

【药效学评价】

羊栖菜褐藻糖胶 CSFP-1 抗肿瘤活性及机制研究

胡晨熙¹, 肖保衡¹, 刘 剑¹, 佟海滨^{1,2,3}, 陈培超^{1,2}, 张 旭^{1,2*}, 吴明江^{1,2*}

1. 温州大学生命与环境科学学院, 浙江 温州 325035

2. 浙江省水环境与海洋生物资源保护重点实验室, 浙江 温州 325035

3. 中国中医科学院 博士后科研流动站 中药资源中心, 北京 100700

摘要: **目的** 分离纯化制备羊栖菜褐藻糖胶 (CSFP-1), 并对其抗肿瘤活性及可能作用机制进行初步研究。**方法** 通过冷水浸提法制备羊栖菜褐藻糖胶 (CSFP), 经超滤系统分离获得 CSFP-1, 并采用苯酚-硫酸比色法、PMP 衍生化、高效液相色谱法、红外光谱分析等多种方法对其理化性质进行分析; 采用 MTT 法评价 CSFP-1 (0、10、100、300 $\mu\text{g/mL}$) 对宫颈癌细胞 (HeLa)、肺癌细胞 (A549) 和肝癌细胞 (Hep3B) 生存能力的影响; 应用流式细胞术评价 CSFP-1 对 HeLa 细胞细胞周期的影响; 应用 Western blotting 技术评价 CSFP-1 对 HeLa 细胞凋亡和自噬相关蛋白表达的影响。**结果** CSFP-1 的糖含量为 84.18%, 糖醛酸含量为 14.28%, 硫酸根含量为 10.02%, 平均相对分子质量为 5.6×10^4 , 主要由半乳糖、岩藻糖、甘露糖、葡萄糖醛酸和木糖组成。CSFP-1 具有选择性细胞毒性, 对 HeLa 细胞生长发挥显著抑制作用 ($P < 0.05$ 、 0.001), 对 A549 和 Hep3B 细胞存活率没有明显影响。与对照组比较, HeLa 细胞经 CSFP-1 处理 24 h 后, G1 期细胞比例明显增加 ($P < 0.001$); 经 CSFP-1 处理 48 h 后, S 期细胞比例显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), G2 期细胞比例显著减少 ($P < 0.01$ 、 0.001), 均呈现剂量相关性。与对照组比较, CSFP-1 100、300 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组处理 24 h, 300 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组处理 48 h Bcl-2 蛋白表达显著减少 ($P < 0.05$); 100、300 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组处理 24、48 h Beclin-1 蛋白表达显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且存在时间和剂量相关性。**结论** CSFP-1 具有选择性抑制 HeLa 细胞增殖作用, 作用机制可能与阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡相关。

关键词: 羊栖菜; 褐藻糖胶; 细胞凋亡; 细胞自噬; 抗肿瘤; 细胞周期**中图分类号:** R962.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2018) 09- 1581 - 08**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.09.004Preliminary study on anti-tumor activity of fucoidin of *Sargassum fusiforme*HU Chenxi¹, XIAO Baoheng¹, LIU Jian¹, TONG Haibin^{1,2,3}, CHEN Peichao^{1,2}, ZHANG Xu^{1,2}, WU Mingjiang^{1,2}

1. College of Life and Environmental Science, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China

2. Zhenjiang Provincial Key Laboratory of Water Environmental and Marine Bio-resources Protection, Wenzhou 325035, China

3. Center for Post-doctoral research, Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: Objective To extract, purify, and prepare the fucoidin of *Sargassum fusiforme* (CSFP-1), and preliminary investigate its anti-tumor activity and underlying mechanism. **Methods** CSFP was extracted by cold water and CSFP-1 was obtained by ultrafiltration system. Phenol-sulfuric acid colorimetry, PMP derivatization, high performance liquid chromatography, infrared spectroscopy, and other methods were used to analyze the physical and chemical properties. The effects of CSFP-1 (0, 10, 100, and 300 $\mu\text{g/mL}$) on the viability of cervical cancer cells (HeLa), lung cancer cells (A549), and hepatoma cells (Hep3B) were evaluated by MTT assay, the effects of CSFP-1 on the cell cycle of HeLa were evaluated by flow cytometry, and the effects of CSFP-1 on apoptosis and

收稿日期: 2018-03-06**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (314070430); 浙江省教育厅科研项目 (Y201737374); 浙江省基础公益研究计划 (LGN18C020004); 浙江省科技计划项目 (2017C32103); 浙江省自然科学基金 (LY18C020006)**第一作者:** 胡晨熙 (1991—), 女, 浙江温州人, 硕士研究生, 研究方向为羊栖菜多糖的活性研究。Tel: 13506550861 E-mail: 15451382279@stu.wzu.edu.cn***通信作者:** 吴明江, 硕士生导师, 教授, 主要从事糖生物学、海藻活性产物研究及开发。E-mail: wmj@wzu.edu.cn
张 旭, 讲师, 主要从事糖生物学、海藻活性产物研究及开发。E-mail: zhangx24@wzu.edu.cn

