

金针菇粗多糖结构特征及免疫调节活性研究

王馨诺 彭楚珺 金语萌 张默澜 游丽君

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东 广州 510641)

摘要: [目的] 制备金针菇粗多糖 (*Flammulina velutipes* polysaccharide, FVP), 并评价其结构特征和免疫调节活性。[方法] 以金针菇为原料, 采用水提醇沉法制备得到 FVP, 并结合傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 和高效尺寸排阻色谱—多角度激光光散射—差折光检测 (HPSEC-MALLS-RI) 对其进行结构表征; 通过 RAW 264.7 巨噬细胞和环磷酰胺诱导免疫抑制小鼠模型评价 FVP 的免疫调节活性。[结果] FVP 总糖含量为 (51.39 ± 1.36) g/100 g。结构表征结果显示, FVP 有 β -型吡喃糖环特征, 并呈现多组分相对分子质量分布, 整体平均重均相对分子质量为 291.40。进一步体内外活性评价表明, FVP 在 3.125~600.0 μ g/mL 范围内对 RAW 264.7 巨噬细胞无明显毒性, 并可促进一氧化氮生成及肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-1 β 和白细胞介素-6 的 mRNA 表达水平, 显著改善免疫抑制小鼠体质量增长受抑、淋巴细胞相关指标下降及免疫器官指数异常。[结论] 研究制备得到的 FVP 具有较好的免疫调节活性, 可应用于功能性食品领域。

关键词: 金针菇; 粗多糖; 结构特征; 免疫调节; RAW 264.7 巨噬细胞; 免疫抑制小鼠

Study on structural characteristics and immunomodulatory activity of *Flammulina velutipes* crude polysaccharide

WANG Xinnuo PENG Chujun JIN Yumeng ZHANG Molan YOU Lijun

(School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510641, China)

Abstract: [Objective] To prepare *Flammulina velutipes* crude polysaccharide (FVP) and evaluate its structural characteristics and immunomodulatory activity. [Methods] FVP was prepared from *Flammulina velutipes* using hot-water extraction and ethanol precipitation, and its structural characteristics were characterized by combining Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and high-performance size-exclusion chromatography-multi-angle laser light scattering-refractive index detection (HPSEC-MALLS-RI). The immunomodulatory activity of FVP was evaluated using RAW 264.7 macrophages and a cyclophosphamide-induced immunosuppressed mouse model. [Results] The total sugar content of FVP is (51.39 ± 1.36) g/100 g. Structural characterization results show that FVP has characteristic features of a β -type pyranose ring and exhibits a multi-component relative molecular weight distribution, with an overall weight-average relative molecular weight of 291.40. Further *in vitro* and *in vivo* bioactivity evaluations indicate that FVP has no obvious toxicity toward RAW 264.7 macrophages in the range of 3.125~600.0 μ g/mL and can promote nitric oxide production and the mRNA expression levels of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interleukin-6 and significantly improve the suppression of body weight gain, the decrease of lymphocyte-related indices, and the abnormalities of immune organ indices in immunosuppressed mice. [Conclusion] The prepared FVP has favorable immunomodulatory activity and can be applied in the field of functional foods.

Keywords: *Flammulina velutipes*; crude polysaccharide; structural characteristic; immunomodulation; RAW 264.7 macrophage; immunosuppressed mouse

基金项目: 国家重点研发计划项目 (编号: 2024YFE0109500)

通信作者: 张默澜 (1998—), 女, 华南理工大学助理研究员, 博士。E-mail: zml1209@scut.edu.cn

游丽君 (1982—), 女, 华南理工大学教授, 博士。E-mail: feyoulijun@scut.edu.cn

收稿日期: 2026-03-20 改回日期: 2026-06-04

引用格式: 王馨诺, 彭楚珺, 金语萌, 等. 金针菇粗多糖结构特征及免疫调节活性研究[J]. 食品与机械, 2026, 42(6): 124-133.

Citation: WANG Xinnuo, PENG Chujun, JIN Yumeng, et al. Study on structural characteristics and immunomodulatory activity of *Flammulina velutipes* crude polysaccharide[J]. Food & Machinery, 2026, 42(6): 124-133.

在天然来源活性成分中,食用真菌多糖因其良好的免疫调节潜力备受关注^[1-2]。自香菇多糖实现分离并应用于临床以来^[3],裂褶多糖、云芝多糖K等相继被开发为功能性食品^[4-6]。金针菇(*Flammulina velutipes*)是全球广泛栽培的第四大食用菌,其多糖因结构多样性和作用机制复杂性而受到关注^[7]。研究^[1,8-9]表明,金针菇多糖属于由多种单糖组成的杂多糖,部分组分还可与蛋白质结合形成复合物。此外,不同制备方式可引起金针菇多糖在组成、结构特征及生物学活性方面的差异,并进一步影响其免疫调节作用^[10]。

关于金针菇多糖的免疫调节作用,现有研究主要集中在细胞层面与肠道相关途径。已有研究^[11-13]发现,金针菇多糖可作用于巨噬细胞和淋巴细胞,促进一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等相关分子的释放。此外,也有研究^[12,14]表明,金针菇多糖可通过调节肠道菌群间接参与免疫稳态的维持。在分子机制方面,金针菇多糖可被Toll样受体4(toll-like receptor 4, TLR4)识别,进而影响丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)与核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)等信号通路,从而参与免疫反应的调控^[9,15]。

研究拟制备金针菇粗多糖(*Flammulina velutipes* polysaccharide, FVP),采用傅里叶变换红外光谱(fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)、高效体积排阻色谱—多角度激光光散射—示差折光检测(high-performance size-exclusion chromatography coupled with multi-angle laser light scattering and refractive index detection, HPSEC-MALLS-RI)对其结构进行表征,并结合RAW 264.7细胞模型和环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)诱导免疫抑制小鼠模型评价其免疫调节活性,以期金针菇粗多糖在功能食品领域的开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

金针菇(*Flammulina velutipes*):广东粤微食用菌技术有限公司;

小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7:中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库;

氯仿:分析纯,成都市科隆化学品有限公司;

正丁醇、乙醇:分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司;

透析袋:截留相对分子质量为3.5,湖南翊博生物科技有限公司;

浓硫酸:分析纯,广东广试试剂科技有限公司;

5%苯酚水溶液:北京兰杰柯有限公司;

Bradford 蛋白浓度测定试剂盒、一氧化氮检测试剂盒:上海碧云天生物技术有限公司;

Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒:美国 GLPBIO 公司;

反转录试剂盒:湖南艾科瑞生物工程有限公司;

ArtiCan^{ATM}SYBR qPCR Mix:北京擎科生物科技股份有限公司;

