

刺松藻水溶性多糖抗肿瘤及免疫调节作用研究

吴荣杰^{1,2}, 杨丽丽², 佟欣², 李巧梅², 邹向阳^{2*}, 侯林^{1*}

1. 辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁 大连 116029

2. 大连医科大学 生物技术系, 辽宁 大连 116044

摘要: **目的** 研究刺松藻水溶性多糖(WSPCF)抗肺癌和免疫调节作用。**方法** 采用MTT法检测WSPCF对人肺腺癌A549细胞体外生长的抑制作用,对正常C57BL/6J小鼠脾淋巴细胞增殖的影响和对脾淋巴细胞与巨噬细胞抑瘤作用的影响;中性红比色法检测WSPCF对C57BL/6J小鼠脾巨噬细胞吞噬活性的影响;检测WSPCF对Lewis肺癌荷瘤小鼠肿瘤生长、脾脏和胸腺的影响;采用ELISA法检测荷瘤小鼠的细胞免疫因子指标。**结果** WSPCF质量浓度高于1 000 µg/mL时,对A549细胞生长有抑制作用,500 µg/mL时能显著增强淋巴细胞增殖和巨噬细胞吞噬活性($P < 0.05$),提高两者的抑瘤效果;与对照组相比,WSPCF对荷瘤小鼠的抑瘤率分别为39%、42%,差异有统计学意义($P < 0.05$),荷瘤小鼠血清中的免疫因子IL-1β、IL-2、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、IFN-γ、FAS-L水平均显著提高($P < 0.05$)。**结论** WSPCF在体外对人肺腺癌A549细胞有一定的抑制作用,能提高小鼠细胞和分子免疫应答水平;在体内可改善Lewis肺癌荷瘤小鼠的免疫功能,通过激活机体免疫系统实现有效的抗肺癌活性和免疫调节作用。

关键词: 刺松藻水溶性多糖; 抗肿瘤; 免疫调节; Lewis肺癌; 细胞增殖

中图分类号: R979.18; R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)03-0529-05

Antitumor activity of water-soluble polysaccharides from *Codium fragile* and its immunomodulation

WU Rong-jie^{1,2}, YANG Li-li², TONG Xin², LI Qiao-mei², ZOU Xiang-yang², HOU Lin¹

1. College of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China

2. Department of Biotechnology, Dalian Medical University, Dalian 116044, China

Abstract: Objective To investigate the anti-lung cancer activity and immunomodulation of water-soluble polysaccharides from *Codium fragile* (WSPCF). **Methods** Inhibitory rate of WSPCF on A549 cell line, the C57BL/6J mice spleen lymphocyte proliferation, antitumor effect of spleen macrophages and lymphocytes were assessed by MTT assay. The effect of WSPCF on phagocytosis of C57BL/6J mice spleen macrophages was studied by neutral red colormetric method. The effect of WSPCF on the level of cytokine secretion, tumor growth, and the spleen and thymus of the Lewis lung cancer-bearing mice was detected by ELISA method and statistical analysis. **Results** *In vitro*, WSPCF, when the concentration was higher than 1 000 µg/mL, could inhibit the growth of A549 cells, while 500 µg/mL, it could significantly enhance the lymphocyte proliferation and phagocyte activity of macrophages ($P < 0.05$), so as to improve their anti-tumor effects. *In vivo*, tumor inhibitory rates in WSPCF group were 39% and 42%, compared with the control group, the difference being statistically significant ($P < 0.05$), the levels of IL-1β, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IFN-γ, and FAS-L in tumor-bearing mice serum, compared with the control group, were obviously improved ($P < 0.05$). **Conclusion** WSPCF, has an *in vitro* inhibitory effect on human lung cancer A549 cells and could improve the level of cellular and molecular immune response. Also it could significantly improve the immune function of Lewis lung cancer-bearing mice and achieve the effective anti-lung cancer activity and immunoregulation through activating the immune system of the organism.

