

• 药理与临床 •

基于红细胞免疫功能调节的石蒜碱体内抗肿瘤作用机制研究

辛国松^{1,2}, 杨 焱¹, 张 晶², 于 淼^{1,2}, 王福玲^{1,2}, 刘 斌^{1,2}, 李文兰^{1,2}, 季宇彬^{1,2}

1. 哈尔滨商业大学药物工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

摘要: 目的 研究石蒜碱对肝癌 H₂₂ 细胞荷瘤小鼠红细胞膜结构功能的影响。方法 通过抑瘤率实验、生命延长率实验、流式细胞仪检测肿瘤细胞凋亡率实验, 验证石蒜碱的体内抗肿瘤活性; 采用试剂盒测定红细胞膜总蛋白、胆固醇和唾液酸含量, 考察石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜主要组分的影响; 采用荧光偏振法检测红细胞膜流动性, 荧光染色法检测红细胞膜封闭度, 验证石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜结构功能的影响; 采用三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 酶活性检测试剂盒、荧光分光光度计、激光共聚焦扫描显微镜、Western blotting 法, 检测石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜离子通道相关因子活性的影响; 采用 Western blotting 法检测石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞内活化的半胱氨酸蛋白酶-3 (cleaved Caspase-3)、cleaved Caspase-9、B 淋巴细胞瘤 2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2) 和 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 表达的影响。结果 石蒜碱能够显著抑制 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤生长、有效延长 H₂₂ 荷瘤小鼠生存时间, 并且能够诱导 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡 ($P < 0.05$ 、 0.01); 石蒜碱能够增加 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜总蛋白、唾液酸和胆固醇含量, 同时提高红细胞膜流动性和封闭度, 增强 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜 Na⁺, K⁺-ATP、Ca²⁺, Mg²⁺-ATP 酶活性, 升高 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞内 pH 值, 降低红细胞内 H⁺、Ca²⁺、Cl⁻ 浓度, 增强 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞对 HCO₃⁻/Cl⁻ 转运活性, 升高 Band 3 蛋白表达水平 ($P < 0.01$); 石蒜碱能够升高 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞内 cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 蛋白表达水平, 升高促凋亡蛋白 Bax 表达、降低抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达, 使 Bcl-2/Bax 降低 ($P < 0.01$)。结论 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠具有抗肿瘤作用, 能够通过调控 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜组成结构, 提高细胞膜离子通道的活性, 在离子通道之间建立联系相互促进, 通过这种相互促进作用来调节胞内酸碱度、离子平衡, 使红细胞膜结构功能得到改善, 进而增强红细胞免疫功能, 并调控肿瘤细胞内凋亡相关蛋白表达, 激活肿瘤细胞凋亡相关因子, 启动肿瘤细胞凋亡程序, 从而发挥抗肿瘤作用。

关键词: 石蒜碱; H₂₂ 荷瘤小鼠; 红细胞免疫; 细胞凋亡; 抗肿瘤

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2022)02-0432-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.02.013

Anti-tumor mechanism of lycorine *in vivo* based on regulation of red blood cell immune functionXIN Guo-song^{1,2}, YANG Yi¹, ZHANG Jing², YU Miao^{1,2}, WANG Fu-ling^{1,2}, LIU Bin^{1,2}, LI Wen-lan^{1,2}, JI Yu-bin^{1,2}

1. Engineering research center for medicine, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. Anti-tumor Natural Drug Engineering Research Center, Ministry of Education, Harbin 150076, China

Abstract: Objective To study the effect of lycorine on structure and function of red blood cell membranes in H₂₂ tumor-bearing mice. **Methods** Anti-tumor activity of lycorine *in vivo* was verified by tumor inhibition rate experiment, life extension rate experiment, and tumor cells apoptosis rate test by flow cytometry. Contents of total protein, cholesterol and sialic acid of erythrocyte membrane were determined by assay kit to detect the effect of lycorine on content of main components of erythrocyte membrane in H₂₂ tumor-bearing mice. The erythrocyte membrane fluidity was detected by fluorescence polarization method, and erythrocyte membrane sealing degree was determined by Zamudio method to verify the effect of lycorine on erythrocyte membrane structure function of H₂₂ tumor-bearing mice. Adenosine

收稿日期: 2021-08-20

基金项目: 中国博士后面上项目 (2019M651296); 黑龙江省自然科学基金联合引导项目 (LH2019H066); 哈尔滨商业大学青年创新人才项目 (18XN024, 2019CX37); 中央支持地方高校改革发展基金优秀青年人才项目 (2020YQ12); 黑龙江省博士后科研启动资助项目 (LBH-Q20026); 2021 年哈尔滨商业大学教师“创新”项目支持计划项目

作者简介: 辛国松 (1984—), 男, 副研究员, 博士后, 硕士生导师, 研究方向为抗肿瘤中药药理学研究。E-mail: 13766801150@163.com