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、CTX:美国 Sigma-Aldrich 公司;

磷酸缓冲溶液(phosphate-buffered saline, PBS)、生理盐水:武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

电子分析天平:BCE224I-1CCN 型,北京赛多利斯科学仪器有限公司;

磁力搅拌水浴锅:HH-6J 型,常州恩谊仪器有限公司;

旋转蒸发器:Hei-VAP Core HL/G3 型,德国 Heidolph 公司;

真空冷冻干燥机:Alpha 1-2 LD plus 型,德国 Marin Christ 公司;

全自动酶标仪:BioTek Epoch 型,美国 Agilent 公司;

傅里叶变换红外光谱仪:Spotlight 400 型,美国 PerkinElmer 公司;

高效液相色谱:e2695 型,美国 Waters 公司;

8角度激光光散射仪:WH2-06 型,美国 Wyatt 公司;

生物安全柜:SG604-INT 型,美国 Baker 公司;

梯度 PCR 仪:T100TMThermal Cycler 型,美国 Bio-Rad 公司;

实时荧光定量 PCR 仪:Mini Opticon CFD-3120 型,美国 Bio-Rad 公司;

全自动血细胞分析仪:BC-5000vet 型,深圳迈瑞动物医疗科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 FVP 制备 基于实验室前期工艺优化结果,采用热水浸提法制备 FVP。干燥金针菇经超微粉碎后,按料液比 1:6 (g/mL)加入乙醇,于 80 °C 下脱脂、脱色处理 4 h,处理结束后烘干,得金针菇脱脂脱色粉。按料液比 1:30 (g/mL)加入纯水,85 °C 热水浸提 2.5 h。浸提结束后 8 000 r/min 离心 15 min,收集上清液。加入 1/4 体积的 Sevag 试剂($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{正丁醇}}=5:1$),剧烈振荡 30 min 后离心(4 000 r/min, 15 min)去除下层蛋白沉淀,重复操作 5 次。脱蛋白后的多糖溶液加入乙醇,使体系最终乙醇体积分数达到 80% 以上,并于 4 °C 下静置醇沉 24 h,离心(8 000 r/min, 15 min)收集沉淀,按沉淀质量与去离子水体积比 1:8~1:

10 (g/mL)加入去离子水复溶,转入透析袋中透析 48 h。液体经真空冷冻干燥 48 h(真空度 0.05 MPa)得到 FVP。采用苯酚—硫酸法^[16]测定总糖含量。FVP 总糖含量为 (51.39±1.36) g/100 g。

1.2.2 FVP 的傅里叶变换红外光谱分析 将 FVP 均匀铺在衰减全反射晶体上,使用压力杆轻轻压实,确保粉末与晶体充分接触,扫描范围设定 4 000~550 cm⁻¹,分辨率 4 cm⁻¹,扫描次数 4 次。

1.2.3 FVP 的相对分子质量测定 参照 Xu 等^[17]的方法并稍作修改,采用 HPSEC-MALLS-RI 系统测定。色谱柱采用 Ultrahydrogel 2000 (7.8 mm×300 mm, 12 μm) 和 Ultrahydrogel 250 SEC 柱 (7.8 mm×300 mm, 12 μm) 串联,配备保护柱使用。以 0.05% 叠氮化钠的 100 mmol/L 硝酸钠溶液为流动相;流量 0.6 mL/min;进样体积 100 μL;柱温 30 ℃。MALLS 参数:He-Ne 激光光源(λ=663.7 nm);流动相折光指数 1.331;折光指数增量 0.135 mL/g;检测角度 16.9°~155.4°。FVP 以流动相配制成 5 mg/mL 溶液,经 0.22 μm 水系滤膜过滤后进样,等度洗脱 61 min。数据采集与分析采用 Astra 6.1 软件。

1.2.4 FVP 对 RAW 264.7 细胞活力的影响 RAW 264.7 细胞采用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素—链霉素的高糖 Dulbecco 改良 Eagle 培养基,于 37 ℃、含 5% CO₂ 培养箱中。为评价 FVP 对 RAW 264.7 细胞的潜在毒性,采用 CCK-8 法检测细胞活力。将处于对数生长期的 RAW 264.7 细胞以 2.7×10⁴ 个/孔接种于 96 孔板中,贴壁培养 24 h 后进行分组处理:试验设对照组(Con)、阳性对照组(LPS, 1 μg/mL),以及不同质量浓度 FVP 处理组(3.125, 6.250, 12.50, 25.00, 50.00, 100.0, 200.0, 400.0, 600.0 μg/mL),每组设 6 个复孔,继续培养 24 h。处理结束后,每孔直接加入 10 μL CCK-8 溶液,于培养箱中避光孵育 30 min,随后使用酶标仪在 450 nm 下测定各孔吸光度,按式(1)计算细胞存活率。

$$V = \frac{A_s - A_b}{A_c - A_b} \times 100\%, \tag{1}$$

式中:

V——细胞存活率,%;

A_s——试验组(LPS 组、FVP 组)吸光度;

A_c——对照组(Con 组)吸光度;

A_b——空白孔吸光度。

1.2.5 FVP 对 RAW 264.7 细胞 NO 生成量的影响 采用一氧化氮测试试剂盒测定 RAW 264.7 细胞 NO 生成水平。细胞培养、接种及分组处理方法与 1.2.4 节一致。处理结束后,收集各组细胞培养上清,与等体积试剂于 96 孔板中室温避光反应 15 min,在 540 nm 下测定吸光度。以不同浓度亚硝酸钠标准溶液制作标准曲线,计算各组 NO 浓度,并按式(2)计算归一化 NO 水平。

$$N = \frac{C_s}{C_L} \times 100\%, \tag{2}$$

式中:

N——归一化 NO 水平,%;

C_s——对照组、FVP 组 NO 浓度,μmol/L;

C_L——LPS 组 NO 浓度,μmol/L。

1.2.6 FVP 对免疫相关细胞因子 mRNA 表达的影响 采用反转录实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测 RAW 264.7 细胞中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-1β(IL-1β)和白细胞介素-6(IL-6)的 mRNA 表达水平,以 β-actin 作为内参基因。处理结束后收集细胞,采用 Trizol 法提取总 RNA,并测定 RNA 浓度和纯度。取等量 RNA 进行逆转录反应,合成 cDNA。以所得 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 扩增,反应体系中加入 SYBR Green qPCR 反应体系及相应引物。PCR 扩增程序包括预变性、循环变性、退火和延伸等步骤,反应结束后通过仪器软件获得 Ct 值,并采用 2^{-ΔCt} 方法计算各目标基因的相对表达量。目标基因的引物序列见表 1。

