);HE LaserJet 1020 plus Epoch 超微量分光光度计购于(美国 Bio Tek 公司);LightCycler 480 II 实时荧光定量 PCR 仪(罗氏公司);Amersham Imager 600 超灵敏数字发光成像仪(Cytiva 公司)。

2 实验方法

2.1 细胞培养

RAW 264.7 巨噬细胞用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于 CO₂ 培养箱中 37 °C 5% CO₂ 常规培养,每 3 天传代 1 次,传代比例 1:3,传代次数不超过 30 代。

2.2 吞噬能力检测

采用中性红吞噬法^[9]检测巨噬细胞吞噬能力。将细胞按 7×10^4 个/孔,接种于 96 孔板,37 °C 5% CO₂ 条件下培养过夜。实验孔中加入不同浓度(25、50、100 μ g/mL) AHP-III,对照(LPS)孔中加入 0.1 μ g/mL LPS,空白(blank)孔加入相同体积培养基,37 °C 5% CO₂ 培养 24 h。每孔加入 1% 中性红溶液 20 μ L,继续培养 2 h 后,PBS 洗涤 3 次,每孔加 200 μ L 中性红检测裂解液,室温摇床上裂解 10 min,酶标仪 540 nm 检测各孔吸光度值。计算吞噬率:吞噬率 = (实验组吸光度值/空白组吸光度值) \times 100%。

2.3 TNF- α 、IL-6 分泌量检测

按“2.2”的实验分组给药,培养 24 h 后收集上清,按照 Thermo 公司 ELISA 试剂盒说明书,酶标仪测定吸光度($A_{450\text{nm}}$),根据标准曲线计算上清中的 IL-6 和 TNF- α 的浓度。

2.4 NO 分泌量检测(Griess 法)^[10]

按“2.2”的试验分组给药,培养 24 h 后收集上清(60 μ L),按照试剂说明书进行操作,与 Griess 试剂混合,避光反应 10 min,酶标仪 540 nm 测定吸光度。NO 浓度参考 NaNO₂(2 ~ 80 μ mol/L)标准曲线计算。

2.5 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)^[11]

取对数生长的 RAW 264.7 细胞调节浓度至 7.5×10^5 个/mL,每孔 2 mL 接种于 6 孔板中,37 °C 5% CO₂ 条件下培养过夜。按“2.2”的实验分组给药,37 °C 5% CO₂ 培养 24 h。Trizol 试剂提取总 RNA。利用 HiFiScript cDNA 第一链合成试剂盒反转录成 cDNA。每样品各取 1 μ L 的 cDNA 按照 TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II 说明书进行 RT-qPCR 反应,所用引物如表 1 所示。反应条件为:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 30 s,54 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s 共循环 30 次,73 °C 终末延伸 5 min。程序运行结束后,记录收集 Ct 值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组 mRNA 相对表达量。

2.6 免疫印迹实验^[12]

取对数生长的 RAW 264.7 细胞调节浓度至 2×10^6 个/mL,每个培养皿($d = 60$ mm)加入 1 mL 细胞悬液,4 mL 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,37 °C 5% CO₂ 培养过夜,按“2.2”的实验分组给药后继续培养 1 h。加入 RIPA 细胞裂解液,反复吹打细胞直至细胞完全裂解,离心收集上清,提取蛋白,BCA

表 1 RT-qPCR 所用引物序列
Table 1 Primers used in RT-qPCR

基因名称 Gene name	上游引物(5'→3') Forward primer(5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse primer(5'→3')	产物长度 Product length (bp)
β -actin	TCTTTGCAGCTCCTTCGTTGCCGGTCC	GTCCTTCTGACCCATTCCCACCATCACAC	176
IL-6	TGTGCAATGGCAATTCTGAT	GGTACTCCAGAAGACCAGAGGA	156
TNF- α	CAGGCGGTGCCTATGTCTC	CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG	89
iNOS	GCCACCAACAATGGCAACAT	TCGATGCACAACACTGGGTGAA	176

法测定总蛋白浓度。每组各取 40 μ g 蛋白上样,于 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白(浓缩胶电压 80 V,30 min;分离胶电压 100 V,60 min)。将分离后的蛋白转移(100 mA,60 min)至 PVDF 膜。加入 5% 脱脂奶粉于摇床上室温封闭 1 h,再分别加入一抗抗体(体积稀释比例均为 1:1 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日以 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;之后加入 HRP 标记的二抗(体积稀释比例为 1:1 000),于室温反应 1 h;用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。按 ECL 试剂盒说明书进行曝光显影。

