

## 西藏灵菇胞外多糖组分对小鼠免疫调节作用及机制的研究

孟利<sup>1</sup>, 张兰威<sup>2\*</sup>

(黑龙江大学生命科学学院, 哈尔滨 150080)

(哈尔滨工业大学食品科学与工程学院, 哈尔滨 150001)

**摘要:** 【目的】研究数均分子量为  $0.1 \times 10^5 \sim 3.0 \times 10^5$  (组分 1) 及  $1.8 \times 10^3$  (组分 2) 的西藏灵菇胞外多糖组分对正常小鼠免疫功能的影响, 并探讨其影响机制。【方法】依据卫生部保健食品功能学评价程序和检验方法, 灌胃给药, 剂量分别 120 mg/kg 体重、80 mg/kg 体重、40 mg/kg 体重, 检测脏器/体重比值、半数溶血值 ( $HC_{50}$ )、自然杀伤细胞 (NK) 活性、迟发型变态反应 (DTH)、腹腔巨噬细胞吞噬功能。采用免疫印迹法, 测定小鼠腹腔巨噬细胞中 Erk 蛋白及 COX-2 酶的表达量。【结果】组分 1 能够明显提高  $HC_{50}$ , NK 细胞活性以及 DTH, 且量效关系体现为低剂量效果好于高剂量, 组分 2 能够明显提高 DTH、巨噬细胞吞噬率和吞噬指数, 其量效关系体现为高剂量效果好于低剂量。Erk 蛋白和 COX-2 酶表达量的趋势与吞噬指数的变化趋势相同。【结论】组分 1、组分 2 均具有调节正常小鼠免疫功能的作用, 组分 1 的调节免疫作用主要通过 NK 细胞、B 细胞来实现, 而组分 2 主要通过巨噬细胞和 T 细胞来实现。小鼠巨噬细胞吞噬功能的增强可能是多糖通过细胞外信号调节蛋白激酶 Erk 通路实现的。

**关键词:** 西藏灵菇; 胞外多糖; 免疫调节作用

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209 (2009) 12-1660-05

西藏灵菇 (Tibetan Kefir, TK) 胞外多糖是从我国传统发酵乳制品西藏灵菇发酵液中提取出来的微生物多糖。许多报道表明西藏灵菇发酵乳制品具有免疫调节、抑制肿瘤、吞噬癌细胞等生理功能<sup>[1-4]</sup>, 西藏灵菇多糖对荷瘤小鼠具有抑制肿瘤的作用<sup>[5]</sup>, 并表明抑制作用来自于其免疫调节作用<sup>[6-7]</sup>, 西藏灵菇多糖活性提取物对伤口具有愈合作用<sup>[8]</sup>。但西藏灵菇胞外多糖对正常小鼠是否具有免疫调节作用以及不同级分的多糖作用效果是否存在差别未见报道。本实验旨在探讨不同分子量范围的西藏灵菇胞外多糖对正常小鼠的免疫调节作用, 本研究的重要意义在于为今后进一步研究西藏灵菇胞外多糖的构效关系及作用机制提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物:** 清洁级雄性昆明小鼠, 体重 18 ~ 22 g, 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供, 哈尔滨医科大学公卫学院动物试验中心饲养。西藏灵菇菌粒由哈尔滨工业大学食品工程实验室保存。

**1.1.2 主要试剂与仪器:** 高效凝胶色谱柱: Shodex OH pak 500、250 SMB-20 生物型错流超滤系统, 中科院原子核所膜分离技术研发中心; Yac-1 细胞、补体 (豚鼠血清) 哈尔滨医科大学公卫学院实验室保存; RPMI1640 细胞培养液, Gibico 公司; 二氧化碳培养箱, SANYO 公司; ELX800 酶标仪, Bio-Tech 公司。

基金项目: 国家“863”重点项目——食品高效分离制备技术与制备 (2007AA100404), 国家“863”目标导向项目——益生菌定向选育及其高活性制品开发关键技术 (2007AA10Z354)

