DOI:10.13652/j.issn.1003-5788.2020.06.026

兰坪虫草多糖组分分析及免疫活性研究

Studies on the component analysis and immune activities of *Ophiocordyceps lanpingensis* polysaccharides

柯迎妹[1] 周树波[1] 葛 锋[1,2] 虞 泓[2,3]

KE Ying-mei[1] *ZHOU Shu-bo*[1] *GE Feng*[1,2] *YU Hong*[2,3]

(1. 昆明理工大学生命科学与技术学院,云南 昆明 650500;2. 昆明市虫草生物资源开发利用工程技术研究中心,云南 昆明 650100;3. 云南大学中草药生物资源研究所云百草实验室,云南 昆明 650091)

(1. *Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan* 650500, *China*; 2. *The Research Center of Cordyceps Development and Utilization of Kunming, Kunming, Yunnan* 650100, *China*; 3. *Yunnan Herbal Laboratory, Institute of Herb Biotic Resources, Yunnan University, Kunming, Yunnan* 650091, *China*)

摘要:从兰坪虫草中提取多糖,对其分子量、单糖组成和官能团特征进行分析,并探讨兰坪虫草多糖对免疫力的影响。结果表明,兰坪虫草多糖分子量为 3.2×10^5 Da,主要由甘露糖、半乳糖和葡萄糖组成,其摩尔百分比为 13.38∶5.31∶81.31,可能为含有糖醛酸和吡喃环的酸性多糖。兰坪虫草多糖可显著提高免疫抑制小鼠的免疫器官指数,减少免疫抑制小鼠脾脏组织红髓区域充血,改善碳粒廓清能力,提高免疫抑制小鼠单核—巨噬细胞的吞噬功能,促进抗绵羊红细胞抗体的生成,促使 ConA 诱导的 T 淋巴细胞增殖,提高免疫相关细胞因子 IL-2 和 IL-10 的基因表达水平,说明兰坪虫草多糖具有增强小鼠免疫力的作用。

关键词:兰坪虫草;多糖;免疫活性

Abstract: The polysaccharides was extracted from *O. lanpingens*, and the molecular weight, monosaccharide composition and functional group characteristics were analyzed. Furthermore, the effect of *O. lanpingensis* polysaccharides on immunity was investigated. The results showed that OLP had a molecular weight of 3.2×10^5 Da, and it was mainly composed of mannose, galactose and glucose with a molar ratio of 13.38∶5.31∶81.31. OLP might be an acid polysaccharide containing uronic acid and pyran ring. OLP could significantly increase the spleen index, reduce red pulp area congestion of spleen, improve the ability of clearing carbon particles, strengthen phagocytic function of mononuclear phagocytic system, promote the production of antibodies against sheep red blood cells and increase ConA-induced T lymphocyte proliferation. Moreover, OLP also increased gene expression levels of immune-related cytokines IL-2 and IL-10. These studies indicated that OLP could enhance the immunity of mice.

Keywords: *Ophiocordyceps lanpingensis*; polysaccharides; immune activities

兰坪虫草(*Ophiocordyceps lanpingensis*)为近年来发现的虫草新种,主要成分为虫草多糖、核苷类、甾醇类、氨基酸等[1],具有显著的抗疲劳活性[2],对小鼠肾功能衰竭和肺纤维化有明显缓解作用[3-4]。临床上,诸如慢性肾功能衰竭、肺纤维化等疾病均与免疫系统失调相关[5-6]。近年来,作为免疫调节剂,多糖在治疗疾病和调节免疫力方面表现出独特的优势[7-8]。其活性与其固有的理化性质相关,包括分子量、官能团以及单糖组分等[9]。

试验拟从兰坪虫草菌粉中提取多糖,分析其分子量、单糖组分及官能团特征,并参照《保健食品检验与评价技术规范》中提高免疫力功能的检测方法,明确兰坪虫草多糖(OLP)增强免疫力功能的作用,为兰坪虫草的进一步研究开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

兰坪虫草菌种:经云南大学虞泓教授鉴定为线虫草

基金项目:云南省万人计划项目(编号:YNWR-QNBJ-2018-059);科技部项目(中央引导地方科技发展专项)(编号:KC1610530)