2.7 统计学分析

实验数据均采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。组间差异用 *t* 检验进行, $P < 0.05$ 表示有统计学显著性差异。

3 实验结果

3.1 AHP-III 对 RAW 264.7 细胞免疫活性影响检测

3.1.1 AHP-III 对巨噬细胞 RAW 264.7 吞噬能力的影响

与空白组相比,AHP-III 在实验浓度范围内(25 ~ 100 μ g/mL)均可增强 RAW 264.7 细胞的吞噬能

力($P < 0.05$),如图 1 所示。

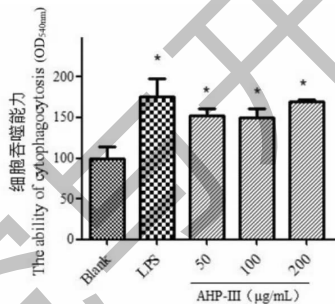


图 1 AHP-III 对 RAW 264.7 细胞吞噬能力的影响

Fig.1 Effect of AHP-III on the phagocytosis of RAW 264.7 cells
注:与空白组相比,* $P < 0.05$ 。Note:Compared with blank group,* $P < 0.05$ 。

3.1.2 AHP-III 对巨噬细胞 RAW 264.7 细胞因子分泌的影响

如图 2 所示,与空白组相比,AHP-III 在 25 ~ 100 μ g/mL 浓度范围内,可显著促进 RAW 264.7 细胞分泌 TNF- α ($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$),并呈剂量依赖性。同时,AHP-III 高剂量实验组可促进 RAW 264.7 细胞分泌 IL-6 ($P < 0.05$)。

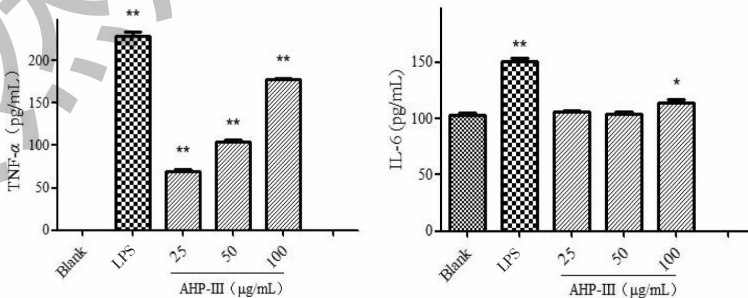


图 2 AHP-III 对 RAW 264.7 细胞释放 TNF- α 、IL-6 的影响

Fig.2 Effect of AHP-III on the release of TNF- α and IL-6 from RAW 264.7 cells

注:与空白组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.001$ 。Note:Compared with blank group,* $P < 0.05$,** $P < 0.001$ 。

3.1.3 AHP-III 对 RAW 264.7 NO 生成的影响

如图 3 所示,AHP-III 在 3 个不同浓度的实验组

均能显著增加 RAW 264.7 细胞 NO 的释放($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$),中、高剂量组释放量高于低剂

量组,且 AHP-III 浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,RAW 264.7 的 NO 释放量最高。

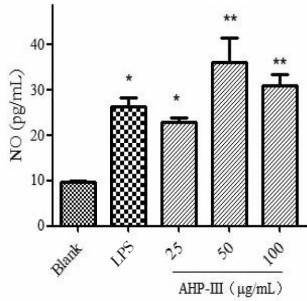


图3 HP-III对RAW 264.7细胞释放NO的影响

Fig. 3 Effect of HP-III on NO release from RAW 264.7 cells

注:与空白组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.001$ 。Note:Compared with blank group,* $P < 0.05$,** $P < 0.001$ 。

3.1.4 AHP-III对巨噬细胞RAW 264.7中TNF- α 、IL-6、iNOS mRNA表达的影响

TNF- α 、IL-6和iNOS基因相对表达水平的结果显示,与空白组相比,AHP-III的25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组TNF- α 基因表达水平显著升高($P < 0.05$),50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组TNF- α 基因表达水平极显著升高($P < 0.001$),如图4A所示。如图4B所示,AHP-III的50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组IL-6基因表达水平显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$)。如图4C所示,AHP-III的25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组iNOS基因表达水平显著升高($P < 0.05$),50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组iNOS基因表达水平极显著升高($P < 0.001$)。并且,与空白组相比AHP-III对巨噬细胞TNF- α 、IL-6和iNOS基因相对表达量的影响具有明显的剂量依赖性。