\* 通信作者。Tel: +86-451-86282901; E-mail: lanweizhang@yahoo.com.cn

作者简介: 孟利 (1980 - ), 女, 黑龙江五常人, 讲师, 博士, 主要从事乳品及乳品微生物研究。

收稿日期: 2009-07-23; 修回日期: 2009-09-12

## 1.2 西藏灵芝胞外多糖组分 1、组分 2 的提取与纯化

(1) 西藏灵芝粗多糖的制备:西藏灵芝菌粒在 25℃ 接种量 10%, 接种到 12% 的脱脂乳中, 发酵 12 h, 用筛网滤去菌粒, 取发酵乳, 经流通蒸汽 5 min 灭酶得到发酵液, 用聚酰胺柱层析法除蛋白得到的除蛋白液, 除蛋白液用三倍的 95% 乙醇沉淀, 离心 (16000 × g) 得到粗多糖。

(2) 西藏灵芝多糖的分级分离:粗多糖用水溶解, 微滤, 用截留分子量为 10000 超滤膜超滤, 得到的截留液经 3 倍乙醇沉淀、离心 (16000 × g), 冷冻干燥得到组分 1, 透过液再经截留分子量为 3000 的超滤膜超滤, 得到截留液, 经三倍乙醇沉淀、离心 (16000 × g), 冷冻干燥得到组分 2。

经高效凝胶色谱测定西藏灵芝胞外多糖组分 1 的数均分子量为  $0.1 \times 10^5 \sim 3.0 \times 10^5$ , 组分 2 为  $1.8 \times 10^3$ 。两个多糖组分的纯度均在 90% 以上。

## 1.3 多糖组分对小鼠免疫调节作用及机制的研究

### 1.3.1 动物分组与给药:小鼠随机分组,灌胃给药。

对照组给予蒸馏水, I ~ III 组给予组分 1, 灌胃剂量分别为 120 mg/kg 体重、80 mg/kg 体重、40 mg/kg 体重, IV ~ VI 组给予组分 2, 灌胃剂量分别为 120 mg/kg 体重、80 mg/kg 体重、40 mg/kg 体重。所有受试小鼠自由摄食、饮水。

1.3.2 小鼠体重指数的测定:小鼠连续灌胃 30 d, 每 7 d 称体重一次, 作体重变化趋势曲线。

1.3.3 小鼠脏器指数的测定:小鼠称重, 处死后取肝脏、脾脏、胸腺, 吸干, 用分析天平称量, 计算脏器体重比值。

1.3.4 小鼠免疫指标的测定:半数溶血素的测定:半数溶血值 ( $HC_{50}$ ) 测定法; NK 细胞活性:乳酸脱氢酶 (LDH) 测定法; 迟发型变态反应 (DTH): 绵羊红细胞 (SRBC) 诱导小鼠 DTH (足跖增厚法); 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验:半体内法<sup>[9-10]</sup>。

1.3.5 腹腔巨噬细胞中 COX-2 及 Erk 的表达的测定:取对照组及组分 1 的 I、III 组分 2 的 IV、VI 的小鼠腹腔巨噬细胞, 调细胞数至  $2 \times 10^6$  个/mL, 5%  $CO_2$  温箱孵育 2 h, 4℃ 裂解 2 h 后, 10000 r/min 离心 15 min, 取上清, -20℃ 保存, 实验时将上清与样品缓冲液混合, 变形后按等蛋白量加到 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶上, 电泳完毕后转至硝酸纤维素膜, 经封闭, 再分别与第一抗体 Erk-1、COX-2 杂交、PBS 冲洗, 与加入碱性磷酸酶标记的二抗杂交、再冲洗, 显色, 结果用凝胶扫描数字成像系统进行分析<sup>[11]</sup>。

### 1.4 统计学处理

使用 SPSS 11.5 软件, Duncan 平均数多重比较进行方差分析。

## 2 结果

### 2.1 组分 1、组分 2 对小鼠体重的影响

连续灌胃 30 d 后, 小鼠体重变化趋势如图 1 所示。在前两周为小鼠快速生长阶段, 此时剂量组比对照组小鼠体重比略高, 但经过统计分析, 无显著差别 ( $P > 0.05$ )。后两周小鼠体重进入稳定阶段, 此时对照组的体重与其他各组的体重无明显不同。这说明西藏灵芝胞外多糖的两个组分不会引起小鼠体重的明显改变。

