

麒麟菜多糖体内抗肿瘤机理研究

于娟, 纪海玉, 王玉芳, 贾贺威, 刘安军

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 本文对麒麟菜多糖抑制小鼠体内 H22 肝癌细胞增殖的作用机理进行了研究。构建动物肿瘤模型, 观察实验期内各组小鼠肿瘤体积及脏器指数的变化, 并通过 Elisa 实验确定各组小鼠血清中肿瘤特异性抗体含量, 流式细胞术检测小鼠胸腺、脾脏、外周血及实体肿瘤内 T 细胞亚群比例, HE 染色和 PI 单染分析小鼠实体肿瘤内细胞状态。结果表明, 灌喂 600 mg/(kg·d)麒麟菜多糖可显著抑制荷瘤小鼠肿瘤的生长, 有效保护其胸腺和脾脏, 并可显著增强胸腺发育分化 CD4⁺ T 细胞的能力($p<0.05$), 提高小鼠血液中肿瘤特异性抗体的含量($p<0.05$)和 T 细胞亚群比例($p<0.05$); 模型组和多糖组小鼠实体肿瘤浸润淋巴细胞中均主要是 CD8⁺ T 细胞, 但多糖组小鼠实体瘤内细胞凋亡率显著升高($p<0.05$)。因此初步断定麒麟菜多糖可显著提高荷瘤小鼠的抗肿瘤免疫水平, 使 CD8⁺ T 细胞在 CD4⁺ T 细胞和肿瘤特异性抗体的辅助下有效抑制 H22 细胞体内增殖。

关键词: 麒麟菜多糖; 抗肿瘤; 肿瘤特异性抗体; T 细胞

文章编号: 1673-9078(2017)5-14-19

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.5.003

Study of the Antitumor Mechanism of *Eucheuma* Polysaccharides *In vivo*

YU Juan, JI Hai-yu, WANG Yu-fang, JIA He-wei, LIU An-jun

(Department of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The mechanism of the inhibitory effect of *Eucheuma* polysaccharides on the proliferation of H22 hepatocellular carcinoma cells (H22) in mice was investigated *in vivo*. An animal tumor model was established and changes in tumor size and organ indices of the mice in all groups were observed during the experiments. The content of tumor-specific antibodies in serum were measured via ELISA assay. Meanwhile, the proportions of T-cell subsets in thymus, spleen, peripheral blood, and solid tumors were detected by flow cytometry, and the cell cycle status of solid tumor cells was analyzed by hematoxylin-eosin staining and propidium iodide single staining. The results showed that administration of 600 mg/(kg·d) *Eucheuma* polysaccharides could significantly inhibit tumor growth, effectively protect the thymus and spleen, significantly enhance the development of CD4⁺ T cells in the thymus ($p<0.05$), and significantly increase the content of tumor-specific antibodies in serum ($p<0.05$) and the proportion of T cell subsets in blood ($p<0.05$). In addition, the tumor-infiltrating lymphocytes in both the polysaccharide and model groups were mainly CD8⁺ T cells. However, the apoptosis rate of solid tumor cells in the polysaccharide group was significantly increased ($p<0.05$) compared to that of the model group. It was preliminarily concluded that *Eucheuma* polysaccharides could improve the antitumor effect significantly in tumor-bearing mice and allow CD8⁺ T cells to effectively inhibit the proliferation of H22 cells with the help of CD4⁺ T cells and tumor-specific antibodies.

Key words: polysaccharides from *Eucheuma*; antitumor; tumor-specific antibody; T cells

癌症属于恶性肿瘤, 其治愈困难, 致死率高, 一般癌症治疗的主要手段是化疗, 但在许多情况下会产生严重的副作用。近年来, 许多研究集中在多糖及其衍生物的结构和生物活性上, 尤其是多糖的硫酸化衍生物、含磷酸盐衍生物和羧甲基化衍生物^[1-3]。研究表明, 从海藻、蘑菇、酵母和地衣等物质中提取的许

收稿日期: 2016-06-27

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31271975)

作者简介: 于娟 (1990-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 功能性食品

通讯作者: 刘安军 (1963-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事天然产物提取与作用机理研究

