

毛蕊花糖对巨噬细胞RAW264.7的免疫调节作用

苏 娣, 张 芸, 戴竹青, 叶 红, 胡 冰, 曾晓雄*
(南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095)

摘 要: 目的: 明确毛蕊花糖对巨噬细胞RAW264.7免疫功能的调节作用。方法: 分别以质量浓度25、50、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ 的毛蕊花糖对RAW264.7巨噬细胞进行培养, 以10 $\mu\text{g/mL}$ 的脂多糖(LPS)为阳性对照组、不加任何样品的培养基为空白对照组。通过噻唑蓝(MTT)实验、吞噬中性红实验、NO释放量测定及酶联免疫吸附法测定细胞因子(IL-6、IL-1 β 、IFN- α 、IFN- γ)的分泌量, 评价毛蕊花糖的免疫调节作用。结果: 质量浓度为25~400 $\mu\text{g/mL}$ 的毛蕊花糖对巨噬细胞RAW264.7作用24h后, 可显著提高巨噬细胞的增殖活性、吞噬活性、NO释放量以及细胞因子的分泌水平, 并且毛蕊花糖溶液质量浓度为200 $\mu\text{g/mL}$ 时效果最好。结论: 毛蕊花糖对小鼠腹腔巨噬细胞系RAW264.7具有免疫调节活性, 是一种良好的免疫增强剂。

关键词: 毛蕊花糖; 巨噬细胞RAW264.7; 免疫调节活性

Immunoregulatory Function of Verbascose on Macrophage Cell Line RAW264.7

SU Di, ZHANG Yun, DAI Zhu-qing, YE Hong, HU Bing, ZENG Xiao-xiong*
(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Objective: To investigate the immunoregulatory function of verbascose on macrophage cell line RAW264.7. Methods: RAW264.7 cells were cultured in a 96-well plate with different concentrations of verbascose (25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ and 400 $\mu\text{g/mL}$), and the role of verbascose was evaluated based on the proliferative activity of cultured splenocytes as determined by MTT assay, nitric oxide (NO) production and cytokines (IL-6, IL-1 β , IFN- α and IFN- γ) expression levels, neutral red phagocytosis. In the present study, lipopolysaccharide (LPS, 10 $\mu\text{g/mL}$) was used as a positive control, and treatment without verbascose or LPS was used as a negative control. Results: Verbascone significantly improved the proliferation, phagocytosis, NO level and cytokines expression levels when RAW264.7 cells were cultured for 24 h in the studied concentration range. Verbascone at a dose of 200 $\mu\text{g/mL}$ showed the highest effect. Conclusion: Verbascone has an immunomodulatory effect on macrophage cell line RAW264.7 as a potential immunomodulatory enhancer.

Key words: verbascose; macrophage cell RAW264.7; immunostimulatory activity

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)07-0250-04

α -低聚半乳糖(α -GOS)是一类含有 α -半乳糖苷键的低分子可溶性低聚糖^[1], 广泛分布于豆科植物中, 不仅对于植物有重要的生理保护功能^[2], 而且能有效促进人体有益菌尤其是双歧杆菌的增殖, 改善肠道微生态环境, 促进肠道内营养物质和矿物质的吸收, 提高机体的免疫力^[3-4]。目前对 α -GOS的研究主要集中在提取工艺、理化特性、肠道益生作用及免疫活性方面^[5-7]。毛蕊花糖是一种在蔗糖的葡萄糖残基一侧以 α -(1 \rightarrow 6)糖苷键结合3个半乳糖分子构成的五糖, 它是棉子糖家族中的一种^[8], 其调节微生态的功能优于目前应用的所有低聚糖, 例如形成化学屏障和微生物屏障、抑制有害菌、促进B族维生素、蛋白质和钙、铁、锌等矿物质的吸收、减少和清除体内

有害物质、阻止毒素进入血液循环等^[4]。但关于毛蕊花糖的免疫调节活性鲜见报道, 因此本实验以小鼠腹腔巨噬细胞系RAW264.7为研究对象, 通过分析细胞的增殖活性、吞噬活性、NO释放水平及细胞因子(IL-6、IL-1 β 、IFN- α 、IFN- γ)的分泌水平以探讨毛蕊花糖对巨噬细胞的体外免疫调控作用, 为毛蕊花糖及 α -GOS的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

绿豆购自江苏南京苏果超市。

收稿日期: 2012-07-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171750); 江苏高校优势学科建设工程资助项目

作者简介: 苏娣(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: sudi88216@126.com

