

# 龙须菜酸性多糖对 H22 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用

范艳丽<sup>1</sup>, 郑国强<sup>2</sup>, 刘安军<sup>2</sup>

(1. 宁夏大学农学院, 宁夏银川 750021) (2. 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

**摘要:** 本文主要研究龙须菜酸性多糖 (GLSPs) 对 H22 荷瘤小鼠的肿瘤抑制作用。通过流式细胞术检测 GLSPs 对小鼠体内肿瘤细胞的细胞凋亡和细胞周期的影响; MTT 法检测 GLSPs 对荷瘤小鼠脾淋巴细胞增殖能力和 NK 细胞杀伤活性的影响; 组织病理学方法检测 GLSPs 对荷瘤小鼠肿瘤和免疫器官 (脾脏、胸腺) 的影响。结果显示, GLSPs 能够促进荷瘤小鼠体内 H22 肝癌细胞凋亡, 显著抑制肿瘤生长。以 200 mg/(kg·d) 和 600 mg/(kg·d) GLSPs 灌胃管理荷瘤小鼠 28 d, 小鼠的平均体积抑制率分别为 84.65% 和 94.58%。免疫学试验显示, GLSPs 能够明显改善荷瘤小鼠脾脏肿大和胸腺萎缩的组织病变情况, 增强荷瘤小鼠免疫器官的免疫功能, 同时能够有效调节荷瘤小鼠白细胞和淋巴细胞的激增, 显著增强荷瘤小鼠由 ConA 和 LPS 诱导的 T、B 细胞的增殖能力, 提高脾 NK 细胞的杀伤活性, 多方面提高荷瘤小鼠机体的免疫水平, 提示 GLSPs 通过免疫调节作用达到体内抗肿瘤效果。

**关键词:** 龙须菜; 多糖; 抗肿瘤; 免疫调节

文章编号: 1673-9078(2014)9-7-12

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.09.002

## Anti-tumor Effect of an Acid Polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis* in H22-bearing Mice

FAN Yan-li<sup>1</sup>, ZHENG Guo-qiang<sup>2</sup>, LIU An-jun<sup>2</sup>

(1. School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

(2. College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** In this study, the inhibitory effect of an acid polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis* (GLSPs) on H22-bearing mice was investigated. The influence of GLSPs on the cell cycle and apoptosis of tumor cells *in vivo* was studied using flow cytometry. The effect of GLSPs on splenic lymphocyte proliferation and killing activity of NK cells in tumor-bearing mice were determined by MTT assay. The tissue pathological detection of the immune organs (spleen and thymus) in mice was performed. The results showed that apoptosis of H22 hepatoma cells in mice was promoted by GLSPs, and tumor growth was remarkably inhibited. Intragastric administration of GLSPs at 200 mg/(kg·d) and 600 mg/(kg·d) in tumor-bearing mice for 28 days resulted in an average inhibition rate of tumor volume of 84.65% and 94.58%, respectively. Immunological tests in tumor-bearing mice showed that pathological changes, including splenic enlargement and thymic atrophy, were significantly improved, and the function of the immune organs was reinforced. Moreover, the drastic increase of leukocytes and lymphocytes in the blood of tumor-bearing mice was effectively regulated, while the proliferation of T and B cells induced by ConA and LPS as well as the killing activity of NK cells were significantly improved. Thus, the immunity of tumor-bearing mice was enhanced through different mechanisms. These results indicate that GLSPs have anti-tumor effects *in vivo* via immunomodulation.

**Key words:** *Gracilaria lemaneiformis*; polysaccharides; anti-tumor; immunomodulation

海藻是一类海洋中数量和品种最多的低等植物, 主要分为褐藻、红藻、绿藻和蓝藻四大类。海藻的主要生物活性成分是多糖, 约占其干重的 50% 以上<sup>[1]</sup>。近年来, 研究者们从不同海藻中提取了大量活性多糖,

收稿日期: 2014-04-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31271975)

作者简介: 范艳丽 (1980-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品营养与功能性食品

通讯作者: 刘安军 (1963-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 生物资源开发与利用

经证实它们大多富含硫酸基, 为酸性杂多糖, 多具有高粘度或凝固能力, 且能够显著提高机体免疫水平, 抑制体内移植性肿瘤的生长, 达到很好的抗肿瘤效果<sup>[2-4]</sup>。研究认为, 只有少数多糖能够直接抑制肿瘤细胞, 改变其细胞膜的生化特性, 影响肿瘤细胞的信号传导, 抑制肿瘤细胞的核酸和蛋白质合成或对肿瘤细胞的超微结构产生影响。大多数多糖发挥抗肿瘤功能是通过作用于机体免疫系统, 增强宿主的特异性和非特异性免疫反应, 间接达到杀伤肿瘤细胞的目的<sup>[5-7]</sup>。