triphosphate (ATP) activity assay kit, fluorescence spectrophotometer, laser confocal scanning microscopy and Western blotting method were used to detect the effect of lycorine on erythrocyte membrane ion channel activity of H₂₂ tumor-bearing mice. Western blotting was used to detect the effects of lycorine on protein expressions of cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9, B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) in tumor cells of H₂₂ tumor-bearing mice. **Results** Lycorine inhibited tumor growth in H₂₂ tumor-bearing mice, prolonged the survival time of H₂₂ tumor-bearing mice, and induced tumor cell apoptosis in H₂₂ tumor-bearing mice ($P < 0.05, 0.01$); Lycorine increased erythrocyte membrane total protein, sialic acid and cholesterol contents in H₂₂ tumor-bearing mice, improved the fluidity and tightness of erythrocyte membrane, enhanced the erythrocyte membrane Na⁺, K⁺-ATPase and Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase activity of H₂₂ tumor-bearing mice, increased the intracellular pH of H₂₂ tumor-bearing mice, decreased H⁺, Ca²⁺, Cl⁻ concentrations in red blood cells, enhanced the HCO₃⁻/Cl⁻ transport activity of H₂₂ tumor-bearing mice, and increased Band 3 protein expression ($P < 0.01$). Lycorine increased the protein expressions of cleaved Caspase-3 and cleaved Caspase-9, increased the expression of pro-apoptotic protein Bax, decreased the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2, and reduced the ratio of Bcl-2/Bax ($P < 0.01$). **Conclusion** Lycorine has anti-tumor effect on H₂₂ tumor-bearing mice, and can improve the activity of cell membrane ion channel by changing the erythrocyte membrane structure of H₂₂ tumor-bearing mice, and establish a relationship between ion channels to promote each other. Through this mutual promotion, the intracellular pH and ion balance are adjusted, and the structural function of erythrocyte membrane is improved, thereby enhancing the immune function of red blood cells. In addition, lycorine regulates the activity of apoptosis-related proteins in tumor cells, activates the apoptosis-related factors, initiates the apoptosis-related process of tumor cells, and exerts the anti-tumor effect.

Key words: lycorine; H₂₂ tumor-bearing mice; red blood cell immunity; apoptosis; anti-tumor

肿瘤严重威胁着人类的生命健康,在肿瘤发展过程中,免疫系统发挥重要作用。红细胞作为机体血液循环中含量最多的血细胞,是一种天然免疫调节剂和免疫刺激剂,红细胞免疫在机体抗击肿瘤过程中起着重要作用^[1-2]。石蒜碱是一种广泛存在于石蒜科植物中并经分离得到的一种单体活性成分,是一种异喹啉类生物碱^[3-7],具有抗肿瘤^[8-19]、抗炎^[20-21]、抗菌^[22]、抗病毒^[23-25]等药理作用。近年来,石蒜碱的抗肿瘤作用研究已成为热点,本研究以肝癌 H₂₂ 细胞荷瘤小鼠红细胞为研究对象,通过体内实验考察石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜的组成成分和结构功能以及红细胞膜离子通道活性的影响。本研究也以此为契机,以石蒜碱为载体,从红细胞免疫的角度阐述抗肿瘤药物作用肿瘤细胞生物膜靶点和作用机制,为抗肿瘤新药的研发、寻找抗肿瘤药物作用靶点、发现抗肿瘤药物作用途径提供研究基础,也为红细胞免疫的深入研究提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级昆明种小鼠(出生 4~5 周),雌雄各半,体重 18~22 g,购于黑龙江中医药大学动物实验室(黑动字第 00101003 号)。动物饲养于温度 18~22 ℃、湿度 50%~60%的环境中,自由进食饮水,每周换水 2~3 次,每周更换 2 次垫料。动物实验伦理审批号 sydwgzr2021-104。

1.2 细胞

H₂₂ 肝癌细胞由国家教育部抗肿瘤天然药物工

程研究中心提供。

1.3 药品与试剂

石蒜碱(批号 34296,质量分数 98%)购自阿拉丁试剂有限公司;羟基喜树碱(质量分数 98%,批号 20130112)购自哈尔滨圣泰药业有限公司;考马斯亮蓝试剂盒、胆固醇定量试剂盒、唾液酸定量试剂盒、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)酶活性检测试剂盒购自南京建成生物公司;还原型辅酶 I(reduced nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)、BCECF-AM(pH 荧光探针)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体、兔 Band 3 多克隆抗体、兔 B 淋巴细胞瘤 2(B-cell lymphoma 2, Bcl-2)多克隆抗体、兔 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)多克隆抗体、兔活化的半胱氨酸蛋白酶-3(cleaved Caspase-3)多克隆抗体、兔 cleaved Caspase-9 多克隆抗体、兔 β -actin 多克隆抗体、考马斯亮蓝快速染色液购自碧云天生物技术有限公司;Fluo-3/AM(Ca²⁺荧光探针)购自美国 MolecularProbe 公司;MQAE(Cl⁻荧光探针)购自美国 Biotium 公司。

1.4 仪器

EPICS-XL 型流式细胞仪、低温高速离心机、TGL-22 型台式冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司);DKZ 系列恒温水浴箱(上海一恒科技有限公司);752 型紫外-可见分光光度计(上海第三仪器厂);RF-5301PC 型荧光分光光度计(日本 Shimadzu 公司);TCS-SP2 型激光共聚焦扫描显微镜(德国 Leica 公司);Anke TDL80-2C 型离心机(上海安亭

科学仪器厂)。

2 方法

2.1 石蒜碱体内抗肿瘤作用研究

2.1.1 H₂₂ 荷瘤小鼠实体瘤模型的建立 小鼠 ip H₂₂ 肝癌细胞, 饲养 5~8 d, 接种成功后抽取腹水 (小鼠存活率 ≥95%), 使用 4 ℃ 无菌 0.9% 氯化钠溶液将细胞密度调整为 5×10⁶ 个/mL, 小鼠右前肢腋部 sc 0.2 mL 细胞。

2.1.2 H₂₂ 荷瘤小鼠腹水瘤模型的建立 小鼠 ip H₂₂ 肝癌细胞, 饲养 5~8 d, 接种成功后抽取腹水 (小鼠存活率 ≥95%), 使用 4 ℃ 无菌 0.9% 氯化钠溶液将细胞密度调整为 5×10⁶ 个/mL, 小鼠 ip 0.2 mL 细胞。

2.1.3 分组和给药 取事先接种成功的昆明种小鼠 50 只, 随机分成 5 组, 每组 10 只, 分别为模型组、羟基喜树碱 (6 mg/kg) 组及石蒜碱高、中、低剂量 (40、20、10 mg/kg) 组。各给药组 ip 相应药物, 模型组 ip 0.9% 氯化钠溶液, 1 次/d, 连续 7 d。