autophagy related protein expression in HeLa cells were evaluated by Western blotting. **Results** CSFP-1 was mainly composed of galactose, fucose, mannose, glucuronic acid, and xylose with the sugar content of 84.18%, glucuronic acid content of 14.28%, sulfate content of 10.02% and average molecular weight of 56 kDa. CSFP-1 had selective cytotoxicity and significantly inhibited the growth of HeLa cells ($P < 0.05, 0.001$), but had no significant effect on the survival rate of A549 and Hep3B cells. Compared with the control group, HeLa cells treated with CSFP-1 for 24 h increased the proportion of G1 phase cells significantly ($P < 0.001$); After treated with CSFP-1 for 48 h, the proportion of S phase cells increased significantly ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and the proportion of G2 phase cells decreased significantly ($P < 0.01, 0.001$). Compared with control group, the expression of Bcl-2 protein in 100 and 300 $\mu\text{g/mL}$ CSFP-1 groups decreased significantly at 24 h, and that in 300 $\mu\text{g/mL}$ group decreased significantly at 48 h ($P < 0.05$); The expression of Beclin-1 protein in 100 and 300 $\mu\text{g/mL}$ group increased significantly at 24 and 48 h ($P < 0.05$ and 0.01), and there was a time-dose correlation. **Conclusion** CSFP-1 has selective inhibited effect on the proliferation of HeLa cells and its anti-tumor activity mechanism may be related with blocking cell cycle and inducing apoptosis.

Key words: *Sargassum fusiforme*; fucoidin; cell apoptosis; autophagy; anti-tumor; cell cycle

羊栖菜 *Sargassum fusiforme* (Harv.) Setch, 隶属褐藻纲, 墨角藻目, 马尾藻科, 又称鹿角尖、海藻芽、羊奶子、海大麦等, 是一种营养丰富的药食两用海藻, 广泛分布于我国辽宁、山东、浙江、福建沿海, 以及日本和韩国^[1]。羊栖菜古称“海藻”, 在秦汉时期的医学药典中就记载其食用和药用方法, 其中《本草纲目》记载羊栖菜能主治“瘰疬结气”, 能“治疗脚气、水气浮肿等”^[2]; 而《中国药典》(2015年版)也将羊栖菜和海蒿子作为中药“海藻”收录。羊栖菜具有多种药理功能, 如抗肿瘤^[3], 抗氧化^[4-5], 调节免疫力^[6]和抗衰老等, 而褐藻糖胶是发挥上述功能的主要活性成分^[7]。

肿瘤治疗一直是医学研究的热点领域, 无论化学还是物理治疗法, 其最终目的是让肿瘤细胞走向死亡。目前, 细胞的死亡分为细胞凋亡、自噬性细胞死亡和细胞坏死3类。其中前两者都属于程序性死亡, 是治疗肿瘤的重要方式, 特别是自噬性细胞死亡已作为一种凋亡耐受肿瘤细胞的死亡方式^[8]。近年来, 细胞自噬和细胞凋亡引起了广大科研工作者的兴趣, 研究表明, 细胞凋亡和细胞自噬二者关系密不可分^[9]。如自噬相关基因5(Atg5)在被钙蛋白酶(Calpain)裂解后可从胞质易位到线粒体, 与Bcl-xl结合并促进细胞色素C的释放, 进而激活细胞凋亡^[10]。而且许多抗癌药物如西妥昔单抗、白藜芦醇、阿霉素等都在诱导肿瘤细胞凋亡的同时又激活了自噬^[11-12]。

研究表明, 羊栖菜褐藻糖胶(CSFP)能诱导肿瘤细胞发生凋亡和自噬^[13], 而CSFP活性级分的鉴定和发挥抗肿瘤作用的机制尚不清楚。因此, 本实验通过冷水浸提的方法制备CSFP, 进一步纯化与分级获得主要级分CSFP-1, 并对其进行抗肿瘤活性

和机制的研究, 旨在为羊栖菜功能性食品和抗肿瘤药物的开发提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 细胞

宫颈癌细胞(HeLa)、肺癌细胞(A549)和肝癌细胞(Hep3B), 中国科学院上海生科院细胞资源中心。

1.2 药物及主要试剂

羊栖菜由浙江省温州市洞头区养殖, 经温州市洞头区水产科学技术研究所高级工程师林立东鉴定, 鉴定结果为羊栖菜 *Sargassum fusiforme* (Harv.) Setch. 噻唑蓝(MTT, 上海生物工程股份有限公司); Bcl-2(#15071)、Beclin-1(#3495)、LC3B(#3868)、SQSTM1/p62(#8025)抗体(Cell Signaling Technology, 美国); β -actin(#AM1021B)抗体(药明康德, 中国); 细胞周期检测试剂盒(C1052, 碧云天生物技术有限公司, 中国)。

1.3 主要仪器

BioTek 酶标仪(伯腾仪器有限公司, 美国); 凝胶成像系统(General electric company, 美国); 1525高效液相色谱仪(Waters 科技有限公司, 美国); TENSOR27 红外光谱仪(Bruker 光谱仪器公司, 德国); ODS-2HYPERASIL 色谱柱(Thermo Scientist, 美国); TSK gel G-3000PWXL-CP 色谱柱(TOSOH 公司, 日本); 流式细胞仪FACSCantoTMII(BD, 美国)。