龙须菜 (*Gracilaria Lemaneiformis*) 是一种大型

天然或养殖海藻, 属红藻门 (Rhodophyta) 江蓠科 (*Gracilariaceae*) 江蓠属 (*Gracilaria*), 又名海发菜、线菜或江蓠, 在中国山东、辽宁、江苏、福建等地被大规模养殖。长期以来龙须菜主要被用作提取琼胶和琼脂糖的主要原料, 另有少部分用作鲍鱼养殖饲料和民间食用, 对其药用、保健功效开发不足。特别是龙须菜中的硫酸多糖, 在提取琼胶和琼脂糖的脱硫工艺中被废弃, 在过去的研究和开发中未被重视。然而研究表明, 硫酸多糖在抗凝血、抗氧化、抗肿瘤、抗病毒等多方面都显示出中性多糖所不及的生物活性, 是一部分十分宝贵的天然资源。本文通过分析龙须菜酸性多糖 (GLSPs) 对 H22 荷瘤小鼠的免疫器官 (脾脏和胸腺) 的组织形态、免疫细胞 (T 细胞、B 细胞和 NK 细胞) 的增殖和作用能力等免疫学指标的影响, 研究 GLSPs 的体内抗肿瘤活性, 为龙须菜的深加工利用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 试验动物及材料

本实验采用雌性 ICR 小鼠, 清洁级, 6~8 周, 体重  $20 \pm 2$  g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司 [许可证编号 SCXK (京) 2009-004]。饲养条件为: 基础饲料, 自由取食, 空气湿度  $50 \pm 5\%$ , 温度  $20 \sim 25$  °C。

龙须菜酸性多糖 (GLSPs) 为本实验提取产物, 简要提取过程是: 龙须菜原料用  $0.3$  M NaOH 溶液室温提取 3 次, 提取液用尼龙滤布过滤、收集,  $55$  °C 真空浓缩。上清液用  $1$  M HCl 调酸碱度至 pH=3, 离心去沉淀。上清液加 30% 终浓度乙醇进行多糖沉淀, 离心取沉淀, 无水乙醇反复洗涤。沉淀复溶于水, Sevag 法除蛋白, 经透析、浓缩、冷冻干燥得龙须菜酸性多糖 (GLSPs) [8]。

HyQ<sup>®</sup>改良型 RPMI1640 培养基, 购自 Hyclone 生物化学制品 (北京) 有限公司; 优级胎牛血清, 购自杭州四季青生物工程有限公司; 青霉素、链霉素、刀豆蛋白 A (ConA)、脂多糖 (LPS)、红细胞裂解液、二甲基亚砜 (DMSO)、四甲基偶氮唑蓝 (MTT)、瑞氏—吉姆萨染色液等, 均购自北京索莱宝 (Solarbio) 科技有限公司; 甲醛、二甲苯等其它试剂, 均为分析纯试剂。

#### 1.1.2 试验仪器

FACSCalibur 流式细胞仪和 Bio-Rad580 型酶标仪均, 购自美国 BD 公司; Nikon 70i 显微镜, 购自日本 Nikon 公司; MCO-20AIC 二氧化碳培养箱, 购自日本

SANYO 公司; RM 2015 组织切片仪, 购自德国 Leica 公司; B600B 型医用低速离心机和 B600 型低速自动平衡离心机, 购自河北白洋离心机厂; KD-P 摊片机和 KD-H 烘片机, 均购自浙江金华市科迪仪器设备有限公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 试验动物分组和饲养

40 只 ICR 小鼠平均分为 4 组。空白组和模型组每天灌胃生理盐水, GLSPs 低剂量组每天灌胃 GLSPs 水溶液  $200$  mg/(kg·d), GLSPs 高剂量组每天灌胃 GLSPs 水溶液  $600$  mg/kg·d。在灌胃第 14 d 时, 给模型组、GLSPs 低剂量组和 GLSPs 高剂量组小鼠于左前肢腋下接种 H22 肝癌细胞 ( $1 \times 10^7$  cells/mL,  $0.2$  mL), 并每天持续灌胃直至 4 周的实验期结束。

#### 1.2.2 肿瘤大小的测定

当接种肿瘤达可触或肉眼可见程度, 每天用游标卡尺测量并记录肿瘤长 (L) 和宽 (W) 的详细尺寸, 并计算肿瘤大小 (V) [9]。

$$V = \frac{LW^2}{2}$$

#### 1.2.3 流式细胞仪 (FCM) 检测肿瘤细胞周期

采用 FCM 测定实体瘤细胞周期。解剖取出模型组、GLSPs 低剂量组和 GLSPs 高剂量组小鼠腋下肿瘤, 手术剪破碎成小块。用 200 目的细胞筛, 加  $1 \sim 2$  mL PBS 顺时针研磨瘤块, 制备肿瘤细胞悬液。收集细胞悬液放于  $4$  °C 冰箱中保存, PBS 离心洗涤沉淀 3 次 ( $1000$  r/min,  $5$  min), 调整细胞浓度至  $1 \times 10^6$  cells/mL。取  $1$  mL 逐滴加入到  $3$  mL  $\sim 20$  °C 预冷的 70% 乙醇中, 于  $4$  °C 冰箱中固定大于  $18$  h。上机测定前, 同样离心去除乙醇, PBS 洗涤 3 次, 重悬。加  $1$  mg/mL RNase  $50$   $\mu$ L 消化  $30$  min, 加  $400$   $\mu$ g/mL PI 染液  $50$   $\mu$ L 避光染色  $30$  min 以上。过 200 目尼龙网后, 上机检测。结果用 Modifit 软件处理, 计算出各周期时相的细胞百分比。