2.1.4 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠的抑瘤作用 实体瘤模型昆明种小鼠末次给药 24 h 后, 称定小鼠体质量, 剥离瘤体并称定瘤质量, 此过程全程在冰浴上操作, 重复进行 3 批实验, 计算石蒜碱抑瘤率。

抑瘤率 = (模型组平均瘤质量 - 给药组平均瘤质量) / 模型组平均瘤质量

2.1.5 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠生命延长的作用 腹水瘤模型昆明种小鼠末次给药 24 h 后, 记录各给药组和模型组的小鼠平均生存时间, 重复进行 3 批实验, 计算石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠的生命延长率。

生命延长率 = (给药组平均生存天数 - 模型组平均生存天数) / 模型组平均生存天数

2.1.6 石蒜碱诱导 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡的影响 腹水瘤模型昆明种小鼠给药结束后, 抽取 H₂₂ 荷瘤小鼠腹水 1 mL, 2000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液; 加入 70% 乙醇重悬, 于 -20 ℃ 沉淀, 随后 4 ℃ 固定 24 h, 加入碘化丙啶 (PI) 染色剂, 0.5 h 后经尼龙网滤过, 采用流式细胞仪检测凋亡情况。

2.2 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜结构功能的影响

2.2.1 分组及给药 取 10 只昆明种小鼠作为对照组, 取腹水瘤造模成功小鼠 50 只, 随机分成模型组、羟基喜树碱 (6 mg/kg) 组及石蒜碱高、中、低剂量 (40、20、10 mg/kg) 组。各给药组 ip 相应药物, 对照组和模型组 ip 0.9% 氯化钠溶液, 1 次/d, 连续 7 d。

2.2.2 红细胞膜悬液的制备 末次给药 24 h 后, 小

鼠眼球采血, 加入肝素, 3000 r/min 离心 5 min, 弃上清液; 沉淀加入 8 mL Tris-HCl 溶液 (10 mmol/L、pH 7.4) 和适量苯甲基磺酰氟 (PMSF), 4 ℃ 溶血过夜; 4 ℃、12 000 r/min 离心 30 min, 弃上清, 加入 Tris-HCl 溶液 (10 mmol/L、pH 7.4), 12 000 r/min 离心洗涤 3 次, 取白色沉淀物, 加入等体积 PBS 溶液 (pH 7.4) 重悬待用。

2.2.3 石蒜碱对 H₂₂ 小鼠红细胞膜总蛋白、胆固醇、唾液酸含量的影响 取 “2.2.2” 项下制备的红细胞膜悬液, 采用考马斯亮蓝法对蛋白含量进行测定; 按照胆固醇定量试剂盒说明书测定红细胞膜胆固醇含量, 按照唾液酸定量试剂盒说明书测定红细胞膜唾液酸含量。

2.2.4 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜流动性的影响 将 “2.2.2” 项下收集的红细胞膜悬液, 用 0.9% 氯化钠溶液悬浮, 加入 2 mL 荧光探针 DPH, 37 ℃ 温育 30 min, PBS 溶液洗涤 1 次, 离心 10 min, 将下层沉淀悬浮在适量的 PBS 溶液中。采用荧光分光光度计测定, 氙灯为光源, 荧光激发波长设定为 362 nm, 发射波长为 432 nm, 测定平行荧光偏振光强度和垂直荧光偏振光强度 I_{11} 、 $I_{\perp}$, 计算荧光偏振度 (P)、微黏度 (η) 及流动性 (LFU)。

$$P = (I_{11} - I_{\perp}) / (I_{11} + I_{\perp})$$

$$\eta = 2P / (0.46 - P)$$

$$\text{LFU} = (0.5 - P) / P^2$$

2.2.5 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜封闭度的影响 在比色皿中加入 0.6 mL “2.2.2” 项下制备的红细胞膜悬液, 按试剂盒说明书操作, 采用紫外-可见分光光度计测定, 波长设定为 420 nm, 从加入 NADH 开始, 每隔 1 min 记录 1 次吸光度 (A) 值, 连续记录 6 min, 计算封闭度。

封闭度 = (加表面活性剂酶活力 - 不加表面活性剂酶活力) / 加表面活性剂酶活力

2.3 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜离子通道活性的影响

2.3.1 分组及给药 方法参见 “2.2.1” 项。

2.3.2 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜阴离子交换蛋白 1 (anion exchanger 1, AE1) 阴离子转运活性的影响 末次给药 24 h 后, 小鼠眼球采血, 取新鲜血液, 加入 PBS 溶液, 3000 r/min 离心 5 min, 反复清洗 3 次, 得沉淀红细胞。将沉淀细胞按 1:50 稀释, 加入 Cl⁻ 荧光探针 (MQAE), 37 ℃ 避光孵育 2 h, 2000 r/min 离心 5 min; 弃上清液, 用等体积试剂盒

配比的溶液 II 混匀重悬, 离心洗涤; 然后将红细胞加入含有 2 mL 试剂盒配比的溶液 III 的比色杯, 充分混匀, 静置 10 min 后, 采用荧光分光光度计检测, 发射波长为 460 nm, 激发波长为 350 nm。

2.3.3 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞内 H⁺浓度的影响 末次给药 24 h 后, 小鼠眼球采血, 取新鲜血液, 加入 PBS 溶液, 3000 r/min 离心 5 min, 反复清洗 3 次, 得到红细胞沉淀。取 100 μ L 红细胞沉淀, 取 100 μ L 红细胞沉淀, 用 PBS 溶液定容至 5 mL, 制成悬液, 吸取 50 μ L 悬液, 加入 PBS 溶液 950 μ L, 然后加入 pH 荧光探针 (BCECF-AM), 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 充分吹散细胞, 取混悬液细胞置于盖玻片上, 采用激光共聚焦扫描显微镜检测, 发射波长为 535 nm, 激发波长为 488 nm。