1.2.7 动物试验设计 选用无特定病原体级 BALB/c 雄性小鼠,4~5 周龄,体质量(20±2) g。该研究获得了华南理工大学医学院伦理委员会的伦理批准,并按照动物试验伦理委员会的规范进行。试验开始前,小鼠适应性喂养 1 周,自由摄食和饮水。适应性喂养 1 周后,将小鼠随机分成 4 组,每组 10 只,分为正常对照组(Con)、模型组(CTX, 80 mg/(kg BW·d))、FVP 低剂量组(FVP-L, 50 mg/(kg BW·d))和 FVP 高剂量组(FVP-H, 100 mg/(kg BW·d))。在随后的 18 d 内,Con 组和 CTX 组灌胃 PBS,FVP-L 组和 FVP-H 组分别灌胃相应浓度的 FVP

表 1 RT-qPCR 引物序列^[18]
Table 1 RT-qPCR primer sequences

基因	正向引物序列	反向引物序列
<i>β-actin</i>	5'-CCACAGCTGAGAGGGAATC-3'	5'-AAGGAAGGCTGGAAAAGAGC-3'
<i>IL-1β</i>	5'-GGGCCTCAAAGGAAAGAATC-3'	5'-TACCAAGTTGGGGAAGCTCTGC-3'
<i>IL-6</i>	5'-AGTTGCCTTCTTGGGACTGA-3'	5'-CAGAATGCCATTGCACAAC-3'
<i>TNF-α</i>	5'-AGCCCCAGTCTGTATCCTT-3'	5'-CATTCGAGGCTCCAGTGAAT-3'

溶液。试验期间,每天观察小鼠生长状态,并记录体质量和饲料摄入量。灌胃体积按体质量的1%给予。试验最后3 d,Con组腹腔注射生理盐水,其余各组腹腔注射CTX构建小鼠免疫抑制模型。最后一次造模16 h后,对小鼠进行麻醉,经眼眶取血后脱颈处死。解剖分离肝脏、胸腺和脾脏。

1.2.8 血液指标测定 小鼠麻醉后眼眶取血,立即置于抗凝管中,采用全自动血细胞分析仪测定血液中白细胞和红细胞等参数。

1.2.9 脏器指数测定 小鼠解剖后收集胸腺、脾脏、肝脏等免疫器官组织,用生理盐水清洗,滤纸吸去多余的生理盐水溶液后称重,按式(3)~式(5)计算脏器指数。

$$I_t = \frac{m_t}{m}, \quad (3)$$

$$I_s = \frac{m_s}{m}, \quad (4)$$

$$I_h = \frac{m_h}{m}, \quad (5)$$

式中:

I_t ——胸腺指数,mg/g;

I_s ——脾脏指数,mg/g;

I_h ——肝脏指数,mg/g;

m_t ——胸腺质量,mg;

m_s ——脾脏质量,mg;

m_h ——肝脏质量,mg;

m ——小鼠质量,g。

1.2.10 数据处理与统计分析 采用SPSS 27.0软件进行统计分析,所有试验数据均以均值±标准差表示。多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。

2 结果与分析

2.1 FVP的傅里叶变换红外光谱

如图1所示,FVP在4 000~550 cm^{-1} 范围内呈现典型多糖吸收特征。3 301 cm^{-1} 处的宽峰对应O—H伸缩振动,2 920,2 851 cm^{-1} 处分别归属于C—H(CH_2 、 CH_3)不对称与对称伸缩振动,表明FVP具有多糖常见的羟基和饱和碳骨架特征^[19];1 636 cm^{-1} 处的弱吸收峰可能与少量吸附水有关,也可能受到残留蛋白酰胺I带及糖醛酸羧基相关吸收的影响^[20-21]。指纹区(1 500~600 cm^{-1})内,1 423,1 372 cm^{-1} 处的弱吸收峰分别对应C—H弯曲振动及O—H面内弯曲振动或 CH_3 对称弯曲振动;1 150,1 030 cm^{-1} 处的吸收峰分别与C—O—C不对称伸缩振动和C—O伸缩振动相关,提示其具有吡喃型糖环结构^[22]。889 cm^{-1} 处的特征峰则表明其糖苷键构型以 β 型为主^[23-24]。

前人^[14,25]关于FVP的研究报道了相似的光谱特征,

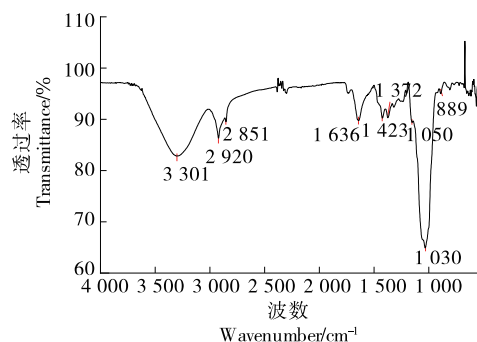


图1 FVP的傅里叶变换红外光谱图

Figure 1 Fourier transform infrared spectrum of FVP

将1 026,888~879 cm^{-1} 一带的吸收峰分别归属于吡喃糖环和 β -型糖苷键。已报道具有免疫调节活性的FVP同样具有 β -糖苷键连接的葡聚糖特征,提示该构型与其生物活性密切相关^[1,8,14]。因此,研究制备的FVP具有 β -吡喃多糖的谱学特征。鉴于FTIR主要反映官能团组成和糖苷键构型,仍需进一步结合相对分子质量分布分析,以补充分子层面的结构信息。

2.2 FVP的相对分子质量

如图2和表2所示,FVP的示差折光信号(differential refractive index, dRI)出现3个洗脱峰,且光散射信号(light scattering, LS)与dRI峰形对应良好,表明FVP呈现出明显的多组分相对分子质量分布特征。峰3为主组分,质量分数为60.1%,重均相对分子质量(M_w)为62.50。而峰1和峰2合计占39.9%,且 M_w 分别约为峰3的11.3倍和9.1倍。按各组分质量分数加权计算,FVP的整体重均相对分子质量为291.40。此外,各组分的多分散指数分别为1.009,1.056,1.281,整体表明各峰分布相对集中,其中主组分的分布范围略宽于其余两峰。

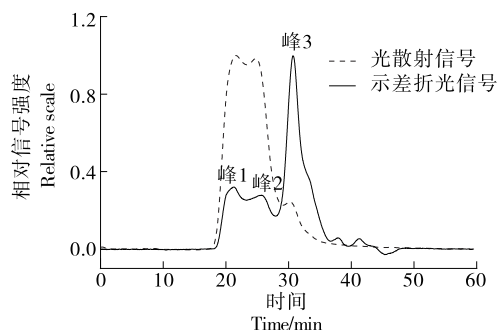


图2 FVP的LS和RI检测信号图

Figure 2 LS and RI detection signals of FVP

未经进一步纯化的FVP通常保留不同相对分子质量组分,因而更容易表现出多峰分布特征。已有研究^[10,26-27]发现,热水提取初步得到的FVP可呈多峰分布,而经二乙

