

• 药理与临床 •

嗜盐隐杆藻胞外多糖抗肿瘤活性研究

郑维发¹, 陈才法¹, 程启平²

(1. 徐州师范大学 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116;

2. 安徽师范大学生命科学学院, 安徽 芜湖 241000)

摘要:目的 探讨嗜盐隐杆藻胞外多糖(exopolysaccharide of *Aphanothece halophytica*, EPAH)的抗肿瘤活性。方法 以S₁₈₀肉瘤为肿瘤模型,检测EPAH对肿瘤生长的抑制活性;MTT法检测EPAH对S₁₈₀肉瘤细胞、Smcc7721肝癌细胞和HeLa细胞的体外抑制活性;以对荷瘤小鼠免疫器官、血液淋巴细胞数量及淋巴细胞增殖影响、NK细胞杀伤活性和巨噬细胞产生NO及其他细胞因子的影响评价EPAH对小鼠免疫功能的作用。结果 EPAH对S₁₈₀肉瘤生长有显著的抑制作用,其中预防给药和与肿瘤接种同时给药组最大抑瘤率分别达66.79%和47.93%。100 μg/mL EPAH对Smcc7721细胞、HeLa细胞以及S₁₈₀细胞生长的抑制率达60%以上。EPAH显著提高荷瘤小鼠脾脏和胸腺质量以及血液淋巴细胞数量,促进淋巴细胞增殖反应,增加NK细胞杀伤活性,刺激巨噬细胞产生NO,分泌白细胞介素-1β(IL-1β)及肿瘤坏死因子-α(TNF-α)。结论 EPAH有显著的抗肿瘤活性,并能直接作用于肿瘤细胞,抑制肿瘤生长。EPAH可能是通过增加荷瘤小鼠免疫器官的质量和免疫细胞的数量、促进淋巴细胞分裂,提高NK细胞杀伤活性和巨噬细胞产生NO以及其他细胞因子实现其抗肿瘤活性。

关键词:嗜盐隐杆藻胞外多糖;抗肿瘤活性;免疫功能

中图分类号:R286.91

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)07-1026-05

Antitumor activity of exopolysaccharide from *Aphanothece halophytica*ZHENG Wei-fa¹, CHEN Cai-fa¹, CHENG Qi-ping²

(1. Key Laboratory for Biotechnology on Medicinal Plants of Jiangsu Province, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China; 2. College of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China)

Abstract: **Objective** To elucidate the antitumor activity of exopolysaccharide from *Aphanothece halophytica* (EPAH). **Methods** The *in vivo* inhibition of EPAH on growth of tumor was performed by inoculation of S₁₈₀ sarcoma cells into ICR mice. While *in vitro* activity against tumor cells was assayed by the growth inhibition of cell lines of S₁₈₀ sarcoma, Smcc7721, and HeLa. The effects of EPAH on immune function were evaluated by the influence on the thymus, spleen, and the number of lymphocytes in blood stream, the influence on proliferation of lymphocytes, the killing activity of NK cells, and the production of NO, IL-1β, and TNF-α. **Results** EPAH inhibited *in vivo* S₁₈₀ sarcoma growth with the highest inhibitory rate of 66.79% and 47.93% in the test mice of pretreatment and simultaneous treatment, respectively. EPAH also displayed *in vitro* activity against the test cell lines with the highest inhibitory rate being more than 60% at a concentration of 100 μg/mL. EPAH was found to affect the immune function in mice including increasing the weight of thymus, spleen, and the number of lymphocytes in the blood stream, accelerating the proliferation of lymphocytes, enhancing the killing activity of NK cells, and stimulating the production of NO, IL-1β, and TNF-α by macrophages. **Conclusion** EPAH is an effective antitumor agent. It inhibites the tumor cells directly and hence the growth of tumor. Its antitumor activity is probably realized by increasing the weight of immune organs and the number of immunocytes as well as lymphocyte proliferation, enhancing the killing activity of NK cells, facilitating the production of NO and related cytokines in tumor-bearing mice.