作者简介:柯迎妹,女,昆明理工大学在读硕士研究生。

通信作者:葛锋(1979—),男,昆明理工大学教授,博士生导师,博士。E-mail: panaxcordyceps@163.com

收稿日期:2020-02-20

科线虫草属，使用部位为兰坪虫草菌丝体，云南大学中草药生物资源研究所云百草实验室；

BALB/c 小鼠：SPF 级，体重 18～20 g，生产许可证号为 SCXK(辽)2015-0001，辽宁长生生物技术有限公司；

三氟乙酸(TEA)、氯仿：分析纯，国药集团化学试剂有限公司；

环磷酰胺：分析纯，江苏恒瑞医药股份有限公司；

刀豆蛋白(ConA)：美国 Sigma 公司；

绵羊红细胞(SRBC)：中国科学院上海细胞库；

印度墨汁：北京笃信精细制剂厂；

Trizol 试剂盒、逆转录试剂盒：日本 Takara 生物技术公司；

细胞周期试剂盒：北京 Solarbio 生物科技有限公司；

实时荧光定量聚合酶链式反应引物：生工生物工程上海股份有限公司。

1.2 仪器与设备

低速恒温离心机：ST16R 型，美国 ThermoFisher Scientific 公司；

超声微波组合反应装置：XO-SM100 型，南京先欧仪器制造有限公司；

凝胶色谱仪：PL-GPC 50 型，美国安捷伦科技有限公司；

气质联用仪：GC7890 型，美国安捷伦科技有限公司；

傅里叶变换红外光谱仪：8700 型，美国 ThermoFisher Scientific 公司；

酶标仪：MMC-GZ-010 型，美国 ThermoFisher Scientific 公司；

紫外分光光度计：MLtrospec 2100 pro 型，美国 Amersham Biosciences 公司；

二氧化碳培养箱：E191IR 型，美国金西盟公司；

血液分析仪：LH750 型，美国贝克曼库尔特有限公司；

病理学切片机：HM325 型，美国 ThermoFisher Scientific 公司；

实时荧光定量 PCR 仪：LightCycler 96 型，瑞士 Roche 公司。

1.3 方法

1.3.1 兰坪虫草多糖的提取　将兰坪虫草菌粉与超纯水按料液比 1∶10 (g/mL)混合，沸水浸提 2 h，然后进行超声波提取(160 W，45 ℃，30 min)，2 500 r/min 离心 15 min，上清液旋蒸至原体积的 25%，用无水乙醇以体积比 1∶4 进行醇沉过夜，4 000 r/min 离心 10 min，取沉淀溶于适量体积的超纯水，通过 Savage 方法[10]去除蛋白，并透析 2 d，冷冻干燥即得兰坪虫草多糖。

1.3.2 兰坪虫草多糖的测定

(1) 分子量：采用凝胶渗透色谱法。色谱柱：phenomenex PolySep-GFC-P 4000，7.80 mm×300 mm，进样量 20 μL，柱温 35 ℃。

(2) 单糖组成及含量：采用 GC-MS 法。色谱柱为 HP-5 气相色谱柱(30 m×0.32 mm×0.25 μm)，进样量 1 μL；初始温度 110 ℃，保持 2 min，以 8 ℃/min 升温至 160 ℃，再以 2 ℃/min 升温至 230 ℃，最后以 5 ℃/min 升温至 250 ℃，保持 2 min。

(3) 官能团特征分析：采用傅里叶变换红外光谱法(FT-IR)，扫描频率 4 000～400 cm^{-1}。

1.3.3 动物造模、分组及给药　试验前 24 h 对小鼠禁水，不禁食。次日将小鼠随机分为 5 组，每组 10 只，分别为空白组、模型组、兰坪虫草多糖低剂量组(0.3 g/kg，OLPL 组)、兰坪虫草多糖中剂量组(0.5 g/kg，OLPM 组)、兰坪虫草多糖高剂量组(1.0 g/kg，OLPH 组)。除空白组外，其他小鼠根据体重每天腹腔注射环磷酰胺(40 mg/kg)，连续 4 d，建立小鼠免疫抑制模型。造模后，使用相应的药物对各组小鼠进行灌胃，空白组和模型组给予等体积的生理盐水。试验小鼠每天灌胃一次，连续 30 d。