#### 1.2.4 小鼠外周血白细胞瑞氏-吉姆萨 (Wright's-Giemsa) 染色观察

在洁净载玻片上滴加  $20$   $\mu$ L 肝素溶液 ( $0.2$  mg/mL), 小鼠眼球后静脉丛取血  $40$   $\mu$ L, 迅速与肝素钠充分混匀。置预温的湿盒中  $37$  °C 孵育  $15$  min, 室温放置  $15$  min, 制作血涂片。空气中挥干后, 用甲醇固定  $3$  min。滴加瑞氏染液  $3 \sim 5$  滴, 保留约  $1$  min。然后用吉姆萨染液  $5 \sim 10$  滴复染, 染色  $10$  min。流水冲洗, 自然晾干后于低倍镜下观察染色、数量和分布情况, 于血膜体尾交界处油镜观察  $100$  个视野, 观察细胞形态并计算白细胞和淋巴细胞个数。

### 1.2.5 脾淋巴细胞增殖试验

采用 MTT 法测定小鼠脾淋巴细胞的增殖能力<sup>[10]</sup>。将小鼠处死后无菌环境中取脾脏, 用 RPMI1640 完全培养基洗涤并研磨制成分散的细胞悬液。收集细胞液并移入离心管中, 轻轻吹散后使其自然沉降, 去除大块组织。将上层悬液吸出, 4 °C 低速离心 (1000 r/min, 5 min), 弃上清。加入预冷的红细胞裂解液 3 mL, 室温放置 3~5 min 后, 加 3 mL RPMI1640 完全培养基终止裂解。离心弃上清, 观察裂解效果, 需要的话可重复裂解 1~2 次。将细胞重悬于 3 mL RPMI1640 完全培养液中。经细胞计数和存活率测定后, 调整细胞浓度至  $1 \times 10^7$  cells/mL。

将上述制备好的脾细胞悬液加入到 96 孔培养板中, 100  $\mu$ L/well。实验孔加 100  $\mu$ L/well ConA (终浓度为 5  $\mu$ g/mL) 或 LPS (终浓度为 10  $\mu$ g/mL), 对照孔加 100  $\mu$ L/well RPMI1640 完全培养基, 均设 3 个复孔, 置 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37 °C 培养 44 h。之后离心弃上清, 加 5 mg/mL MTT 溶液 20  $\mu$ L/well, 继续培养 4 h, 离心弃上清。每孔加 DMSO 150  $\mu$ L, 溶解甲臞颗粒, 充分震荡后静置 20 min, 酶标仪 570 nm 处读数, 并计算刺激指数 (SI)。

$$\text{刺激指数 (SI)} = \frac{\text{实验孔吸光度}}{\text{对照孔吸光度}}$$

### 1.2.6 脾 NK 细胞活性的测定

将 1.2.5 中制备的脾细胞悬液沿离心管壁缓缓平铺于配好的 Percoll 分离液 (比重 1.077) 上, 离心 (2000 r/min, 20 min), 吸取第二层云雾状低密度细胞 (脾单个核细胞)。用 Hanks 液离心洗涤 3 次, RPMI1640 完全培养基将细胞数调至  $2 \times 10^6$  cells/mL; 同时将传代良好的 H22 小鼠肝癌细胞调整至  $1 \times 10^5$  cells/mL。于 96 孔板内, 实验孔加不同效靶比 (20:1 和 10:1) 的靶细胞 (H22 细胞) 和效应细胞 (脾单个核细胞) 各 100  $\mu$ L/well; 效应细胞对照孔加效应细胞和培养基各 100  $\mu$ L/well; 靶细胞对照孔加靶细胞和培养基各 100  $\mu$ L/well。然后加 5 mg/mL MTT 10  $\mu$ L/well, 置 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内 37 °C 培养 4 h。离心弃上清, 加 DMSO 150  $\mu$ L/well, 溶解结晶紫甲臞。充分震荡后静置 20 min, 用酶标仪于 570 nm 处测定吸光度。求出各组平均值, 以杀伤百分率表示 NK 细胞活性。

$$\text{杀伤百分率 (\%)} = \left[ 1 - \frac{\text{实验孔吸光度} - \text{效应孔吸光度}}{\text{靶细胞对照孔}} \right] \times 100$$