Key words: exopolysaccharide of *Aphanothece halophytica* Frey (EPAH); antitumor activity; immune function

嗜盐隐杆藻 *Aphanothece halophytica* Frey 为 一种高盐环境中生长的蓝藻,系统分类上属于色球

收稿日期:2004-11-21

基金项目:江苏省高新技术产业化项目(02KJ360008)

作者简介:郑维发(1962—),男,安徽南陵人,理学博士,教授,研究方向为天然产物化学及其药理毒理学。

Tel: (0516)3403179 E-mail: yyzw@xznz.edu.cn

藻科隐杆藻属。该藻生长时向生长基质中分泌大量的、种类单一的胞外多糖。研究表明,该多糖由阿拉伯糖、岩藻糖、甘露糖、葡萄糖以及葡萄糖醛酸组成。其中阿拉伯糖、岩藻糖、甘露糖、葡萄糖的摩尔比为1:2.08:1.57:2.87,而葡萄糖醛酸占整个多糖的15.78%^[1]。嗜盐隐杆藻胞外多糖(exopolysaccharide of *Aphanothece halophytica*, EPAH)是一种高度硫酸化的多糖硫酸酯,其中硫酸根占整个分子的34.46%^[2]。阿拉伯糖的连接方式为1,3糖苷键,岩藻糖的连接方式为1,4或1,3糖苷键,甘露糖连接方式为1,2,4糖苷键,葡萄糖连接方式为1,3糖苷键,葡萄糖醛酸的连接方式为1,3糖苷键。同时EPAH还结合了Ca²⁺、Na⁺、Mg²⁺和K⁺。现代药理学研究表明,硫酸化多糖具有广谱的抗肿瘤、抗病毒以及免疫调节活性^[3~6]。因此,推测EPAH具有潜在的药理活性。有关EPAH的药理学研究目前仅有其对小鼠的免疫功能有正向调节作用的报道^[7]。为了进一步揭示EPAH的药理活性,本室开展了EPAH的抗肿瘤活性研究。本实验研究其对S₁₈₀肉瘤的抑制作用及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 药品与仪器:EPAH由本实验室制备,质量分数为98.2%。RPMI-1640培养液(Gibco)、小牛血清(Hyclone)、24孔细胞培养板(Nunc)、96孔细胞培养板(Nunc)、环磷酰胺(江苏恒瑞制药,批号02091921)、MTT(Sigma)、二甲基亚砜(Sigma)、DMEM f/12培养液(Gibco)。S₁₈₀肉瘤细胞、HeLa细胞、Smcc7721肝癌细胞(军事医学科学院提供)。CO₂培养箱(SHELBA)、离心机(上海飞鸽离心机厂)、分析天平(Sartorius)。NO试剂盒(南京建成生物技术研究所),白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)试剂盒(TPI Inc,美国)。

1.2 动物:ICR小鼠,体重18~23 g,雌雄各半,徐州医学院实验动物中心提供,动物生产许可证号SCXK2002-0022。饲养在(25 $\pm$ 2)℃、明暗各12 h、湿度为60%的饲养室中,自由饮水和取食。

1.3 对S₁₈₀肉瘤的抑制作用:取小鼠110只,分为11组(每组10只),包括模型组、阳性对照组和9个给药组。给药组中的3个组(预防给药组)分别按50、75和100 mg/(kg·d)连续ig EPAH 5 d后,分别皮下接种S₁₈₀肉瘤(5 $\times$ 10⁶ S₁₈₀细胞),继续ig EPAH 10 d;另3个组(同时给药组)皮下接种S₁₈₀肉瘤的当天按50、75和100 mg/(kg·d)的剂量连续ig EPAH 15 d;剩下3个组(治疗给药组)

接种S₁₈₀肉瘤5 d后按50、75和100 mg/(kg·d)的剂量连续ig EPAH 15 d。阳性对照组,于接种的同时按20 mg/(kg·d)连续ig环磷酰胺15 d。模型组,每天ig等体积的生理盐水溶液。末次给药24 h后处死小鼠,取肉瘤称质量,计算抑瘤率。