Key words: water-soluble polysaccharides from *Codium fragile* (Sur.) Hariot. (WSPCF); antitumor; immunoregulation; Lewis lung cancer; cell proliferation

收稿日期: 2011-10-05

基金项目: 辽宁省教育厅基金项目(2009A199); 辽宁省科技厅计划项目(2011225013)

作者简介: 吴荣杰(1985—), 男, 硕士研究生。E-mail: justin.rjwu@gmail.com

*通讯作者 邹向阳 E-mail: zouxiangyang@126.com

侯林 E-mail: houlin01@126.com

刺松藻 *Codium fragile* (Sur.) Hariot. 为世界性泛暖温带性海藻, 在大西洋沿岸^[1]、东亚沿海均有分布, 生长非常迅速, 生物量较大, 在我国部分海区可形成优势藻种。刺松藻有抗肿瘤^[2]、抗病毒、抗凝血^[3]、利尿消肿等活性, 并具有很强的杀灭肠道寄生虫的作用, 是一种重要的海洋中药资源。随着对植物多糖抗肿瘤、抗病毒、抗衰老以及增强免疫功能等生物活性的不断深入研究, 刺松藻水溶性多糖 (water-soluble polysaccharides from *Codium fragile*, WSPCF) 作为刺松藻基础活性物质, 越来越受到关注。

近 50 多年来, 世界各国特别是工业发达国家, 肺癌的发病率和病死率均呈迅速上升趋势, 全球每年约 130 万人死于肺癌, 是造成人类癌症死亡的最主要原因之一^[4]。前期研究表明, WSPCF 有抗凝血、抗血栓、增强机体免疫力等活性^[5]。本实验进一步研究 WSPCF 体外对人肺腺癌 A549 细胞生长的抑制作用, 以及对正常 C57BL/6J 小鼠脾淋巴细胞增殖的影响; 体内对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠细胞免疫指标的影响, 以探讨 WSPCF 对机体免疫功能调节作用及抗肿瘤活性的分子机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

WSPCF 系以热水浸提-乙醇分级沉淀法, Sephadex G-100 凝胶色谱法从刺松藻 [2009 年 4 月采自大连黄海海域, 经辽宁师范大学王宏伟教授鉴定为 *Codium fragile* (Sur.) Hariot.] 中分离得到, 以葡萄糖为标准品, 苯酚硫酸法测得其总糖的质量分数为 65.8%, 硫酸钡比浊法测得硫酸根的质量分数为 17.3%, 以 DMEM/F-12 (1:1) 培养液配制, 滤过除菌, 4 °C 保存备用。

DMEM/F-12 (1:1) 培养基、RPMI 1640 培养基、0.25%胰蛋白酶-EDTA、环磷酰胺、噻唑蓝 (MTT)、二甲基亚砜 (DMSO)、刀豆蛋白 (Con A)、细菌脂多糖 (LPS), 美国 Sigma 公司; 小牛血清, 杭州四季青生物工程材料研究所; 兔抗 IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、 γ 干扰素 (IFN- γ)、FAS 配体 (FAS-L) 多克隆抗体, 北京中杉金桥生物技术有限公司; ELISA 显色试剂盒, 南京凯基生物科技有限公司产品; 其他试剂为国产分析纯。

1.2 细胞系与动物

人肺腺癌细胞株 A549、Lewis 鼠源性肺腺癌 (LLC) 细胞系, 购自中国科学院上海细胞研究所,

大连医科大学保存。C57BL/6J 小鼠, 6~8 周龄, SPF 级, 体质量 (20 $\pm$ 2) g, 雌雄各半, 大连医科大学 SPF 实验动物中心提供, 许可证号 SCXK (辽) 2008-0002。

1.3 仪器

CO₂ 孵箱、酶标仪, Thermo Election Corporation 公司; 倒置显微镜, 日本 Nikon 公司; 超净工作台, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; FD-1 真空冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司。

2 方法

2.1 MTT 法检测细胞增殖

2.1.1 对 A549 细胞增殖的影响 用含 10% 小牛血清的 DMEM/F-12 培养液培养 A549 细胞至对数生长期, 0.25% 胰蛋白酶消化, 调整细胞浓度至 1×10^5 /mL, 接种于 2 块 96 孔板, 每孔 100 μ L, 待细胞贴壁后, 设对照组, 环磷酰胺 (100 μ g/mL) 阳性对照组, WSPCF (10、100、500、1 000 μ g/mL) 给药组, 每组 3 个复孔, 分别培养 24、48 h。培养结束前 4 h, 每孔加 5 mg/mL 的 MTT 15 μ L, 振荡混匀, 继续孵育 4 h, 弃上清液, 加入 DMSO 150 μ L, 振荡 10 min, 酶标仪测 492 nm 处吸光度 (*A*) 值, 计算抑制率。