### 1.2.7 H&E 染色观察小鼠肿瘤和各免疫组织器官

组织取材后固定于 10% 甲醛固定液中, 常规方法脱水、透明、浸蜡并包埋。切片机切片 (4~5  $\mu$ m),

经展片、捞片和烘片后, 经 H&E 染色法染色于显微镜下观察组织和细胞形态。

### 1.2.8 数据统计

实验结果都以均数  $\pm$  标准偏差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示; 组间差异采用双侧 *t* 检验及方差分析进行统计分析。检验水平为  $p < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 龙须菜酸性多糖对 H22 荷瘤小鼠实体瘤

的影响

实验结果显示, GLSPs [200 mg/(kg·d) 和 600 mg/(kg·d)] 对 H22 荷瘤小鼠的实体瘤均具有明显的抑制作用, 且高剂量的抑制效果优于低剂量。各组小鼠接种 H22 肿瘤第 7 d 时, 模型组中部分小鼠首先出现可触实体瘤。第 9 d 时, GLSPs 剂量组中部分小鼠也陆续出现可触实体瘤, 此时用酒精棉球擦拭后, 游标卡尺可测。如图 1 所示, 随着接种天数的增加, 模型组小鼠从第 10 d 到第 11 d 肿瘤体积具有大幅度地上升, 而两个剂量组小鼠的肿瘤体积虽然也呈上升趋势, 但是增幅缓慢, 显示出 GLSPs 良好的抑制作用。特别是, 在低剂量组和高剂量组中各有 2 只小鼠体内始终没有实体瘤长出, 高剂量组还有 1 只小鼠在长出可触实体瘤后随着饲喂期的增长又出现肿瘤萎缩脱落的现象, 这也是导致剂量组小鼠肿瘤体积标准差较大的主要原因。实验期结束时, 两个剂量组的平均瘤体积较模型组具有显著性差异 ( $p < 0.05$ ), 体积抑瘤率分别为 84.65% 和 94.58%。

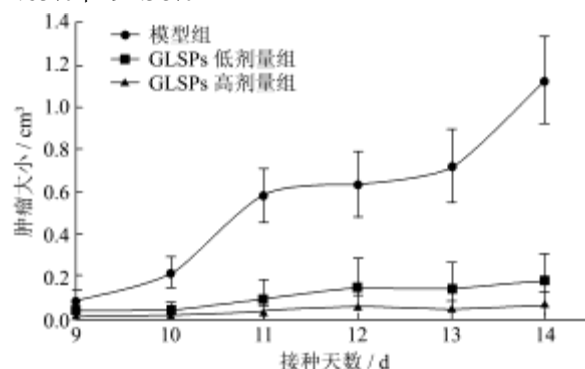


图 1 H22 荷瘤小鼠肿瘤大小变化曲线

Fig.1 Tumor size curves of H22-bearing mice

采用流式细胞仪 PI 染色法检测荷瘤小鼠的实体瘤细胞周期和凋亡率, 直方图见图 2, 分析结果见表 1。由结果可知, GLSPs 剂量组小鼠的实体瘤细胞出现不同程度的凋亡, 而且高剂量组小鼠的 G0/G1 期细胞较模型组多, S 期细胞较模型组少, G2/M 期细胞明显多

于模型组。表明经 GLSPs 作用后, 小鼠实体瘤的部分肿瘤细胞出现凋亡, 其余部分细胞被阻滞在 G0/G1 期不能顺利进入 S 期, 而部分 S 期细胞顺利进入 G2/M 期, 导致 G2/M 期细胞比例的显著增高。