抑瘤率=(模型组肉瘤质量-给药组肉瘤质量)/模型组肉瘤质量 $\times$ 100%

1.4 对肿瘤细胞体外生长的抑制作用:将S₁₈₀肉瘤细胞、HeLa细胞、Smcc7721肝癌细胞以含10%小牛血清的RPMI-1640培养基在96孔板中,37℃、5%CO₂培养箱中培养24 h,再加入EPAH,使每孔的终质量浓度分别为12.5、25、50、100和200 μ g/mL(每个质量浓度设5个平行孔,并设对照组),继续培养48 h。30 μ g/mL环磷酰胺作为阳性对照。MTT法^[8]测定每孔的吸光度(A)值,计算细胞生长的抑制率。

抑制率=(A_{对照}-A_{实验})/A_{对照} $\times$ 100%

1.5 对小鼠免疫功能的影响

1.5.1 对荷瘤小鼠免疫器官及免疫细胞数量的影响:取小鼠120只,分为12组,除增加正常组外,其余各组分组及给药方法同1.3项。末次给药24 h后称体重,摘眼球放血,收集血液并处死小鼠,取胸腺和脾脏,计算胸腺指数和脾指数。以淋巴细胞分离液分离其中的淋巴细胞,血球计数板计数淋巴细胞数量。

1.5.2 对正常小鼠淋巴细胞增殖的调节作用:取小鼠90只,分为6组(每组15只),包括5个给药组和1个空白组。给药组分别ig 20、40、60、80、100 mg/(kg·d) EPAH,空白组ig等体积的生理盐水溶液。给药后的第5、10、15天分别取各组中的5只小鼠摘眼球放血,脱颈椎处死,无菌取脾,按常规方法^[9]培养、收集脾淋巴细胞,在液体闪烁计数器中测定每个孔的放射量。根据放射量对应的细胞数曲线计算脾细胞的增殖数。

1.5.3 对NK细胞杀伤活性的影响:取小鼠50只,随机分为5组(每组10只),包括1个正常组和4个环磷酰胺处理组,环磷酰胺处理组按40 mg/kg ip给予环磷酰胺后,分别ig给予等体积生理盐水、50、75和100 mg/(kg·d) EPAH,连续14 d,正常组仅每天ig等体积蒸馏水。末次ig给药8 h后,小鼠摘眼球放血,脱颈椎处死,无菌取脾制备脾细胞(调整细胞浓度为2 $\times$ 10⁷/mL)作为效应细胞。取传代培养的HeLa细胞(调整其细胞浓度为1 $\times$ 10⁶/mL)作为靶细胞。取靶细胞悬液100 μ L加入96孔板(每组5个平行孔),再向各孔加入等体积

的效应细胞。另设效应细胞和靶细胞对照组。将以上细胞于 37℃、5% CO₂ 培养箱中杀伤 4 h, 再向每孔加入 MTT 20 μL (5 mg/mL) 继续孵育 3 h, 小心弃去上清液 100 μL, 再加入 DMSO 100 μL, 充分振荡, 使形成的结晶完全溶解后, 以酶标仪测定 570 nm 波长处各孔吸光度 (A) 值, 计算 NK 细胞杀伤活性^[9]。

NK 细胞杀伤活性 = $[1 - (A_{\text{实验}} - A_{\text{效应细胞}}) / A_{\text{靶细胞}}] \times 100\%$

1.5.4 对小鼠腹腔巨噬细胞释放 NO 和其他细胞因子的影响: 取小鼠 6 只, (20±2) g, 雌雄各半, 于实验的前 3 d 按每只 2 mL ip 0.6% 巯基乙醇酸钠。实验时脱颈椎处死, ip 8 mL Hank's 液, 按文献方法^[10]在 24 孔板中无菌制备和培养单层巨噬细胞。EPAH 以无血清的 RPMI-1640 液配成 12.5、25、50、100 和 200 μg/mL, 分别加入单层巨噬细胞, 每孔 1 mL。阳性对照为含 LPS 20 μg/mL 的无血清 RPMI-1640 液, 空白对照为无血清 RPMI-1640 液。按文献方法^[11]制备巨噬细胞培养上清液, 分别以相应的试剂盒测定 NO、IL-1β 及 TNF-α 的水平。

1.6 统计学方法: 数据经 SPSS 7.0 (Window95) 软件处理, 统计数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并用 ANOVA 和 *t* 检验分析。