多种类多糖和多糖-蛋白复合物, 展现出了各种各样的生物活性, 尤其是在抗肿瘤和免疫调节方面, 不仅对机体没有副作用, 还帮助机体适应环境和生物压力^[4]。大多数海藻多糖在体外与肿瘤细胞培养时不会抑制肿瘤细胞增殖, 但是在体内却显现出很好的疗效^[5]。现代药理学研究表明, 麒麟菜多糖作为一类带有硫酸化羟基的硫酸多糖, 其在抗肿瘤、抗病毒及抗氧化等各方面显示出许多中性多糖所不及的生物活性^[6-8]。近年来, 国内外对麒麟菜的利用也逐渐扩展到制备具有生物活性的麒麟菜多糖上。

机体的免疫系统主要包括体液免疫和细胞免疫两

大类。T 细胞作为机体内重要的免疫活性细胞之一，在细胞免疫中发挥着重要的作用。研究发现，T 细胞具有多种生物学功能，如直接杀伤靶细胞，辅助或抑制 B 细胞产生抗体，以及对特异性抗原和促有丝分裂原的应答反应等，其演化过程与抗肿瘤密切相关^[9,10]。同样，B 细胞在机体的免疫系统中主要执行体液免疫，在肿瘤抗原的刺激下可分化成浆细胞，进而合成和分泌抗体，同细胞免疫一起共同发挥免疫监视、防御和调控的作用^[11]，机体的抗体水平可以反应其免疫能力。

为了提高麒麟菜中酸性多糖的得率及抗肿瘤活性，本实验室改变了热水浸提的传统提取工艺，采用常温稀碱浸提法提取麒麟菜酸性多糖，并通过灌胃给药的方式，发现该法提取的麒麟菜酸性多糖具有良好的体内抗肿瘤活性^[12]，但关于其抑制肿瘤作用的机理以及肿瘤细胞体内凋亡的现象报道较少。因此，本文以常温稀碱浸提法提取的麒麟菜酸性多糖为原料，构建肿瘤动物模型，从 T 细胞亚群以及抗体水平的角度进一步探讨了麒麟菜多糖体内对 H22 肝癌细胞的抑制作用机理，旨在为肿瘤的免疫疗法提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 实验材料

麒麟菜多糖，来源于天津科技大学食品工程与生物技术学院功能性食品实验室^[12]。

麒麟菜多糖的理化特性研究：本文分别利用苯酚硫酸法、考马斯亮蓝 G-250 法、硫酸-咔唑法以及明胶-氯化钡法对麒麟菜多糖的总糖、蛋白质、糖醛酸及硫酸基含量进行了测定。结果表明，麒麟菜多糖的总糖含量为 48.91%，蛋白质含量极低，仅为 1.67%，而醛酸和硫酸基含量分别为 5.90% 和 10.85%，这与本课题组做的麒麟菜多糖红外光谱图结果一致^[13]。除此之外，本课题组通过气相色谱(GC)分析得出麒麟菜多糖的单糖组成为葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖和木糖（摩尔比为 1.56:1.00:0.53:0.95）。

1.1.2 实验动物

雌性昆明小鼠 30 只(SPF 级)，鼠龄 8 周，体重 18~22 g，购自中国食品药品检定研究院[实验动物生产许可证号：SCXK(京)2009-0017]。

1.1.3 主要药品与试剂

肝素钠、苏木精、伊红，美国 sigma 公司；Anti-CD4⁺-PE 抗体、Anti-CD8⁺-FITC 抗体，天津三箭生物技术有限公司；红细胞裂解液、多聚甲醛，北京

索来宝科技有限公司；其他试剂为国产分析纯，天津江天试剂有限公司。

1.1.4 仪器与设备

Nikon 激光共聚焦显微镜，尼康仪器（上海）有限公司；BD 流式细胞仪，碧迪医疗器械（上海）有限公司；B600B 医用低速离心机，河北白洋离心机厂；TG328A 分析天平，上海天平仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 实验动物模型的建立及生理指标的采集

本研究室已证实，麒麟菜多糖在体内具有良好的抗肿瘤活性，且当灌胃剂量达 600 mg/(kg·d) 时，本多糖展现出更强的抗肿瘤生物活性，因此，在后续实验中多糖的灌胃剂量选为 600 mg/(kg·d)^[12]。