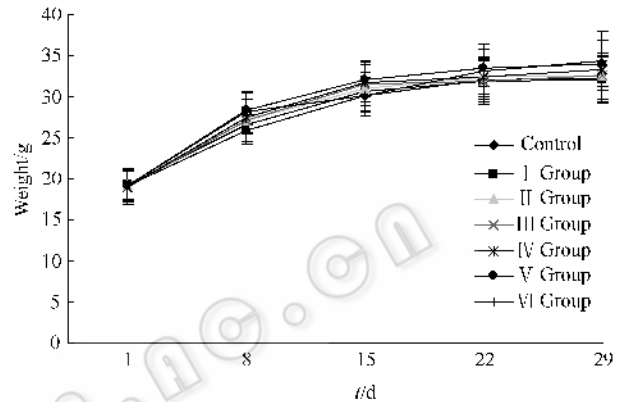


图 1 西藏灵芝胞外多糖各剂量组小鼠体重变化

Fig. 1 Body weight change of mice treated with different dose of TK EPS.  $n = 20$ ,  $\bar{x} \pm SD$ ; Group I ~ III: 1g fraction 1, 120 mg/kg, 80 mg/kg, 40 mg/kg; Group IV ~ VI: 1g fraction 2, 120 mg/kg, 80 mg/kg, 40 mg/kg.

### 2.2 组分 1、组分 2 对小鼠脏器指数的影响

脾脏、胸腺、肝脏为小鼠体内重要的免疫器官, 免疫调节物质一般能够影响到脏器指数, 组分 1、组分 2 对小鼠脏器指数的影响, 见表 1。

结果表明, 各处理组与对照组的胸腺、肝脏的脏器指数之间没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。这说明, 西藏灵芝胞外多糖的两个组分组分 1、组分 2 不会引起正常小鼠免疫器官的改变。

### 2.3 组分 1、组分 2 对小鼠血清溶血素的影响

B 淋巴细胞受抗原 (绵羊红细胞) 刺激后, 分化为浆细胞, 浆细胞产生一种抗体 (免疫球蛋白)——溶血素, 当再次接受相同抗原刺激时, 溶血素和抗原在补体的参与下发生免疫反应 (溶血)。血清溶血素的含量反映了被绵羊红细胞免疫后的小鼠特异性体液免疫的功能。

结果表明, 组分 1 的 I 组在数值上略有提高, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ ), II 组、III 组的  $HC_{50}$  分别为  $202.28 \pm 25.84$  和  $209.19 \pm 36.26$ , 对照组为  $123.19 \pm 45.85$ , 差异显著 ( $P < 0.05$ )。组分 2 的 IV ~ VI 组  $HC_{50}$  在  $134.37 \pm 33.25 \sim 143.09 \pm 43.66$  之间, 与对照组差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 但数值上有一

定量的提高。组分 1、组分 2 对小鼠血清溶血素的影响结果见表 2。

因此,西藏灵菇胞外多糖的 1 组分灌胃后,可以

明显提高小鼠血清半数溶血值,且低剂量组作用比较明显。而 2 组分的增强作用不明显 ( $P > 0.05$ )。

表 1 西藏灵菇胞外多糖对小鼠脏器指数的影响

Table 1 Effect of TK EPS on mice immune organ index

Group	Treatment	Dose (mg/kg)	Spleen index/ (mg/g)	Thymus index/ (mg/g)	Liver index/ (mg/g)
control	distilled water	80	6.420 ± 1.414	3.576 ± 0.410	45.50 ± 3.21
I		120	5.787 ± 0.776	3.251 ± 0.819	47.68 ± 3.40
II	fraction 1	80	5.480 ± 1.003	3.188 ± 0.054	48.53 ± 6.42
III		40	7.639 ± 1.496	2.755 ± 0.105	45.99 ± 5.36
IV	fraction 2	120	6.492 ± 1.127	4.846 ± 0.382	45.01 ± 4.28
V		80	6.560 ± 0.954	4.659 ± 0.392	46.11 ± 5.25
VI		40	7.419 ± 1.655	4.546 ± 0.438	49.73 ± 5.11

$n = 10 \bar{x} \pm SD$ .