2 结果

2.1 对 S₁₈₀ 肉瘤的抑制作用: EPAH 的 3 种给药方式对 S₁₈₀ 肉瘤都表现出一定的抑制作用。预防给药组对 S₁₈₀ 肉瘤的抑制率均在 57% 以上。其中 75 mg/(kg·d) 剂量组抑瘤率最高, 达 66.79%。与预防给药组相比, 同时给药组的抑瘤率有所下降, 仅在 38% 以上, 仍以 75 mg/(kg·d) 剂量组抑瘤率最高, 达 47.93%。治疗给药组的抑瘤率很低, 仅在 20% 左右。表明 EPAH 对 S₁₈₀ 肉瘤生长有抑制作用, 但抑制率随给药的时间不同而有很大的变化, 见表 1。

2.2 对肿瘤细胞体外生长的抑制作用: EPAH 对 3 种实验肿瘤细胞株的生长表现出显著的抑制作用。其抑制率随浓度二倍递增而呈现明显的上升趋势。质量浓度为 100 μg/mL 时抑制率最大, 且与阳性对照药环磷酰胺的抑制率接近。当质量浓度增加到 200 μg/mL 时, 对 Smcc7721 细胞的抑制率略有下降, 而对 S₁₈₀ 和 HeLa 细胞的抑制率则分别降为 22.89% 和 38.26%, 见表 2。

2.3 对小鼠免疫功能的影响

2.3.1 对免疫器官指数及免疫细胞数量的影响: 结

表 1 EPAH 不同给药方式对小鼠 S₁₈₀ 肉瘤生长的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, *n*=10)

Table 1 Inhibition of EPAH on mice S₁₈₀ sarcoma growth in different administration manner ($\bar{x} \pm s$, *n*=10)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	瘤质量/g	抑瘤率/%
模型	—	1.89±0.39	—
阳性对照	20	0.84±0.03***	55.31±2.76
EPAH 预防给药	50	0.79±0.12***	57.96±2.89
	75	0.63±0.04***	66.49±2.94
	100	0.81±0.01***	57.05±1.39
EPAH 同时给药	50	1.13±0.05**	40.11±1.48
	75	0.98±0.04**	47.93±2.30
	100	1.17±0.11**	38.06±1.14
EPAH 治疗给药	50	1.57±0.08*	17.06±0.91
	75	1.51±0.19*	20.03±1.24
	100	1.55±0.21*	18.09±1.37

与模型组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01 ****P*<0.001

P*<0.05 *P*<0.01 ****P*<0.001 vs model group

表 2 EPAH 对 3 种肿瘤细胞生长的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, *n*=5)

Table 2 Inhibition of EPAH on growth of three kinds of tumor cell lines ($\bar{x} \pm s$, *n*=5)

组别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	抑制率/%		
		Smcc7721	S ₁₈₀	HeLa
阳性对照	30	72.04±1.22	67.17±1.25	73.57±1.72
EPAH	12.5	35.28±0.89	19.33±0.99	16.98±3.00
	25	45.89±1.25	40.37±1.62	23.64±1.86
	50	57.76±0.32	59.94±2.21	53.63±1.56
	100	73.56±2.25	69.29±3.98	61.16±3.04
	200	65.59±3.13	22.89±4.54	38.26±1.97

果表明, 荷瘤小鼠的胸腺与脾指数以及血液淋巴细胞数量大大减少。每日 ig 环磷酰胺的小鼠, 脾脏和胸腺指数以及血液淋巴细胞数量则进一步减少。EPAH 预防给药的 3 个剂量均能明显提高荷瘤小鼠的胸腺和脾指数, 增加血液淋巴细胞的数量, 其中 75 mg/(kg·d) 剂量组可使这 3 个指标恢复到正常水平。EPAH 同时给药或 EPAH 治疗给药也能使这 3 个指标有所提升, 其中以 75 mg/(kg·d) 剂量组最为显著, 见表 3。

2.3.2 对正常小鼠淋巴细胞增殖的促进作用: EPAH 给药的第 5 天便显示出对小鼠淋巴细胞增殖的促进作用, 并随给药时间增加而越来越显著。不同剂量的 EPAH 对小鼠淋巴细胞增殖的促进作用不同。EPAH 在 20~60 mg/(kg·d) 对淋巴细胞增殖的促进作用随剂量的增加而加强。80 mg/(kg·d) 以上剂量组对淋巴细胞增殖的促进作用随剂量的增加而呈减弱的趋势, 见表 4。