将 30 只雌性昆明小鼠饲养 2 周后，随机分为空白组、模型组和多糖组，共 3 组，每组 10 只。多糖组每天灌胃麒麟菜多糖水溶液[600 mg/(kg·d)]，空白组和模型组每天灌胃同体积的生理盐水，在灌胃两周后，给模型组、多糖组小鼠于右前肢腋下接种 H22 肝癌细胞 (1×10^7 cells/mL, 0.2 mL)，并继续灌胃 3 周。实验期内，当实体肿瘤达肉眼可见程度时，每两天用游标卡尺测量并记录肿瘤长(Length, L)和宽(Wide, W)，以公式 (1) 计算肿瘤体积(Volume, V)。

$$V = \frac{LW^2}{2} \quad (1)$$

实验期结束后，对所有小鼠断粮 12 h，称取小鼠体重并记录，采用眼眶取血收集血液样品于 Eppendorf 管中，断颈处死，迅速解剖取出胸腺和脾脏，称其湿重，按以下公式计算脏器指数：

$$\text{胸腺指数} = \frac{\text{胸腺重 (mg)}}{\text{体重 (g)}} \quad (2)$$

$$\text{脾脏指数} = \frac{\text{脾脏重 (mg)}}{\text{体重 (g)}} \quad (3)$$

1.2.2 ELISA 法检测小鼠血清 IgG 抗体含量

本实验中用小鼠 H22 肝癌细胞作为包被抗原，将不同组小鼠的血清中的 IgG 作为一抗，用山羊抗小鼠 IgG-HRP 作为酶标二抗，与底物作用出现颜色反应，在抗原过量的情况下，则其在 495 nm 波长下的读数大小与血清中抗体的量成正比。

1.2.3 流式细胞术检测各组小鼠不同部位 T 淋巴细胞亚群比例

分别制备胸腺、脾脏、外周血及实体瘤淋巴细胞悬液，用 PBS 冲洗并调密度至 1×10^7 cells/mL，均用 PE-CD4⁺ 和 FITC-CD8⁺ 抗体避光孵育 30 min，PBS 缓冲液洗涤(1000 r/min, 5 min)2 次，最后重悬于 0.5 mL

PBS 缓冲液中, 过 300 目尼龙网, 并通过流式细胞术 (FCM) 分别测定胸腺、脾脏、外周血及实体瘤内的 T 淋巴细胞亚群水平。

1.2.4 HE 染色观察各组小鼠肿瘤内细胞形态

实验期结束, 解剖取出荷瘤小鼠实体肿瘤, 用手术剪剪到合适大小, 200 目细胞筛上轻轻研磨, 并用 PBS 缓冲液调密度至 1×10^7 cells/mL, 滴 10 μ L 到载玻片上, 3.7% 甲醛溶液固定后进行 HE 染色, 激光共聚焦显微镜下观察肿瘤内细胞形态。

1.2.5 流式细胞术检测荷瘤小鼠实体瘤细胞周期

取上述制备的肿瘤细胞研磨液 100 μ L 到试管中,

表 1 多糖对荷瘤小鼠肿瘤体积的影响

Table 1 Effects of polysaccharides on tumor volume in H22-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

实验组别	接种 H ₂₂ 肝癌细胞后小鼠肿瘤体积/(cm ³)					
	7 d	9 d	11 d	13 d	15 d	17 d
模型组	0.01±0.01	0.04±0.03	0.09±0.08	0.15±0.09	0.38±0.16	0.57±0.17
多糖组	0.01±0.01	0.02±0.01	0.04±0.04	0.03±0.03 [#]	0.07±0.08 [#]	0.12±0.15 [#]

注: [#]与模型组比较 $p < 0.05$ 。

各实验组荷瘤小鼠肿瘤体积的统计结果如表 1 所示。接种 H22 肝癌细胞后第 7 d, 多糖组和模型组小鼠均出现可触实体瘤, 且随接种天数的增加, 两组小鼠的肿瘤均有所增加。然而, 接种 13 d 以后, 模型组小鼠肿瘤迅速增大, 到第 17 d, 肿瘤体积 (cm³) 达 0.57±0.17; 而多糖组小鼠肿瘤体积较模型组显著降低 ($p < 0.05$), 到第 17 d 肿瘤体积 (cm³) 仅为 0.12±0.15。然而, 由于各小鼠之间存在个体差异, 且多糖不能激活所有小鼠抗肿瘤免疫, 导致免疫未被激活的小鼠肿瘤体积相对较大, 大部分小鼠肿瘤较小或消退无法检出, 因而多糖组小鼠肿瘤大小的标准差较大。但相对于模型组, 可以看出麒麟菜多糖可显著提高荷瘤小鼠的抗肿瘤免疫水平。