1.3.4 脾脏指数及胸腺指数的测定　给药结束后，处死小鼠，取小鼠脾脏和胸腺，称重。脾脏或胸腺质量和体质量比值即为脾指数和胸腺指数。

1.3.5 脾脏组织病理学检测　将脾脏组织固定于 10%的中性福尔马林，乙醇梯度脱水，二甲苯显色透明，石蜡包埋并切片(厚度 4 μm)，然后对组织切片进行苏木精—伊红(H&E)染色，光学显微镜下观察。

1.3.6 碳粒廓清试验　末次给药后，将印度墨汁(10 mL/kg)按体重注入小鼠尾静脉，并计时。分别于第 2，10 min 时从内眦静脉丛取血 20 μL，立即加入 0.1%的 Na_2CO_3 溶液 2 mL。测定 600 nm 处光密度值，以 Na_2CO_3 溶液为空白对照。称量脾脏、肝脏质量，按式(1)、(2)计算吞噬指数。

$$\alpha = \frac{m_1}{m_2 + m_3} \times K^{1/3}, \tag{1}$$

$$K = \frac{\lg OD_1 - \lg OD_2}{t_2 - t_1}, \tag{2}$$

式中：

α——吞噬指数；

m_1——小鼠体质量，g；

m_2——肝质量，g；

m_3——脾质量，g；

K——廓清指数；

OD_1——2 min 时的光密度值；

OD_2——10 min 时的光密度值；

t_1——2 min；

t_2——10 min。

1.3.7 抗体生成细胞检测　采用 Jerne 改良玻片法[11]进

行检测并计数溶血空斑数,抗体生成细胞数用溶血空斑数/10^6 脾细胞表示。

1.3.8　ConA 诱导的小鼠脾脏 T 淋巴细胞转化试验　采用 MTT 法[12]。

1.3.9　细胞周期的测定　末次给药后处死小鼠,无菌取脾,制备脾淋巴细胞悬液,加入 24 孔培养板中,每孔 500 μL,37 ℃培养 24 h,取每孔细胞于 4 ℃、1 000 r/min 离心 5 min,弃上清。加入 1 mL 预冷的无菌磷酸盐缓冲液(PBS),轻轻吹打均匀后,继续离心 5 min,弃上清,重复上述操作两次。加入 70%冰乙醇 1 mL 混匀,于 4 ℃冰箱过夜。根据细胞周期检测试剂盒说明书配制染色液,4 ℃冰箱保存。取样品 0.5 mL,轻轻吹打,37 ℃避光培养 30 min,过 200 目尼龙膜,用流式细胞仪进行检测,每个样品计数 1×10^4 细胞。

1.3.10　细胞因子基因表达水平检测　使用 Trizol 试剂盒提取小鼠脾组织 RNA,逆转录成 cDNA,对目标基因进行实时荧光定量 PCR,反应体系 20 μL,反应扩增程序:95 ℃,15 s;60 ℃,30 s;72 ℃,30 s;共 42 个循环。引物序列如表 1 所示。每个样品重复 3 次,以 *β-actin* 作内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 IL-2 和 IL-10 的基因表达水平。

1.3.11　统计分析　采用 Excel、SPSS 20.0 软件进行数据处理和统计分析,以($\bar{x}\pm s$)表示。组间数据采用单因素方差分析,方差齐用 Duncan 方法计算 F 值比较各组间的差异性,方差不齐用 Dunnett T3 检验及非参数检验统计学比较各组间的差异有无显著性。$P<0.05$ 表示有统计学意义。