表 2 FVP 的相对分子质量分布

Table 2 Relative molecular weight distribution of FVP

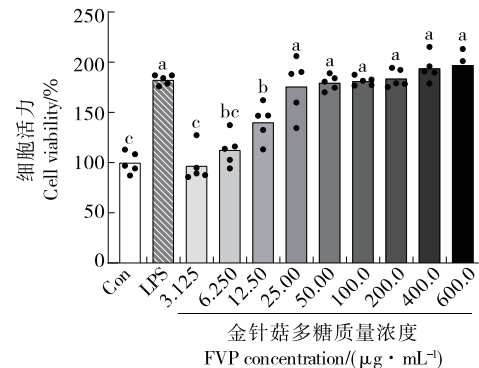
洗脱峰	质量分数/%	数均相对分子质量(M_n)	重均相对分子质量(M_w)	Z 均相对分子质量	峰位相对分子质量	多分散指数(M_w/M_n)
峰 1	19.4	700.30	706.90	718.10	683.30	1.009
峰 2	20.5	538.90	569.20	596.00	548.50	1.056
峰 3	60.1	48.81	62.50	103.20	39.47	1.281

氨基乙基离子交换、凝胶柱层析等进一步分离纯化后的 FVP 组分多表现为相对单一的洗脱峰。说明 FVP 的相对分子质量分布特征与纯化程度密切相关。此外,虽然 FVP 的较低相对分子质量组分占主要质量分数(60.1%),但高相对分子质量组分的存在使整体重均相对分子质量维持在较高水平,表明其是影响 FVP 整体相对分子质量特征的关键组成部分。相对分子质量差异可能进一步影响 FVP 的免疫调节活性。Chen 等^[10]发现,相比热水提取的 FVP,超声处理在提高低相对分子质量组分比例、降低平均相对分子质量的同时,也伴随 FVP 免疫增强作用减弱,推测相对分子质量变化可能与活性改变存在关联^[8]。对于食用菌多糖而言,相对分子质量差异会影响其免疫调节方式:高相对分子质量组分通常难以直接进入免疫细胞,其作用更可能依赖于与细胞表面糖识别受体的结合;而低相对分子质量组分则可能进入免疫细胞并发挥刺激作用^[6]。因此,FVP 的多组分相对分子质量分布可能是其后续细胞活性表现的重要结构基础,而不同相对分子质量组分的具体贡献仍需通过分级纯化进一步明确。

2.3 FVP 对 RAW 264.7 细胞活力的影响

如图 3 所示,FVP 在所测质量浓度范围内未表现出明显细胞毒性;3.125 和 6.250 $\mu\text{g/mL}$ 组与 Con 组差异不显著,自 12.50 $\mu\text{g/mL}$ 起细胞活力显著升高,25.00~600.0 $\mu\text{g/mL}$ 各组维持在 175.89%~197.18% 的较高水平。上述结果说明,FVP 在所设质量浓度范围内具有良好的细胞相容性。

类似的细胞活力升高现象在其他食用菌多糖中亦有



小写字母不同表示组间差异显著($P<0.05$)

图 3 FVP 对 RAW 264.7 细胞活力的影响

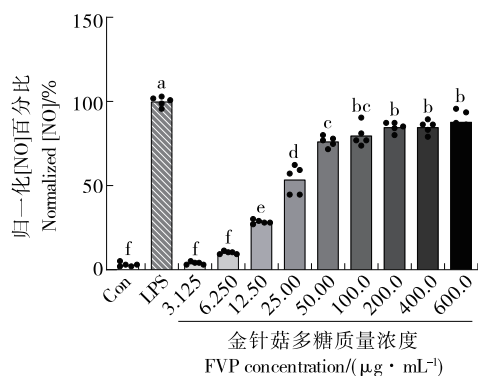
Figure 3 Effect of FVP on viability of RAW 264.7 cells

报道。Yan 等^[28]采用 CCK-8 法评价红菇多糖 RP-1 和 RP-5 时发现,两种多糖均可提高 RAW 264.7 细胞活力,且组分间差异可能与相对分子质量、羟基含量和单糖组成有关。而 Cheng 等^[29]关于结构相近而相对分子质量不同的阿拉伯聚糖的研究发现,较高相对分子质量组分对 RAW 264.7 细胞活力提升作用更强。上述研究说明,多糖对 RAW 264.7 细胞活力或细胞状态的影响,可能与相对分子质量分布及相关结构特征有关。此外,已报道^[12,27]的纯化 FVP1 和 FVP2 均采用 MTT 法检测,且两种纯化组分在相应浓度范围内均未明显改变 RAW 264.7 细胞活力。试验所得的 FVP 为粗多糖提取物,虽经脱蛋白和透析处理,但仍含有一定比例的非糖伴随组分;同时,HPSEC-MALLS-RI 结果显示,其具有多组分相对分子质量分布。因此,试验中细胞活力升高可能与不同相对分子质量多糖组分、非糖伴随组分及 CCK-8 法对细胞代谢还原能力较敏感等因素共同有关。后续可通过分级纯化、伴随组分去除及不同细胞活力检测方法交叉验证,进一步明确 FVP 提高 RAW 264.7 细胞活力的主要贡献因素。该结果明确了 FVP 在所设浓度范围内具备开展体外活性评价的条件,而其免疫调节活性的初步判断仍需结合 NO 生成水平,从而为后续 mRNA 表达分析的作用浓度筛选提供依据。

2.4 FVP 对 RAW 264.7 细胞 NO 生成量的影响

如图 4 所示,FVP 在有效质量浓度范围内可剂量依赖性促进 RAW 264.7 细胞 NO 生成,而在较高质量浓度区间,该促 NO 作用增幅减小并呈饱和趋势。与 Con 组相比,低质量浓度 FVP(3.125~6.250 $\mu\text{g/mL}$)处理后 NO 水平无显著变化;当 FVP 质量浓度升至 12.50 $\mu\text{g/mL}$ 时,NO 水平显著升高至(28.48 $\pm$ 1.19)%。随着 FVP 质量浓度继续增加,NO 生成进一步增强;当质量浓度增至 200.0~600.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,NO 水平维持在 84.82%~87.94%,各处理间差异不显著,表明其主要增幅发生于起效后的中等浓度区间。