2 方法

2.1 羊栖菜褐藻糖胶 CSFP-1 的制备

干燥的羊栖菜经粉碎后, 称取粉末 500 g, 加入 95%的乙醇, 加热回流脱脂。将脱脂粉末按料液比 1:20 加入蒸馏水, 浸提 7 次, 每次 8 h。过滤, 合并浸提液并浓缩。加入 4 倍体积乙醇静置过夜, 离心, 沉淀经冷冻干燥, 得到水溶性羊栖菜粗多糖。

将粗多糖复溶,加入4 mol/L氯化钙沉淀褐藻胶,将上清液进行醇沉,离心,冷冻干燥。样品经脱色、脱盐、浓缩、冻干,得到羊栖菜褐藻糖胶(CSFP)。采用截流量相对分子质量为 1.0×10^4 的超滤系统,将羊栖菜褐藻糖进行超滤分级,获得相对分子质量在 1.0×10^4 以上的样品,经浓缩、冻干,制备得到CSFP-1。

2.2 CSFP-1的理化性质分析

总糖含量采用苯酚-硫酸比色法^[14]测定,以L-岩藻糖(L-Fuc)为标准品制作标准曲线。单糖组成采用PMP衍生化及高效液相色谱法测定^[15]。采用间羟基联苯法^[16]测定糖醛酸含量。采用考马斯亮兰法测定蛋白质含量。采用离子色谱法^[17]测定硫酸根含量。采用高效凝胶渗透色谱法^[18]测定相对分子质量分布范围。

2.3 CSFP-1红外光谱分析

取干燥的CSFP-1样品,与KBr混合研磨均匀后压片,在 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 进行红外光谱扫描,记录红外光谱图。

2.4 细胞生长抑制分析

将HeLa、A549和Hep3B细胞以 5×10^3 /孔的密度接种在96孔细胞培养板中,完全贴壁后,加入CSFP-1(0、10、100、300 $\mu\text{g/mL}$)处理24和48 h,每孔加入5 mg/mL MTT溶液20 μL 培养4 h,弃去原有培养基,每孔加入DMSO 150 μL ,室温下震荡15 min,使用CYTATION3酶标仪(BIO-TEK)在490 nm波长下测定吸光度(A)值。计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{CSFP-1组}} / A_{\text{对照组}}$$

2.5 细胞周期检测

利用流式细胞术检测CSFP-1对HeLa细胞周期的影响。将HeLa细胞以 5×10^5 /孔的密度接种在6孔培养板中,完全贴壁后,加入CSFP-1(0、10、100、300 $\mu\text{g/mL}$)处理24和48 h,经PI染色并使用流式细胞仪FACSCantoTMII进行检测。

2.6 Western blotting分析

将细胞以 5×10^5 /孔的密度接种在6孔培养板中,完全贴壁后,加入CSFP-1(0、10、100、300 $\mu\text{g/mL}$)处理24和48 h,然后分别用胰酶消化并收集细胞,使用RIPA裂解液裂解30 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min离心10 min,取上清测定蛋白质浓度。向样品中加入上样缓冲液后,通过SDS-PAGE电泳,转膜,封闭,一抗孵育过夜,TBST洗涤3次,孵育二抗,用ECL试剂盒进行显影,分别使用Amersham Imager 600和Imagequant软件(GE)进行分析。

2.7 数据处理

数据采用SPSS 16.0、Flow J 6.0、Prism 6软件处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组均数差异采取LSD-*t*检测。

3 结果

3.1 CSFP-1的理化性质分析

如表1和2所示,CSFP-1的糖含量为84.18%,糖醛酸含量为14.28%,硫酸根含量为10.02%,平均相对分子质量为 5.6×10^4 ,其主要由半乳糖、岩藻糖、甘露糖、葡萄糖醛酸和木糖组成。从红外光谱图(图1)中可知,CSFP-1在 3400 cm^{-1} 处有一吸收强度较大的峰,是多糖特征的O-H伸缩振动峰,是由糖分子内或分子间氢键O-H伸缩振动引起的吸收;在 2852 cm^{-1} 附近有岩藻糖和半乳糖基C-6的振动峰;在 2923 cm^{-1} 附近为吡喃环的C-H弯曲伸缩振动峰;在 1430 cm^{-1} 附近为半乳糖和木糖CH₂的剪切震动,在 1450 cm^{-1} 附近为岩藻糖和O-乙酰基CH₃的非对称弯曲振动,在 1384 cm^{-1} 为岩藻糖和O-乙酰基CH₃的对称弯曲振动。在 1630 cm^{-1} 附近出现羰基非对称伸缩振动,在 1425 cm^{-1} 前后是与糖醛酸相关的振动峰,在 1255 cm^{-1} 附近表现出硫酸酯中O=S=O的非对称伸缩振动。由此可知,CSFP-1具有明显的褐藻糖胶的特征。