2.3.4 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞内 Ca²⁺浓度的影响 末次给药 24 h 后, 小鼠眼球采血, 取新鲜血液, 加入 PBS 溶液, 3000 r/min 离心 5 min, 反复清洗 3 次, 得红细胞沉淀。取 100 μ L 红细胞沉淀, 用 PBS 溶液定容至 5 mL, 制成悬液, 使用荧光探针负载导入, 精确吸取 100 μ L 红细胞悬液, 向红细胞悬液中加入无钙台式液 500 μ L 以及 Fluo-3/AM 溶液 200 μ L, 37 $^{\circ}$ C 避光染色 120 min; 3500 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入无钙台式液 300 μ L, 吹匀, 制成悬液, 采用激光共聚焦扫描显微镜检测, 激发激光为 488 nm。

2.3.5 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜 Na⁺, K⁺-ATP 酶、Ca²⁺, Mg²⁺-ATP 酶活性的影响 按“2.2.2”项下方法制备红细胞膜悬液, 按 ATP 酶活性检测试剂盒说明书进行检测。

2.3.6 Western blotting 法检测石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜 Band 3 蛋白表达的影响 按“2.2.2”项下方法制备红细胞膜悬液, 采用考马斯亮蓝法进行蛋白定量, 蛋白样品至 15% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 于 TBST 封闭液中封闭 2 h, 分别加入 Band 3、 β -actin 抗体 (1:200), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 以 TBST 封闭液洗涤, 加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (1:500), 室温孵育 2 h; 加入 AP-NBT/BICT 显色液进行显色, 采用凝胶成像系统成像并使用 Image G v2.8.7 软件分析。

2.4 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠凋亡相关蛋白表达的影响

2.4.1 细胞收集

(1) H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞的收集: 采用 H₂₂ 荷瘤小鼠腹水瘤模型, 于末次给药次日 (处死前), 用

注射器于小鼠腹腔中抽取腹水 1 mL, 2000 r/min 离心 10 min, 弃上层清液; 沉淀用 0.85% NH₄Cl 溶液洗涤 3 次, 然后用 0.9% 氯化钠溶液洗涤 3 次, 2000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 即得肿瘤细胞。

(2) 正常小鼠肝细胞的收集: 取对照组小鼠肝组织适量并切成小细块, 用 PBS 溶液清洗后放入试管中, 加入胰酶, 于 37 $^{\circ}$ C 消化 15 min, 用小牛血清终止消化, 滤过; 将消化后的组织液以 2000 r/min 反复离心 3 次, 2 min/次, 收集沉淀, 加入 0.83% NH₄Cl 溶液 1 mL 以破除血细胞, 1500 r/min 离心 5 min, 收集沉淀, 即得正常小鼠肝细胞。

2.4.2 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠凋亡相关蛋白表达的影响 取“2.4.1”项下各组细胞, 用 PBS 溶液清洗 1 次, 彻底吸净 PBS 溶液, 加入裂解液适量, 于冰浴中裂解 15 min, 4 $^{\circ}$ C、16 000 r/min 离心 15 min, 取上清液置于 -80 $^{\circ}$ C 保存, 待用。采用考马斯亮蓝法测定蛋白含量后, 加入适量上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 金属浴 5 min 使蛋白变性; 取变性后的蛋白样品适量, 经 15% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 于脱脂牛奶中封闭 2 h, 分别加入 Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9、 β -actin 抗体 (1:200), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 依次用 TBST 溶液、TBS 溶液在室温下洗涤 2、1 次, 10 min/次, 加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (1:500), 室温孵育 2 h; 加入 AP-NBT/BICT 显色液进行显色, 采用凝胶成像系统成像并使用 Image G v2.8.7 软件分析。

2.5 统计分析

统计分析用 SPSS 21.0 软件进行, 数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本均数比较采用 One-way ANOVA 分析。

3 结果

3.1 石蒜碱体内抗肿瘤作用

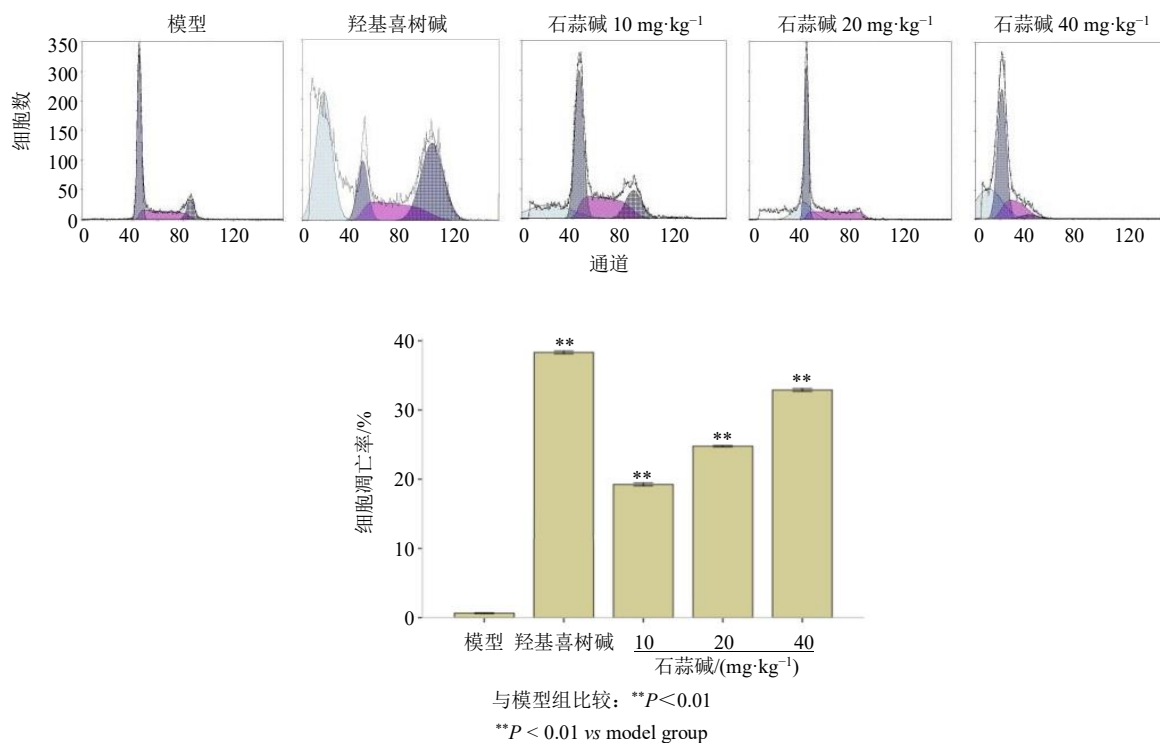
3.1.1 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠瘤质量的影响 如表 1 所示, 与模型组比较, 石蒜碱各剂量组小鼠瘤质量明显下降 ($P < 0.05$ 、0.01), 呈剂量相关性。各给药组均可以抑制 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤的生长, 具有抗肿瘤作用。