表 2 西藏灵菇胞外多糖对小鼠  $HC_{50}$ 、NK 细胞活性、DTH 及吞噬细胞的吞噬功能的影响

Table 2 Effects of TK EPS on  $HC_{50}$ , NK cell, DTH and phagocytosis of macrophage

Group	$HC_{50}$	Activity of NK cell (%)	Degree of paw edema (cm)	Phagocytic rate (%)	Phagocytic index
control	123.19 ± 45.85 <sup>a</sup>	22.73 ± 3.42	0.149 ± 0.068	18.45 ± 5.07	0.50 ± 0.19
I	124.30 ± 37.56	32.95 ± 2.92**	0.209 ± 0.061	35.04 ± 7.11*	0.83 ± 0.23
II	202.28 ± 25.84*	34.31 ± 2.40**	0.243 ± 0.074*	35.30 ± 7.44*	0.85 ± 0.24
III	209.19 ± 36.26*	38.96 ± 3.45**	0.264 ± 0.107**	38.00 ± 8.87*	0.97 ± 0.30
IV	138.17 ± 38.91	20.62 ± 3.31	0.402 ± 0.096**	52.38 ± 11.55**	1.38 ± 0.31*
V	134.37 ± 33.25	20.58 ± 3.62	0.401 ± 0.058**	50.27 ± 10.50**	1.39 ± 0.32*
VI	143.09 ± 43.66	19.58 ± 2.70	0.366 ± 0.066**	42.19 ± 11.76**	1.55 ± 0.37**

$n = 10 \bar{x} \pm SD$ , \* :  $P < 0.05$  VS control group, \*\* :  $P < 0.01$  VS control group.

## 2.4 组分 1、组分 2 对小鼠 NK 细胞活性的影响

活细胞的胞浆内含有乳酸脱氢酶 (LDH),正常情况下,LDH 不能透过细胞膜,当细胞受到 NK 细胞的杀伤后,LDH 释放到细胞外,通过该试验,可以测定小鼠脾脏的 NK 细胞杀伤 Yac-1 细胞的活性,组分 1、组分 2 对小鼠 NK 细胞活性的影响,结果见表 2。

结果表明, I 组和 II 组小鼠脾脏 NK 细胞活性分别为  $32.95 \pm 2.92\%$  和  $34.31 \pm 2.40\%$ , 对照组为  $22.73 \pm 3.42\%$ , 差异极显著 ( $P < 0.01$ )。 III 组小鼠脾脏的 NK 细胞活性为  $38.96 \pm 3.45\%$ , 明显高于 I 和 II 组 ( $P < 0.05$ ); IV ~ VI 组小鼠脾脏 NK 细胞活性在  $19.58 \pm 2.70\% \sim 20.62 \pm 3.31\%$  之间, 与对照组差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

因此,经西藏灵菇胞外多糖的组分 1 灌胃后小鼠脾脏 NK 细胞杀伤 YAC-1 细胞的活性明显提高,且低剂量组作用较强,而组分 2 对该活性没有明显的促进作用。

## 2.5 组分 1、组分 2 对迟发型变态反应的影响

机体 T-淋巴细胞受抗原刺激后,分化为特异性的致敏 T-淋巴细胞,当致敏 T-淋巴细胞再次接触相同的抗原后,引起迟发型超敏反应,使 T-淋巴细胞活化,释放出多种淋巴因子,产生炎症,炎症反应的程度反映了机体对该抗原特异性细胞免疫力的大小。组分 1、组分 2 对小鼠的迟发型变态反应的影响,见表 2。

响,见表 2。

结果表明,组分 1 的 I、II 和 III 组小鼠足跖肿胀厚度分别为  $0.209 \pm 0.061$  cm、 $0.243 \pm 0.074$  cm、 $0.264 \pm 0.107$  cm, 对照组小鼠的足跖肿胀厚度为  $0.149 \pm 0.068$  cm, 差异分别为不显著 ( $P > 0.05$ )、显著 ( $P < 0.05$ ) 和极显著 ( $P < 0.01$ ); 组分 2 的 IV ~ VI 组小鼠足跖增加肿胀厚度分别为  $0.402 \pm 0.096$  cm、 $0.401 \pm 0.058$  cm、 $0.366 \pm 0.066$  cm, 对照组小鼠足跖增加的厚度为  $0.149 \pm 0.068$  cm, 差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 且极显著高于 I ~ III 组 ( $P < 0.01$ )。