表1 CSFP-1中糖、糖醛酸、蛋白质及硫酸根含量

Table 1 Content of sugar, uronic acid, protein and sulfate of CSFP-1

样品	质量分数/%			
	糖	糖醛酸	蛋白质	硫酸根
CSFP-1	84.18	14.28	1.21	10.02

表2 CSFP-1的平均相对分子质量和单糖组成情况

Table 2 Average molecular weight and monosaccharide composition of CSFP-1

样品	平均相对分子质量	单糖组成/%						
		葡萄糖	鼠李糖	木糖	葡萄糖醛酸	甘露糖	岩藻糖	半乳糖
CSFP-1	5.6×10^4	1.91	3.84	10.38	17.67	18.8	21.44	25.96

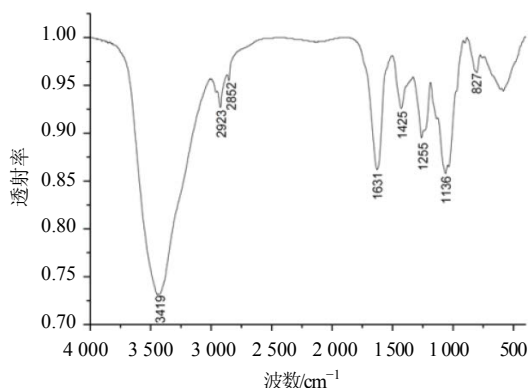


图1 CSFP-1 红外光谱

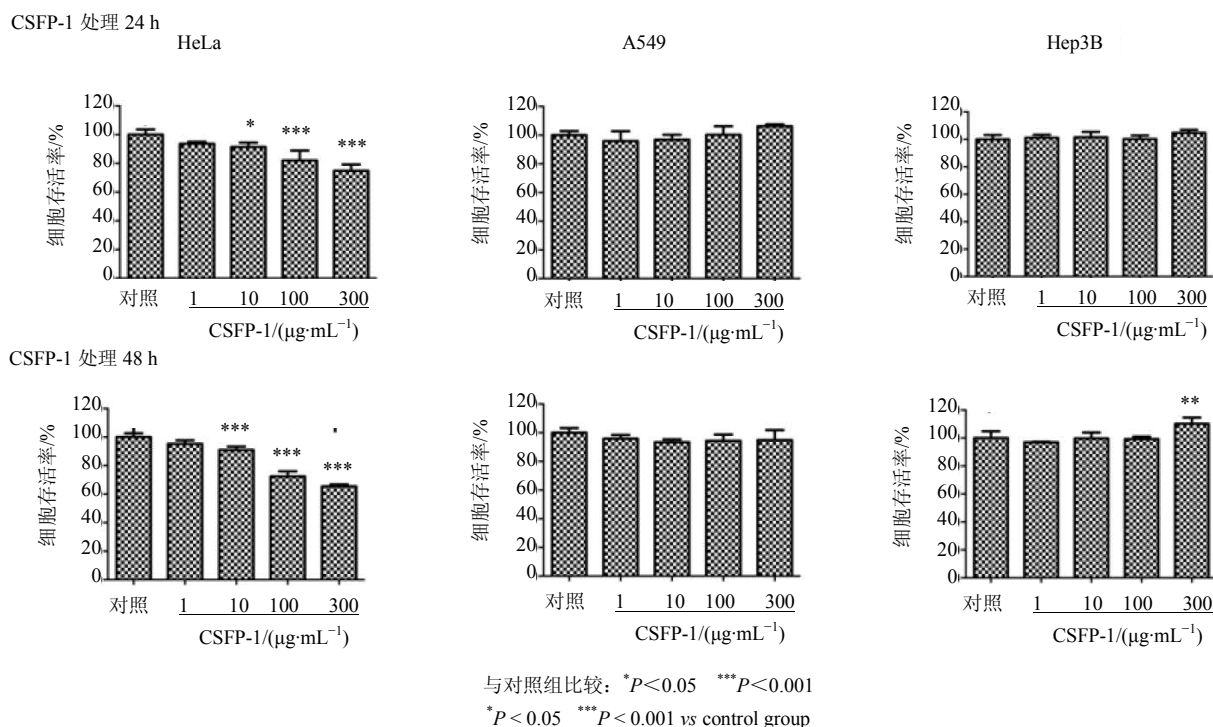
Fig. 1 Infrared spectrogram of CSFP-1

3.2 CSFP-1 选择性细胞毒性研究

运用 MTT 法检测 CSFP-1 对 HeLa、A549 和 Hep3B 细胞生存能力的影响。CSFP-1 显著抑制了 HeLa 细胞的增殖能力 ($P < 0.05$ 、 0.001)，并呈现时间和剂量相关性，当剂量为 $300 \mu\text{g/mL}$ CSFP-1 处理 48 h，其抑制率达到 35.1%。CSFP-1 对 A549 和 Hep3B 细胞存活率没有明显影响。因此，CSFP-1 对肿瘤细胞的抑制作用具有一定的特异性。

3.3 CSFP-1 对 HeLa 细胞周期的影响

HeLa 细胞经 CSFP-1 处理 24 h 后，G1 期比例明显增加 ($P < 0.001$)，并呈现剂量相关性，当剂量为 $300 \mu\text{g/mL}$ 时，G1 期比例为 69.52%。HeLa 细胞

图2 CSFP-1 对不同癌细胞的细胞生存能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 2 Effects of CSFP-1 on cell viability in various cancer cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