2.3.3 对 NK 细胞杀伤活性的影响: ip 给予环磷酰胺导致小鼠 NK 细胞杀伤活性显著降低 (*P*<0.01)。3 个剂量的 EPAH 均能显著地提高环磷酰胺诱导

表 3 EPAH 对荷瘤小鼠免疫器官和淋巴细胞数量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of EPAH on immune organs and lymphocyte number in tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	胸腺指数/(mg · g ⁻¹)	脾脏指数/(mg · g ⁻¹)	淋巴细胞/个 (1×10 ⁶)
正常	—	2.72±0.27	8.51±0.47	10.94±0.81
模型	—	1.70±0.07**	5.50±0.38**	7.49±0.57**
阳性对照	20	1.24±0.27	3.49±0.16	4.05±0.18
EPAH 预防给药	50	2.41±0.26△△	8.01±0.37△△	9.03±0.28△△
	75	2.61±0.17△△	8.31±0.17△△	9.54±0.11△△
	100	2.51±0.15△△	7.60±0.29△△	9.72±0.22△△
EPAH 同时给药	50	1.70±0.17	6.70±0.09△	8.29±0.04△
	75	2.02±0.24△	7.01±0.22△	8.48±0.06△
	100	1.80±0.16	6.51±0.12△	8.78±0.04△
EPAH 治疗给药	50	2.10±0.24	5.71±0.09	7.78±0.09
	75	2.30±0.09△	6.09±0.23△	7.99±0.09△
	100	2.01±0.17	5.51±0.18	7.69±0.11

与正常组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: △ $P<0.05$ △△ $P<0.01$

** $P<0.01$ vs normal group; △ $P<0.05$ △△ $P<0.01$ vs model group

表 4 EPAH 对小鼠淋巴细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

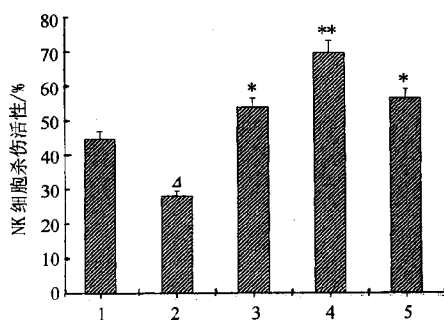
Table 4 Effect of EPAH on lymphocyte proliferation in mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	淋巴细胞/(1×10 ⁶ · mL ⁻¹)		
		第 5 天	第 10 天	第 15 天
空白	—	8.62±1.02	8.70±0.97	8.73±1.54
EPAH	20	9.12±0.85*	12.37±0.54*	13.51±0.17**
	40	11.51±0.52*	14.74±1.15**	15.66±0.54**
	60	15.63±1.18**	18.54±0.56**	20.03±0.98***
	80	12.69±0.69*	16.90±0.20**	18.01±0.14***
	100	9.41±0.54*	14.37±0.44**	16.06±0.16**

与空白组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

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

的免疫低下小鼠 NK 细胞的杀伤活性,其中以 75 mg/(kg · d) 剂量组最为显著 ($P<0.01$),见图 1。



1-正常 2-环磷酰胺 3~5-EPAH (50,75,100 mg/kg)

与正常组比较: △ $P<0.01$

与环磷酰胺组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

1-normal 2-cytoxan 3—5-EPAH (50, 75, 100 mg/kg)

△ $P<0.01$ vs normal group;

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs cytoxan group

图 1 EPAH 对小鼠 NK 细胞杀伤活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 1 Effect of EPAH on killing activity of NK cells in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

2.3.4 对小鼠腹腔巨噬细胞产生 NO 及细胞因子的影响,EPAH 对巨噬细胞产生 NO 及细胞因子有明显的促进作用。在 12.5~100 $\mu\text{g/mL}$ 明显促进 NO 形成并呈浓度依赖性,200 $\mu\text{g/mL}$ 以上促进作用有所减弱。在 12.5~50 $\mu\text{g/mL}$ EPAH 对 TNF- α 释放的促进作用也呈现出浓度依赖性,在 50 $\mu\text{g/mL}$ 时促进作用最为显著,100 $\mu\text{g/mL}$ 以上时促进作用减弱。EPAH 对 IL-1 β 释放的促进作用在 25 $\mu\text{g/mL}$ 时最为显著,50 $\mu\text{g/mL}$ 以上促进作用随浓度的二倍增加逐渐减弱,见表 5。