2.2 多糖对各组小鼠的脏器指数的影响

表 2 多糖对各组小鼠脏器指数的影响

Table 2 Effects of polysaccharides on visceral indices in H22-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

实验组别	脾脏指数/(mg/g)	胸腺指数/(mg/g)
空白组	4.00±0.42	1.79±0.86
模型组	5.60±1.75*	1.08±0.16*
多糖组	4.24±0.31 [#]	1.39±0.31 [#]

注: *与空白组比较 $p < 0.05$, [#]与模型组比较 $p < 0.05$ 。

各实验组小鼠的脾脏指数和胸腺指数统计结果如表 2 所示。随着肿瘤在体内的无限增殖, 模型组小鼠的脾脏指数和胸腺指数 (mg/g) 分别为 5.60±1.75 和

用预冷的 70% 乙醇固定过夜, 洗涤 (1000 r/min, 5 min) 两次除去乙醇, 重悬于 0.5 mL PBS 缓冲液中, 加 50 μ L RNase (1 mg/mL) 消化 30 min, 加 50 μ L PI (0.5 mg/mL), 室温避光孵育 30 min, 过 300 目尼龙网, 上机检测。

1.2.6 数据分析

实验数据以平均数±标准偏差表示, 各实验组间的差异比较采用 SPSS 软件进行统计分析, 检验水平 $p < 0.05$ 时为差异显著, 具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 各组小鼠肿瘤体积的变化

1.08±0.16, 与空白组相比出现了明显的脾脏肿大 ($p < 0.05$) 和胸腺萎缩 ($p < 0.05$) 现象, 说明肿瘤的恶性增殖使小鼠的免疫器官受到损害, 严重影响了小鼠的血液过滤、体液免疫、和 T 细胞分化的功能, 使小鼠综合免疫力降低; 多糖组小鼠的脾脏指数与胸腺指数 (mg/g) 分别为 4.24±0.31 和 1.39±0.31, 与模型组相比均存在显著性差异 ($p < 0.05$), 且更接近空白组, 说明麒麟菜多糖能在一定程度上抑制肿瘤生长, 维持荷瘤小鼠生理指标的的稳定, 保护小鼠的免疫器官不受损伤, 维持免疫器官的正常功能, 降低了肿瘤对机体的危害。

2.3 各组小鼠血清 IgG 特异性抗体及其含量的检测

的检测

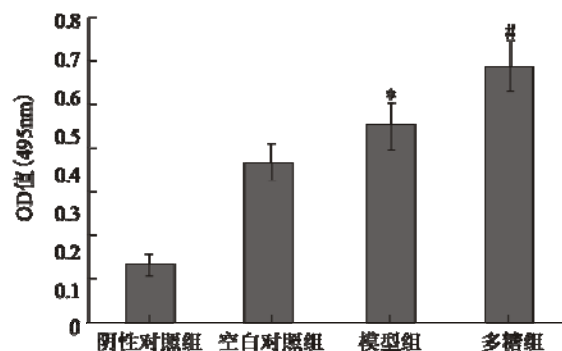


图 1 各组小鼠血清抗体含量检测结果

Fig.1 Mouse serum antibody levels in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

注: *与空白组比较 $p < 0.05$, [#]与模型组比较 $p < 0.05$ 。

B 细胞能够合成并分泌抗体, 参与机体的体液免疫, 为了证实小鼠体内肿瘤与体液免疫的相互影响以及灌胃多糖后小鼠体液免疫能力是否有所提升, 采用 Elisa 法检测血清中可与肿瘤细胞特异性结合的 IgG 抗体含量, 统计结果如图 1 所示。各组小鼠肿瘤特异性 IgG 抗体均显著高于阴性对照组, 模型组小鼠血清中 IgG 抗体含量达 0.52 ± 0.06 , 较空白组显著增多 ($p < 0.05$); 而多糖组小鼠血清中 IgG 抗体含量为 0.67 ± 0.09 , 较模型组显著提高 ($p < 0.05$), 表明空白组小鼠体内可产生少量肿瘤特异性抗体, 模型组小鼠由于大量肿瘤细胞的刺激, 促使机体产生较空白组更多的抗体, 而麒麟菜多糖可引起小鼠机体特异性体液免疫应答, 从而生成大量的特异性抗体, 在机体抗肿瘤免疫应答过程中发挥重要的作用。