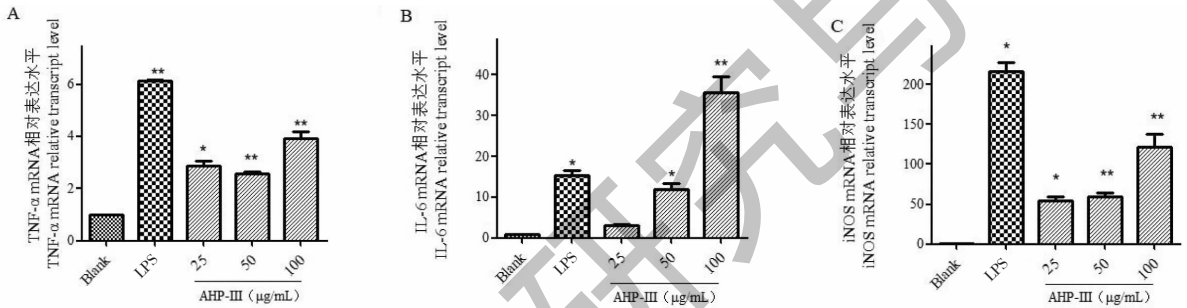


图4 AHP-III对RAW 264.7细胞TNF- α 、IL-6和iNOS mRNA表达水平的影响

Fig. 4 Effect of AHP-III on the expression levels of TNF- α , IL-6 and iNOS mRNA in RAW 264.7 cells

注:与空白组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.001$ 。Note:Compared with blank group,* $P < 0.05$,** $P < 0.001$ 。

3.1.5 AHP-III对巨噬细胞RAW 264.7 NF- κB 信号通路相关蛋白表达影响的测定

如图5所示,与空白组相比,AHP-III实验组中的磷酸化p65(p-p65)/p65蛋白表达水平比值升高,当AHP-III给药浓度为50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时达到最高,且具有显著性差异($P < 0.05$)(见图5B);磷酸化IKK β (p-IKK β)/IKK β 蛋白表达水平比值在实验浓度范围内上升并具有显著性差异($P < 0.001$)(见图5C)。磷酸化I κ B α (p-I κ B α)/I κ B α 蛋白表达水平在实验浓度范围内均高于空白组,且具有显著性差异,但没有剂量依赖性(见图5D)。以上结果表明AHP-III作用RAW 264.7细胞时,细胞内的NF- κB 通路会被激活。

4 讨论与结论

免疫反应通过“识别”和排除抗原性异物,维持机体内环境的平衡和稳定。炎症是由剧烈的免疫反应引起^[13],其特征是协调激活各种信号通路,调节

组织细胞和血液白细胞中促炎和抗炎介质的表达;有效的炎症反应依赖于免疫系统、血管系统和组织之间复杂的细胞和分子相互作用,可提高机体免疫调节功能,例如植物多糖等可激活巨噬细胞增强其吞噬杀伤功能,以及释放相关的细胞因子达到免疫调节作用^[14,15]。

巨噬细胞是机体重要的免疫细胞,在机体中发挥抵抗感染、保持自身内环境稳定以及免疫监视的作用,活化后的巨噬细胞能够产生免疫应答和炎症有关的生物活性分子,如NO、白介素(IL)、肿瘤坏死因子(TNF)等。已有报道表明巨噬细胞能够作为多糖的靶细胞,通常作为理想的细胞模型来评估多糖的免疫调节活性^[16]。Liu等^[17]研究发现西洋参花多糖可通过增强巨噬细胞吞噬能力以及释放免疫因子等方面增强巨噬细胞免疫活性。另外,灵芝多糖和猪苓多糖经研究发现对巨噬细胞同样具有激活作用^[18]。