表 5 EPAH 对小鼠巨噬细胞产生 NO、TNF- α 和 IL-1 β 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 5 Effects of EPAH on release of NO, TNF- α , and IL-1 β from macrophage in mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	ρ /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	NO/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TNF- α /($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-1 β /($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
空白	—	9.42±1.88	186.63±23.40	20.37±3.05
阳性对照	20	26.77±2.34**	430.51±63.91**	107.39±15.09**
EPAH	12.5	10.82±0.53	283.94±58.23**	35.23±3.38*
	25	14.27±0.66**	297.00±34.59**	51.84±3.99**
	50	18.45±0.61**	349.00±61.34**	49.19±5.70**
	100	19.70±0.39**	248.12±34.80*	47.98±3.40**
	200	15.17±0.29*	208.37±56.14	38.56±6.82

与空白组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs blank group

3 讨论

本实验结果表明,EPAH 对 S₁₈₀ 肉瘤的生长有显著的抑制作用,其抑制率随给药时间的不同而表现出很大差异。预防给药和与接种肉瘤同时给药都能显著地抑制肉瘤生长,且多数剂量的抑制率均在 40% 以上。体外实验表明,EPAH 对 Smcc7721 肝癌细胞、HeLa 细胞、S₁₈₀ 细胞的生长也表现出显著的抑制作用,最大抑制率分别在 73.56%、61.16% 和

69.29%,说明酸性多糖 EPAH 具有抗肿瘤活性,并且可直接作用于肿瘤细胞,抑制肿瘤细胞生长。

荷瘤小鼠的淋巴细胞由于受到肿瘤细胞的诱导而逐渐凋亡^[12],导致胸腺与脾脏明显萎缩,血液淋巴细胞数量大大减少。经 EPAH 预防给药或同时给药的荷瘤小鼠的胸腺、脾脏以及血液淋巴细胞的数量恢复到正常水平。脾脏和胸腺是淋巴细胞成熟的重要场所,这两个免疫器官的萎缩是导致淋巴细胞量减少的重要原因。淋巴细胞是机体免疫系统的重要组成部分,直接参与肿瘤免疫的过程^[10]。EPAH 对小鼠淋巴细胞的增殖表现出显著的促进作用,说明 EPAH 的抗肿瘤活性可能是通过增加荷瘤小鼠淋巴器官的质量并促进淋巴细胞增殖来实现的。

NK 细胞是细胞免疫中的非特异性细胞,是机体免疫监视功能的重要执行者,先于 T 细胞发挥作用,能非特异性杀伤肿瘤细胞,其杀伤作用不需抗原预先致敏,也不需要抗体参加,不受主要组织相容性(抗原)复合物(MHC)限制,为机体抗肿瘤的第一道防线^[13]。EPAH 显著提高 NK 细胞的杀伤活性,可能是其抗肿瘤活性的另一重要机制。

巨噬细胞是机体细胞免疫过程中的重要效应细胞,巨噬细胞的活化需要刺激和启动两个步骤,LPS 是常用的巨噬细胞启动剂和活化剂^[11]。巨噬细胞激活后表达 iNOS 的 mRNA,再转录成 iNOS,催化产生大量的 NO。高水平的 NO 是杀伤肿瘤细胞的主要介质,在体内可直接杀伤肿瘤细胞和介导巨噬细胞杀伤肿瘤细胞,最终破坏肿瘤细胞内三羧酸循环中的顺乌头酸酶和线粒体呼吸链,阻断肿瘤细胞的能量代谢,从而抑制肿瘤细胞的生长或引起肿瘤细胞的死亡^[14]。激活的巨噬细胞还分泌 IL-1 和 TNF- α 。IL-1 进而刺激巨噬细胞表达 iNOS,从而进一步促进 NO 的形成^[15]。TNF- α 则诱导肿瘤细胞的程序性死亡^[16]。实验结果显示,EPAH 显著地提高巨噬细胞产生的 NO、IL-1 和 TNF- α 的水平,说明 EPAH 还可能通过激活巨噬细胞表达相应产物实现其抗肿瘤活性。