*通信作者: 曾晓雄(1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: zengxx@njau.edu.cn

RAW264.7小鼠巨噬细胞株 南京中医药大学。

DMEM培养基 上海英骏生物技术有限公司；双抗(Hyclone青霉素-链霉素) 美国Sigma公司；新生小牛血清、HEPES试剂、0.25%胰酶-EDTA 美国Gibco公司；脂多糖(LPS)、噻唑蓝(MTT) 北京Solarbio公司；NO试剂盒及细胞因子(IL-6、IL-1 β 、IFN- α 、IFN- γ)ELISA试剂盒 南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器与设备

Series II 3110细胞培养箱 美国Thermo Scientific公司；Synergy-2酶标仪 美国Biotek公司；XDS-37倒置显微镜 上海光学仪器五厂；Genius 3旋涡混匀器 德国IKA公司。

1.3 方法

1.3.1 毛蕊花糖的制备

毛蕊花糖的制备参照向小丽等^[9]报道的以鹰嘴豆制备鹰嘴豆糖醇的方法。选取籽粒饱满、无虫害、无缺失的绿豆种子，用粉碎机粉碎，过60目筛。称取适量绿豆粉于三角瓶中，按料液比1:10(*m/V*)加入体积分数为80%的乙醇水溶液，于70℃恒温振荡器中振荡提取1h，将提取液于5000r/min离心10min，收集上清液，残渣重复提取1次，合并提取液，减压浓缩。浓缩液上活性炭-硅藻土(1:1, *m/m*)中压层析柱，用5%~50%的乙醇水溶液进行线性洗脱，收集乙醇体积分数20%左右的洗脱液，此洗脱液经浓缩后利用Bio-gel p2凝胶过滤层析柱进一步分离，洗脱液用苯酚硫酸法和高效液相色谱法(HPLC)进行检测，收集只含有毛蕊花糖的组分并进行真空浓缩与冷冻干燥。制备得到的产品经ESI-TOF-MS和¹H-NMR结构分析，数据与文献[10]报道的毛蕊花糖的数据一致，确定其为毛蕊花糖，经HPLC分析其纯度为93.85%。

1.3.2 RAW264.7细胞的培养

RAW264.7用含10%小牛血清的DMEM培养基(含100 IU/mL青霉素和100 IU/mL链霉素)在37℃、5% CO₂的培养箱中培养，待细胞长至对数生长期时，用0.25%胰酶(含0.01% EDTA)消化，DMEM培养基洗涤离心，细胞计数后接种于96孔培养板，细胞数10⁵个/孔，贴壁12h后按不同实验目的处理。

1.3.3 RAW264.7细胞增殖实验

采用MTT法测定RAW264.7细胞的增殖活性。取对数生长期细胞以10⁵个/孔接种于96孔培养板，每孔体积100 μ L，37℃、5% CO₂培养箱中培养12h，待细胞贴壁后，弃去上清液，分别加入25、50、100、200、400 μ g/mL的毛蕊花糖溶液100 μ L，空白对照组为含10%小牛血清的DMEM培养基，阳性对照组为10 μ g/mL LPS，每组6个复孔。在37℃、5% CO₂条件下分别继续培养12、24、36、48h，弃掉培养上清液，每孔加入0.5mg/mL的MTT，每孔200 μ L，4h后加入DMSO 150 μ L，振荡5min，使甲瓚彻

底溶解，酶标仪波长570nm处测定OD值。细胞的增殖能力按公式(1)计算增殖指数。

$$\text{细胞增殖指数} = \frac{\text{样品OD}_{570\text{nm}}}{\text{空白对照组OD}_{570\text{nm}}} \quad (1)$$

1.3.4 RAW264.7细胞吞噬中性红实验

细胞的前期培养参照1.3.3节的方法。加入空白对照组、阳性对照组及不同质量浓度的样品，6个复孔，在37℃、5% CO₂条件下培养24h后弃掉培养上清液，加入0.075%中性红溶液100 μ L，37℃、5% CO₂培养箱中继续培养1h，弃去中性红，用PBS洗2遍，每次100 μ L，并甩干。加入醋酸-乙醇(1:1, *V/V*)细胞溶解液100 μ L/孔，室温静置过夜，酶标仪于波长540nm处测定OD值。细胞对中性红吞噬能力用吞噬指数表示(式2)。

$$\text{吞噬指数} = \frac{\text{样品OD}_{540\text{nm}}}{\text{空白对照组OD}_{540\text{nm}}} \quad (2)$$