3.1.2 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠生命延长的作用 如表 1 所示, 与模型组比较, 石蒜碱各剂量组小鼠生存时间明显延长 ($P < 0.05$ 、0.01), 呈剂量相关性。

3.1.3 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡的影响 如图 1 所示, 与模型组比较, 石蒜碱各剂量组小鼠肿

表 1 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤质量和生存时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 1 Effect of lycorine on tumor weight and survival time of H₂₂ bearing-tumor mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	瘤质量/g	抑瘤率/%	生存时间/d	生命延长率/%
模型	—	1.37 ± 0.08	—	10.38 ± 0.24	—
羟基喜树碱	6	0.83 ± 0.12**	39.41	15.49 ± 0.18**	49.23
石蒜碱	10	1.05 ± 0.06*	23.36	13.40 ± 0.23*	29.09
	20	0.87 ± 0.09**	36.50	15.59 ± 0.14**	50.19
	40	0.59 ± 0.05**	56.93	17.55 ± 0.11**	69.08

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group图 1 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Fig. 1 Effect of lycorine on apoptosis rate of tumor cells of H₂₂ bearing-tumor mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

瘤细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.01$), 呈剂量相关性。

3.2 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜组成结构的影响

3.2.1 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜总蛋白、唾液酸和胆固醇含量的影响 如表 2 所示, 与对照组

比较, 石蒜碱各剂量组红细胞膜总蛋白、唾液酸和胆固醇含量明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 石蒜碱各剂量组红细胞膜蛋白、唾液酸和胆固醇含量明显升高 ($P < 0.01$), 呈剂量相关性。

表 2 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜组分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 2 Effect of lycorine on erythrocyte membrane composition of H₂₂ bearing-tumor mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	总蛋白/(g·L ⁻¹)	唾液酸/(mmol·g ⁻¹)	胆固醇/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	0.577 ± 0.032	0.893 ± 0.014	2.645 ± 0.027
模型	—	0.332 ± 0.028**	0.618 ± 0.017**	1.044 ± 0.011**
羟基喜树碱	6	0.413 ± 0.024***	0.819 ± 0.015***	2.082 ± 0.014***
石蒜碱	10	0.377 ± 0.029***	0.692 ± 0.008***	1.154 ± 0.007***
	20	0.432 ± 0.015***	0.792 ± 0.009***	1.969 ± 0.037***
	40	0.518 ± 0.027***	0.827 ± 0.019***	2.342 ± 0.024***

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.01$, 下表同* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.01$ vs model group, same as below tables

3.2.2 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜流动性和封闭度的影响 如表 3 所示, 与对照组比较, 石蒜碱各剂量组红细胞膜流动性和封闭度明显降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 石蒜碱各剂量组红细胞膜流动性和封闭度明显升高 ($P<0.01$), 呈剂量相关性。

3.3 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜离子通道活性的影响

3.3.1 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜 Na⁺, K⁺-ATP 酶、Ca²⁺, Mg²⁺-ATP 酶活性的影响 如表 4 所示, 与对照组比较, 石蒜碱各剂量组红细胞膜 Na⁺, K⁺-ATP 酶、Ca²⁺, Mg²⁺-ATP 酶活性明显降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 石蒜碱各剂量组红细胞膜 Na⁺, K⁺-ATP 酶、Ca²⁺, Mg²⁺-ATP 酶活性明显升高 ($P<0.01$), 呈剂量相关性。

3.3.2 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜 AE1 阴离子转运活性的影响 如表 5 所示, 各给药组与对照组比较, 荧光强度均有所下降 ($P<0.01$); 各给药组与模型组比较, 荧光强度明显升高 ($P<0.01$); 石蒜碱能够升高 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞阴离子转运活

性, 且呈剂量相关性。

3.3.3 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞内 pH 值的影响 如表 5 所示, 各给药组与对照组比较, 荧光强度均有所下降 ($P<0.01$); 各给药组与模型组比较, 荧光强度明显升高 ($P<0.01$); 石蒜碱能够升高 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞内 pH 值, 胞内 H⁺ 浓度降低, 且呈剂量相关性。

3.3.4 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞内 Ca²⁺ 浓度的影响 如表 5 和图 2 所示, 各给药组与对照组比较, 荧光强度均有所升高 ($P<0.01$); 各给药组与模型组比较, 荧光强度明显降低 ($P<0.01$); 石蒜碱能够降低 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞内 Ca²⁺ 浓度, 且呈剂量相关性。