经 CSFP-1 处理 48 h 后，S 期比例显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，而 G2 期比例显著减少 ($P < 0.01$ 、 0.001)，同样呈现剂量相关性。结果见图 3。

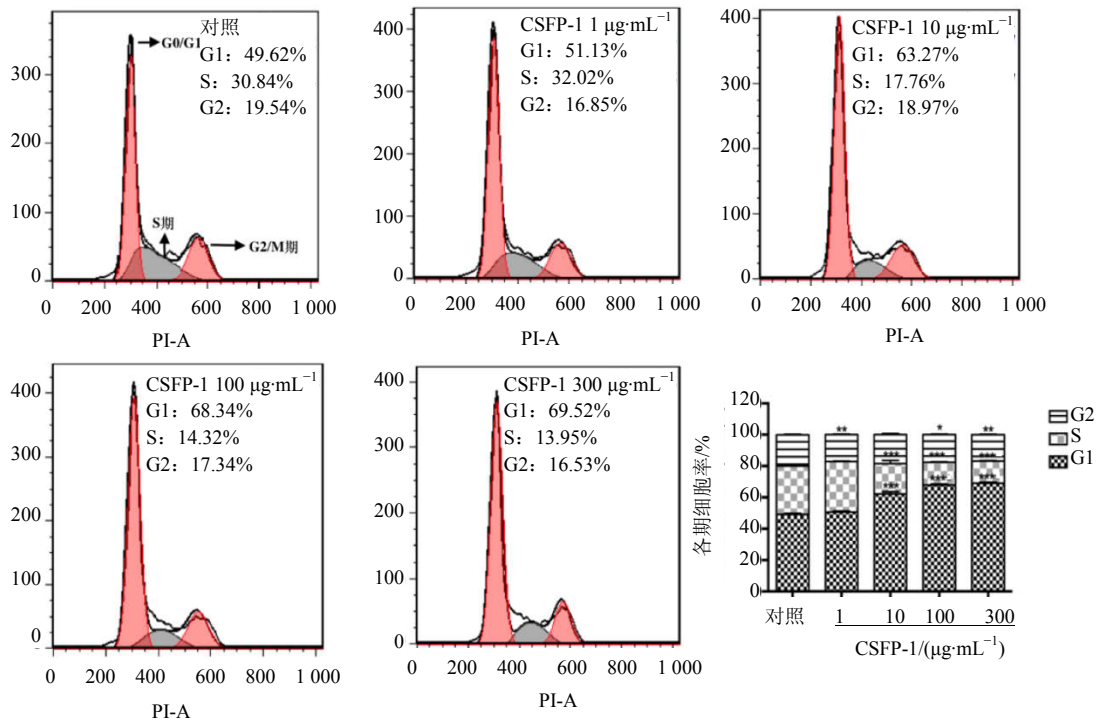
3.4 CSFP-1 诱导 HeLa 细胞凋亡

通过 Western blotting 检测 HeLa 细胞经不同浓度的 CSFP-1 处理 24、48 h 后，细胞凋亡和自噬相关蛋白的表达情况。经 CSFP-1 处理后，HeLa 细胞中 Bcl-2 的表达量逐渐减少，且存在时间和剂量相关性，与对照组比较，100、 $300 \mu\text{g/mL}$ 剂量组处理 24 h， $300 \mu\text{g/mL}$ 剂量组处理 48 h 差异

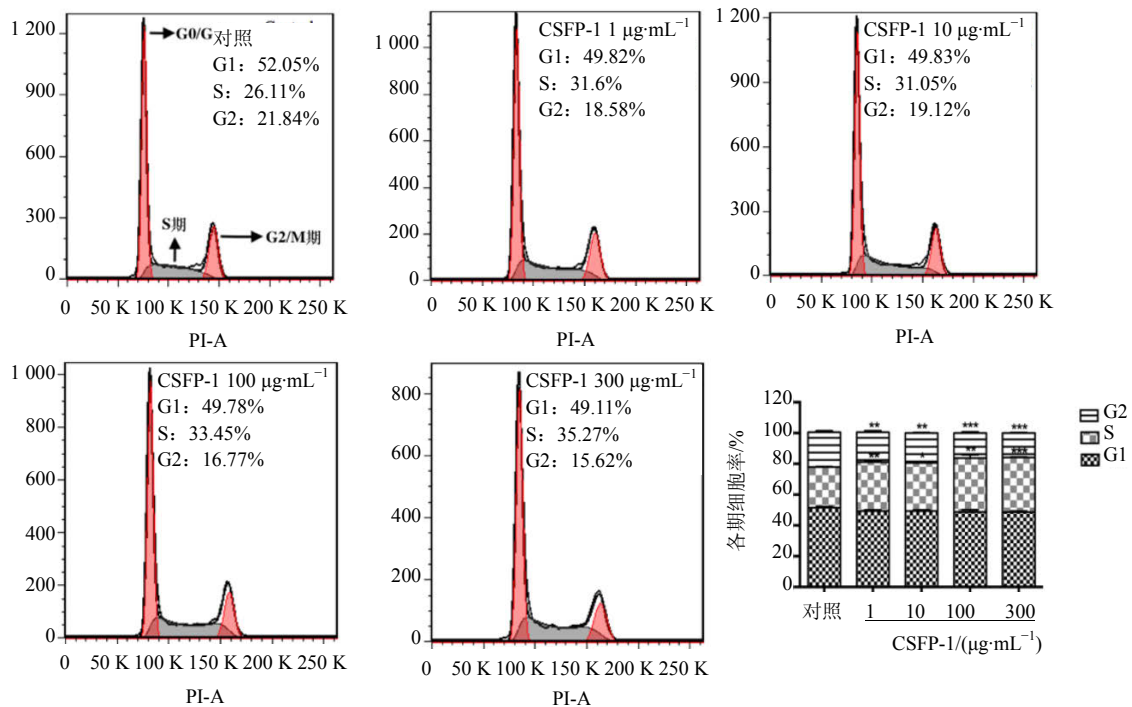
显著 ($P < 0.05$)；Beclin-1 蛋白表达量逐渐增加，且存在时间和剂量相关性，与对照组比较，100、 $300 \mu\text{g/mL}$ 剂量组处理 24、48 h 均差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)，结果见图 4。结果说明凋亡或自噬均有可能参与 CSFP-1 引起的 HeLa 细胞增殖抑制。