2.4 各组小鼠不同部位 T 淋巴细胞亚群检测

CD4 分子主要表达于辅助 T 细胞表面, 这类细胞主要行使辅助识别的功能; CD8 分子主要表达于细胞毒 T 细胞表面, 行使直接杀伤靶细胞的功能。流式细胞术检测小鼠外周血、脾脏及胸腺 T 细胞亚群结果如图 2 所示。

胸腺中细胞主要为 $CD4^+CD8^+$ 双染的不成熟 T 细胞和 $CD4^+CD8^-$ T 细胞。如图 2a 所示, 模型组小鼠胸腺中 $CD8^+$ T 细胞比例 (%) 为 3.72 ± 1.02 , 显著高于空白组 ($p < 0.05$), 而 $CD4^+$ T 细胞比例 (%) 为 22.15 ± 1.59 , 与空白组无显著差异; 多糖组小鼠胸腺中 $CD4^+$ T 细胞比例 (%) 达 29.13 ± 5.06 , 显著高于模型组 ($p < 0.05$), 说明灌胃麒麟菜多糖后, 小鼠胸腺细胞分化成为 $CD4^+$ T 细胞的数量增多, 对肿瘤细胞表面特异抗原的识别能力增强, 可有效激活 $CD8^+$ T 细胞攻击肿瘤细胞, 控制体内肿瘤细胞的增殖。

脾脏是人体最大的外周免疫器官之一, 其中的 T 细胞占机体 T 细胞总数的 25% 左右, 能直接参与细胞免疫, 与抗肿瘤活性强弱也有重要的关系。如图 2b 所示。模型组小鼠由于肿瘤的恶性增殖, 脾脏的功能受损, $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞的比例 (%) 分别为 17.67 ± 2.71 和 4.42 ± 0.96 , 二者较空白组均显著降低 ($p < 0.05$); 灌胃麒麟菜多糖后, 小鼠体内 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞的比例 (%) 分别达 29.00 ± 4.19 和 8.51 ± 0.77 , 较模型组显著升高 ($p < 0.05$), $CD8^+$ T 细胞的比例甚至高于空白组小鼠 (图 2c), 因而能有效抑制肿瘤细胞增殖, 保护脾脏功能, 具有提高机体体液免疫功能的效果。

血液中 T 细胞约占淋巴细胞总数的 75%, 能参与抗肿瘤和抗感染等机体免疫活动。如图 2c 所示, 模型

组小鼠外周血中 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞的比例 (%) 分别为 45.91 ± 6.64 和 12.71 ± 3.04 , 二者较空白组均显著降低 ($p < 0.05$); 多糖组小鼠 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞的比例 (%) 分别为 57.45 ± 1.71 和 23.84 ± 3.91 , 较模型组均显著升高 ($p < 0.05$), 说明麒麟菜多糖体内能刺激小鼠增殖分化出大量的 T 细胞进入血液, 并增强机体 T 细胞清除肿瘤细胞的能力, 有效抑制体内肿瘤细胞的恶性增殖。