抑制率 = $1 - \frac{\text{实验组 } A \text{ 值}}{\text{对照组 } A \text{ 值}}$

2.1.2 对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响 常规方法制备正常 C57BL/6J 小鼠脾淋巴细胞, 用含 10% 胎牛血清和双抗的 RPMI 1640 培养基调整细胞浓度为 1×10^7 /mL, 并加入 96 孔板中, 每孔 100 μ L。设对照组、WSPCF (250、500、1 000 μ g/mL) 给药组、Con A (5 μ g/mL) 和 LPS (10 μ g/mL) 阳性对照组, 终体积均为 200 μ L, 每组 3 个复孔, 培养 48 h, MTT 法测 492 nm 处 *A* 值, 计算相对增殖率。

2.2 吞噬中性红法测定小鼠脾巨噬细胞活性

常规方法制备正常 C57BL/6J 小鼠脾巨噬细胞, 以 RPMI 1640 培养基调整细胞密度 1×10^6 /孔, 加入 96 孔板中, 每孔 100 μ L (1×10^5 个细胞)。设对照组和 WSPCF (250、500、1 000 μ g/mL) 给药组, 每组 3 个复孔, 终体积每孔 200 μ L。细胞培养 48 h, 每孔吸弃上清 100 μ L, 加入中性红溶液每孔 100 μ L, 继续培养 30 min, 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清, PBS 洗涤 3 次, 每孔加 200 μ L 裂解液 (乙醇-醋酸 1:1) 室温过夜, 于 589 nm 测 *A* 值, 计算吞噬率。

吞噬率 = $\frac{\text{实验组 } A \text{ 值}}{\text{对照组 } A \text{ 值}}$

2.3 对淋巴细胞和巨噬细胞抑瘤活性的影响

分组与给药同“2.2”项。常规分离并分别收集 C57BL/6J 小鼠脾淋巴细胞和巨噬细胞，分别加入 96 孔板， 2×10^5 /孔；按效、靶比 20:1 加入对数生长长期的小鼠肝癌 H22 细胞 1×10^4 /孔，每组设 3 个复孔，培养 68 h 后，MTT 法测定 A_{492} 值，计算抑瘤率。

$$\text{抑瘤率} = 1 - (A_{\text{效+靶}} - A_{\text{效}}) / A_{\text{靶}}$$

2.4 体内抗肿瘤实验

2.4.1 模型制备及给药处理 取接种 14 d、生长良好的 LLC 细胞，冰浴下以生理盐水稀释成 1×10^7 /mL 的细胞悬液，接种于 C57BL/6J 小鼠右腋皮下，每只 0.2 mL，3 min 内完成。24 h 后将小鼠随机分为 5 组，即对照组，WSPCF 低、高剂量（100、200 mg/kg）组，环磷酰胺（30 mg/kg）阳性对照组，WSPCF（100 mg/kg）与环磷酰胺（30 mg/kg）联合给药组，每组 8 只，雌雄各半。药物以生理盐水作为溶剂，每天 ip 给药 1 次，注射剂量均为 0.2 mL，连续给药 21 d，对照组给予生理盐水。末次给药后 24 h，称小鼠体质量，眼球取血，制备血清， -20°C 保存备用。颈椎脱臼处死小鼠，剖取脾脏、肺脏、肾脏和肿瘤，分别称质量重，计算脾脏指数、肾脏指数、肺脏指数和抑瘤率。

$$\text{抑瘤率} = (\text{对照组瘤质量} - \text{实验组瘤质量}) / \text{对照组瘤质量}$$

$$\text{脏器指数} = \text{脏器质量} / \text{小鼠体质量}$$

2.4.2 ELISA 法检测小鼠血清中免疫分子水平 收集“2.4”项各组小鼠血清， -20°C 保存，间接 ELISA 法检测小鼠血清中 IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、FAS-L 和 IFN- γ 相对的量。