3.3.5 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜 Band 3 蛋白表达的影响 如图 3 和表 6 所示, 与对照组比较, 各给药组小鼠红细胞膜 Band 3 蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组小鼠红细胞膜 Band 3 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$), 且呈剂量相关性。

表 3 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜流动性及封闭度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of lycorine on erythrocyte membrane fluidity and blocking degree of H₂₂ bearing-tumor mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	流动性	封闭度/%
对照	—	25.886±0.147	70.35±2.13
模型	—	9.466±0.155**	33.47±0.59**
羟基喜树碱	6	12.305±0.287***	48.08±2.18***
石蒜碱	10	10.612±0.243***	38.35±2.32***
	20	11.589±0.331***	45.26±1.78***
	40	17.754±0.297***	52.17±2.23***

表 4 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜 ATP 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

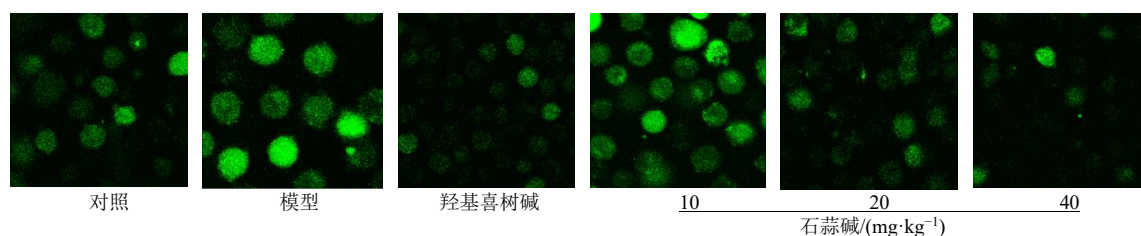
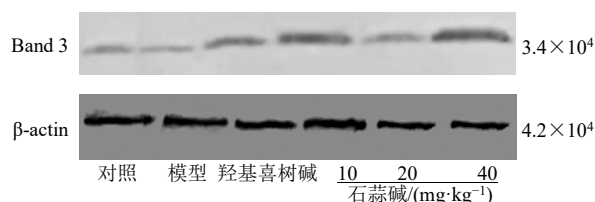
Table 4 Effect of lycorine on ATP activity of erythrocyte membrane of H₂₂ bearing-tumor mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Na ⁺ , K ⁺ -ATP 酶/(μmol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹)	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -ATP 酶/(μmol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹)
对照	—	0.357±0.035	0.378±0.032
模型	—	0.125±0.025**	0.138±0.012**
羟基喜树碱	6	0.236±0.014***	0.239±0.027***
石蒜碱	10	0.174±0.017***	0.173±0.029***
	20	0.248±0.021***	0.253±0.031***
	40	0.287±0.024***	0.296±0.025***

表 5 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜 AE1 阴离子转运活性以及红细胞内 pH 值和 Ca²⁺ 浓度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of lycorine on AE1 anion transport activity of erythrocyte membrane, pH value and Ca²⁺ concentration in erythrocyte of H₂₂ bearing-tumor mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	平均荧光强度		
		AE1	pH	Ca ²⁺
对照	—	6.15±0.12	98.75±2.05	35.43±1.64
模型	—	1.54±0.16**	52.43±1.93**	86.64±1.47**
羟基喜树碱	6	3.28±0.13***	71.58±1.64***	55.36±1.66***
石蒜碱	10	2.31±0.14***	65.99±1.98***	74.97±0.62***
	20	3.63±0.09***	80.73±0.79***	57.89±0.97***
	40	5.45±0.21***	90.31±0.82***	42.39±0.85***

图 2 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞内 Ca²⁺ 浓度的影响 (×400)Fig. 2 Effect of lycorine on Ca²⁺ concentration in red blood cells of H₂₂ tumor-bearing mice (×400)图 3 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜 Band 3 蛋白表达的影响
Fig. 3 Effect of lycorine on Band 3 protein expression of erythrocyte membrane in H₂₂ bearing-tumor mice表 6 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜 Band 3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 6 Effect of lycorine on Band 3 protein expression of erythrocyte membrane in H₂₂ bearing-tumor mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Band 3/β-actin
对照	—	90.34 ± 0.89
模型	—	35.45 ± 0.74**
羟基喜树碱	6	52.57 ± 0.51***
石蒜碱	10	41.43 ± 0.70***
	20	61.78 ± 0.57***
	40	82.09 ± 1.19***

表 7 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 7 Effect of lycorine on apoptosis proteins expressions of tumor cells in H₂₂ bearing-tumor mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

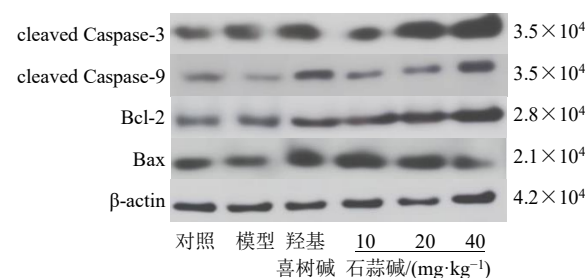
组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量		
		Bcl-2/Bax	cleaved Caspase-3/β-actin	cleaved Caspase-9/β-actin
对照	—	176.32 ± 1.25	65.47 ± 1.43	74.96 ± 1.95
模型	—	153.62 ± 3.09**	71.21 ± 1.94**	96.04 ± 1.59**
羟基喜树碱	6	67.69 ± 1.76***	121.68 ± 1.87***	132.94 ± 2.69***
石蒜碱	10	88.29 ± 1.12***	113.27 ± 2.16***	113.91 ± 1.89***
	20	68.54 ± 1.31***	129.84 ± 1.86***	136.94 ± 2.28***
	40	53.91 ± 1.32***	146.19 ± 2.43***	148.09 ± 1.13***