2　结果与分析

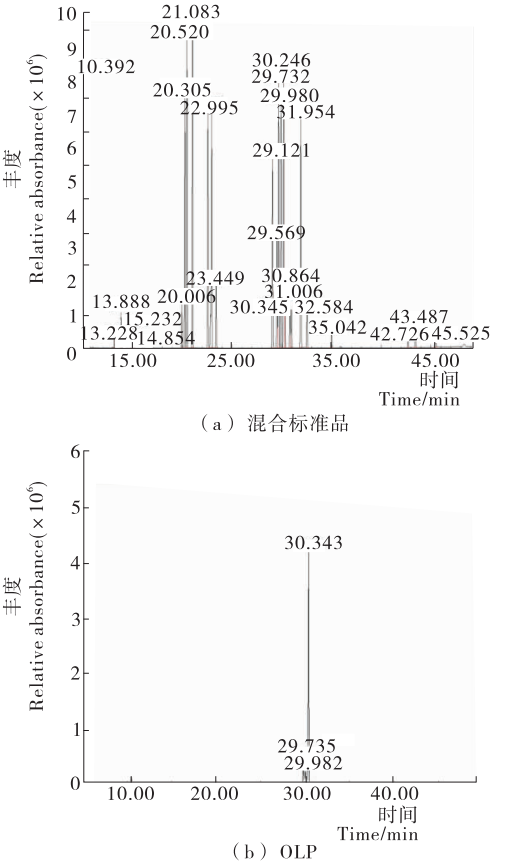
2.1　结构表征

试验测得 OLP 分子量为 3.2×10^5 Da。由图 1、表 2 可知,木糖、阿拉伯糖、核糖、鼠李糖、岩藻糖、果糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖、葡萄糖醛酸的保留时间分别为 20.006,20.520,21.083,22.995,23.449,29.121,29.736,29.983,30.345,31.956 min,OLP 主要由甘露糖、半乳糖、葡萄糖组成,且摩尔比为 13.38∶5.31∶81.31。

表 1　qRT-PCR 引物序列信息

Table 1　The primer sequences used for qRT-PCR

基因	基因库登录号	引物序列(5′-3′)
IL-2	NC_000069.6	F:GCAGCAGCAGCAGCAG R:GCCGCAGAGGTCCAAGTTCATC
IL-10	NC_000067.6	F:CTATGCTGCCTGCTCTTACTGACTG R:GAGTCGGTTAGCAGTATGTTGTCCAG
β-actin	NC_000071.6	F:GATCATTGCTCCTCCTGAGC R:ACATCTGCTGGAAGGTGGAC



(a) 混合标准品

(b) OLP

图 1　单糖标准品和兰坪虫草多糖的 GC-MS 色谱图

Figure 1　GC-MS chromatograms of monosaccharides standards and OLP

表 2　兰坪虫草多糖的单糖组分及含量

Table 2　Monosaccharides composition and contents of OLP

组分	保留时间/min	相对含量/%
甘露糖	29.735	13.38
半乳糖	29.982	5.31
葡萄糖	30.343	81.31

由图 2 可知,O—H/N—H 的伸缩振动在 3 431.59/3 386.17 cm^{-1} 处有两个连续的强且宽的吸收带,C—H 和 C—O—C 的伸缩振动峰分别为 2 929.43,1 024.07 cm^{-1},这些区域的吸收峰为糖类特征峰[13-14]。1 650.59 cm^{-1} 处的吸收峰是糖分子中羰基 C═O 的伸缩振动峰,即多糖中含有糖醛酸,为酸性多糖;1 419～1 200 cm^{-1} 处是羧基的 C—O 伸缩振动引起的吸收峰;1 200～1 000 cm^{-1} 处的吸收峰表示兰坪虫草多糖的糖环构型可能为吡喃环[15];950～800 cm^{-1} 处为异头质子的 C—H 弯曲振动峰,其中 865.01 cm^{-1} 处的异头 C—H 振动峰说明具有 α-半乳糖,810.43 cm^{-1} 处的峰则进一步证实 α-甘露糖是兰坪虫草多糖的单糖成分之一[16]。