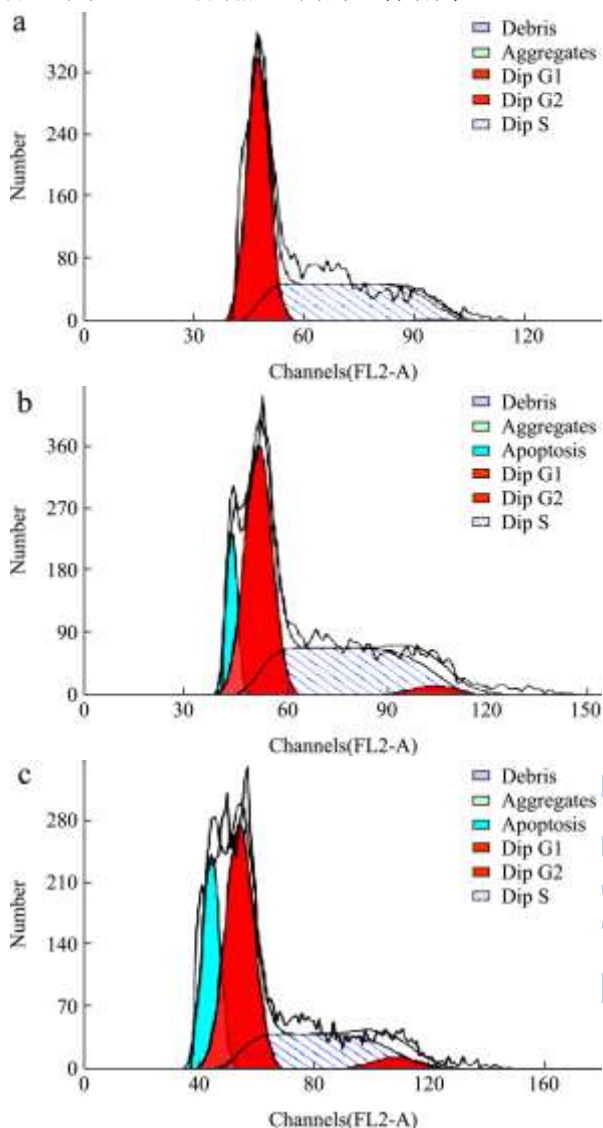


图 2 GLSPs 对 H22 肝癌细胞周期分布和凋亡率的影响

Fig.2 Effect of GLSPs on cell cycle and apoptosis ratio of H22 hepatoma cells

注: a: 模型组; b: GLSPs 低剂量组; c: GLSPs 高剂量组。

## 2.2 龙须菜酸性多糖对 H22 荷瘤小鼠白细胞的影响

白细胞计数是临床常用的检测指标, 能够精确地反映机体免疫系统的损伤程度<sup>[11]</sup>。对荷瘤小鼠外周血白细胞进行瑞氏-吉姆萨染色观察和计数。如图 3 和表 2 所示, 模型组小鼠的白细胞较空白组显著增多, 其中淋巴细胞(深染颗粒)也显著多于空白组。GLSPs

剂量组小鼠的白细胞较空白组也有所增多, 但是没有显著性差异。其中, 淋巴细胞较空白组也明显增多, 尤其是 GLSPs 高剂量组小鼠的淋巴细胞显著多于空白组 ( $p < 0.05$ )。但是, 与模型组相比, 经不同剂量的 GLSPs 作用后, 荷瘤小鼠白细胞的大幅增加得到显著改善 ( $p < 0.05$ ), 其淋巴细胞数量也显著降低 ( $p < 0.05$ )。

表 1 GLSPs 作用后 H22 肝癌细胞的周期分布和凋亡率

Table 1 Effect of GLSPs on cell cycle and apoptosis ratio of H22

| hepatoma cells |            |            |            |           |
|----------------|------------|------------|------------|-----------|
| 组别             | 凋亡率/%      | 细胞周期分布/%   |            |           |
|                |            | G0/G1      | S          | G2/M      |
| 模型组            | 0          | 49.15±6.20 | 50.05±6.04 | 0.82±0.54 |
| GLSPs 低剂量组     | 11.20±0.80 | 48.15±2.42 | 48.00±4.27 | 3.85±1.96 |
| GLSPs 高剂量组     | 19.09±4.02 | 53.58±5.14 | 39.47±5.31 | 6.95±1.12 |

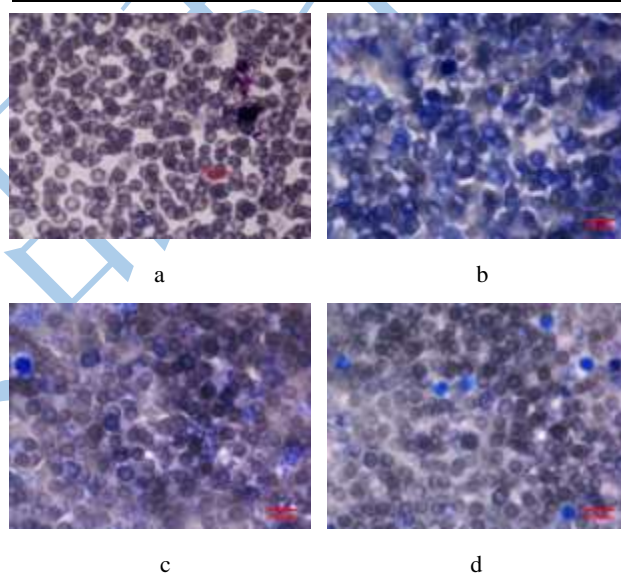


图 3 荷瘤小鼠白细胞瑞氏-吉姆萨染色观察 (×100)

Fig.3 Wright's-Giemsa dyeing observation of leucocytes in H22-bearing mice (Magnification: 100)

注: a: 空白组; b: 模型组; c: GLSPs 低剂量组 d: GLSPs 高剂量组。

表 2 荷瘤小鼠白细胞分类计数

Table 2 Leucocytes differential count of H22-bearing mice

| 组别         | 剂量/[mg/(kg·d)] | 白细胞总数/个             | 淋巴细胞总数/个            |
|------------|----------------|---------------------|---------------------|
| 空白组        | -              | 44±8                | 4±2                 |
| 模型组        | -              | 111±13 <sup>b</sup> | 41±9 <sup>b</sup>   |
| GLSPs 低剂量组 | 200            | 60±9 <sup>a</sup>   | 9±2 <sup>a</sup>    |
| GLSPs 高剂量组 | 600            | 58±10 <sup>a</sup>  | 14±3 <sup>a,b</sup> |