4 讨论

近年来对红细胞免疫的研究一直是国内外学者的研究热点,文献报道恶性肿瘤的发生发展与机体免疫系统状态密切相关,机体内红细胞数量巨大,红细胞作为一种天然免疫调节剂和免疫刺激剂,可以调控多种肿瘤的发生发展,红细胞免疫在抗肿瘤免疫反应中作用重大^[26-28]。红细胞膜的组成结构与正常机体细胞相似,主要由磷脂双分子层组成,中间镶嵌着膜蛋白、胆固醇、糖脂分子等膜质。在

3.4 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡蛋白表达的影响

如图 4 和表 7 所示,与对照组和模型组比较,各给药组小鼠肿瘤细胞 cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$), Bcl-2/Bax 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$),且呈剂量相关性。

图 4 石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡蛋白表达的影响
Fig. 4 Effect of lycorine on apoptosis proteins expressions of tumor cells in H₂₂ bearing-tumor mice

红细胞膜内层的表面镶嵌着一层细胞膜支架蛋白,这些蛋白组成了一层网状结构,而这些网状结构对红细胞膜的整体结构形态起保护作用,即为红细胞膜的骨架,而这层骨架主要是由肌动蛋白和收缩蛋白组成的短纤维结构。红细胞膜的主要作用是将血红蛋白与血浆分开,起到保护作用,当红细胞与细胞外环境发生反应,如红细胞的物质运输、信息传递以及红细胞免疫等过程,这些反应必须通过或刺激红细胞膜,因此,红细胞膜的结构生理功能发生

改变都会对红细胞免疫功能产生影响。本研究以此为切入点,研究了石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜结构功能的影响,进而探究石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠的体内抗肿瘤机制。

本研究首先通过抑瘤率实验、生命延长率实验考察石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用,发现石蒜碱具有抑瘤作用,能够有效延长肿瘤小鼠生存时间;采用流式细胞仪检测石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡率的影响,发现石蒜碱能够诱导 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞发生凋亡,表明石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠具有抗肿瘤作用;检测石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜主要组成成分的影响,结果发现石蒜碱能够升高红细胞膜总蛋白、唾液酸和胆固醇含量,使红细胞膜主要组成成分含量增加,促进红细胞膜上物质的运输,增强红细胞免疫活性;考察石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜结构功能的影响,结果发现石蒜碱能够降低红细胞膜的微黏度,升高红细胞膜流动性,升高红细胞膜的封闭度,且呈剂量相关性;检测石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜 Ca²⁺、Mg²⁺-ATP 和 Na⁺、K⁺-ATP 酶活性的影响,发现石蒜碱能够升高红细胞膜 ATP 酶活性,增强红细胞免疫功能。采用 MQAE (Cl⁻ 荧光探针) 检测石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜 AE1 阴离子转运活性的影响,利用 BCECF-AM (pH 荧光探针) 检测石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞内 H⁺ 浓度的影响,利用 Fluo-3/AM (Ca²⁺ 荧光探针) 检测石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞内 Ca²⁺ 浓度的影响,采用 Western blotting 法检测石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜阴离子转运通道 Band 3 蛋白表达的影响,结果发现石蒜碱能够通过升高 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞内 pH 值,降低红细胞内 H⁺ 浓度,使红细胞内酸碱度维持在相对平衡状态;石蒜碱能够降低 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞内 Ca²⁺ 浓度,使红细胞膜阳离子通道转运活性增强,与此同时石蒜碱还可以降低 H₂₂ 小鼠红细胞内 Cl⁻ 浓度,增强 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞对 HCO₃⁻/Cl⁻ 转运活性,增强红细胞膜阴离子通道转运活性;石蒜碱能够有效提高 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜 Band 3 蛋白的表达,增强红细胞膜阴离子通道转运功能。表明石蒜碱可以通过提高 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞内 pH 值,降低红细胞内 Ca²⁺、Cl⁻ 浓度,维持红细胞内环境平衡,提高红细胞膜功能,增强红细胞免疫能力。采用 Western blotting 法检测石蒜碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞内 cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9、Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响,

结果发现石蒜碱能够升高促凋亡蛋白 Bax 表达、降低抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达,使 Bcl-2/Bax 的比值降低,启动细胞凋亡程序;此外石蒜碱能够升高 Caspase 级联反应上游凋亡蛋白 cleaved Caspase-9 活性,激发 Caspase 级联反应,进而启动凋亡启动蛋白 cleaved Caspase-3 活性,并最终启动细胞凋亡程序。

综上所述,石蒜碱在 H₂₂ 荷瘤小鼠体内具有抗肿瘤作用,石蒜碱通过调节 H₂₂ 荷瘤小鼠红细胞膜的组成结构,改善膜脂质流动性,调控红细胞膜的通透性、信息传递、物质和能量交换、离子泵功能等,从而维持红细胞内环境稳定,增强红细胞免疫功能,起到抗肿瘤作用。同时石蒜碱能够升高红细胞内 pH 值,保持红细胞内酸碱平衡,改善红细胞内离子状态,降低红细胞内 Ca²⁺ 浓度,增强红细胞对 HCO₃⁻/Cl⁻ 转运活性,进而增强红细胞阴离子通道转运活性,并能提高荷瘤小鼠红细胞膜 Band 3 蛋白的表达,促进红细胞发挥免疫功能,并最终激活肿瘤细胞凋亡相关因子,启动细胞凋亡程序,发挥抗肿瘤作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 赵彬彬, 史令娟, 高弼虎. 终末期肾脏病患者红细胞免疫功能提高与肿瘤免疫 [J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2014, 8(3): 542-545.
- [2] 季宇彬, 汲晨峰. 黄芪多糖对肿瘤模型小鼠红细胞免疫功能的影响 [J]. 现代食品科技, 2013, 29(9): 2042-2046.
- [3] Li A Q, Du Z F, Liao M, et al. Discovery and characterisation of lycorine-type alkaloids in *Lycoris* spp. (Amaryllidaceae) using UHPLC-QTOF-MS [J]. *Phytochem Anal*, 2019, 30(3): 268-277.
- [4] Tasker S Z, Cowfer A E, Hergenrother P J. Preparation of structurally diverse compounds from the natural product lycorine [J]. *Org Lett*, 2018, 20(18): 5894-5898.
- [5] Hu J, Liu Y, Li Q, et al. Amaryllidaceae alkaloids from *Lycoris radiata* [J]. *China J Chin Mater Med*, 2018, 43(10): 2086-2090.
- [6] Hu Z, Wang Z W, Liu Y X, et al. Leveraging botanical resources for crop protection: The isolation, bioactivity and structure-activity relationships of *Lycoris* alkaloids [J]. *Pest Manag Sci*, 2018, 74(12): 2783-2792.
- [7] Wang Y C, Zhu G M, Li X, et al. Simultaneous determination of galanthamine and lycorine in *Lycoris radiata* by a capillary electrophoresis with an