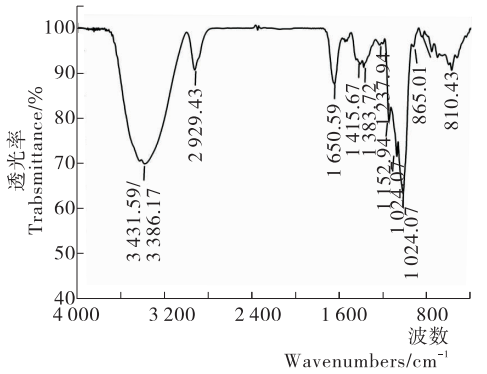


图 2　兰坪虫草多糖的 FT-IR 图

Figure 2　FT-IR spectrum of OLP

2.2　对小鼠脾脏指数和胸腺指数的影响

脾脏和胸腺作为外周免疫器官和中枢免疫器官，是参与免疫反应的主要场所。免疫器官指数的变化可以初步反映药物对免疫器官以及免疫调节是否具有影响[17]。由表 3 可知，模型组小鼠脾指数和胸腺指数均显著低于空白组（P＜0.05），表明模型组小鼠免疫器官受损；兰坪虫草多糖给药组小鼠的脾指数和胸腺指数均高于模型组，其中 OLPH 组的升高趋势明显（P＜0.05）。故兰坪虫草多糖可以提高免疫抑制小鼠的脾指数和胸腺指数，改善环磷酰胺引起的小鼠免疫器官萎缩，从而提高小鼠的免疫功能。

2.3　对小鼠脾脏组织的影响

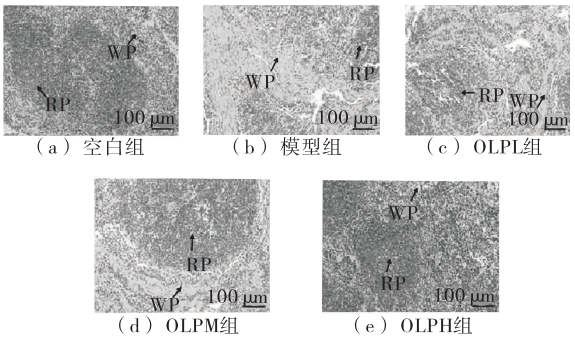
由图 3 可知，空白组小鼠脾脏白髓（WP）与红髓（RP）边缘分界清晰，白髓由脾小体和动脉周围淋巴鞘组成，淋巴细胞密集，红髓部分的脾索和脾窦结构清晰。模型组的脾小体萎缩、形状不规则，淋巴细胞离散且排列疏松，红髓充血明显。兰坪虫草多糖给药组小鼠脾脏的淋巴细胞数量呈剂量依赖性增加，脾小体结构逐渐恢复，红髓区域充血现象得到改善。说明兰坪虫草多糖可能通过增加淋巴细胞数量，逐步恢复脾小体结构，改善红髓区域充血来提高机体免疫力。

表 3　兰坪虫草多糖对小鼠免疫器官指数的影响†

Table 3　Effects of OLP on immune organ index of mice

组别	剂量/（g·kg⁻¹）	脾指数/（mg·g⁻¹）	胸腺指数/（mg·g⁻¹）
空白组	—	3.64±0.15	2.05±0.25
模型组	—	2.50±0.20#	1.51±0.15#
OLPL 组	0.3	2.65±0.15	1.73±0.11
OLPM 组	0.5	3.08±0.33*	1.75±0.54
OLPH 组	1.0	3.15±0.27*	2.12±0.15*

†　#表示与空白组相比差异显著（P＜0.05）；*表示与模型组相比差异显著（P＜0.05）。



WP. 脾脏白髓　RP. 脾脏红髓

图 3　兰坪虫草多糖对小鼠脾脏组织的影响

Figure 3　Effect of *Ophiocordyceps lanpingensis* polysaccharides on mice spleen（×100）

2.4　对小鼠碳粒廓清的影响

由表 4 可知，与空白组相比，模型组小鼠吞噬廓清异体颗粒的能力显著降低（P＜0.01）；与模型组相比，兰坪虫草多糖治疗组小鼠吞噬廓清异体颗粒的能力依赖剂量有效提高。说明兰坪虫草多糖能增强免疫低下小鼠单核—巨噬细胞的吞噬能力，改善小鼠的非特异性免疫，从而调节免疫功能。

2.5　对小鼠抗体生成细胞的影响

抗体生成细胞试验用于体外测定生成 IgM、IgG 等抗体的细胞数，小鼠被绵羊红细胞免疫后，B 淋巴细胞产生抗体，与适量的 SRBC 混合后，在补体的参与下可以溶解抗体分泌细胞周围的绵羊红细胞，生成空斑，空斑数量反映了机体的体液免疫功能[18]。由表 5 可知，与空白组相比，模型组溶血空斑数显著降低（P＜0.01）；与模型组相比，兰坪虫草多糖给药组的溶血空斑数随给药剂量的增加逐渐升高，OLPM 组和 OLPH 组的增加效果显著（P＜0.01）。说明兰坪虫草多糖可以促使小鼠抗体生成细胞的产生，并诱导抗体的释放，在一定程度上增强机体的体液免疫功能。