这表明西藏灵菇胞外多糖的组分 1、组分 2 均能提高正常小鼠迟发性变态反应。组分 2 的作用比组分 1 的作用效果明显。

## 2.6 组分 1、组分 2 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响

西藏灵菇胞外多糖组分 1、组分 2 处理组及对照组的小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬率和吞噬指数,如表 2 所示。

结果表明,组分 1 的 I ~ III 组小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬率在  $35.04 \pm 7.11\% \sim 38.00 \pm 8.87\%$  之间, 对照组为  $18.45 \pm 5.07\%$ , 差异显著 ( $P < 0.05$ ), 吞噬指数在  $0.83 \pm 0.23 \sim 0.97 \pm 0.30$  之间, 对照组的吞噬指数为  $0.50 \pm 0.19$ , 差异在统计学上不显著 ( $P > 0.05$ ), 但在数值上有明显提高; 组分 2 的 IV ~ VI 组

小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬率为  $42.19 \pm 11.76\% \sim 52.38 \pm 11.55\%$  ,与对照组差异极显著 ( $P < 0.01$ ) 和吞噬指数为  $1.38 \pm 0.31 \sim 1.55 \pm 0.37$  ,与对照组有显著差异 ( $P < 0.05$ ) 。

因此,西藏灵菇胞外多糖的组分 1、组分 2 均能提高正常小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能,其中组分 2 比组分 1 效果明显。

## 2.7 腹腔巨噬细胞中 COX-2 及 Erk 的表达的测定

细胞外信号调节蛋白激酶 Erk (extracellular signal-regulated protein in kinase, Erk) 通路是 MAPK 通

路之一,它可以被多种刺激剂,如蛋白激酶 C 激活剂、有丝分裂原、氧化剂、细菌、病毒、免疫刺激剂和 LPS 和自由基等激活。活化的 Erk 激酶移位至细胞核磷酸化活化一系列转录因子包括 Elk、SAP-1 及 AP-1 多种转录因子等,参与调控 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  等多种细胞因子的表达。为探讨组分 1 和组分 2 提高巨噬细胞吞噬功能的机理,检测了剂量组巨噬细胞中环氧合酶 COX-2, Erk 蛋白的表达情况,结果见图 2。各组 COX-2, Erk 的表达趋势与吞噬细胞的吞噬率和吞噬指数的变化趋势比较结果见图 3。

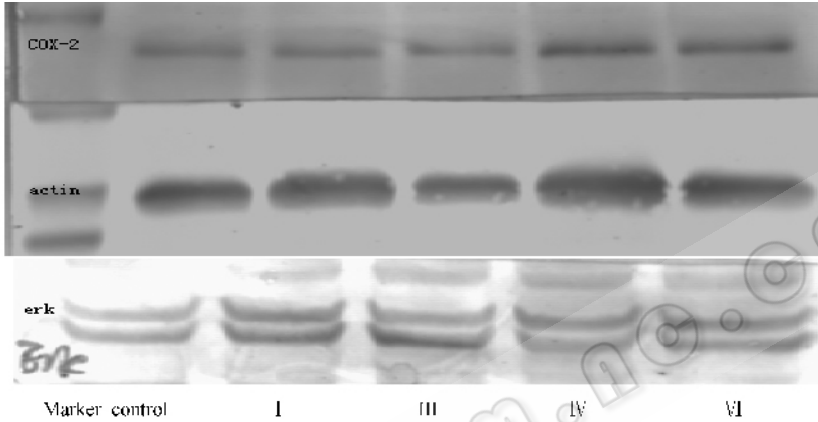


图 2 小鼠巨噬细胞中 COX-2 和 Erk 蛋白的表达

Fig.2 The expression of COX-2 and Erk in phagocyte.

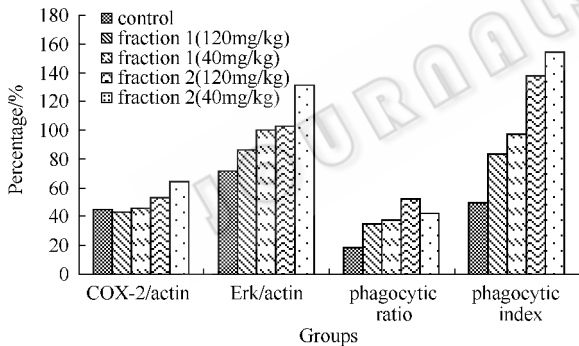


图 3 小鼠巨噬细胞中 COX-2, Erk 蛋白表达与吞噬功能的关系

Fig.3 The expression of COX-2, Erk and macrophage function of phagocyte.