注: <sup>a</sup>与模型组比较,  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup>与空白组比较,  $p < 0.05$ 。

### 2.3 龙须菜酸性多糖对 H22 荷瘤小鼠脾淋巴

细胞增殖的影响

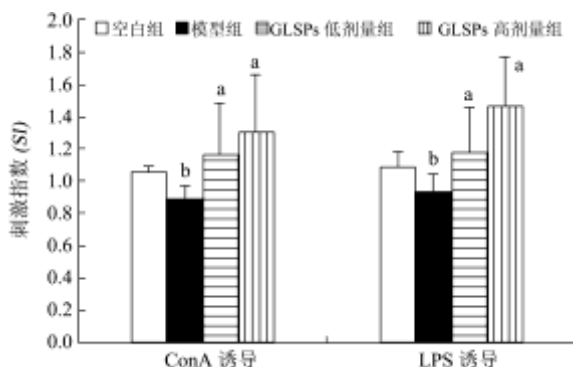


图 4 GLSPs 对荷瘤小鼠脾淋巴细胞增殖能力的影响

Fig.4 Effect of GLSPs on splenocyte proliferation in H22-bearing mice

注：a与模型组比较， $p<0.05$ ；b与空白组比较， $p<0.05$ 。

图 4 显示了 GLSPs 对 H22 荷瘤小鼠脾淋巴细胞增殖能力的影响。可以看出，模型组荷瘤小鼠经 ConA 和 LPS 诱导的脾淋巴细胞增殖能力都较空白组小鼠明显降低 ( $p<0.05$ )，平均刺激指数甚至低于 1，表明对丝裂原 ConA 和 LPS 的诱导基本没有反应，培养 48 h 后细胞密度反而因细胞的死亡等原因而降低。而 GLSPs 剂量组荷瘤小鼠 ConA 和 LPS 诱导的淋巴细胞增殖能力均显著高于模型组 ( $p<0.05$ )，甚至稍高于空白组，且呈剂量相关性。表明在 GLSPs 作用下，荷瘤小鼠脾淋巴细胞具有较高活性，能够对丝裂原 ConA 和 LPS 的诱导产生正效应。

### 2.4 龙须菜酸性多糖对 H22 荷瘤小鼠脾 NK 细

胞活性的影响

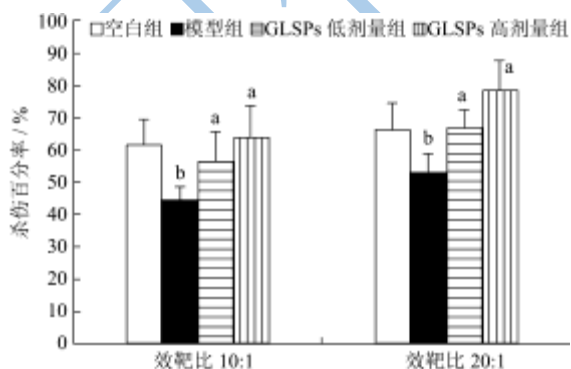


图 5 GLSPs 对荷瘤小鼠脾 NK 细胞活性的影响

Fig.5 Effect of GLSPs on NK cells activity of spleen in H22-bearing mice

注：a与模型组比较， $p<0.05$ ；b与空白组比较， $p<0.05$ 。

图 5 显示，模型组荷瘤小鼠的脾 NK 细胞杀伤能力较空白组小鼠显著降低 ( $p<0.05$ )，而 GLSPs 剂量组荷瘤小鼠的脾 NK 细胞的杀伤能力较模型组显著增高 ( $p<0.05$ )，接近甚至高于空白组小鼠，且呈浓度相关性。当提高效靶比至 20:1，各组小鼠的脾 NK 细胞杀伤能力均高于效靶比 10:1，且 GLSPs 高剂量组的增加幅度更为明显。表明 GLSPs 能够提高荷瘤小鼠脾 NK 细胞的活性，使其具有较高的杀伤和免疫反应能力。

### 2.5 H22 荷瘤小鼠的肿瘤和免疫器官的病理

学观察

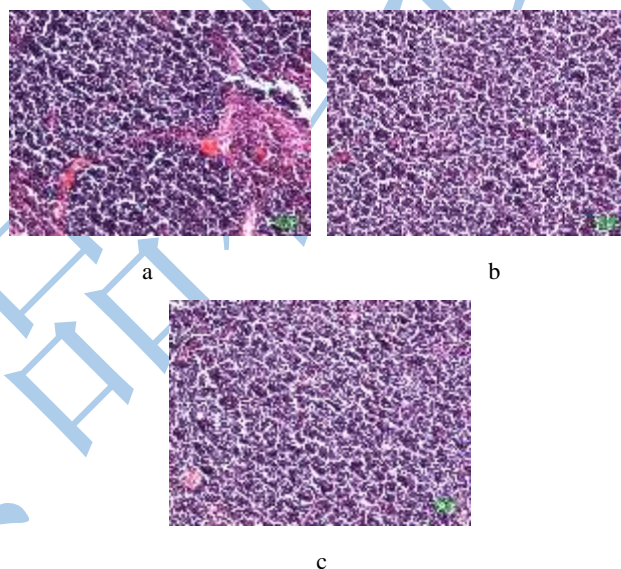


图 6 荷瘤小鼠肿瘤的组织病理学观察 (×20)