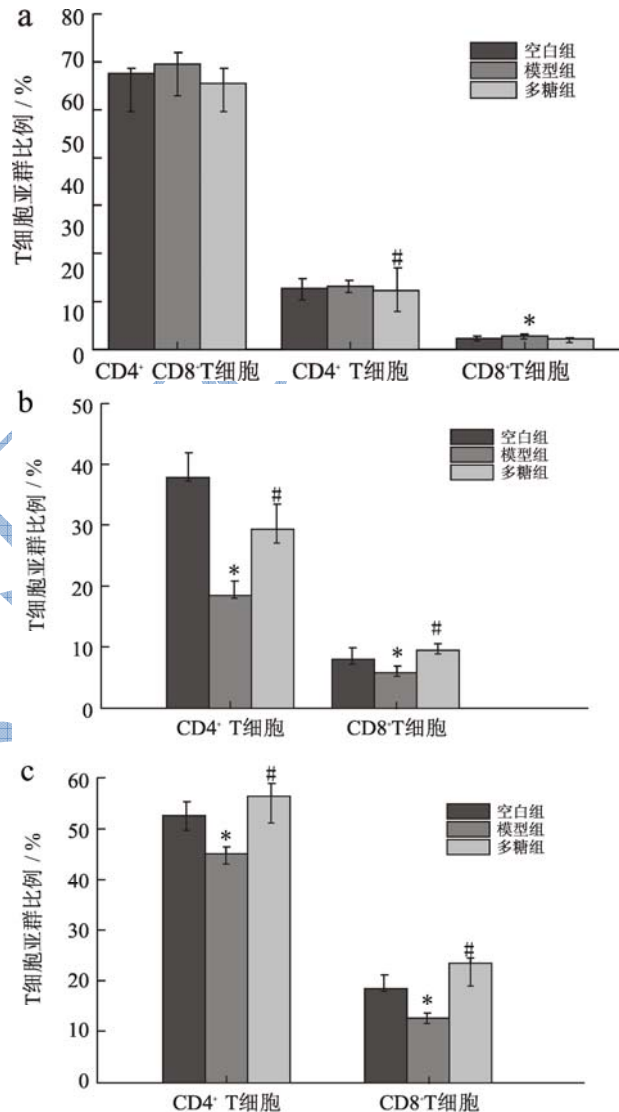


图 2 外周血 T 淋巴细胞亚群分布

Fig.2 Distribution of T lymphocyte subsets in thymus (a), spleen (b), and peripheral blood (c) ($\bar{x} \pm s, n=10$)

注: *与空白组比较 $p < 0.05$, #与模型组比较 $p < 0.05$ 。

2.5 荷瘤小鼠实体肿瘤内 T 淋巴细胞亚群检测

荷瘤小鼠实体肿瘤内有淋巴细胞浸润, 这是机体正常的免疫反应。流式细胞仪检测荷瘤小鼠实体肿瘤

内 T 细胞亚群比例, 结果如表 3 所示。在荷瘤小鼠实体肿瘤内的 T 细胞主要是 CD8⁺ T 细胞, 只含有少量的 CD4⁺ T 细胞, 且两个实验组之间 T 细胞亚群比例无显著差异, 模型组小鼠肿瘤细胞生长不被抑制, 说明 CD8⁺ T 细胞具有直接攻击肿瘤细胞的能力, 但单一的 CD8⁺ T 细胞不能特异性识别肿瘤细胞表面抗原, 可能需要肿瘤特异性抗体和体内 CD4⁺ T 细胞行使辅助识别的功能。

表 3 实体肿瘤内 T 细胞亚群分布

Table 3 Distribution of T-cell subsets in solid tumors

实验组别	CD4 ⁺ T 细胞/%	CD8 ⁺ T 细胞/%
模型组	5.38±2.10	81.32±1.87
多糖组	4.24±0.43	81.39±2.84

2.6 HE 染色观察各组小鼠实体肿瘤内细胞形态

正常情况下肿瘤细胞和 T 细胞的细胞核在细胞中所占比例都较大, HE 染色法可将实体瘤内细胞的细胞核染成蓝紫色, 细胞浆、结缔组织等的不同成分被染成深浅不同的红色, 从而分辨出病变的组织或细胞。由图 3 可以看出, 模型组小鼠的肿瘤内细胞生长状态

良好, T 细胞(体积较小)和肿瘤细胞(体积较大)在肿瘤内互不影响, 涂片背景较为整洁, 无蛋白类细胞分泌物; 多糖组小鼠实体肿瘤内细胞形态异常, 出现细胞核裂解现象, 且分泌大量凋亡蛋白类物质, 涂片背景有较多的蛋白粘连物。说明灌胃麒麟菜多糖后小鼠 T 细胞活性增强, 能有效识别并攻击肿瘤细胞, 使肿瘤细胞出现凋亡现象。图中可以看出, 体积较小的 T 细胞也出现凋亡现象, 说明其攻击靶细胞过程中自身也会发生凋亡现象。