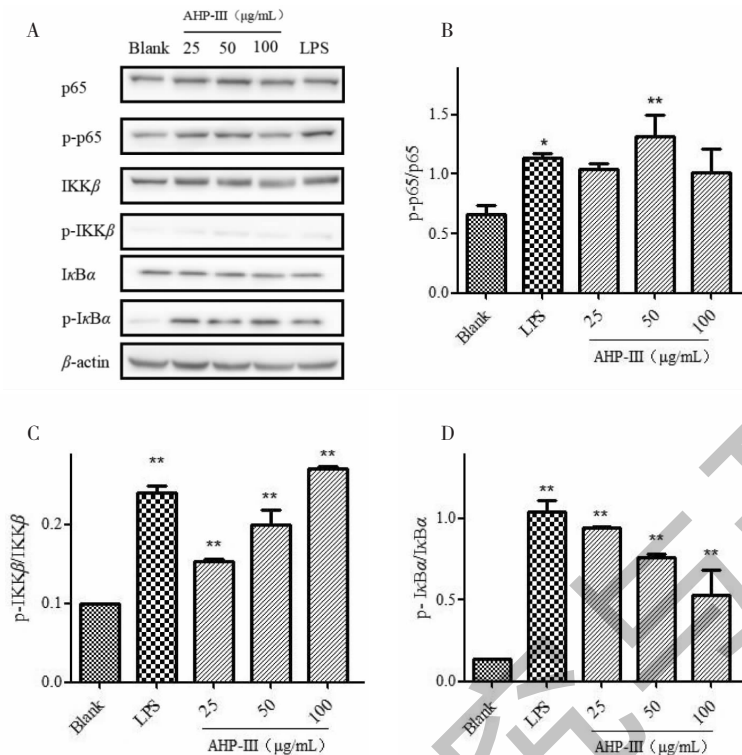


图5 AHP-III对RAW 264.7细胞NF-κB相关蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of AHP-III on expression of NF-κB related protein in RAW 264.7 cells

注:与空白组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.001$ 。Note:Compared with blank group,* $P < 0.05$,** $P < 0.001$ 。

目前关于多糖生物活性的研究多针对粗多糖,其成分复杂,不便于阐明多糖作用机制^[19]。课题组前期从红毛五加粗多糖分离纯化得到3个单一组分^[20],本研究在课题组前期研究的基础上,探讨红毛五加多糖AHP-III对小鼠巨噬细胞RAW 264.7的激活作用及机制。

巨噬细胞的吞噬作用是先天性免疫的基本防御机制,中性红实验表明AHP-III可以增强RAW 264.7细胞的吞噬能力,且在实验浓度范围内具有显著性差异。NO是由巨噬细胞分泌产生的一种信号分子,在机体免疫调节和炎症反应方面起重要作用^[21],由3种NO合成酶催化产生,其中一些外来刺激如干扰素类、炎症因子类(TNF-α、IL-6)等都可激活诱导型NO合酶(iNOS)^[22,23]。IL-6和TNF-α常被用作促炎细胞因子系统激活的标志^[24],RT-qPCR和ELISA实验表明,AHP-III通过提高TNF-α、IL-6基因表达水平,增加该细胞因子释放量,其中ELISA实验中空白组TNF-α细胞因子的释放量低于标准曲线最低阈值,释放量较少,计算结果为0;RT-qPCR实验表明iNOS基因表达水平随着给药剂量增大而升高,且与空白组相比具有显著性差异;同

时,通过Griess试验可知,与空白组相比给药组NO分泌量显著增加。上述实验结果表明AHP-III可通过提高细胞因子基因的表达进而促进细胞因子释放,起到免疫调节作用。

NF-κB长期以来一直被认为是一种典型的促炎信号通路,很大程度上基于促白细胞介素等促炎细胞因子和肿瘤坏死因子激活,可通过巨噬细胞介导炎症反应^[25,26]。RAW 264.7巨噬细胞受TNF-α和IL-6等炎症因子刺激后激活NF-κB信号通路中的IKK激酶,磷酸化的IKK可使IκBα磷酸化并被降解,释放NF-κB二聚体,提高NF-κB信号通路相关蛋白磷酸化水平^[27]。Western blot实验结果表明,AHP-III刺激RAW 264.7巨噬细胞后,NF-κB中的p65、IKKβ和IκBα磷酸化水平明显升高。证实AHP-III可能通过诱导NF-κB中p65和IKKβ磷酸化来激活NF-κB信号通路,进而刺激RAW 264.7巨噬细胞活化。

综上所述,AHP-III试验组相较于空白组RAW 264.7巨噬细胞吞噬能力显著提升,细胞因子NO、IL-6和TNF-α释放量和基因表达水平明显上调,且具有一定的剂量依赖性;同时NF-κB信号通路中的

p65、IKK β 磷酸化水平明显提高。由此可知 AHP-III 可能通过激活 NF- κ B 信号通路达到免疫调节作用, 为红毛五加多糖的进一步开发利用提供理论依据。