1.3.5 NO的测定

将对数生长期细胞接种于96孔培养板，每孔体积100 μ L，接种密度为10⁵个/孔，于37℃、5% CO₂培养箱中培养12h，待细胞贴壁后，弃去上清液，分别加入25、50、100、200、400 μ g/mL的毛蕊花糖溶液100 μ L，空白对照组为含10%小牛血清的DMEM培养基，阳性对照组为10 μ g/mL的LPS，每组3个复孔。于37℃、5% CO₂条件下培养24h后，取上清液100 μ L，按NO试剂盒说明书测定NO的量。

1.3.6 细胞因子(IL-6、IL-1 β 、IFN- α 和IFN- γ)的测定

细胞的处理方法同1.3.5节，在37℃、5% CO₂培养箱中对细胞培养24h后，取上清液100 μ L，按ELISA试剂盒说明书测定各细胞因子(IL-6、IL-1 β 、IFN- α 、IFN- γ)。

2 结果与分析

2.1 毛蕊花糖对RAW264.7细胞增殖的影响

表1 不同质量浓度毛蕊花糖对RAW264.7细胞增殖的影响
Table 1 Effect of different concentrations of verbascose on cell viability of RAW264.7

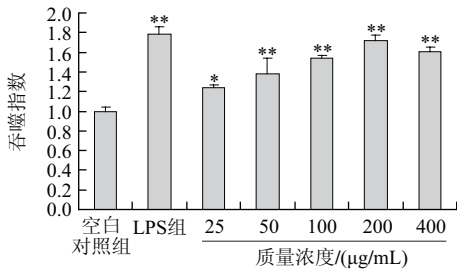
培养时间/h	空白对照组	LPS组	质量浓度(μ g/mL)				
			25	50	100	200	400
12	1.00 \pm 0.08 ^a	1.29 \pm 0.14 ^c	1.04 \pm 0.02 ^a	1.13 \pm 0.02 ^{ab}	1.23 \pm 0.07 ^{bc}	1.34 \pm 0.12 ^c	1.34 \pm 0.16 ^c
24	1.00 \pm 0.09 ^a	1.76 \pm 0.19 ^{cd}	1.21 \pm 0.10 ^b	1.25 \pm 0.30 ^b	1.56 \pm 0.21 ^c	1.82 \pm 0.25 ^d	1.78 \pm 0.11 ^{cd}
36	1.00 \pm 0.12 ^a	1.67 \pm 0.17 ^c	1.29 \pm 0.17 ^b	1.34 \pm 0.29 ^b	1.43 \pm 0.20 ^b	1.60 \pm 0.15 ^c	1.62 \pm 0.24 ^c
48	1.00 \pm 0.05 ^a	1.50 \pm 0.14 ^d	1.23 \pm 0.28 ^b	1.26 \pm 0.13 ^b	1.31 \pm 0.22 ^{bc}	1.44 \pm 0.11 ^{cd}	1.41 \pm 0.12 ^{cd}

注：字母不同代表同一时间(表中同一行)不同样品之间的显著性差异($P < 0.05$)。下同。

由表1可知，当巨噬细胞RAW264.7培养12h后，质量浓度为100、200、400 μ g/mL的样品对RAW264.7细胞的增殖指数相对于空白对照组有显著性差异($P < 0.05$)；巨

噬细胞分别培养24、36、48h后,5种质量浓度的毛蕊花糖样品与空白对照组相比都有显著性差异($P<0.05$),表明各质量浓度的毛蕊花糖样品对RAW264.7细胞均有增殖作用。随着质量浓度的增加,细胞增殖指数增加,在质量浓度为200 $\mu\text{g/mL}$ 时达到最大值,并且200 $\mu\text{g/mL}$ 和400 $\mu\text{g/mL}$ 时样品的增殖指数与其他样品组相比有显著性差异($P<0.05$),但200 $\mu\text{g/mL}$ 与400 $\mu\text{g/mL}$ 的样品之间没有显著差异。与阳性对照组相比,在质量浓度为200 $\mu\text{g/mL}$ 的毛蕊花糖溶液作用下巨噬细胞经培养24h后,细胞增殖指数提高。表明毛蕊花糖在一定质量浓度范围能有效地促进RAW264.7细胞的增殖,增殖效果在质量浓度200 $\mu\text{g/mL}$ 达到最大;培养时间则以24h增殖能力较强,质量浓度分别为100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞的增殖指数均在24h达到最大值。所以以下实验的细胞培养时间均选为24h。

2.2 毛蕊花糖对RAW264.7细胞吞噬作用的影响



*.与空白对照组比较,有显著性差异($P<0.05$);
**.与空白对照组比较,有极显著性差异($P<0.01$).

