

文章编号:1001-6880(2016)6-0846-07

石见穿多糖对 H22 荷瘤小鼠的抗肿瘤免疫调节作用

程 阜,赵文豪,黄 旭,王 冠,吕叙鹏,吴超群,舒广文*

中南民族大学药学院化学生物学教研室,武汉 430074

摘要:前期研究发现石见穿多糖(*polysaccharides from Salvia chinensis* Benth.,PSSC)能有效抑制H22肝癌细胞在昆明小鼠体内的生长。在此基础上,本研究进一步探讨了PSSC对H22荷瘤小鼠免疫器官和免疫细胞的影响。通过在昆明小鼠右腋皮下注射H22肝癌细胞构建荷瘤小鼠模型。采用流式细胞术、免疫组织化学染色、酶联免疫法等实验方法评价PSSC对CD4+T细胞、CD8+T细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)抗肿瘤免疫能力的影响。结果表明PSSC可以有效增加小鼠的脾脏/胸腺指数并促进Con A/LPS刺激的脾细胞增殖。同时,PSSC剂量依赖性地增加了荷瘤小鼠外周血单核细胞、脾脏及淋巴结中CD8+T细胞比例并提高CD8+T细胞与NK细胞在肿瘤组织中的组分含量。注射PSSC后,CD4+T细胞分泌免疫促进因子IFN- γ 和IL-2的量增加,而分泌免疫抑制因子IL-4和IL-10的量减少。这一系列实验研究结果表明PSSC具有显著的抗肿瘤免疫增强活性。

关键词:石见穿;多糖;H22荷瘤小鼠;抗肿瘤免疫

中图分类号:R967

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.6.006

Anti-tumor and Immunomodulatory Effects of Polysaccharides from *Salvia Chinensis* Benth. on H22 Tumor-bearing Mice

CHENG Zhuo,ZHAO Wen-hao,HUANG Xu,WANG Guan,LV Xu-peng,WU Chao-qun,SHU Guang-wen*

South-central University For Nationalities,College of Pharmacy,Wuhan 430074,China

Abstract: Our previous study showed that polysaccharides from *Salvia chinensis* Benth. (PSSC) inhibited the proliferation of H22 hepatocellular carcinoma cells in Kunming mice. The current study was designed to further understand the effects of PSSC on immune organs and anti-tumor activities of immune cells on H22 tumor-bearing mice. In this study, H22 cells were subcutaneously transplanted into right flanks of Kunming mice. Flow cytometry analysis, immunohistochemical staining and enzyme-linked immunosorbent assays were performed to evaluate the immune potency of CD4+T cells, CD8+T cells and natural killer cells (NK cells). The results revealed that PSSC increased spleen/thymus indexes and Con A/LPS-induced spleenocyte proliferation in tumor-bearing mice. Ratios of CD8+T cells in peripheral blood mononuclear cells, spleens and lymph nodes and numbers of CD8+T and NK cells infiltrated into transplanted tumor tissues were elevated in response to PSSC. In CD4+T cells, PSSC provoked excretions of immunostimulatory cytokines such as IFN- γ and IL-2 and suppressed those of immunosuppressive cytokines such as IL-4 and IL-10. These findings collectively suggested that PSSC were capable of enhancing anti-tumor immune response in H22 tumor-bearing mice.

Key words:*Salvia chinensis* Benth.;polysaccharides;H22 tumor-bearing mice;anti-tumor immunomodulatory effect

肝癌是一种严重威胁人民群众生命与健康的恶性肿瘤。在高等动物体内,免疫系统主要负责抵御包括恶性转化细胞在内的异常细胞对机体的侵入。自然杀伤细胞(NK细胞)、CD8+T细胞和CD4+T细胞都是机体免疫系统的重要组成部分。它们在机体抗肿瘤免疫反应过程中扮演了不可或缺的关键性

角色^[1]。免疫抑制在癌症发生发展过程中起到了至关重要的作用^[2]。中药材石见穿为唇形科植物华鼠尾草(*Salvia chinensis* Benth.)的干燥地上部分。中医认为,石见穿味辛、苦,性微寒,能够活血化瘀,清热利湿,散结消肿^[3]。长期传统中医理论指导下的临床实践证实,石见穿对包括肝癌在内的多种恶性肿瘤性疾病具有确切的疗效,然而其具体作用机制尚不清楚。目前已知,石见穿总黄酮可以通过靶向NF- κ B信号通路来诱导肝癌细胞凋亡^[4]。除黄酮外,多糖也是石见穿药材的重要化学组分之一。

收稿日期:2016-01-20 接受日期:2016-03-15

基金项目:中南民族大学国家级大学生创新训练计划(GCX15008);湖北省高等学校省级教学研究项目(2015195)