- electrochemiluminescence method [J]. *J Sep Sci*, 2014, 37(20): 3007-3012.
- [8] Sun Y, Wu P, Sun Y, *et al.* Lycorine possesses notable anticancer potentials in on-small cell lung carcinoma cells via blocking Wnt/ β -catenin signaling and epithelial-mesenchymal transition (EMT) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 911-921.
- [9] Yu H Y, Qiu Y L, Pang X, *et al.* Lycorine promotes autophagy and apoptosis via TCRP1/Akt/mTOR axis inactivation in human hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Cancer Ther*, 2017, 16(12): 2711-2723.
- [10] Zeng H, Fu R, Yan L X, *et al.* Lycorine induces apoptosis of A549 cells via AMPK-mammalian target of rapamycin (mTOR)-S6K signaling pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 2035-2041.
- [11] Ji Y B, Yu M, Qi Z, *et al.* Study on apoptosis effect of human breast cancer cell MCF-7 induced by lycorine hydrochloride via death receptor pathway [J]. *Saudi Pharm J*, 2017, 25(4): 633-637.
- [12] Zhang P, Zhang M L, Yu D, *et al.* Lycorine inhibits melanoma cell migration and metastasis mainly through reducing intracellular levels of β -catenin and matrix metalloproteinase 9 [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 10566-10575.
- [13] Jiang Q Q, Liu W B. Lycorine inhibits melanoma A375 cell growth and metastasis through the inactivation of the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Med Sci*, 2018, 34: 33-38.
- [14] Wu S, Qiu Y L, Shao Y Y, *et al.* Lycorine displays potent antitumor efficacy in colon carcinoma by targeting STAT3 [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 881.
- [15] Roy M, Liang L, Xiao X J, *et al.* Lycorine: A prospective natural lead for anticancer drug discovery [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107: 615-624.
- [16] Liu W Y, Zhang Q, Tang Q, *et al.* Lycorine inhibits cell proliferation and migration by inhibiting ROCK1/cofilin-induced actin dynamics in HepG2 hepatoblastoma cells [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(4): 2298-2306.
- [17] Shen J, Zhang T, Cheng Z, *et al.* Lycorine inhibits glioblastoma multiforme growth through EGFR suppression [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 157.
- [18] Chen X, Long X H, Liao Y, *et al.* Lycorine inhibits the proliferation and promotes apoptosis of SGC-7901 gastric cancer cells by downregulating expression of cyclin D1 [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2018, 34(4): 354-358.
- [19] 辛国松, 季宇彬, 于淼, 等. 基于线粒体靶向机制的石蒜碱抗肝癌作用研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(5): 1132-1138.
- [20] Chen S, Fang X Q, Zhang J F, *et al.* Lycorine protects cartilage through suppressing the expression of matrix metalloproteinases in rat chondrocytes and in a mouse osteoarthritis model [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(4): 3389-3396.
- [21] Chen D Z, Cai J Y, Yin J L, *et al.* Lycorine-derived phenanthridine downregulators of host Hsc70 as potential hepatitis C virus inhibitors [J]. *Future Med Chem*, 2015, 7(5): 561-570.
- [22] Bendaif H, Melhaoui A, Ramdani M, *et al.* Antibacterial activity and virtual screening by molecular docking of lycorine from *Pancreaticum foetidum* Pom (Moroccan Endemic Amaryllidaceae) [J]. *Microb Pathog*, 2018, 115: 138-145.
- [23] Nair J J, van Staden J. Antiplasmodial lycorane alkaloid principles of the plant family Amaryllidaceae [J]. *Planta Med*, 2019, 85(8): 637-647.
- [24] Guo Y, Wang Y X, Cao L, *et al.* A conserved inhibitory mechanism of a lycorine derivative against Enterovirus and hepatitis C virus [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60(2): 913-924.
- [25] Wang P, Li L F, Wang Q Y, *et al.* Anti-dengue-virus activity and structure-activity relationship studies of lycorine derivatives [J]. *ChemMedChem*, 2014, 9(7): 1522-1533.
- [26] 张卫强, 刘克强, 裴迎新, 等. 胸腹腔镜联合 Ivor Lewis 食管癌根治术对食管癌患者肺功能、红细胞免疫及应激反应的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2021, 21(1): 66-69.
- [27] 黄振华, 邓向亮, 张凯敏, 等. 枸杞多糖对免疫抑制小鼠红细胞免疫功能的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2018, 34(2): 214-217.
- [28] Ge Y K, Zhang Z H. Effect of tumor red blood cell immunity and tumor cell cycle in mice bearing solid liver cancer with intelligent cancer Zhongning therapeutic apparatus [J]. *J Healthc Eng*, 2021, 2021: 3329800.

[责任编辑 李亚楠]