表 4　兰坪虫草多糖对小鼠碳粒廓清的影响†

Table 4　Effects of OLP on carbon particle clearance of mice

组别	剂量/（g·kg⁻¹）	吞噬指数
空白组	—	5.32±0.48
模型组	—	3.90±0.57##
OLPL 组	0.3	4.31±0.77
OLPM 组	0.5	5.04±0.69*
OLPH 组	1.0	5.38±0.74**

†　##表示与空白组相比差异极显著（P＜0.01）；*表示与模型组相比差异显著（P＜0.05），**表示与模型组相比差异极显著（P＜0.01）。

表 5　兰坪虫草多糖对小鼠抗体生成细胞的影响†

Table 5　Effects of OLP on antibody forming cells of mice

组别	剂量/(g·kg^{-1})	溶血空斑数
空白组	—	123.4±12.63
模型组	—	75.7±7.13##
OLPL 组	0.3	88.0±10.38*
OLPM 组	0.5	99.0±8.21**
OLPH 组	1.0	100.3±10.63**

† ##表示与空白组相比差异极显著(P<0.01);*表示与模型组相比差异显著(P<0.05),**表示与模型组相比差异极显著(P<0.01)。

2.6　对 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化的影响

ConA 诱导 T 淋巴细胞的增殖是一种典型的细胞免疫,已被广泛用作淋巴细胞反应性研究中的免疫参数[19]。由表 6 可知,与空白组相比,模型组小鼠 T 淋巴细胞增殖能力显著降低(P<0.01)。与模型组相比,OLPM 组和 OLPH 组小鼠 T 淋巴细胞的增殖能力均显著增高(P<0.01),表明兰坪虫草多糖可以改善环磷酰胺对小鼠 ConA 诱导脾淋巴细胞的增殖反应造成的抑制,具有明显增强机体特异性细胞免疫功能的作用。

2.7　对小鼠脾脏 T 淋巴细胞周期的影响

细胞周期是连续分裂的真核细胞的增殖周期,可分为分裂间期和分裂期,分裂间期包括 G_0、G_1、S 和 G_2 期,其中在 S 期进行染色体复制[20]。由表 7 可知,与空白组相比,模型组小鼠 T 淋巴细胞在 S 期的比例降低(P<0.05),说明环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠 T 淋巴细胞的细胞周期 S 期受到抑制,细胞增殖能力减弱。与模型组相比,兰坪虫草多糖各组小鼠 T 淋巴细胞 S 期比例均有所增加,其中OLPH组的差异显著(P<0.05),表明兰坪虫草多糖对 T 淋巴细胞周期有一定的影响,能缓解环磷酰胺对小鼠 T 淋巴细胞进入 S 期的抑制作用,促进 DNA 合成和细胞增殖,进一步说明兰坪虫草多糖对机体免疫力的提升可能是通过增加 T 淋巴细胞的数量来实现。

表 6　兰坪虫草多糖对 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化试验的影响†

Table 6　Effects of OLP on ConA-induced spleen lymphocyte transformation test in mice

组别	剂量/(g·kg^{-1})	存活率/%
空白组	—	0.95±0.19
模型组	—	0.56±0.06##
OLPL 组	0.3	0.68±0.09*
OLPM 组	0.5	0.92±0.10**
OLPH 组	1.0	0.96±0.11**

† ##表示与空白组相比差异极显著(P<0.01);*表示与模型组相比差异显著(P<0.05),**表示与模型组相比差异极显著(P<0.01)。

表 7　兰坪虫草多糖对小鼠脾脏 T 淋巴细胞周期的影响†

Table 7　Effects of OLP on T-lymphocyte cycle

组别	剂量/(g·kg^{-1})	G_0/G_1/%	S/%	G_2/M/%
空白组	—	70.85±5.60	12.07±3.75	17.08±0.97
模型组	—	72.83±1.99	7.55±2.83#	19.62±2.87
OLPL 组	0.3	73.04±1.02	8.20±1.42	18.76±1.35
OLPM 组	0.5	75.05±0.95	8.80±0.76	16.15±3.02**
OLPH 组	1.0	74.22±0.57**	9.16±0.69*	16.62±0.49**