*通讯作者 E-mail:shuguangwen@whu.edu.cn

天然植物多糖具有较好的免疫调节活性^[5,6],而促进机体抗肿瘤免疫反应已成为防控肿瘤性疾病的重要手段之一^[7]。课题组前期研究工作表明,石见穿多糖 (polysaccharides from *Salvia chinensis* Benth., PSSC)能有效抑制 H22 肝癌细胞在小鼠体内的生长^[8]。在 PSSC 的作用下,荷瘤小鼠血清中促进抗肿瘤免疫的细胞因子干扰素 γ (IFN- γ) 和白细胞介素-2 (IL-2) 的浓度增加,而抑制机体抗肿瘤免疫的细胞因子白细胞介素 4 (IL-4) 和白细胞介素 10 (IL-10) 的浓度降低。这种抗肿瘤免疫调节作用与 PSSC 能够抑制 H22 荷瘤小鼠体内前列腺素的生成以及前列腺素诱导的 CD4+ T 细胞凋亡有关^[8]。在此基础上,本实验首先分析了 PSSC 对 H22 荷瘤小鼠免疫器官(脾脏与胸腺)的影响,并把这种影响与经典抗肿瘤药物顺铂进行比较。CD8+ T 细胞和 NK 细胞是能够产生细胞毒性效应而清除肿瘤细胞的免疫细胞亚群。故本实验还分析了 PSSC 对 H22 移植肿瘤组织中 CD8+ T 细胞和 NK 细胞组分含量的影响。考虑到 CD4+ T 细胞是重要的免疫调节细胞,它们通过分泌各种细胞因子而对机体抗肿瘤免疫反应产生调节作用^[9],因此本实验还进一步分析了 PSSC 对 CD4+ T 细胞细胞因子分泌的影响。以上研究工作进一步丰富了人们从机理上对 PSSC 抗肿瘤免疫调节活性的认识,为科学利用中药材石见穿提供了理论依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物与药材

无特定病原体 (SPF) 级昆明小鼠购自湖北省疾病预防控制中心,实验动物合格证号: SCXK (鄂) 2015-0018。小鼠于 SPF 动物房饲养一周,适应环境后开始实验。石见穿药材购自湖北省中药材有限公司(经中南民族大学药学院万定荣教授鉴定无误),石见穿多糖依参考文献^[8]制备。

1.2 药品

顺铂、RPMI 1640 培养液、台盼蓝、噻唑蓝 (MTT)、刀豆蛋白 A (Con A)、脂多糖 (LPS)、抗 CD4、CD8、CD49b 蛋白的抗体及各类细胞因子酶联免疫定量试剂盒等试剂耗材均购自武汉晟亚生物技术有限公司。

1.3 仪器

354 型多功能酶标仪 (Thermo 公司);流式细胞仪 (Becton Dickinson FACSCalibur, Franklin Lakes 公

司);317 型 CO₂ 细胞培养箱 (Thermo 公司);cp114 型电子天平 (奥豪斯仪器有限公司);5810 型高速冷冻离心机 (Eppendorf 公司)。

2 实验方法

2.1 H22 肿瘤模型的建立

取昆明小鼠 60 只,随机分成 A (正常对照组)、B (H22 肝癌移植模型组)、C (顺铂阳性药物组)、D、E 和 F (PSSC 给药组,给药剂量分别为 10、30 和 100 mg/kg) 6 组,每组 10 只。A 组小鼠每日注射生理盐水。B、C、D、E 和 F 组建立肿瘤模型(将 1×10^6 个 H22 肝癌细胞通过皮下注射途径移植到健康小鼠右前肢腋下),24 h 后,B 组每日腹腔注射生理盐水,C 组腹腔注射 5 mg/kg 的顺铂,D、E 和 F 组按所给剂量每日腹腔注射 PSSC,连续 10 d。给药完成后麻醉小鼠,收集血样,然后迅速处死小鼠,取相应组织进行后续实验。

2.2 脾脏/胸腺指数测定及小鼠脏器细胞悬液制备

迅速取出处死后小鼠的脾脏与胸腺,称重,计算脏器指数 = 脏器重量 (mg)/小鼠体重 (g)。将解剖取出的脏器迅速置于装有冰冷的 RPMI 1640 培养液的培养皿内,捣碎研磨,使组织充分分离为单细胞悬浮在培养液内,纱布过滤得到相应脏器的单细胞悬液。再向细胞悬液中加入 0.15 mol/L 的 NH₄Cl (pH 7.4) 低渗溶液去除悬液中的红细胞。离心收集细胞后,用台盼蓝染色法确定细胞存活率大于 95%。最后将所得细胞接种到 96 孔培养板中,调整细胞密度至 5×10^6 个/孔,备用。其他组织单细胞悬液制备方法与此类似。