研究结果表明,FVP 对 RAW 264.7 细胞 NO 生成的促进作用具有明显的浓度依赖性,但在较高浓度区间增幅减小,并呈饱和趋势。与之类似,海带来源杂多糖也表现为 NO 随剂量升高而增加,并在较高浓度区间维持于较高水平^[30]。多糖对巨噬细胞 NO 生成的促进作用多在有效



小写字母不同表示组间差异显著 ($P < 0.05$)

图4 FVP对RAW 264.7细胞NO生成量的影响

Figure 4 Effect of FVP on NO production of RAW 264.7 cells

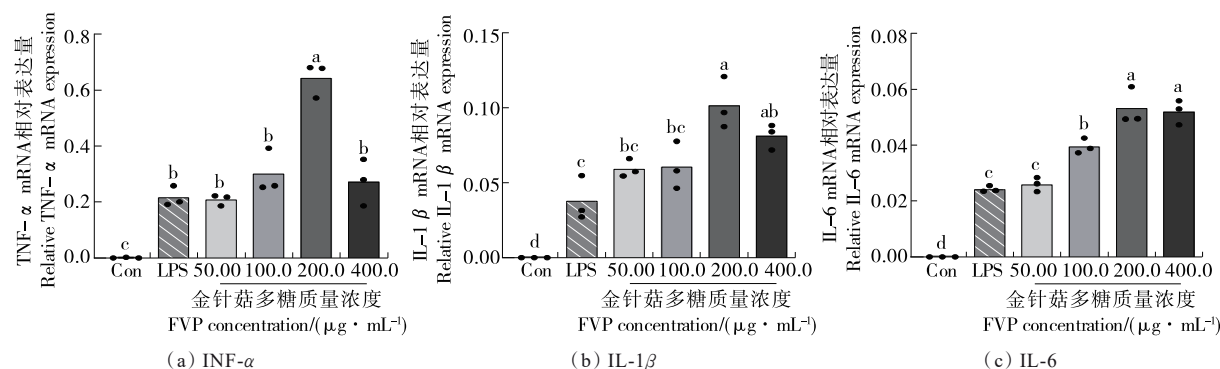
浓度范围内呈剂量依赖性增强,其相关机制通常涉及膜受体识别、NF- κ B/MAPK等下游信号转导激活及iNOS/NOS2上调^[31-33]。因此,在较高浓度范围内观察到的NO水平差异不显著,可能与持续刺激下相关信号传导效率逐步趋于饱和有关。另一方面,FVP纯化组分在相对分子质量、支链度及糖苷键组成上存在显著差异,而这些差异与NO诱导能力及TLR4/MyD88/NF- κ B/NOS2激活水平相关^[9];此外,高相对分子质量阿拉伯聚糖的NO诱导能力显著高于低相对分子质量组分^[29],这进一步说明相对分子质量差异可能是影响多糖NO诱导能力的重要结

构因素之一。结合FVP呈多组分相对分子质量分布这一特征,当前浓度效应还可能与样品中不同相对分子质量组分共存有关。

因此,NO结果从功能层面证明了优化工艺获得的FVP具有明确的体外免疫激活能力,并据其浓度效应特征确定了后续活性评价的适宜浓度范围。基于此,后续有必要在50.00, 100.0, 200.0, 400.0 μ g/mL条件下进一步考察TNF- α 、IL-1 β 和IL-6等免疫相关因子的基因转录变化,以判断NO生成增强是否能够进一步转化为更完整的巨噬细胞免疫激活响应。

2.5 FVP对免疫相关细胞因子mRNA表达的影响

如图5所示,FVP能够促进TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的mRNA表达,但不同指标的浓度变化特征并不完全一致。与Con组相比,LPS组中TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的mRNA表达均显著升高,说明阳性刺激有效。总体来看,其中200.0 μ g/mL为整体作用最强的处理浓度。就关键差异而言,TNF- α 在200.0 μ g/mL时达到最高水平,且显著高于其余处理组,为LPS组的2.97倍;IL-1 β 同样在200.0 μ g/mL时达到最高,为LPS组的2.69倍,而400.0 μ g/mL组仍维持较高表达,为LPS组的2.15倍,与200.0 μ g/mL组差异不显著。相比之下,IL-6的升高趋势更为平缓,100.0 μ g/mL组已明显高于LPS组,200.0 μ g/mL组和400.0 μ g/mL组进一步升高并维持于相近水平,分别为LPS组的2.19倍和2.14倍,二者间无显著差异。



小写字母不同表示组间差异显著 ($P < 0.05$)

图5 FVP对免疫相关细胞因子mRNA表达水平的影响

Figure 5 Effect of FVP on mRNA expression levels of immune-related cytokines

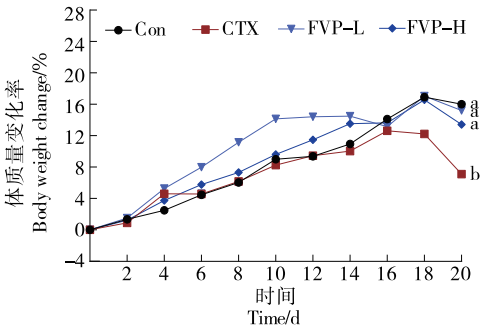
结合前述NO结果,FVP处理16 h后TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的mRNA表达均升高,说明其作用除促进NO生成外,还涉及多种免疫相关细胞因子的转录调节,该结果与Chen等^[9]的研究结果一致,表明FVP诱导的巨噬细胞免疫激活效应可能与TLR4/MyD88/NF- κ B通路激活相关。此外,TNF- α 的mRNA表达量在200.0 μ g/mL时达到峰值,而IL-1 β 和IL-6的mRNA则在较高剂量区间仍维持较

高表达,提示不同细胞因子对FVP刺激的响应强度并不一致。Bailey等^[34]在RAW 264.7细胞中比较TNF- α 和IL-1 β 的RT-PCR曲线时发现,LPS刺激8 h后二者mRNA表达均升高,18 h时TNF- α 已基本回落至接近基础水平,而IL-1 β 仍保持较高表达,说明不同免疫相关细胞因子在巨噬细胞激活后的mRNA表达持续性存在差异。因此,试验中TNF- α 、IL-1 β 和IL-6在16 h时的表达差异,可能与各

因子对 FVP 刺激后的转录上调幅度及表达持续性不同有关。因此,FVP 同时促进 NO 生成和多种免疫相关细胞因子 mRNA 表达,为其体外免疫调节作用提供了进一步证据;其作用能否在体内层面得到体现,仍需结合后续免疫调节活性研究进一步验证。