参考文献

- Nanjing University of Chinese Medicine. Chinese Medicine Dictionary(2nd Edition) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2006:1419-1420.
- Liu J. Research progress on anti-tumor mechanism of *Acanthopanax sanguinosa* polysaccharide[J]. China Pharm(中国药房), 2012, 23:3743-4744.
- Zhang LX, Liu X, Chang YP, et al. Experimental study on antiviral effect of *Acanthopanax sanguinosa* polysaccharide[J]. J Basic Chin Med, 1999, 5(3):26-28.
- Li Q, Wu J, Zheng BR, et al. Protective effects of polysaccharide AHP-II on hepatocyte injury in rats and its mechanism [J]. Guihaia(广西植物), 2019, 39:880-886.
- Cai WD, Chen Y, Chen ZT. Effect of *Acanthopanax giraldii* Harms polysaccharide on enzyme activity of THP-1 macrophage[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2016, 28:741-744.
- Birk RW, Gratchev A, Hakiy N, et al. Alternative Aktivierung antigenpräsentierender Zellen. Konzept und klinische Bedeutung[J]. Der Hautarzt, 2001, 52(3):193-200.
- Raxidam ABLZ, Li M, Hu JP. Effect of polysaccharide from *Cynomorium songaricum* on the immunoregulatory effect of RAW 264.7 macrophages cell[J]. J Food Saf Qual(食品安全质量检测学报), 2018, 9:5694-5698.
- Chen Y, Lu X, Tan XJ, et al. Isolation and molecular weight of polysaccharides from *Acanthopanax giraldii* Harms [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci(四川大学学报: 自科版), 2005(2):373-376.
- Zhao J, Zhang WJ, Chen Y, et al. Effect of bee pupa polypeptide on the immune activity of macrophage RAW 264.7[J]. Curr Biotechnol(生物技术进展), 2020, 10:550-556.
- Cui XZ, Luan Y, Li TT, et al. Innate immunomodulatory effect of Pine Needle polysaccharide on chicken macrophage HD11 [J]. Sci Agr Sin(中国农业科学), 2020, 53:3180-3186.
- Cai JY, Shao YX, Wang K, et al. Paeoniflorin inhibits activation of RAW 264.7 macrophages induced by high glucose via JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2019, 35(1):56-62.
- Liu WB, Wang JB, Feng LS, et al. Mechanisms of Notoginsenoside FC on inflammation and apoptosis in RAW 264.7 cells through MAPK/NF- κ B pathway [J]. J Shanghai Univ Chin Med(上海中医药大学学报), 2020, 34(5):64-71.
- Cui B, Lin H, Yu J, et al. Autophagy and the immune response[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1206:595-634.
- Taams LS. Inflammation and immune resolution[J]. Clin Exp Immunol, 2018, 193(1):1-2.
- Brady OA, Martina JA, Puertollano R. Emerging roles for TFEB in the immune response and inflammation[J]. Autophagy, 2018;14(2):181-189.
- Wu J, Hu JW, Xiong W. Immunomodulatory effect of polysaccharide isolated from *Cinamomum camphora* fruits on macrophage RAW 264.7[J]. Mod Food Sci Technol(现代食品科技), 2018, 34(9):12-18.
- Liu XY, Zhao Y, Liu L, et al. The extraction of polysaccharides from *American ginseng* flower and immunomodulation activities *in vitro* [J]. Food Ind(食品工业), 2018, 39(1):23-25.
- Huang Q, Li LY, Liu QQ, et al. Advances in immunoregulation effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharide and/or *Polyporus umbellatus* polysaccharide [J]. Food Sci(食品科学), 2020, 41(17):275-282.
- Yang B. Isolation, purification, structural identification and hypoglycemic activity of polysaccharides from *Hovenia dulcis* [D]. Chongqing: Southwest University(西南大学), 2020.
- Hao HH, Chen Y, Lin ZJ, et al. Effect of different polysaccharide fraction from *Acanthopanax giraldii* Harms on peritoneal macrophage[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2013, 25:612-616.
- Shang QH, Xie YH, Zhang GG, et al. Immune regulation roles of phytogetic polysaccharides and its mechanisms[J]. Chin J Anim Nutr(动物营养学报), 2015, 27(1):49-58.
- Li R, Chen HG, Zhou X. Immunomodulatory effects of plant polysaccharides: a review of the mechanisms [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2018, 30:2017-2022.
- Fan JH, Liu K, Liu BL. The regulatory role of NO in inflammation and immune response [J]. Chin Fore Med Treat(中外医疗), 2009, 28(25):163.
- Depalo OVA. Anti-inflammatory cytokines [J]. Chest, 2000, 117:1162-1172.
- Li ZQ. The immune regulation effects of *N*-acetyl chitoooligosaccharides on mouse RAW 264.7 macrophages [D]. Guangzhou: South China Univ Technol(华南理工大学), 2020.
- Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1(6):a001651.
- Li Q, Verma IM. NF- κ B regulation in the immune system [J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2:725-734.