2.5 数据处理

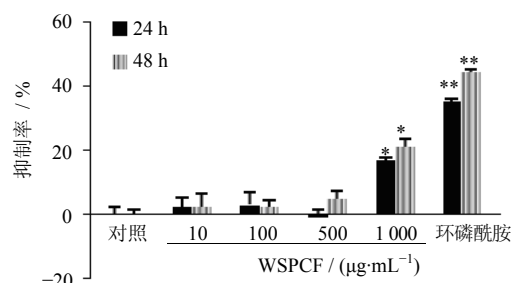
应用统计学软件 SPSS11.5 对所有数据进行统计学处理，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间差异采用 t 检验，

多组间数据比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对人肺腺癌细胞 A549 增殖的影响

WSPCF 质量浓度小于 500 $\mu\text{g/mL}$ 时，对 A549 细胞生长的抑制作用不明显 ($P > 0.05$)；当质量浓度为 1 000 $\mu\text{g/mL}$ ，作用 24、48 h 的抑制率分别为 16.7%、21.0%，与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$)。结果见图 1。



与对照组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ；图 3 同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; Fig. 3 is same

图 1 WSPCF 对人肺腺癌细胞 A549 的增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Inhibition of WSPCF on A549 cell proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 对小鼠脾淋巴细胞增殖和巨噬细胞吞噬活性的影响

与对照组相比，WSPCF 组小鼠脾淋巴细胞增殖活性较高，其中 WSPCF 500、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 组的作用显著 ($P < 0.05$ 、0.01)，而与 LPS 组和 Con A 组的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。WSPCF 对小鼠脾巨噬细胞吞噬活性有促进作用，其中 500、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 组与对照组相比差异显著 ($P < 0.01$)。结果见表 1。

表 1 WSPCF 对 C57BL/6J 小鼠脾淋巴细胞增殖和巨噬细胞吞噬活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of WSPCF on proliferation of spleen lymphocyte and phagocytic activity of macrophage in C57BL/6J mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组 别	$\rho / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	淋巴细胞增殖 (A)	淋巴细胞增殖率 / %	巨噬细胞吞噬活性 (A)	巨噬细胞吞噬率 / %
对照		0.979 ± 0.018	100.0	0.674 ± 0.056	100.0
WSPCF	250	$1.051 \pm 0.078^{\Delta}$	107.4	0.767 ± 0.037	113.9
	500	$1.341 \pm 0.054^{**}$	137.0	$1.076 \pm 0.089^{**}$	159.7
	1 000	$1.225 \pm 0.099^{*}$	125.1	$1.101 \pm 0.043^{**}$	163.4
LPS	10	$1.289 \pm 0.044^{**}$	131.7	—	—
Con A	5	$1.376 \pm 0.038^{**}$	140.6	—	—

与对照组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ；与 LPS 或 Con A 组比较： $\Delta P < 0.05$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs LPS or Con A group

3.3 对小鼠脾淋巴细胞和巨噬细胞抑瘤活性的影响

与对照组相比, WSPCF 质量浓度为 250 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对淋巴细胞和巨噬细胞抑瘤活性的影响不显著 ($P>0.05$); 而在 500、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 时, 淋巴细胞和巨噬细胞抑瘤率与对照组比较差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01)。结果见表 2。

表 2 WSPCF 对淋巴细胞和巨噬细胞抑瘤活性的影响
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effects of WSPCF on antitumor activities of lymphocyte and macrophage ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	淋巴细胞抑瘤率/%	巨噬细胞抑瘤率/%
对照	—	18.6 $\pm$ 4.5	36.4 $\pm$ 4.6
WSPCF	250	23.9 $\pm$ 2.5	43.1 $\pm$ 4.1
	500	32.9 $\pm$ 0.4*	51.1 $\pm$ 1.6**
	1 000	40.5 $\pm$ 4.6*	58.5 $\pm$ 2.2**

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 下表同

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; same as below

3.4 对小鼠 Lewis 肺癌生长的影响

与对照组相比, WSPCF 100、200 mg/kg 对 Lewis 荷瘤小鼠肿瘤生长有明显抑制作用 ($P<0.05$); WSPCF 与环磷酰胺联合给药组的抑瘤率为 99.06%, 与对照组比较差异非常显著 ($P<0.01$), 而环磷酰胺组和联合用药组之间无显著差异, 表明两药合用有协同增效的趋势。结果见表 3。