2.6 FVP 对免疫抑制小鼠体质量的影响

CTX 是一种常用的免疫抑制剂,可抑制机体体液免疫和细胞免疫反应^[35]。在免疫抑制状态下,小鼠常表现为生长迟缓及体质量增长受阻。如图 6 所示,造模前,各组小鼠体质量变化率均随时间稳步上升,组间总体趋势接近。造模后,CTX 组体质量变化率明显下降,并在第 20 天较 Con 组显著下降 48.61%,表明 CTX 处理明显抑制小鼠体质量增长。与 CTX 组相比,FVP-L 组和 FVP-H 组体质量变化率分别显著提高 67.81% 和 52.92%,且均与 Con 组无显著差异。



小写字母不同表示组间差异显著($P<0.05$)

图 6 FVP 干预下免疫抑制小鼠体质量的变化
Figure 6 Changes in body weight of immunosuppressed mice under FVP intervention

结果表明,FVP 预处理可明显改善 CTX 造成的整体状态损伤,与姜黄多糖^[36]和海参肠多糖^[37]在 CTX 诱导小鼠免疫抑制模型中的体质量变化结果一致。然而,在当前给药浓度范围内,FVP 对体质量增长受阻的缓解作用未表现出明确的剂量递增关系,可能与低剂量已达到有

效干预范围有关,而体质量变化率作为总体表型指标,对剂量差异的分辨能力相对有限,还需结合后续血液学和免疫器官指标综合判断。

2.7 FVP 对免疫抑制小鼠血液指标的影响

由表 3 可知,CTX 处理后,血液学异常主要表现为淋巴细胞相关指标下降:淋巴细胞数降至 $(0.27\pm0.06)\times10^9\text{ L}^{-1}$,仅为 Con 组的 20.93%,其比例降至 $(42.60\pm1.35)\%$ 。FVP-L 组和 FVP-H 组的淋巴细胞数分别回升至 $(0.43\pm0.14)\times10^9$ 、 $(0.58\pm0.40)\times10^9\text{ L}^{-1}$ 。CTX 处理后,中性粒细胞数较 Con 组呈下降趋势,而 FVP-L 组和 FVP-H 组较 CTX 组有所回升,但组间差异均未达到显著水平,而中性粒细胞百分比在组间存在波动,未呈现一致变化规律。除白细胞相关指标外,红细胞相关指标在各组间也未见显著差异。

在 CTX 诱导的免疫抑制模型中,血液学异常通常以白细胞特别是淋巴细胞相关指标下降更为突出。已有 BALB/c 小鼠模型研究^[38]表明,CTX 处理后淋巴细胞数呈剂量依赖性下降,说明淋巴细胞相关指标是反映该模型免疫抑制程度的显著指标之一。类似的,海参肠多糖干预后,小鼠血液中淋巴细胞数回升,同时脾脏指数得到改善^[39]。中性粒细胞数组间差异未达到显著水平,可能与 CTX 造模条件及采样时间有关。已有研究表明,CTX 诱导的血液学变化具有剂量和时间依赖性^[38],中性粒细胞的下降幅度也受给药方案及检测节点影响^[40]。这种时间相关性可能与 CTX 对骨髓髓系造血的抑制及后续恢复过程有关,从而使白细胞和中性粒细胞相关指标在不同检测时点呈现动态变化^[41]。此外,中性粒细胞百分比为中性粒细胞占白细胞总数的比例,易受淋巴细胞百分比等其他白细胞亚群比例变化影响,因此其组间波动不宜直接解释为中性粒细胞绝对数量变化。综合来看,FVP 对 CTX 所致血液学异常的改善主要体现为淋巴细胞数及比例回升,表明其作用并非仅表现为体质量变化所反映的整体状态改善,还涉及对外周血淋巴细胞异常的缓解。其对免疫器官状态的影响,可结合免疫器官指数评价。

表 3 FVP 对免疫抑制小鼠血液指标的影响[†]

Table 3 Effect of FVP on hematological parameters of immunosuppressed mice

组别	白细胞数/ ($\times10^9\text{ L}^{-1}$)	淋巴细胞		中性粒细胞		红细胞数/ ($\times10^{12}\text{ L}^{-1}$)	血红蛋白含量/ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	红细胞 压积/%
		细胞数/ ($\times10^9\text{ L}^{-1}$)	细胞百分比/%	细胞数/ ($\times10^9\text{ L}^{-1}$)	细胞百分比/%			
Con	1.82 ± 0.62	1.29 ± 0.54^a	69.90 ± 10.56^a	0.40 ± 0.10	22.43 ± 5.25	9.47 ± 0.36	151.33 ± 3.79	44.13 ± 1.50
CTX	0.64 ± 0.12	0.27 ± 0.06^b	42.60 ± 1.35^b	0.26 ± 0.04	40.80 ± 3.36	6.92 ± 2.80	114.00 ± 44.19	32.67 ± 13.07
FVP-L	0.80 ± 0.25	0.43 ± 0.14^a	53.83 ± 3.51^a	0.31 ± 0.08	39.00 ± 5.64	8.80 ± 0.26	139.33 ± 4.73	40.43 ± 0.83
FVP-H	1.31 ± 0.98	0.58 ± 0.40^a	45.60 ± 2.56^a	0.61 ± 0.53	44.00 ± 5.78	8.02 ± 1.19	126.67 ± 17.56	36.90 ± 5.15

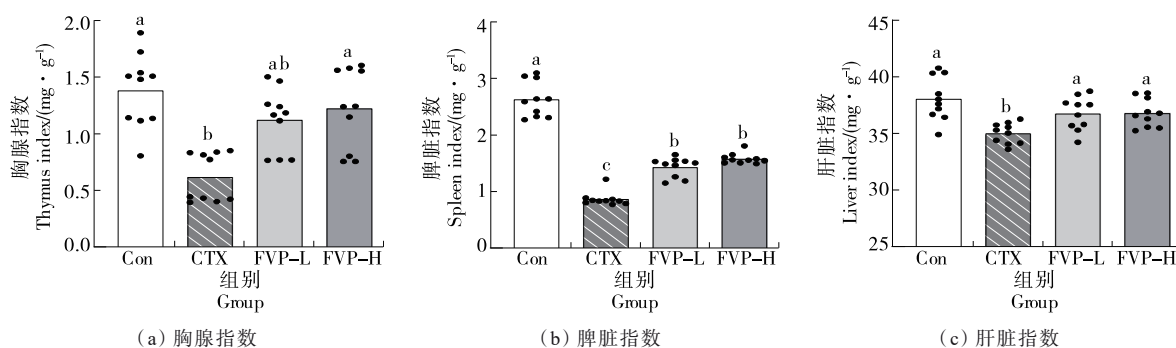
[†] 同列小写字母不同表示组间差异显著($P<0.05$)。

2.8 FVP对免疫抑制小鼠免疫器官指数的影响

如图7所示,与CTX组相比,FVP低、高剂量组的免疫器官指数整体呈回升趋势,但不同器官的改善程度存在差异。与Con组相比,CTX组胸腺、脾脏和肝脏指数均显著降低,说明CTX处理导致免疫相关器官整体受损。胸腺指数的显著改善仅见于高剂量组,FVP-H组较CTX组升高97.82%,而FVP-L组虽有上升,但未达到显著差异。脾脏指数和肝脏指数的改善更为一致,FVP-L组和FVP-H组均较CTX组显著升高。