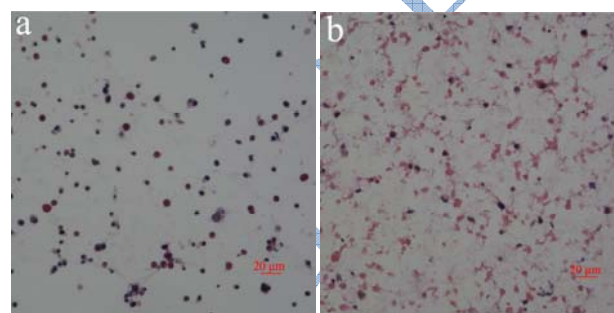


图 3 实体肿瘤内细胞 HE 染色结果

Fig.3 HE staining of solid tumor cells

注: a. 模型组; b. 多糖组。

2.7 荷瘤小鼠实体瘤细胞周期检测

表 4 麒麟菜多糖对荷瘤小鼠实体瘤细胞周期和凋亡率影响

Table 4 Effects of *Eucheuma* polysaccharides on the cell cycle and apoptosis rate of solid tumor cells

实验组别	G0/G1/%	S/%	G2/M/%	Apoptosis/%
模型组	25.42±2.67	58.59±4.19	15.99±6.12	1.70±1.57
多糖组	39.11±3.33 [#]	46.98±6.01 [#]	13.91±3.82	12.24±4.04 [#]

注: [#]与模型组比较 $p < 0.05$ 。

采用 PI 染色法检测荷瘤小鼠的实体瘤细胞周期和凋亡率, DNA 含量分析结果如表 4 所示。由结果可知, 各组小鼠的实体瘤内细胞出现不同程度的凋亡, 多糖组小鼠实体肿瘤内细胞凋亡率(12.24%)较模型组小鼠(1.70%)显著升高($p < 0.05$), 其中部分细胞被阻滞在 G0/G1 期不能顺利进入 S 期, 而部分 S 期细胞能顺利进入 G2/M 期, 导致多糖组小鼠实体瘤内细胞处于 G0/G1 期的比例(39.11%)显著增高($p < 0.05$), 处于 S 期的细胞比例(46.98%)显著降低($p < 0.05$), 而处于 G2/M 期的细胞比例(13.91%)与模型组无显著差异。说明多糖组小鼠机体 T 细胞能特异性识别并攻击肿瘤细胞, 将肿瘤细胞抑制在 G0/G1 期, 并诱导肿瘤细胞发生凋亡, 从而控制体内肿瘤细胞的恶性增殖。

3 结论

3.1 已有报道, 具有良好水溶性和适宜分子量的多糖

显现出较强的抗肿瘤活性。近年来, 许多研究集中在多糖及其衍生物的结构和生物活性上, 尤其是多糖的硫酸化衍生物和含磷酸盐衍生物^[1]。本实验提取的麒麟菜多糖分子属于海藻硫酸多糖, 其总糖含量为 48.91%, 蛋白质含量仅为 1.67%, 而醛酸和硫酸基含量分别为 5.90%和 10.85%, 单糖组成为葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖和木糖(摩尔比为 1.56:1.00:0.53:0.95), 经研究发现该多糖体内具有良好的抗肿瘤活性, 在灌胃剂量为 600 mg/(kg·d)时, 可有效抑制体内肿瘤细胞增殖, 保护荷瘤小鼠的胸腺和脾脏不受损伤, 维持免疫器官的正常功能。

3.2 B 细胞介导体液免疫, 主要通过分泌抗体实现免疫应答, 抗体可使异物凝集便于被白细胞吞噬或结合抗原以刺激 K 淋巴细胞攻击靶细胞, B 细胞还可以分泌细胞因子进行免疫调控^[2]。本文利用 Elisa 法检测各组小鼠血清中肿瘤特异性 IgG 抗体水平, 结果表明麒麟菜多糖能够引起小鼠特异性体液免疫应答, 促使机