3.5 对荷瘤小鼠脾脏、肾脏、肺脏指数的影响

除 WSPCF 200 mg/kg 剂量组 Lewis 荷瘤小鼠的脾脏指数与对照组相比差异显著 ($P<0.05$) 外, WSPCF 对荷瘤小鼠脾脏指数、肾脏指数、肺脏指数影响均较小。WSPCF 与环磷酰胺联合给药组荷瘤小鼠肺部出现白点, 有钙化迹象, 表明两药合用能改善肺部肿瘤病变。结果见图 2。

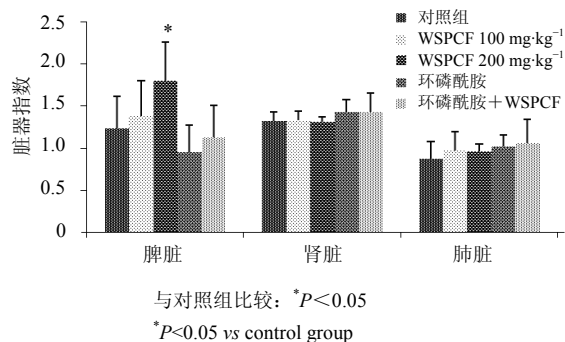
3.6 对荷瘤小鼠血清免疫因子的影响

WSPCF 能促进 Lewis 荷瘤小鼠血清中的免疫

表 3 WSPCF 对 Lewis 荷瘤小鼠的抑瘤作用 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Antitumor effects of WSPCF on Lewis tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	瘤质量/g	抑瘤率/ %
对照	—	3.605 0 $\pm$ 0.126 1	0
WSPCF	100	2.335 0 $\pm$ 0.084 7*	39.51
	200	2.136 0 $\pm$ 0.101 4*	44.67
环磷酰胺	30	0.049 0 $\pm$ 0.003 2**	98.72
WSPCF+环磷酰胺	100+30	0.036 0 $\pm$ 0.001 6**	99.06



与对照组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group

图 2 WSPCF 对荷瘤小鼠脾脏、肾脏、肺脏指数的影响
($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 2 Effect of WSPCF on indexes of spleen, kidney, and lung of tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

因子的水平, 使免疫分子恢复到正常、甚至高出正常水平, 逆转肿瘤所造成的免疫水平整体低下的状况。与对照组相比, WSPCF 的剂量为 100 mg/kg 时, IL-1 β 、IL-10、IL-18、FAS-L 等水平升高 ($P<0.05$), IL-6、IL-12、IFN- γ 水平的升高非常显著 ($P<0.01$); 剂量为 200 mg/kg 时, IL-2 的水平升高 ($P<0.05$), 而 IL-1 β 水平的升高非常显著 ($P<0.01$); WSPCF 与环磷酰胺联合给药组血清免疫因子水平也均显著升高 ($P<0.01$)。结果见图 3。

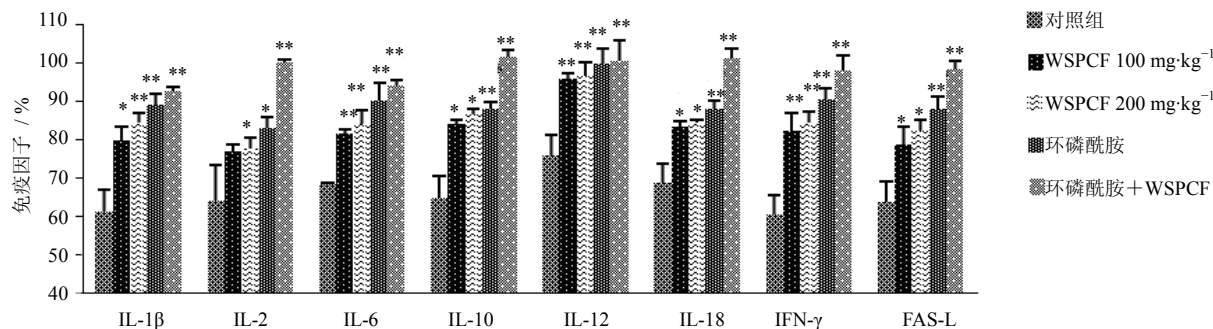


图 3 WSPCF 对 Lewis 荷瘤小鼠免疫因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 3 Effect of WSPCF on immune-response level of Lewis tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