进一步检测了自噬相关蛋白 LC3B 和 p62 的表达情况，结果显示，CSFP-1 处理对 LC3B 和 p62 的表达量均没有显著影响 (图 5)，表明 CSFP-1 对 HeLa 细胞增殖的抑制作用与细胞自噬无关。

CSFP-1 处理 24 h



CSFP-1 处理 48 h



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ *** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

图3 CSFP-1 对 HeLa 细胞的细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of CSFP-1 on cell cycle in HeLa cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

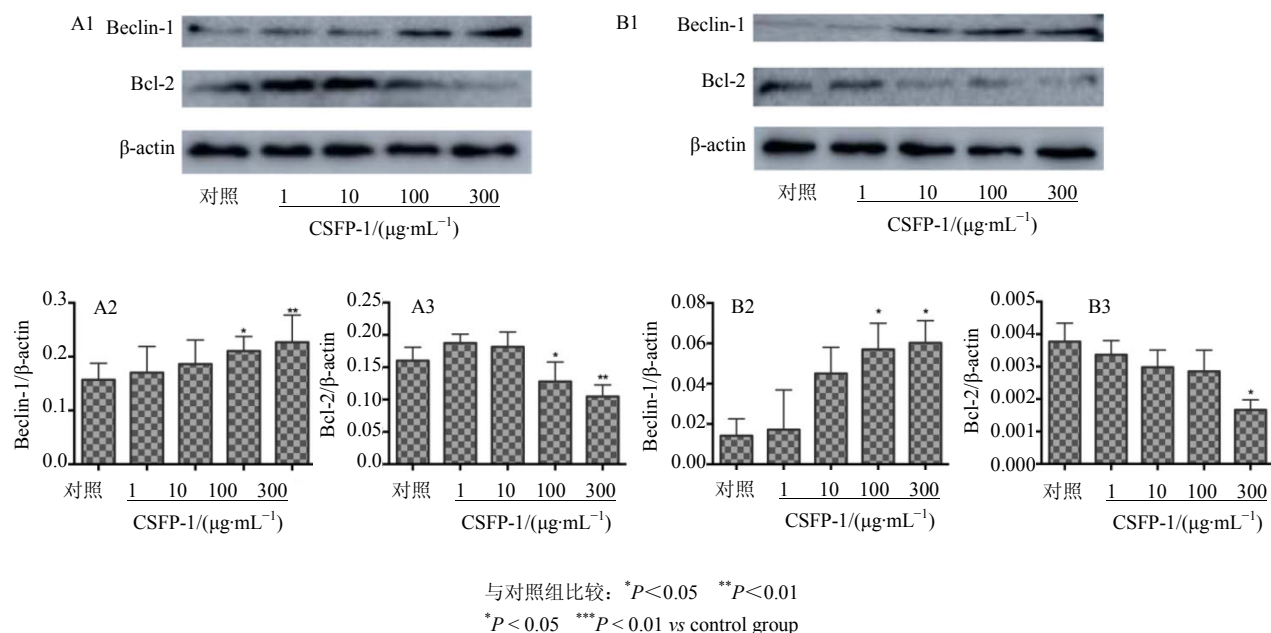


图4 CSFP-1 给药 24 (A)、48 (B) h 对细胞凋亡和细胞自噬关键蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of CSFP-1 treatment of 24 (A) or 48 h (B) on expression of crucial protein of apoptosis and autophagy in HeLa cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