结果表明, COX-2 酶和 Erk 蛋白表达量的趋势与吞噬指数的趋势相似, Erk 可能参与组分 1 和组分 2 诱导的对巨噬细胞吞噬功能增强的过程。而 COX-2 的表达量增加但并不十分明显, 组分 1 和组分 2 灌胃后的小鼠巨噬细胞可以使 COX-2 的表达量在一定范围内提高, 说明组分 1 和组分 2 处理组中小鼠巨噬细胞得到了一定程度的活化。

## 3 讨论

结果表明, 西藏灵菇胞外多糖组分 1 和组分 2

分别体现了对正常小鼠不同的免疫调节作用。组分 1 的调节免疫作用主要通过 NK 细胞、B 细胞介导的体液免疫来实现, 而组分 2 主要通过 T 细胞介导的细胞免疫和巨噬细胞来实现。小鼠巨噬细胞吞噬功能的增强可能是多糖通过细胞外信号调节蛋白激酶 Erk 通路实现的。Kitazawa 等研究保加利亚乳杆菌 OLL1073R-1 分泌的胞外多糖, 发现这种胞外脂多糖具有增加巨噬细胞吞噬功能的作用, 并提出酸性多糖主要通过增强巨噬细胞吞噬功能来影响 T 细胞诱导的免疫, 而其分泌的中性多糖却不会产生诱导免疫作用<sup>[2-13]</sup>。顾笑梅等研究表明乳酸菌 Z222 产生的胞外多糖对荷瘤小鼠具有较高的促进淋巴细胞特异抗体的能力<sup>[4]</sup>。以上报道说明, 不同来源的胞外多糖, 其免疫调节作用不同, 机理也各不相同。西藏灵菇是由多种乳酸菌、酵母菌和醋酸菌组成, 所分泌的胞外多糖在不同分子量区域具有不同的免疫调节作用, 但胞外多糖的分子量影响免疫调节作用的机理尚不清楚, 还有待于进一步探讨。

## 参考文献

- [1] 刘宇峰, 夏海华, 孙建华等. 西藏灵菇乳对肿瘤的抑制作用. 畜牧兽医科技信息 (Husbandry and Veterinary Science and Technology Information) 2005 06 56-57.
- [2] Cummings H, Englyst N. Gastrointestinal effects of food carbohydrate. American Journal of Clinical Nutrition supply.

- 1995 ,61 :938 – 945.
- [3] Diniz R ,Garla L ,Schneedorf J ,Carvalho J. Study of anti-inflammatory activity of Tibetan Mushroom , a symbiotic culture of bacteria and fungi encapsulated into a polysaccharide matrix. *Pharmacological Research* 2003 *A7* : 49 – 52.
- [4] Oda M ,Hasegawa HK ,Kambe M ,et al. 1983. Anti-tumor polysaccharide from *Lactobacillus sp.* *Agricultural Biology and Chemistry* ,1983 *A7* (7) :1621 – 1625.
- [5] Forslen R ,Heiska E ,Herva E. Immunobiological effects of *Streptococcus cremoris* from cultured milk viili. Application of human lymphocyte culture techniques. *Food Microbiology* ,1987 *5* :41 – 47.
- [6] 范荣波. 西藏灵菇粗多糖提取工艺及抑瘤作用的研究. 东北农业大学硕士学位论文 2005.
- [7] Hosono JL ,Amenati A ,Natsume M ,et al. Characterization of a water-soluble polysaccharide fraction with immunopotentiating activity from bifidobacterium adolescentis M101-4. *Bioscience biotechnology and biochemistry* ,1997 *61* :312 – 316.
- [8] Rodrigues KL ,Carvalho JC ,Caputo LR ,et al. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *International Journal of Antimicrobial Agents* ,2005 *25* (5) : 404 – 408.
- [9] 保健食品功能学评价程序和检验方法. 卫生部 ,1998.
- [10] Nishimura UJ ,Kitazawa H ,Kawai Y ,et al. Functional alteration of murine macrophages stimulated with extracellular polysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* OLL1073R-1. *Food Microbiology* ,2003 *20* :267 – 273.
- [11] Kitazawa H ,Itoh T. Antitumoral activity of slime-forming encapsulated *Lactococcus lactis subsp. cremoris* isolated from Scandinavian røp sour milk viili. *Animal Science and Technology* ,1991 *62* :277 – 283.
- [12] Kitazawa H ,Itoh T ,Tomioka Y. Induction of IFN- $\gamma$  and IL-1 $\alpha$  production in macrophages stimulated with phosphopolysaccharide produced by *lactococcus lactis ssp. Cremoris* . *Food Microbiology* ,1996 *31* :99 – 106.
- [13] Kitazawa H ,Ishii Y ,Uemura J ,et al. Augmentation of macrophage function by an extracellular phosphopolysaccharide from *lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* . *Food Microbiology* ,2000 *17* :109 – 118.
- [14] 顾笑梅,孔健,王富生等. 一株乳酸菌所产胞外多糖对荷瘤小鼠机体免疫功能影响的研究. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*) ,2003 *A3* (2) :15 – 17.