† #表示与空白组相比差异显著(P<0.05);*表示与模型组相比差异显著(P<0.05),**表示与模型组相比差异极显著(P<0.01)。

2.8　对小鼠 IL-2 和 IL-10 基因表达的影响

IL-2 是 Thl 型细胞因子,与 T 淋巴细胞的细胞周期从 G_1 期向 S 期过渡相关,可以促使 T 淋巴细胞增殖[21]。由表 8 可知,与空白组相比,模型组小鼠脾脏中 IL-2 基因表达量明显降低(P<0.01),使用 OLP 后可以显著增加 IL-2 基因的表达量(P<0.01),兰坪虫草多糖可有效提高免疫抑制小鼠细胞因子 IL-2 的基因表达水平。结合细胞周期的检测结果可知,兰坪虫草多糖可能通过增加 IL-2 的分泌影响 T 淋巴细胞的细胞周期,促使 DNA 合成和细胞增殖。

IL-10 由多种细胞产生,包括 Th2 细胞和 Th3 细胞,是一种与免疫相关的多效性细胞因子,具有免疫调节特性的 CD41 T 细胞可通过完全或部分依赖 IL-10 的机制起作用[22-23]。而兰坪虫草多糖还可以增加 IL-10 的基因

表 8　兰坪虫草多糖对小鼠 IL-2 和 IL-10 基因表达的影响†

Table 8　Effects of OLP on IL-2 and IL-10 gene expression levels in mice

组别	剂量/(g·kg^{-1})	IL-2	IL-10
空白组	—	0.998±0.056	1.001±0.025
模型组	—	0.338±0.172##	0.579±0.091#
OLPL 组	0.3	0.758±0.116**	0.597±0.088
OLPM 组	0.5	1.102±0.141**	0.741±0.183
OLPH 组	1.0	1.565±0.260**	0.787±0.214

† #表示与空白组相比差异显著(P<0.05);##表示与空白组相比差异极显著(P<0.01);**表示与模型组相比差异极显著(P<0.01)。

表达水平，OLPM 组和 OLPH 组的 IL-10 基因表达量较模型组显著升高。

3 结论

从兰坪虫草菌粉中提取多糖(OLP)，并对其进行单糖组分和官能团特征分析，表明 OLP 主要由甘露糖、半乳糖和葡萄糖构成，其摩尔百分比为 13.38∶5.31∶81.31，可能是含有糖醛酸和吡喃环的酸性多糖。对小鼠免疫力的影响研究表明，OLP 可以改善免疫抑制模型小鼠免疫器官受损情况，提高非特异性免疫、体液免疫以及细胞免疫，初步明确兰坪虫草多糖具有改善免疫力的功能。后续将对兰坪虫草多糖调节免疫活性的机理进行研究，为兰坪虫草多糖作为保健食品佐剂的开发和应用提供依据。

参考文献

[1] 杜亚茜，虞泓，葛锋，等. 人工培养的兰坪虫草子实体中核苷类成分研究[J]. 现代食品科技，2016，32(5)：276-282.

[2] 孔娜，张艳艳，葛锋，等. 兰坪虫草的缓解运动疲劳功能[J]. 食品科学，2018，39(21)：149-154.

[3] ZHANG Yan-yan，DU Ya-xi，YU Hong，et al. Protective effects of *Ophiocordyceps lanpingensis* on glycerol-induced acute renal failure in mice[J]. Journal of Immunology Research，2017，2 017：1-8.

[4] 何益锋，张艳艳，虞泓，等. 兰坪虫草对小鼠肺纤维化的改善作用研究[J]. 中药材，2019，42(4)：880-885.

[5] WANG Chun-nian，ZOU Zheng-ping，XU Hui. Detection and clinical significance of immune function，inflammatory factors，Hcy，SF and β_2-MG in elderly patients with chronic renal failure[J]. Journal of Hainan Medical University，2018，24(21)：1 906-1 908，1 912.