2.3 Con A/LPS 刺激脾脏细胞增殖的检测

将按上述方法获得的脾细胞悬液培养 24 h 后,分成实验组和对照组。实验组每孔加入含有 Con A (浓度为 2 μ g/mL) 的 RPMI 1640 培养液 100 μ L,对照组只加入 RPMI 1640 培养液 100 μ L,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱下培养 72 h 后,每孔再加入 2.0 mg/mL 的 MTT 50 μ L,继续培养 4 h。弃去培养基,用生理盐水洗细胞,再向每孔中加入 150 μ L DM-SO,充分混匀后测定溶液在 570 nm 处的吸光度。以实验孔和对照孔光密度的比值代表 Con A 刺激下脾细胞增殖的能力。测定 LPS 刺激下脾细胞增殖能力的方法与上述相同。

2.4 CD8+ T 细胞的相对含量检测

用荧光标记的抗 CD8 蛋白抗体对小鼠组织单

细胞悬液进行孵育染色。洗去未与细胞表面结合的抗体后,对细胞悬液进行流式细胞分析,测定染色阳性细胞在整个细胞群体中所占的比例。

2.5 CD8 + T 细胞和 NK 细胞对肿瘤组织的浸润能力检测

解剖取小鼠的移植肿瘤组织。先用冰冷的生理盐水洗净组织块,然后将其固定于含有 10% 福尔马林的中性缓冲溶液中,最后用石蜡包埋,将组织块切成 5 μm 厚的薄片。用针对 CD8 或 CD49b 蛋白的抗体对切片进行染色,洗去一抗后添加辣根过氧化物酶标记的二抗复染显色,制片观察并拍照。

为了定量地检测 CD8 + T 细胞和 NK 细胞对肿瘤组织的浸润能力,我们首先采用 2.2 中描述的方法把肿瘤组织制成单细胞悬液,然后用荧光标记的针对 CD8 和 CD49b 蛋白的抗体对肿瘤组织单细胞悬液进行染色,再用流式细胞技术分析染色阳性细胞在整个细胞群体中所占的比例。

2.6 CD4 + T 细胞培养液中细胞因子含量测定

用免疫磁珠法从各组实验小鼠的脾脏单细胞悬液中分离 CD4 + T 细胞。利用流式细胞分析技术检测所得细胞群体中 CD4 + T 细胞的组分含量。当 CD4 + T 细胞纯度高于 95% 时方进行下一步实验。将细胞悬液体外培养 48 h 后,收集培养液上清,采用酶联免疫法测定 IFN- γ 、IL-2、IL-4 和 IL-10 在培养液中的含量。具体操作方法依照相应的试剂盒说明书进行。

2.7 统计分析

本实验中计量数据资料均以平均数 \pm 标准差的形式表述,并采用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析。采用双尾 t 检验法对两组样本均数比较的情

形(如正常对照组和模型对照组的比较)进行统计分析。对于多组间数据比较的情形(如多个 PSSC 剂量组与模型对照组的比较),则先采用单因素方差分析法分析 PSSC 对相关指标影响是否取得统计学意义,如有统计学意义,再采用 SNK 法对各组均数进行进一步两两比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异具有明显的统计学意义。

3 实验结果

3.1 PSSC 对荷瘤小鼠脾脏/胸腺指数以及 ConA/LPS 刺激脾脏细胞增殖的影响

PSSC 对小鼠胸腺/脾脏指数的影响如表 1(右侧两列)所示。相对于健康小鼠,H22 荷瘤小鼠脾脏及胸腺指数无明显变化。阳性抗肿瘤药物顺铂显著降低了它们的脾脏/胸腺指数,显示出一定的免疫器官毒性。PSSC 则剂量依赖性地提高了动物脾脏/胸腺指数。

PSSC 对 ConA/LPS 刺激脾脏细胞增殖的影响见表 1 中间两列。移植 H22 肝癌细胞后,ConA 与 LPS 刺激的脾细胞增殖均明显降低(刺激指数分别从 2.76 降至 1.05,2.82 降低到 1.17)。阳性药物顺铂并不改变这一趋势。PSSC 给药组的脾细胞刺激指数相对于 H22 荷瘤模型组则有明显提升,并且提升程度随着给药量的增加而增加。与模型组小鼠相比,中、高剂量给药组的数据差别具统计学意义。以上结果说明,与阳性抗肿瘤药物顺铂不同,PSSC 能够明显增加小鼠的脾脏与胸腺指数,并且提高了脾细胞在 ConA/LPS 刺激下的增殖能力。

表 1 PSSC 对荷瘤小鼠脾脏/胸腺指数以及 ConA/LPS 刺激脾脏细胞增殖的影响

Table 1 Effect of PSSC on thymus/spleen indexes and splenocyte proliferation induced by Con A and LPS in H22-bearing mice