## Immune regulation activity and mechanism of Tibetan Kefir exopolysaccharide fractions

Li Meng<sup>1</sup> ,Lanwei Zhang<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Life Science ,Heilongjiang University ,Harbin 150080 ,China )

(<sup>2</sup> Food Science and Technology Department ,Harbin Institute of Technology ,Harbin 150001 ,China )

**Abstract :** [Objective] To investigate the effects and mechanism on immune regulation activity in mice of two Tibetan Kefir exopolysaccharides (EPS) with different molecular weight of  $0.1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$  (fraction 1) and  $1.8 \times 10^3$  (fraction 2).

[Method] The immune regulation activity experiment was carried out *in vitro* based on the Functional Assessment Procedure and Test Methods of Health Food ,which was issued by Ministry of Health of China. First ,we treated *mice subjects* with EPS at doses of 40 mg/kg ,80 mg/kg ,120 mg/kg through ig. Then we detected the index of immune organs ,the ability of antibody production (tested by HC<sub>50</sub>) ,activity of NK cell ,delayed type hypersensitivity (DTH) and phagocytosis of macrophage in mice. Finally ,we examined the expression of Erk protein in Macrophages by Western Blot assay. [Results] Fraction 1 could promote HC<sub>50</sub> ,activity of NK cell and DTH in mice which low dose showed better. Fraction 2 could promote DTH ,phagocytosis of macrophage which high dose showed better. The expression of Erk and COX-2 had the same trend with Phagocytic index. [Conclusion] We verified the two fractions of Tibetan Kefir EPS could enhance immune functions in mice. Fraction 1 regulated immune function through NK cell and B cell while fraction 2 through macrophage cell and T cell. The effects to macrophage of Tibetan Kefir EPS in mice may realize through extra cellular signal-regulated kinase Erk pathway.

**Keywords :** Tibetan Kefir ; exopolysaccharides ; immune regulation activity

(本文责编 张晓丽)

Supported by the National Programs for Technology and Equipment of Food Efficient Separation and Preparation (2007AA100404) , the National Programs for Key Technologies of Directional Selection and Highly Active Probiotic Products Development (2007AA10Z354)

\* Corresponding author. Tel : + 86-451-86282901 ; E-mail : lanweizhang@yahoo.com.cn

Received : 2 July 2009/Revised : 12 September 2009

# 《微生物学报》征稿简则

(2008年12月修订)

## 一、刊物简介和栏目设置

《微生物学报》由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办,国内外公开发行人。主要报道国内外微生物学研究领域的最新科研成果和研究动态,内容涵盖工业、农业、医学、兽医微生物学、病毒学、免疫学等现代生物技术的各个领域。本刊是我国微生物学领域最具影响力的综合性学报级期刊和国家自然科学基金核心期刊。已被多家文献数据库收录。设有研究报告、研究简报和小型综述3个栏目。