图1 毛蕊花糖对RAW264.7细胞吞噬作用的影响

Fig.1 Effect of verbascose on phagocytosis of RAW264.7

采用RAW264.7腹腔巨噬细胞吞噬中性红的方法来评价毛蕊花糖体外对巨噬细胞吞噬作用的影响,结果如图1所示。与空白对照组相比,LPS能极显著($P<0.01$)地刺激巨噬细胞吞噬中性红的能力,吞噬指数为1.79。RAW264.7细胞经质量浓度为50~400 $\mu\text{g/mL}$ 的毛蕊花糖溶液作用24h后,吞噬能力与空白对照相比,均具有极显著性差异($P<0.01$),25 $\mu\text{g/mL}$ 的毛蕊花糖对细胞的吞噬能力有显著提高($P<0.05$)。在25~200 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,吞噬指数由1.24增加到1.72,当质量浓度增加到400 $\mu\text{g/mL}$ 时,吞噬指数下降至1.61。表明毛蕊花糖能够激活RAW264.7巨噬细胞、提高RAW264.7巨噬细胞的吞噬能力,从而提高增强机体的免疫力,保护机体免受抗原感染。

2.3 毛蕊花糖对RAW264.7细胞释放NO的影响

表2 毛蕊花糖对RAW264.7细胞释放NO水平的影响
Table 2 Effect of verbascose on NO level in RAW264.7

组别	空白对照组	LPS组	质量浓度/(μg/mL)				
			25	50	100	200	400
NO含量/(μmol/L)	36.04±2.65 ^a	64.53±1.74 ^b	60.47±7.44 ^b	85.53±5.11 ^c	104.65±5.83 ^d	143.02±4.62 ^e	123.26±6.20 ^e

由表2可知,未进行药物处理的空白对照组的NO释放量比较低,这可能与静息状态下RAW264.7细胞iNOS表达较低有关。与空白对照组相比,经过不同质量浓度毛蕊花糖溶液处理后,RAW264.7细胞释放NO的量显著提高($P<0.05$),说明毛蕊花糖具有激活巨噬细胞释放NO的能力。质量浓度在25~200 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,随着样品质量浓度的提高,NO的释放量显著增加($P<0.05$),并且每两个质量浓度之间都达到显著性差异($P<0.05$),这可能与其能诱导RAW264.7细胞中iNOS的表达有关。而当质量浓度增加到400 $\mu\text{g/mL}$ 时,NO的释放量有所下降。

2.4 毛蕊花糖对RAW264.7细胞分泌细胞因子的影响

表3 毛蕊花糖对RAW264.7细胞分泌细胞因子(IL-6、IL-1 β 、IFN- α 、IFN- γ)的影响
Table 3 Effect of verbascose on cytokines (IL-6, IL-1 β , IFN- α and IFN- γ) levels in RAW264.7

组别	IL-6含量(pg/mL)	IL-1 β 含量(pg/mL)	INF- α 含量(pg/mL)	INF- γ 含量(pg/mL)
空白对照组	113.33 \pm 2.32 ^a	53.51 \pm 1.83 ^a	63.77 \pm 4.54 ^a	142.22 \pm 11.98 ^a
LPS组	231.26 \pm 12.31 ^d	137.02 \pm 3.69 ^{cd}	118.98 \pm 7.73 ^b	350.24 \pm 13.20 ^d
质量浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	25	158.17 \pm 8.16 ^b	108.15 \pm 0.26 ^b	118.30 \pm 3.38 ^b
	50	158.33 \pm 2.85 ^b	118.19 \pm 1.14 ^{bc}	128.53 \pm 8.31 ^{bc}
	100	162.67 \pm 6.69 ^b	142.55 \pm 1.83 ^d	136.12 \pm 10.88 ^c
	200	198.33 \pm 4.00 ^c	143.76 \pm 9.41 ^d	134.82 \pm 3.46 ^c
	400	195.00 \pm 1.21 ^c	150.31 \pm 7.33 ^d	132.31 \pm 6.57 ^c