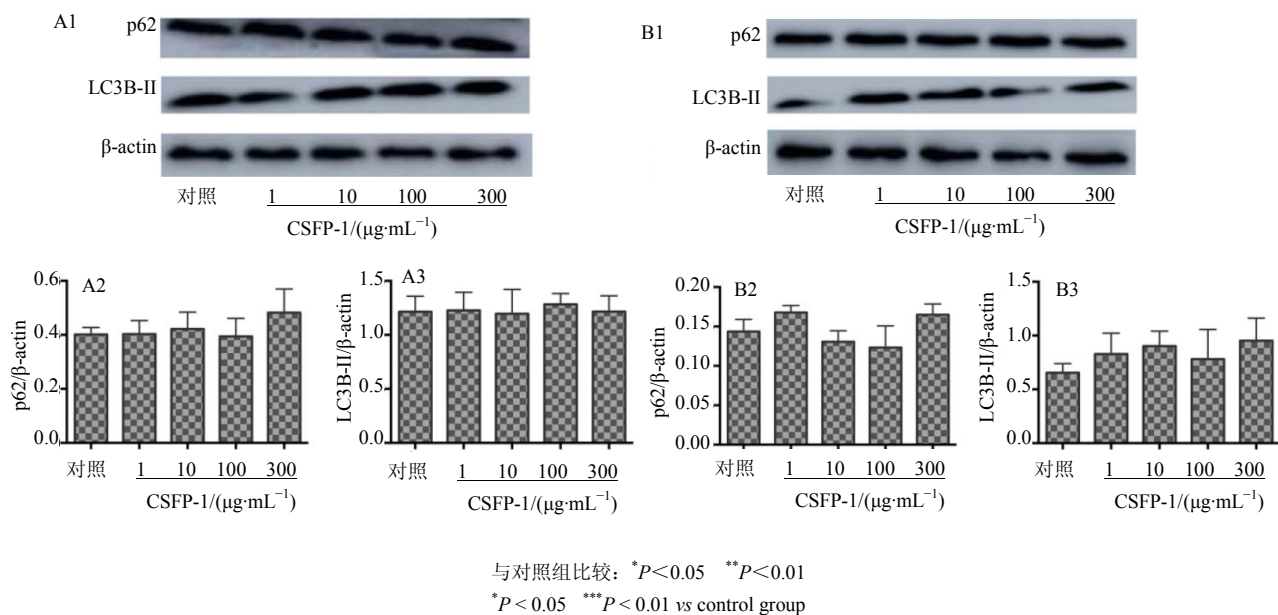


图5 CSFP-1 给药 24 (A)、48 (B) h 对细胞自噬相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of CSFP-1 treatment of 24 h (A) or 48 h (B) on expression of relevant protein of apoptosis and autophagy in HeLa cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

羊栖菜是一种药食两用的经济型藻类, 富含人体必需氨基酸、多不饱和脂肪酸和矿物质等, 具有抗肿瘤、抗炎、延缓衰老等功效。羊栖菜的主要活性成分是 CSFP, 研究表明, 羊栖菜多糖能通过调

控 p53 基因表达来发挥抗肿瘤作用^[19-20], 而且有报道指出羊栖菜多糖的抗氧化活性与其抗肿瘤^[21]、降血糖活性^[22]密切相关。本课题组前期研究发现, CSFP 具有清除自由基的作用, 并保护小鼠急性氧化肝损伤^[23]以及改善小鼠肠道菌群的分布^[24]。但关

于具有抗肿瘤活性的 CSFP 级分的鉴定和发挥抗肿瘤作用的机制尚不清楚。本实验制备 CSFP-1, 并对其抗肿瘤活性和机制进行了初步的探讨。

CSFP-1 的单糖组成分析和红外光谱数据表明, CSFP-1 可能是一种以半乳糖为主链组成的杂多糖。本研究发现 CSFP-1 具有选择性的肿瘤细胞毒性, CSFP-1 不同处理时间对细胞周期产生了不同的影响, 其中处理 24 h 导致细胞增殖的抑制主要与 G1 期阻滞有关; 处理 48 h 则与 S 期阻滞有关。有报道指出 S 期阻滞主要与细胞增殖相关基因的表达和 Chk2 蛋白的磷酸化有关^[25]。

肿瘤细胞的无限生长需要消耗大量能量去维持, 因此自噬常常作为细胞生存的能源来源途径。但当环境压力加大时, 如药物处理, 细胞自噬相关蛋白 Beclin-1、ATG5 等, 会转化为细胞凋亡所需的蛋白前体, 从而使细胞走向凋亡。细胞凋亡和细胞自噬都是程序性死亡, 两者不仅相互关联, 而且各自的关键蛋白, 如 Bcl-2 (抗凋亡蛋白) 和 Beclin-1 (自噬发生关键蛋白), 相互拮抗。因此, 推测 CSFP-1 抑制 HeLa 细胞增殖可能与细胞自噬和细胞凋亡有关。通过检测细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2 和细胞自噬相关蛋白 Beclin-1、p62 和 LC3B 表达量的动态变化, 发现 CSFP-1 处理导致 HeLa 细胞中 Bcl-2 表达量明显下降, Beclin-1 表达量增加, 而自噬发生相关蛋白 LC3B 和 p62 并没有发生明显变化。因此, 我们推测 CSFP-1 可能通过作用于细胞凋亡途径发挥抗肿瘤作用。

通过冷水浸提方法制备的 CSFP-1, 主要通过阻断细胞周期对 HeLa 细胞生长起到明显的抑制作用, 并诱导细胞凋亡。本研究为筛选具有抗肿瘤活性的天然糖类先导化合物, 以及研制高效、安全和具有自主知识产权的海洋中药奠定理论基础, 同时也为羊栖菜中药资源的合理开发与利用提供科学依据。