综上所述,EPAH 对肿瘤细胞的生长有显著的抑制作用,其抗肿瘤作用机制除了增加免疫器官的质量和促进免疫细胞增殖外,还通过提高 NK 细胞的杀伤活性以及激活巨噬细胞表达相应产物实现其

抗肿瘤活性。有关 EPAH 抗肿瘤活性的其他机制有待进一步研究。

References:

- [1] Morris G A, Li P, Pound M, *et al.* Hydrodynamic characterisation of the exopolysaccharide from halophilic cyanobacterium *Aphanethece halophytica* GR02: a comparison with xanthan [J]. *Carbohydr Polym*, 2001, 44: 261-268.
- [2] Ou Y, Liu Z L. Some physicochemical analyses of the exopolysaccharide produced by *Aphanethece halophytica* [J]. *J Nanjing Agric Univ* (南京农业大学学报), 1999, 22: 89-91.
- [3] Li H, Wei P, Ouyang P K. Isolation, purification and physicochemical properties of the exopolysaccharides from *Aphanethece halophytica* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2000, 12: 52-56.
- [4] Yu S C, Zhang Y Z. Effects on *Achyranthes bioentata* polysaccharides on antitumor activity and immune function of S-180 bearing mice [J]. *Chin J Oncol* (中华肿瘤杂志), 1995, 17(4): 275-278.
- [5] Nergard C S, Diallo D, Michaelsen T E, *et al.* Isolation, partial characterization and immunomodulating activities of polysaccharides from *Vernonia kotschyana* [J]. *J Ethnopharm*, 2004, 91: 141-152.
- [6] Zhou L, Meng Y M. Studies on antiviral activity of polysaccharides and their derivatives [J]. *Chin J Appl Environ Bio*, 1997, 3: 82-90.
- [7] Liu Y F, Zhang C W, Shen H Y, *et al.* The effects of exopolysaccharides from *Aphanethece halophytica* on immunological function in mice [J]. *Chin J Marine Drugs* (中国海洋药物杂志), 1998, 2(66): 10-13.
- [8] Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Method*, 1983, 65: 552-563.
- [9] Hu T, Geng P L. Effects of Fufangpianji and Danweiyao on the chemical therapy-induced impairment of cytokines and NK cell activity [J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 2003, 19(9): 616-617.
- [10] Zhang S, Wang Q, Li W F, *et al.* Enhanced antitumor immunity by murine cytokine activated T lymphocytes after co-cultured with bone marrow derived dendritic cells pulsed with whole tumor lysates [J]. *Leukemia Res*, 2004, 28(10): 1085-1088.
- [11] Zheng W F, Wang L, Shi F, *et al.* Modulatory effects on cell immunity of mice by total flavonoids from *Radix Daphne genkwa* [J]. *Pharm J Chin PLA* (解放军药学报), 2004, 20(4): 241-245.
- [12] Arindam B, Debaprasad M, Lakshmishri L, *et al.* Black tea protects immunocytes from tumor-induced apoptosis by changing Bcl-2/Bax ratio [J]. *Cancer Lett*, 2004, 209: 147-154.
- [13] Randy R B, Venkataraman S. Natural killer T (NKT) cells and their role in antitumor immunity [J]. *Crit Rev Oncol/Hemat*, 2002, 41: 287-298.
- [14] Edwards P, Cendan J C, Topping D B, *et al.* Tumor cell nitric oxide inhibits cell growth *in vitro*, but stimulates tumorigenesis and experimental lung metastasis *in vivo* [J]. *J Surg Res*, 1996, 63(1): 49-52.
- [15] Gao S J, Gu G Q. Biological properties of NO and its antitumoral mechanisms [J]. *World Oncol* (国外医学:肿瘤学分册), 1999, 26(5): 260-262.
- [16] Galle P R. Apoptosis and the liver [J]. *Seminars Cancer Biol*, 2000, 10(3): 173-184.