体生成大量的特异性抗体,在机体抗肿瘤免疫应答过程中发挥重要的作用。

3.3 T细胞介导细胞免疫,CD8⁺T细胞虽然可对癌细胞发挥杀伤作用,但其本身不能特异性识别肿瘤抗原,故正常情况下体内抗肿瘤免疫应答较弱,而实体肿瘤(皮肤血管肉瘤)内含有大量的CD8⁺T细胞^[14],也有动物实验表明,肿瘤浸润CD8⁺T细胞的浓度决定其对靶细胞的杀伤效率^[15];CD4⁺T细胞能协调体内抗体生成,激活CD8⁺T细胞直接攻击肿瘤细胞^[3],同时也在CD8⁺T细胞攻击肿瘤细胞和形成记忆细胞过程中行使辅助功能,本实验研究结果表明,多糖组和模型组小鼠实体肿瘤浸润淋巴细胞均主要是CD8⁺T细胞;实体瘤内细胞HE染色和周期检测结果说明,模型组小鼠实体肿瘤内CD8⁺T细胞未被激活不能参与抗肿瘤免疫,而多糖组小鼠CD8⁺T细胞已被激活,可直接攻击H22肝癌细胞,使其形态异常并发生凋亡;多糖组小鼠血液中CD4⁺T细胞比例较高,说明体内CD4⁺T细胞与肿瘤特异性抗体共同参与CD8⁺T细胞的激活过程,有效抑制体内肿瘤细胞增殖。

参考文献

- [1] Huang Qi-lin, Zhang Li-na. Preparation, chain conformation and anti-tumor activities of water-soluble phosphated (1→3)- α -D-glucan from *Poria cocos* mycelia [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 83(3): 1363-1369
- [2] Bao Yan, Cao Xue-tao. The immune potential and immunopathology of cytokine-producing B cell subsets: A comprehensive review [J]. Journal of Autoimmunity, 2014, 55: 10-23
- [3] Lai Yo-ping, Jeng Chung-juan, Chen Shu-ching, et al. The role of CD4⁺T cells in tumor immunity [J]. ISRN Immunology, 2011: 1-6
- [4] Misurcova L, Skrovankova S, Samek D, et al. Health benefits of algal polysaccharides in human nutrition [J]. Advances in Food and Nutrition Research, 2012, 66(1): 75-145
- [5] JIAO Li-li, JIANG Peng, ZHANG Li-ping, et al. Antitumor and immunomodulating activity of polysaccharides from enteromorpha intestinalis [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2010, 15(3): 421-428
- [6] 金富军,陈茂芸,马凯琦,等.麒麟菜多糖提取物体外抗单纯疱疹病毒1型活性及作用机制研究[J].中国卫生检验杂志,2014,24(16):2288-2290,2297
- [7] 江振友,刘玥,唐渝,等.硒化麒麟菜多糖对肝癌细胞株生长和凋亡的影响[J].中山大学学报(医学科学版),2008,29(3): 270-277
- [8] SUN Xiao-bo, ZHAO Chen, WANG Jin-ping, et al. Carboxylate groups play a major role in antitumor activity of *Ganoderma applanatum* polysaccharide [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 123: 283-287
- [9] Peter J, Siska, Jeffrey C, et al. T cell metabolic fitness in antitumor immunity [J]. Immunity and Cancer, 2015, 36(4): 257-264
- [10] LI Shi-Yong, LIU Yang, XU Cong-Fei, et al. Restoring anti-tumor functions of T cells via nanoparticle-mediated immune checkpoint modulation [J]. Journal of Controlled Release, 2016, 231: 17-28
- [11] Dimitry A Chistiakov, Alexander N Orekhov, Yuri V Bobryshev. Immune-inflammatory responses in atherosclerosis: Role of an adaptive immunity mainly driven by T and B cells [J]. Immunobiology, 2016, 221(9): 1014-1033
- [12] 唐娟,孔珍,刘安军,等.麒麟菜多糖对H22肝癌移植瘤的抑制作用研究[J].现代食品科技,2015,31(1):1-5
- [13] TANG Juan, KONG Zhen, LIU An-jun, et al. Inhibitory effect of *Eucheuma gelatinae* polysaccharides on H22 hepatoma xenograft cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(1): 1-5
- [14] Hiroko Fujii, Akiko Arakawa, Daisuke Utsumi, et al. CD8⁺tumor-infiltrating lymphocytes at primary sites as a possible prognostic factor of cutaneous angiosarcoma [J]. International Journal of Cancer, 2014, 134(10): 2393-2402
- [15] Budhu S, Loike J D, Pandolfi A, et al. CD8⁺T cell concentration determines their efficiency in killing cognate antigen-expressing syngeneic mammalian cells *in vitro* and in mouse tissues [J].The Journal of Experimental Medicine, 2010, 207(1): 223-235