由表3可知,与空白对照组比较,经LPS及样品处理后的RAW264.7细胞分泌IL-6、IL-1 β 、IFN- α 、IFN- γ 的水平显著增加($P<0.05$)。质量浓度在25~200 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,随着样品质量浓度的增加,RAW264.7细胞分泌上述4种细胞因子的水平提高,当质量浓度达到200 $\mu\text{g/mL}$ 时,IL-6、IFN- α 、IFN- γ 的量达到最高,细胞分泌IL-1 β 的量在质量浓度为400 $\mu\text{g/mL}$ 时最高,但与200 $\mu\text{g/mL}$ 组分泌的量无显著差异。

3 讨论

免疫系统是机体一个极其复杂而又重要的生理体系,一旦失去平衡,将会影响机体免疫应答而引起各种疾病。病原微生物进入机体的第一道防线是吞噬细胞,其中巨噬细胞是机体免疫系统中重要的吞噬细胞。小鼠巨噬细胞系RAW264.7是一种巨噬细胞,可参与机体免疫过程,特别是机体受LPS等外界刺激后能够启动机体内炎症介质的产生,并启动机体抵抗炎症系统的功能,可以在体外模拟机体免疫过程中抗原递呈细胞—树突状细胞,并表达免疫过程中的相关抗原递呈分子^[11]。因此,本研究以小鼠腹腔巨噬细胞系RAW264.7为对象,通过分析细胞的增殖活性、吞噬活性、NO释放水平及细胞因子的分泌水平以探讨毛蕊花糖对巨噬细胞的体外免疫调控作用。

吞噬作用是巨噬细胞的一种主要功能,在机体非特异免疫中起重要作用。巨噬细胞可吞噬体内的各种病原微生物、肿瘤细胞以及机体内的死细胞等,形成的吞噬体与溶酶体结合并在多种酶的作用下消化杀灭各种抗原性异物^[12]。巨噬细胞RAW264.7吞噬中性红实验结果显示,质量浓度为200 $\mu\text{g/mL}$ 的毛蕊花糖可显著增强细胞的吞噬能力,从而可以保护机体免受抗原感染。

NO是一种新近发现的能调节细胞多种功能的第二信使分子,在体内广泛参与多种生理和病理过程^[13]。研究表明,巨噬细胞的抗肿瘤、抗病毒、炎症反应及免疫反应由NO的释放来完成^[14]。因此,把NO作为一项检测指标,评价毛蕊花糖的免疫调节作用,结果显示25~400 $\mu\text{g/mL}$ 的毛蕊花糖溶液可以通过提高NO的释放水平来介导免疫反应,并且在200 $\mu\text{g/mL}$ 时介导反应最明显,这可能与其能诱导RAW264.7细胞中iNOS的表达有关。

细胞因子是由细胞分泌产生的、具有介导和调节免疫、炎症和造血过程的小分子蛋白质。巨噬细胞被生物活性分子激活后,可以分泌如IL-6、IL-1 β 、IFN- α 、IFN- γ 等细胞因子以调节免疫系统。IL-6与IL-1 β 都属于白细胞介素,由单核-巨噬细胞产生。IL-6可以促进T、B细胞的增殖分化、急性期蛋白的产生及发热,并在B细胞的分化过程中发挥重要作用;IL-1 β 能够激活T细胞及巨噬细胞。干扰素(IFN)是最早发现的细胞因子,因其具有干扰病毒的感染和复制的功能而得名,分为IFN- α 、IFN- β 和IFN- γ 3类。IFN- α 属I型干扰素,可以诱导抗病毒蛋白及MHC II类分子的表达,发挥抗病毒、增殖抑制及免疫调节等作用,从而提高机体体液免疫和细胞免疫水平^[15]。IFN- γ 属II型干扰素,又称“免疫干扰素”,通过作用于病毒感染的组织细胞使其产生抗病毒蛋白,从而发挥非特异性抗病毒、抗肿瘤及免疫调节等多方面功能^[16]。本研究结果表明经毛蕊花糖溶液处理后的RAW264.7细胞分泌IL-6、IL-1 β 、IFN- α 、IFN- γ 的水平显著增加($P<0.05$)。

近年来,关于低聚糖的免疫活性调节有较多的研究报道,Fang等^[17]研究了1~100 $\mu\text{g/mL}$ 阿魏酸低聚糖对腹腔巨噬细胞的增殖能力、NO及细胞因子的分泌水平的影响,发现质量浓度为100 $\mu\text{g/mL}$ 时免疫活性最好,但却不如10 $\mu\text{g/mL}$ LPS的免疫效果,并且没有研究质量浓度大于100 $\mu\text{g/mL}$ 时样品的免疫活性。本实验以绿豆为原料制备了毛蕊花糖,通过RAW264.7细胞增殖实验、吞噬中性红实验、NO的测定及细胞因子的测定发现25~400 $\mu\text{g/mL}$ 的毛蕊花糖溶液可显著提高巨噬细胞的增殖活性、吞噬活性、