总体来看,FVP干预后免疫器官指数回升,说明其对CTX造成的器官损伤具有一定缓解作用,与Liang等^[42]的研究结果相似。在其他多糖干预研究中也观察到相似趋势:CTX诱导后胸腺和脾脏指数下降,而干预

后该变化可被缓解,说明胸腺或脾脏指数下降是CTX免疫抑制模型中较常见的器官表型,多糖对这一损伤具有一定保护作用^[36-37,43]。然而,免疫器官指数,并非在所有研究中都是同向变化的,其差异与模型阶段、组织反应方式以及干预时程有关^[44]。试验中,胸腺指数仅在高剂量组显著回升,而脾脏和肝脏在低、高剂量组均表现出改善,说明FVP对CTX诱导免疫器官损伤的改善具有一定的器官差异性,其中高剂量对胸腺恢复更充分,可能与器官受损程度及恢复阈值不同有关。结合前述体质量变化和血液学结果,FVP对CTX诱导的整体状态受损、淋巴细胞相关异常及免疫器官指数下降均表现出一定缓解作用,说明其在动物水平上具有较完整的免疫保护效应。



小写字母不同表示组间差异显著($P < 0.05$)

图7 FVP对免疫抑制小鼠脏器指数的影响

Figure 7 Effect of FVP on organ indices of immunosuppressed mice

3 结论

研究对金针菇粗多糖的结构特征和免疫调节活性进行了评价。结果表明,所得金针菇粗多糖具有 β -型吡喃糖环的谱学特征,并呈多组分相对分子质量分布,其中较低相对分子质量组分为主要质量组分,同时含有一定比例高相对分子质量组分,整体平均重均相对分子质量为291.40。生物活性评价表明,金针菇粗多糖在3.125~600.0 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度范围内对小鼠单核巨噬细胞RAW 264.7无明显毒性,能够促进一氧化氮生成及肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-1 β 和白细胞介素-6相关基因的转录水平;同时,可显著改善环磷酰胺诱导免疫抑制小鼠的体质量变化率、淋巴细胞相关指标及免疫器官指数异常。综上,金针菇粗多糖具有良好的免疫调节活性,可应用于功能性食品领域。

参考文献

[1] WANG W H, ZHANG J S, FENG T, et al. Structural elucidation of a polysaccharide from *Flammulina velutipes* and its immunomodulation activities on mouse B lymphocytes[J].

Scientific Reports, 2018, 8(1): 3 120.

- [2] LI S P, ZHAO X J, WANG J Y. Synergy of Astragalus polysaccharides and probiotics (*Lactobacillus* and *Bacillus cereus*) on immunity and intestinal microbiota in chicks[J]. Poultry Science, 2009, 88(3): 519-525.
- [3] IKEKAWA T, UEHARA N, MAEDA Y, et al. Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms[J]. Cancer Research, 1969, 29(3): 734-735.
- [4] ZHANG Y F, KONG H L, FANG Y P, et al. Schizophyllan: a review on its structure, properties, bioactivities and recent developments[J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2013, 1(1): 53-71.
- [5] TSUKAGOSHI S, HASHIMOTO Y, FUJII G, et al. Krestin (PSK) [J]. Cancer Treatment Reviews, 1984, 11(2): 131-155.
- [6] EL ENSHASY H A, HATTI-KAUL R. Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications[J]. Trends in Biotechnology, 2013, 31(12): 668-677.
- [7] HAO Y T, LIAO X S, WANG X D, et al. The biological regulatory activities of *Flammulina velutipes* polysaccharide in mice intestinal microbiota, immune repertoire and heart transcriptome[J]. International Journal of Biological