Fig.6 Histopathological observation of tumor in H22-bearing mice (Magnification: 20)

注：a：模型组；b：GLSPs 低剂量组；c：GLSPs 高剂量组。

图 6 显示的是各组小鼠肿瘤的 H&E 染色切片图。显微镜下观察可见，模型组小鼠肿瘤细胞生长密集，呈编织状平行排列，间质内存在丰富的新生毛细血管且呈裂隙状放射性分布；而 GLSPs 剂量组小鼠的肿瘤细胞较模型组稀疏，细胞形态基本正常，细胞间质内少见血管存在。尤其是高剂量组，细胞间质内未见明显的血管增生和扩张充血现象。

恶性肿瘤发生时，机体免疫器官会发生明显的变化。其中，脾脏常常出现肿大现象（厚度增加），而且肿大程度与肿瘤发展病程有关。解剖过程观察到，空白组小鼠的脾脏颜色较深，表面光滑，质地紧密；而模型组小鼠的脾脏颜色发红，表面粗糙，肿大明显，容易破裂；GLSPs 剂量组小鼠脾脏大多也伴有轻微肿

大, 颜色较浅的状态, 但明显优于模型组, 特别是有的高剂量组小鼠脾脏与空白组无显著差异。图 7 显示的是各组小鼠脾脏的 H&E 染色切片图。可以看到, 空白组小鼠的脾脏白髓(深染)和红髓(浅染)区域明显, 边界分明, 显示清晰的边缘区; 而模型组小鼠的脾脏组织质地疏松, 白髓比例明显增大, 未见明显的边缘区。GLSPs 低剂量组小鼠脾脏也出现白髓增多的现象, 但可见明显的边缘区; 高剂量组小鼠脾脏显示明显的白髓和红髓界限, 边缘区也清晰可见, 红、白髓比例较空白组无明显差异。

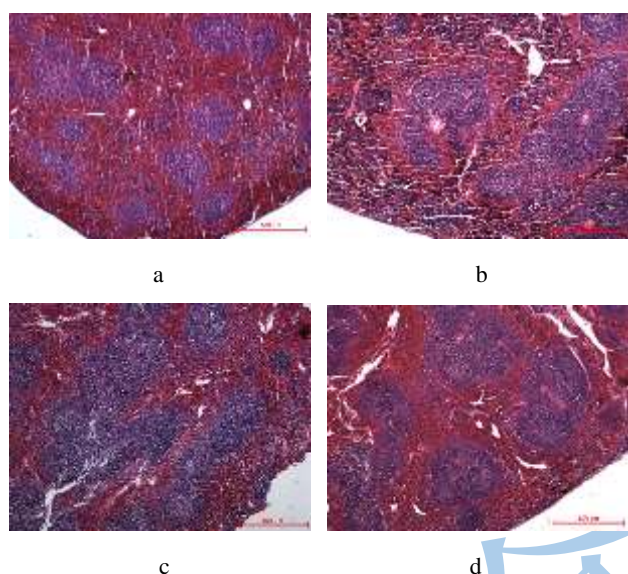


图 7 荷瘤小鼠脾脏的组织病理学观察 (×4)

Fig.7 Histopathological observation of spleen in H22-bearing mice (Magnification: 4)

注: a: 空白组; b: 模型组; c: GLSPs低剂量组; d: GLSPs高剂量组。

解剖观察, 模型组小鼠的胸腺均严重萎缩, 个别小鼠的胸腺小叶退化程度过高, 难以分辨; 而空白组小鼠胸腺较大, 颜色呈粉红色, 结构完整, 很容易从小鼠体内分辨剥离; GLSPs 剂量组小鼠胸腺也出现不同程度的萎缩, 但较模型组小鼠有明显改善, 尤其是高剂量组小鼠胸腺很多与空白组小鼠无显著差异。各组小鼠的胸腺组织形态观察(图 8)显示, 模型组小鼠胸腺小叶分化不明显, 皮质(深染)比例明显增加, 淋巴细胞密集, 髓质间相互连接, 没有清晰的界限。而 GLSPs 剂量组小鼠的胸腺小叶分化明显, 但髓质之间也出现轻微的浸染, 皮质比例有所增大, 但明显优于模型组。特别是 GLSPs 高剂量组小鼠的皮质和髓质比例与空白组无明显差异。

### 3 结论

GLSPs 能显著改善荷瘤小鼠脾脏和胸腺的组织病

变情况, 显示较好的红、白髓比例以及皮、髓质比例, 有效增强荷瘤小鼠脾脏和胸腺的免疫功能。GLSPs 能够促进肿瘤细胞凋亡, 有效调节荷瘤小鼠白细胞的激增, 显著增强荷瘤小鼠脾淋巴细胞的增殖能力, 提高脾 NK 细胞的杀伤活性, 增强荷瘤小鼠的免疫水平, 显著抑制小鼠体内 H22 实体瘤的生长, 具有较好的抗肿瘤活性。