NO释放量以及细胞因子(IL-6、IL-1 β 、IFN- α 、IFN- γ)的分泌水平,并且200 $\mu\text{g/mL}$ 的毛蕊花糖溶液的效果最好。本研究结果表明,毛蕊花糖对巨噬细胞具有免疫调节活性,是一种良好的免疫增强剂。

参考文献:

- [1] SHIVAM K, MISHRA S K. Purification and characterization of a thermostable α -galactosidase with transglycosylation activity from *Aspergillus parasiticus* MTCC-2796[J]. Process Biochemistry, 2010, 45(7): 1088-1093.
- [2] KADLEC P, DOSTALOVA J, HOUSKA M, et al. Evaluation of α -galactosides decrease during storage of germinated pea seeds treated by high pressure[J]. Journal of Food Engineering, 2006, 77(2): 364-367.
- [3] PORRES J M, ARANDA P, VILCHE A, et al. Effects of hydroalcoholic α -galactoside extraction and phytase supplementation on the nutritive utilization of manganese, iron, zinc and potassium from lupin (*Lupinus albus* var. *multolupa*)-based diets in growing rats[J]. Food Chemistry, 2008, 109(3): 554-563.
- [4] 杨秀芳, 陈梅, 马养民. 大豆低聚糖功能及其应用[J]. 粮食与油脂, 2010(5): 8-11.
- [5] 贺晋艳, 张芸, 李伟, 等. 鹰嘴豆 α -低聚半乳糖的肠道益生功能[J]. 食品科学, 2011, 32(15): 94-98.
- [6] YANG Xingbin, ZHAO Yan, HE Nianwu, et al. Isolation, characterization, and immunological effects of α -galactooligosaccharides from a new source, the herb *Lycopus lucidus* Turcz[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(14): 8253-8258.
- [7] ZHENG Ruan, YANG Lingyuan, ZHOU Xiaoli, et al. Effect of soybean oligosaccharides on immunity and TLR2-NF- κ B signal pathway response for weanling pigs[J]. Journal of Food Agriculture and Environment, 2012, 10(1): 273-279.
- [8] TEIXEIRA J S, MCNEILL V, GANZEL M G. Levansucrase and sucrose phosphorylase contribute to raffinose, stachyose, and verbascose metabolism by lactobacilli[J]. Food Microbiology, 2012, 31(2): 278-284.
- [9] 向小丽, 杨立怡, 华双, 等. 不同品种鹰嘴豆中 α -低聚半乳糖与蔗糖的含量分析[J]. 中国农业科学, 2008, 41(9): 2762-2768.
- [10] KOTIGUDA G, PETERBAUER T, MULIMANI V H. Isolation and structural analysis of ajuage from *Vigna mungo* L.[J]. Carbohydrate Research, 2006, 341(12): 2156-2160.
- [11] RHULE A, NAVARRO S, SMITH J R, et al. Panax notoginseng attenuates LPS-induced pro-inflammatory mediators in RAW264.7 cells[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2006, 106(1): 121-128.
- [12] 霍德胜, 柳忠辉, 王世瑶, 等. 激活素A对小鼠巨噬细胞RAW264.7吞噬活性的促进作用[J]. 中国生物制品杂志, 2008, 21(9): 759-761.
- [13] MAYER B, HEMMENS B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells[J]. Trends in Biochemical Sciences, 1997, 22(12): 477-481.
- [14] 陈真, 曾耀英, 尹乐乐. 漆黄素对淋巴细胞和巨噬细胞分泌NO的免疫调节作用[J]. 免疫学杂志, 2011, 27(11): 963-968.
- [15] 林红, 胡格, 伊鹏霏, 等. 黄芩苷、连翘酯苷对肺微血管内皮细胞分泌IFN- α 、IFN- γ 的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(6): 30-33.
- [16] GHAYUR T, BANERJEE S, HUGUNIN M, et al. Caspase-1 processes IFN- γ -inducing factor and regulates LPS-induced IFN- γ -production[J]. Nature, 1997, 386: 619-623.
- [17] FANG H Y, CHEN Yukuo, CHEN Huahan, et al. Immunomodulatory effects of feruloylated oligosaccharides from rice bran[J]. Food Chemistry, 2012, 134(2): 836-840.