[6] O'DWYER D N，ASHLEY S L，MOORE B B. Influences of innate immunity，autophagy，and fibroblast activation in the pathogenesis of lung fibrosis[J]. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology，2016，311(3)：L590-L601.

[7] LI Wen-juan，LI Lu，ZHENG Wen-ya，et al. *Ganoderma atrum* polysaccharide ameliorates ROS generation and apoptosis in spleen and thymus of immunosuppressed mice[J]. Food and Chemical Toxicology，2017，99：199-208.

[8] GU Peng-fei，XU Shu-wen，ZHOU Shu-zhen，et al. Optimization of angelica sinensis polysaccharide-loaded Poly (lactic-co-glycolicacid) nanoparticles by RSM and its immunological activity in vitro[J]. Biological Macromolecules，2018，107(Pt A)：222-229.

[9] QI Jia，KIM S M. Effects of the molecular weight and protein and sulfate content of *Chlorella ellipsoidea* polysaccharides on their immunomodulatory activity[J]. Biological Macromolecules，2018，107(Pt A)：70-77.

[10] NAVARINI L，GILLI R，GOMBAC V，et al. Polysaccharides from hot water extracts of roasted coffea arabica beans：Isolation and characterization[J]. Carbohydrate Polymers，1999，40(1)：71-81.

[11] 张岚，王丹，聂晶石. 蚕蛹虫草片剂对体液免疫和细胞免疫功能的影响[J]. 食品工业科技，2016，37(5)：349-357.

[12] 朱轶锋，韩顺顺，张克英，等. 黄芪多糖对鸡淋巴细胞体外增殖及脾脏淋巴细胞分泌细胞因子和相关 mRNA 表达的影响[J]. 四川农业大学学报，2018，36(5)：674-680.

[13] LI Bei-bei，DONG Meng-xue，DE Ji，et al. Structural characterization and anti-proliferation activities against tumor cells of an arabinogalactan from *Juniperus convallium*[J]. Molecules，2019，24(10)：1 850.

[14] 杨慧，戴军，陈尚卫，等. 灵芝子实体多糖的分离纯化、组成及其免疫活性研究[J]. 食品与机械，2015，31(1)：132-136.

[15] 郭南生，江和栋，张兵，等. 三叶青根多糖提取工艺优化、分离纯化及结构表征[J]. 食品与机械，2018，34(7)：143-147，210.

[16] ZHANG Ying，ZENG Yan，CUI Yong-sheng，et al. Structural characterization，antioxidant and immunomodulatory activities of a neutral polysaccharide from *Cordyceps militaris* cultivated on hull-less barley[J]. Carbohydrate Polymers，2020，235：115969.

[17] 王辉，秦翠丽，宫强，等. 非消化寡糖对小鼠免疫调节的影响[J]. 食品与机械，2019，35(9)：1-5.

[18] 张建伟. 明日叶查尔酮对增强免疫力和抗运动性疲劳的效果[J]. 食品科学，2017，38(9)：196-201.

[19] 包晓玮，韩海霞，杜光明，等. 甜菜红素对小鼠体内抗氧化及免疫调节的作用[J]. 食品科学，2019，40(17)：196-201.

[20] YEH Hsuan-te，TSAI Yi-sheng，CHEN Ming-shan，et al. Flavopereirine induces cell cycle arrest and apoptosis via the AKT/p38 MAPK/ERK1/2 signaling pathway in human breast cancer cells[J]. European Journal of Pharmacology，2019，863：172658.

[21] REN Zhe，HE Cheng-hua，FAN Yan-hong，et al. Immunoenhancement effects of ethanol extract from *Cyrtomium macrophyllum* (Makino) Tagawa on cyclophosphamide-induced immunosuppression in BALB/c mice[J]. Journal of Ethnopharmacology，2014，155(1)：769-775.

[22] MANNINO M H，ZHU Zi-wen，XIAO Hua-ping，et al. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer[J]. Cancer Letters，2015，367(2)：103-107.

[23] MAYNARD C L，WAVER C T. Diversity in the contribution ofinterleukin-10 to T-cell-mediatedimmune regulation[J]. Immunological Reviews，2008，226(1)：219-233.