- Macromolecules, 2021, 185: 582-591.
- [8] YE S Y, GAO Y, HU X Y, et al. Research progress and future development potential of *Flammulina velutipes* polysaccharides in the preparation process, structure analysis, biology, and pharmacology: a review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 267: 131467.
- [9] CHEN X, ZHANG J S, WANG Y F, et al. Structure and immunostimulatory activity studies on two novel *Flammulina velutipes* polysaccharides: revealing potential impacts of $\rightarrow 6$ - α -d-Glcp(1 $\rightarrow$ on the TLR-4/MyD88/NF- κ B pathway[J]. Food & Function, 2024, 15(7): 3 507-3 521.
- [10] CHEN X, FANG D L, ZHAO R Q, et al. Effects of ultrasound-assisted extraction on antioxidant activity and bidirectional immunomodulatory activity of *Flammulina velutipes* polysaccharide[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 140: 505-514.
- [11] YIN H P, WANG Y, WANG Y F, et al. Purification, characterization and immuno-modulating properties of polysaccharides isolated from *Flammulina velutipes* Mycelium [J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2010, 38(1): 191-204.
- [12] YE J F, WANG X D, WANG K, et al. A novel polysaccharide isolated from *Flammulina velutipes*, characterization, macrophage immunomodulatory activities and its impact on gut microbiota in rats[J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2020, 104(2): 735-748.
- [13] YAN Z F, LIU N X, MAO X X, et al. Activation effects of polysaccharides of *Flammulina velutipes* Mycorrhizae on the T lymphocyte immune function[J]. Journal of Immunology Research, 2014, 2 014(1): 285421.
- [14] ZHAO R Q, HU Q H, MA G X, et al. Effects of *Flammulina velutipes* polysaccharide on immune response and intestinal microbiota in mice[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 56: 255-264.
- [15] MENG Y, YAN J M, YANG G, et al. Structural characterization and macrophage activation of a hetero-galactan isolated from *Flammulina velutipes*[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 183: 207-218.
- [16] DUBOIS M, GILLES K, HAMILTON J K, et al. A colorimetric method for the determination of sugars[J]. Nature, 1951, 168(4 265): 167.
- [17] XU X Q, XUE C H, CHANG Y G, et al. Chain conformational and physicochemical properties of fucoidans from sea cucumber[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 152: 433-440.
- [18] WANG X, CAO Y J, CHEN S Y, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of 6,3',4'- and 7,3',4'-trihydroxyflavone on 2D and 3D RAW_{264.7} models[J]. Antioxidants, 2023, 12 (1): 204.
- [19] 陈麟, 布海丽且姆·阿卜杜热合曼, 姜露熙, 等. 小白杏多糖的提取、结构表征及抗氧化活性分析[J]. 食品与机械, 2026, 42(2): 152-159.
- CHEN L, ABUDUREHEMAN B, JIANG L X, et al. Extraction and analysis of structural characterization and antioxidant activity of polysaccharides from Xiaobai apricots [J]. Food & Machinery, 2026, 42(2): 152-159.
- [20] HONG T, YIN J Y, NIE S P, et al. Applications of infrared spectroscopy in polysaccharide structural analysis: progress, challenge and perspective[J]. Food Chemistry: X, 2021, 12: 100168.
- [21] DU H J, HU Q H, YANG W J, et al. Development, physicochemical characterization and forming mechanism of *Flammulina velutipes* polysaccharide-based edible films[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 152: 214-221.
- [22] HAO R L, ZHOU X, ZHAO X Y, et al. *Flammulina velutipes* polysaccharide counteracts cadmium-induced gut injury in mice via modulating gut inflammation, gut microbiota and intestinal barrier[J]. Science of the Total Environment, 2023, 877: 162910.
- [23] CHEN X, ZHAO L Y, HU Q H, et al. The structure - activity mechanism of the changes in the physicochemical properties of *Flammulina velutipes* polysaccharides during ultrasonic extraction[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2022, 102(7): 2 916-2 927.
- [24] DONG Y T, PEI F, SU A X, et al. Multiple fingerprint and fingerprint-activity relationship for quality assessment of polysaccharides from *Flammulina velutipes*[J]. Food and Chemical Toxicology, 2020, 135: 110944.
- [25] YE Z, YU L L, ZHANG C, et al. Modulation of gut microbiota and metabolites by *Flammulina velutipes* polysaccharides during *in vitro* human fecal fermentation: unveiling *Bacteroides* as a potential primary degrader[J]. Food Chemistry, 2024, 450: 139309.
- [26] ZHANG A Q, XIAO N N, DENG Y L, et al. Purification and structural investigation of a water-soluble polysaccharide from *Flammulina velutipes*[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(3): 2 279-2 283.
- [27] ZHANG T T, YE J F, XUE C H, et al. Structural characteristics and bioactive properties of a novel polysaccharide from *Flammulina velutipes*[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 197: 147-156.
- [28] YAN B W, WU H, ZENG K, et al. Structural characterization and immunomodulatory activities of polysaccharides from *Russula vinosa* lindblad extracted using KOH[J]. Journal of Bioresources and Bioproducts, 2025, 10(2): 253-269.
- [29] CHENG F, PAN X B, NOTARO A, et al. Immunomodulatory properties of an arabinan polysaccharide extracted from *Sida cordifolia*: isolation, characterization and *in vitro* mechanism of action[J]. Carbohydrate Polymers, 2025, 363: 123724.

- [30] GENG L H, HU W C, LIU Y J, et al. A heteropolysaccharide from *Saccharina japonica* with immunomodulatory effect on RAW_{264.7} cells[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 201: 557-565.
- [31] FAN R Y, ZHU C Y, QIU D Y, et al. Activation of RAW_{264.7} macrophages by an acidic polysaccharide derived from *Citrus grandis* 'Tomentosa' [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 156: 1 323-1 329.
- [32] YOON Y D, HAN S B, KANG J S, et al. Toll-like receptor 4-dependent activation of macrophages by polysaccharide isolated from the radix of *Platycodon grandiflorum*[J]. International Immunopharmacology, 2003, 3(13/14): 1 873-1 882.
- [33] 周杨洁, 明建, 饶哲楠, 等. 羊肚菌多糖免疫调节的分子机制与构效关系研究进展[J]. 食品与机械, 2025, 41(12): 171-179.
- ZHOU Y J, MING J, RAO Z N, et al. Research progress on the molecular mechanisms and structure-activity relationships of *Morchella esculenta* polysaccharides in immune regulation[J]. Food & Machinery, 2025, 41(12): 171-179.
- [34] BAILEY L O, WASHBURN N R, SIMON C G, et al. Quantification of inflammatory cellular responses using real-time polymerase chain reaction[J]. Journal of Biomedical Materials Research: Part A, 2004, 69(2): 305-313.
- [35] SHAND F L. The immunopharmacology of cyclophosphamide [J]. International Journal of Immunopharmacology, 1979, 1(3): 165-171.
- [36] ZHU Z P, LUO Y R, LIN L T, et al. Modulating effects of turmeric polysaccharides on immune response and gut microbiota in cyclophosphamide-treated mice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(7): 3 469-3 482.
- [37] LI Q, CHEN G Y, CHEN H, et al. Se-enriched *G. frondosa* polysaccharide protects against immunosuppression in cyclophosphamide-induced mice via MAPKs signal transduction pathway[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 196: 445-456.
- [38] HUYAN X H, LIN Y P, GAO T, et al. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice[J]. International Immunopharmacology, 2011, 11(9): 1 293-1 297.
- [39] JIN X Y, BAI L, SONG C, et al. A polysaccharide isolated from sea cucumber intestines enhances immunity and modulates gut microbiota and metabolism with efficacy comparable to that from the body wall[J]. Food Bioscience, 2026, 75: 108084.
- [40] STACKOWICZ J, JÖNSSON F, REBER L L. Mouse models and tools for the *in vivo* study of neutrophils[J]. Frontiers in Immunology, 2020, 10: 3 130.
- [41] GRAMAJO LOPEZ A, GUTIÉRREZ F, SAAVEDRA L, et al. Improvement of myelopoiesis in cyclophosphamide-immunosuppressed mice by oral administration of viable or non-viable *Lactobacillus strains*[J]. Frontiers in Immunology, 2021, 12: 647049.
- [42] LIANG Q X, ZHAO Q C, HAO X T, et al. The effect of *Flammulina velutipes* polysaccharide on immunization analyzed by intestinal flora and proteomics[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 841230.
- [43] XIE H L, FANG J Y, FARAG M A, et al. *Dendrobium officinale* leaf polysaccharides regulation of immune response and gut microbiota composition in cyclophosphamide-treated mice[J]. Food Chemistry: X, 2022, 13: 100235.
- [44] MA X X, WANG G Y, YANG L, et al. Structural characterization of two α -glucans with different molecular weights from *Flemingia philippinensis* and their immune-enhancing activities on cyclophosphamide-treated mice through regulation of gut microbiota[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 321: 146555.