参考文献

- [1] 张展, 刘建国, 刘吉东. 羊栖菜的研究述评 [J]. 海洋水产研究, 2002, (3): 67-74.
- [2] Liu L, Heinrich M, Myers S P, et al. Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed genus *Sargassum* in traditional Chinese medicine: a phytochemical and pharmacological review [M]. J Ethnopharmacol, 2012: 591-619.
- [3] Chen X, Nie W, Yu G, et al. Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from *Sargassum fusiforme* [J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50(3-4): 695.
- [4] Wang W, Lu J B, Wang C, et al. Effects of *Sargassum fusiforme* polysaccharides on antioxidant activities and intestinal functions in mice [J]. Int J Biol Macromol, 2013, 58(7):127-132.
- [5] Wu M, Wu Y, Qu M, et al. Evaluation of antioxidant activities of water-soluble polysaccharides from brown alga *Hizikia fusiformis* [J]. Int J Biol Macromol, 2013, 56(5): 28.
- [6] Chen X, Nie W, Fan S, et al. A polysaccharide from *Sargassum fusiforme* protects against immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice [J]. Carbohydr Polym, 2012, 90(2): 1114-1119.
- [7] Ale M T, Mikkelsen J D, Meyer A S. Important determinants for fucoidan bioactivity: a critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds [J]. Mar Drugs, 2011, 9(10): 2106-2130.
- [8] 张海亮, 唐圣松. 细胞自噬与肿瘤耐药 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2014, 30(3): 224-232.
- [9] Du P, Cao H, Wu H R, et al. Blocking Bcl-2 leads to autophagy activation and cell death of the HEPG2 liver cancer cell line [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(10): 5849-5854.
- [10] Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, et al. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis [J]. Nat Cell Biol, 2006, 8(10): 1124-1132.
- [11] Li X, Lu Y, Pan T, et al. Roles of autophagy in cetuximab-mediated cancer therapy against EGFR [J]. Autophagy, 2010, 6(8): 1066-1077.
- [12] Miki H, Uehara N, Kimura A, et al. Resveratrol induces apoptosis via ROS-triggered autophagy in human colon cancer cells [J]. Int J Oncol, 2012, 40(4): 1020-1028.
- [13] 杨柳. 岩藻多糖硫酸酯的抗肿瘤活性筛选和初步机理研究 [D]. 济南: 山东大学, 2012.
- [14] 郭雷, 吕明生, 王淑军, 等. 苯酚-硫酸法测定樱桃酒中总糖 [J]. 食品研究与开发, 2010, 31(6): 130-132.
- [15] 马定远, 陈君, 李萍, 等. 柱前衍生化高效液相色谱法分析多糖中的单糖组成 [J]. 分析化学, 2002, 30(6): 702-705.
- [16] 王金霞, 赵峡, 于广利, 等. 柱前衍生化高效液相色谱法分析海洋褐藻多糖药物的糖醛酸组成 [J]. 分析化学, 2009, 37(5): 648-652.
- [17] 张丽萍, 王月秋, 姜世成, 等. 离子色谱法测定高山红景天多糖硫酸酯中硫酸根含量的研究 [J]. 分子科学学报, 2000, 16(3): 161-164.
- [18] 徐晓霞, 李炎, 刘华, 等. 高效凝胶色谱法测定多

- 花黄精多糖分子量与分子量分布 [J]. 四川生理科学杂志, 2008, 30(3): 102-103.
- [19] 季宇彬, 高世勇, 孔 琪, 等. 羊栖菜多糖对肿瘤细胞 P53 基因蛋白表达的影响 [J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2001, 17(2): 1-3.
- [20] 季宇彬, 高世勇. 羊栖菜多糖体外抗肿瘤作用及其作用机制的研究 [J]. 中草药, 2003, 34(12): 1111-1114.
- [21] 岑颖洲, 马夏军, 王凌云, 等. 羊栖菜多糖的制备及其对 HepG-2 细胞的抑制作用 [J]. 中国海洋药物, 2005, 24(1): 21-24.
- [22] 倪小芬, 郑 超, 田吉来, 等. 羊栖菜多糖对 H₂O₂ 诱导胰岛 β 细胞凋亡的保护作用及 PI3K 抑制剂的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2009, (7): 1506-1508.
- [23] Chen P, He D, Zhang Y, et al. *Sargassum fusiforme* polysaccharides activate antioxidant defense by promoting Nrf2-dependent cytoprotection and ameliorate stress insult during aging [J]. Food Funct, 2016, 7(11): 4576.
- [24] Chen P, Yang S, Hu C, et al. *Sargassum fusiforme* polysaccharide rejuvenates the small intestine in mice through altering its physiology and gut microbiota composition [J]. Curr Mol Med, 2017, 18.
- [25] Zhao T, Sun Q, del Rincon S V, et al. Gallotannin imposes S phase arrest in breast cancer cells and suppresses the growth of triple-negative tumors *in vivo* [J]. Plos One, 2014, 9(3): e92853.