## 二、投稿要求

1. 投稿方式:从2006年起,本刊已采用“稿件远程处理系统”进行网上投稿、网上审稿、网上查询等。请登录本刊网站 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>,点击“作者投稿”。如果是首次采用远程方式投稿本刊,请先点击“注册”,注册成功后,即可用注册的用户名和口令在线投稿。详见本刊网站中具体投稿要求。
2. 介绍信:作者投稿时应声明专投本刊,非一稿两投,一旦发生一稿两投,责任由作者承担。请您登陆本刊网站进入“下载专区”下载“介绍信模板”,认真填写各项内容,随1份纸稿(单面打印,A4纸输出)一同邮寄到编辑部。
3. 稿件受理费:投稿时请通过邮局汇款100元,切忌将100元夹在纸样中一起邮寄!款到后编辑部会及时以挂号信寄回正式发票。[注:务请在汇款单上注明“第一作者姓名”和“稿件编号”。]
4. 联系方式:为了及时准确地联系,务必请在投稿时注明文章的通信作者、详细邮寄地址、电话及E-mail(E-mail最好同时提供第一作者和通信作者的)。

## 三、写作要求

1. 篇幅:以A4纸五号宋体计算,综述最好在3页以内,简报不超过4页,研究报告5~7页(以上均包括图表)。英文稿请附中文题目及中文摘要等内容。
2. 文题:要求简短、醒目、准确反映主题。中文题名一般不超过30个汉字,英文题名应与中文一致。
3. 中英文摘要:研究论文摘要包括目的、方法、结果和讨论;综述摘要包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望。英文摘要完成后,务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再投来。
4. 图和表:文中的图表需清晰简明,应避免图与表内容重复。图内字号为8P,所有小图的宽度应小于8cm(占半栏),大图的宽度应小于17cm(通栏)。图、表题应中英文对照,图上、表内文字及图、表注释一律用英文。
5. 参考文献:参考文献按文内引用的先后排序,必须是作者在论文中直接引用的。未正式发表的文献(包括私人通讯、产品说明书等,学位论文除外)一般不作为文献引用,必要时可作为脚注处理。格式如下:

期刊:[序号]作者.文章题目.刊名,年,卷(期):页码.

图书:[序号]作者.书名.版次.出版地:出版社,出版年,页码.

[序号]文章作者.文章题目//书的作者.书名.版次.出版地:出版社,出版年,页码.

译著:[序号]外国作者的原姓名.中文书名.译者的中国人名.等译.版次.出版地:出版社,出版年,页码.

专利:[序号]专利所有者.专利题名.专利国别:专利号.日期.学位论文:[序号]作者.论文题目.学校名.博士/硕士论文,年.

## 四、特别说明

1. 所有实验材料和方法都要符合相关的法律。
2. 关于版权:①本刊只接受未公开发表的文章,请勿一稿两投。②凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章,专有出版权和网络传播权等所有版权均属本刊所有。文章发表后,作者仍享有非专有使用权,可以使用文章进行展览、汇编或展示在自己的网站上。作者如有异议,请事先声明。③对录用的稿件编辑部有权进行文字加工,如有大的改动将请作者同意。④作者必须保证论文的真实性,因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果,由作者自负。
3. 审稿程序:来稿刊登与否由编委会最后审定,通常在收到来稿2个月内致作者审稿结果。凡被录用的稿件将及时发出录用通知,对不录用的稿件会致函说明原因。印刷稿不退,请作者自留底稿及原图。
4. 关于综述:本刊只刊登微型综述(mini review),来稿字数应控制在5000字(不含参考文献),综述文章一定要结合作者自己的工作,要求文献新,观点明,有评论,有展望,切忌堆砌资料只述不评。
5. 关于测序:凡涉及测定DNA、RNA或蛋白质序列的内容,请先通过计算机网络进入国际基因库EMBL(欧洲)或GenBank(美国)或DDBJ(日本),申请得到国际基因库接受号(Accession No.)后再投来,文中只列出序列号即可。

## 五、发表费和稿费

论文一经录用,将在发表前根据版面收取一定的发表费(200元/面,彩图另加1000元,不计数量),并酌付稿酬(50元/黑白,200元/彩色)。期刊出版后给每篇文章的作者寄送2本样刊和20个单行本。编辑部会及时开据发票,并以挂号信邮寄给作者。编辑部会留有发票的复印件,并保留3个月,逾期编辑部将不再负责提供任何收据。

## 六、联系方式

地址:(100101)北京市朝阳区北辰西路1号中科院微生物所内

收信(款)人:《微生物学报》编辑部

电话:(010)64807516;传真:(010)64807327

E-mail:actamicro@im.ac.cn

<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>