4 讨论

目前,临床上应用多糖治疗肺癌的报道大多数是关于多糖联合化疗方面的研究^[6]。海藻多糖作为典型的T细胞激活剂,兼有抑制肿瘤和提高免疫功能的生物反应调节效果^[7]:能激活细胞免疫功能,增强NK细胞活性,诱导巨噬细胞活化功能。WSPCF能有效抑制肿瘤细胞增殖和肿瘤的恶化,同时活化杀伤性T淋巴细胞和巨噬细胞,提高NK细胞活性,增强抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用^[8]。本实验结果表明,WSPCF质量浓度大于1 000 $\mu\text{g/mL}$ 时,对人肺腺癌A549细胞有直接杀伤作用($P<0.05$);500 $\mu\text{g/mL}$ 时可促进体外培养的脾淋巴细胞增殖,增强脾巨噬细胞吞噬活性和脾淋巴细胞、巨噬细胞的杀瘤活性。体内实验显示,WSPCF能明显抑制Lewis肺癌移植瘤的生长,改善荷瘤小鼠免疫状态。多糖类免疫调节剂进入机体后,首先诱导巨噬细胞产生急性蛋白诱导因子(acute protein inducing factors),血清中IL-1 β 、IL-2、IL-6、IFN- γ (由上游的NF- κ B调节)水平升高,IL-2活化T细胞,促进包括IL-18在内的多种细胞因子分泌,而IL-18又可反馈调节巨噬细胞的活性,促进Fas/Fas-L介导的NK细胞的细胞毒作用和穿孔素介导的NK细胞对靶细胞的杀伤活性^[9-10],同时IL-6、IL-12能激活JAK/STAT信号通路,将免疫信号传到免疫细胞,产生IFN- γ 、FAS-L等,介导与免疫和炎症有关的许多免疫应答的产生^[11]。本实验结果还表明,WSPCF能显著提高荷瘤小鼠血清中IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-12、IL-18、IFN- γ 和FAS-L水平,具有改善化疗药物环磷酰胺对荷瘤小鼠免疫器官的抑制与药物协同增效作用。

综上所述,WSPCF对人肺腺癌A549细胞生长有直接抑制作用,对Lewis肺癌荷瘤小鼠的肿瘤生长有明显抑制和较强的免疫调节作用,其作为一种良好的免疫调节剂,无毒、高效,可用于减轻化疗不良反应,是值得深入研究和开发的海洋药物资源。

参考文献

- [1] Watanabe M A, Scheibling R E. Dispersal potential of the invasive green alga *Codium fragile* ssp. *fragile* [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2009, 381(2): 114-125.
- [2] Isuru W, Ratih P, Se-Kwon K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae [J]. *Carbohydr Polym*, 2011, 84(1): 14-21.
- [3] Marina C, Irene Q, Maria I V, et al. Polysaccharides from the green seaweeds *Codium fragile* and *C. vermilara* with controversial effects on hemostasis [J]. *Int J Biol Macromol*, 2007, 41(5): 641-649.
- [4] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60(5): 277-300.
- [5] 汪艳秋,刘宪丽,刘东颖,等.刺松藻多糖抗凝血及抗血栓作用的研究[J].安徽医药,2011,15(7): 804-806.
- [6] Kimura Y, Iijima S, Kato T, et al. TS-1 and lentinan combination immunochemotherapy for advanced or recurrent gastric cancer: a preliminary report [J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2003, 30(11): 1791-1793.
- [7] 吴梧桐,高美凤,吴文俊.多糖的抗肿瘤作用研究进展[J].中国天然药物,2003,1(3): 182-186.
- [8] Jung-Bum L, Yuko O, Kyoko H, et al. Immuno-stimulating effects of a sulfated galactan from *Codium fragile* [J]. *Carbohydr Res*, 2010, 345(10): 1452-1454.
- [9] Perrella O, Cuomo O, Sbreglia C, et al. IL-18 and interferon-gamma in HCV-related hepatocellular carcinoma: a model of interplay between immune status and cancer [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2009, 23(4): 251-258.
- [10] Sunyoung P, Soyoung C, Daeho C. The dual effects of interleukin-18 in tumor progression [J]. *Cell Mol Immunol*, 2007, 4(5): 329-335.
- [11] Otieno F G, Lopez A M, Jimenez S A, et al. Allograft inflammatory factor-1 and tumor necrosis factor single nucleotide polymorphisms in systemic sclerosis [J]. *Tissue Antigens*, 2007, 69(6): 583-591.