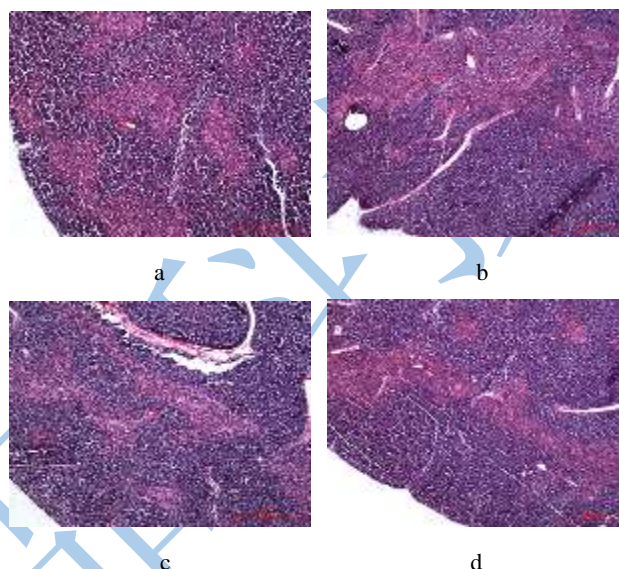


图 8 荷瘤小鼠胸腺的组织病理学观察 (×4)

Fig.8 Histopathological observation of thymus in H22-bearing mice (Magnification: 4)

注: a: 空白组; b: 模型组; c: GLSPs低剂量组; d: GLSPs高剂量组。

### 参考文献

- [1] 刘凤艳,钟红茂,范杰伟,等.海藻多糖药理研究新进展[J].广东药学,2005,15(3):81-84  
LIU Feng-yan, ZHONG Hong-mao, FAN Jie-wei. Research progress on the pharmacological effect of seaweed polysaccharides [J]. Guangdong Pharmacy, 2005, 15 (3): 81-84
- [2] Chen Xiaoming, Nie Wenjian, Yu Guoqing, et al. Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from *Sargassum fusiforme* [J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50 (3-4): 695-700
- [3] Zhou Gefei, Sheng Wenxu, Yao Wenhong, et al. Effect of low molecular  $\lambda$ -carrageenan from *Chondrus ocellatus* on antitumor H22 activity of 5-Fu [J]. Pharmacological Research, 2006, 53 (2): 129-134
- [4] 刘慧燕,赵广才,赵谋明.江蓠硫酸酯多糖的体外抗肿瘤和免

- 疫活性研究[J].现代食品科技,2006,23(1):28-30
- LIU Hui-yan, ZHAO Guang-cai, ZHAO Mou-ming. Study on anti-tumor activity and immunomodulating effects of sulfated polysaccharides from *Gracilaria tenuistipitata in vitro* [J]. Modern Food Science and Technology, 2006, 23 (1): 28-30
- [5] 陈健,向莹.滑子菇多糖的免疫活性及抗肿瘤作用[J].现代食品科技,2013,29(8):1800-1804
- CHEN Jian, XIANG Ying. Immunological and antitumor activities of the polysaccharides from *Pholiota nameko* [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29 (8): 1800-1804
- [6] Marcel Tutor Ale, Hiroko Manyama, Hidekazu Tamauchi, et al. Fucoidan from *Sargassum* sp. and *Fucus vesiculosus* reduces cell viability of lung carcinoma and melanoma cells *in vitro* and activates natural killer cells in mice *in vivo* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 49 (1): 331-336
- [7] Amira M. Gamal-Eldeen, Eman F. Ahmed, Mona A. Abo-Zeid. In vitro cancer chemopreventive properties of polysaccharide extract from the brown alga, *Sargassum latifolium* [J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47 (6): 1378-1384
- [8] Fan Yanli, WANG Wenhong, SONG Wei, et al. Partial characterization and anti-tumor activity of an acidic polysaccharides from *Gracilaria Lemaneiformis* [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 88: 1313-1318
- [9] Huang H, Cieh S, Tso T K, et al. Orally administered mycelial culture of *Phellinus linteus* exhibits antitumor effects in hepatoma cell bearing mice [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 133: 460-466
- [10] 培欣,梅余霞,梁运祥.一种虫草多糖的体外免疫学活性[J].食品科技,2013,38(9):25-28
- PEI Xin, MEI Yu-zhen, LIANG Yun-xiang. Immunological activity of a purified polysaccharide from *Cordyceps sinensis in vitro* [J]. Food Science and Technology, 2013, 38(9): 25-28
- [11] Cao Li, Liu Xiuzhen, Qian Tianxiu, et al. Antitumor and immunomodulatory activity of arabinoxylans: A major constituent of wheat bran [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 48: 160-164