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	刺激指数 Stimulation index		胸腺指数 Thymus index (mg/g)	脾脏指数 Spleen index (mg/g)
		ConA	LPS		
正常对照组 Normal group	-	2.76 \pm 0.24	2.82 \pm 0.27	3.17 \pm 0.29	6.93 \pm 0.58
模型对照组 Model group	-	1.05 \pm 0.22 ^c	1.17 \pm 0.14 ^c	3.01 \pm 0.31	7.06 \pm 0.60
阳性对照组 Positive group	5	0.93 \pm 0.09	1.01 \pm 0.12	0.86 \pm 0.13 ^b	4.55 \pm 0.46 ^b
PSSC 低剂量组 PSSC-L	10	1.79 \pm 0.24	1.85 \pm 0.17 ^a	3.32 \pm 0.25	7.84 \pm 0.39
PSSC 中剂量组 PSSC-M	30	2.42 \pm 0.23 ^b	2.38 \pm 0.29 ^a	3.90 \pm 0.32 ^a	8.22 \pm 0.48 ^a
PSSC 高剂量组 PSSC-H	100	3.14 \pm 0.28 ^b	3.49 \pm 0.27 ^b	4.49 \pm 0.35 ^b	8.89 \pm 0.61 ^b

注:^a $P < 0.05$,给药组和模型组比较;^b $P < 0.01$,给药组和模型组比较;^c $P < 0.05$,模型组和正常组比较。

Note: ^a $P < 0.05$ compared to model group; ^b $P < 0.01$ compared to model group; ^c $P < 0.05$ compared to normal group.

3.2 PSSC 对荷瘤小鼠组织中 CD8 + T 细胞组分含量的影响

如图 1 所示,皮下移植 H22 肝癌细胞后,荷瘤昆明小鼠外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PMBC)、脾脏和淋巴结中 CD8 + T 细胞比例无明显变化(与健康小鼠相比)。PSSC 则能

剂量依赖性地增加荷瘤小鼠 PMBC、脾脏及淋巴结内 CD8 + T 细胞的比例。与注射生理盐水的荷瘤小鼠相比,来自 30 和 100 mg/kg PSSC 给药组的数据具有统计学意义(图 1 和图 2)。以上数据表明腹腔注射 PSSC 可增加 PMBC、脾脏和淋巴结中 CD8 + T 细胞的含量。

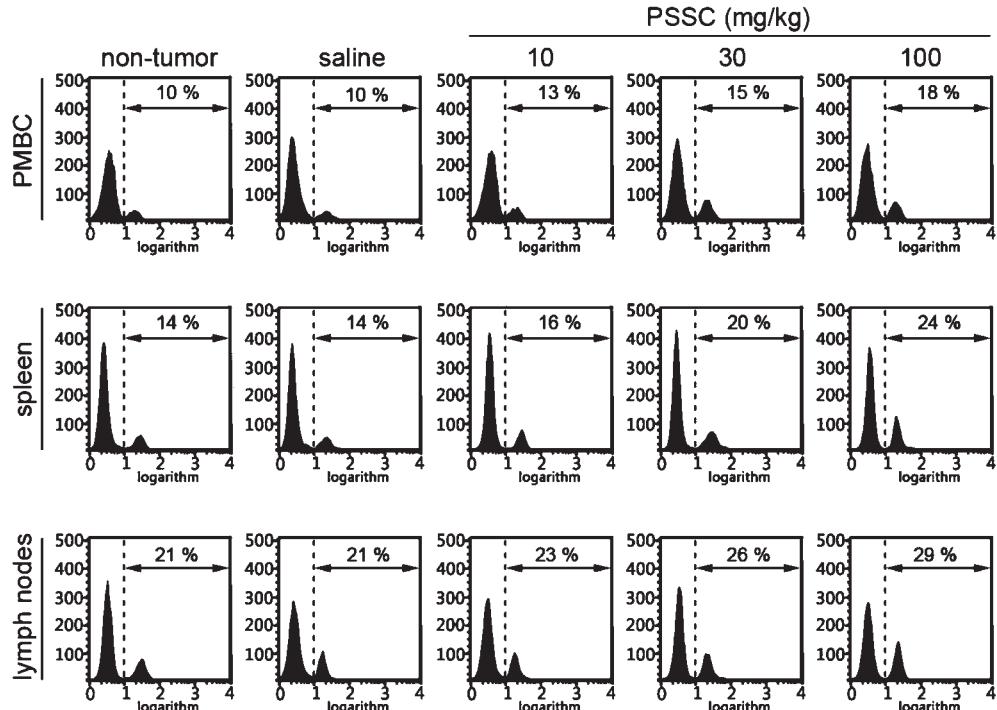


图 1 小鼠组织中 CD8 + T 细胞比例(流式细胞分析结果)

Fig. 1 Effects of PSSC on the ratios of CD8 + T cells in PMBC, spleens and lymph nodes (determined by flow cytometry analysis)

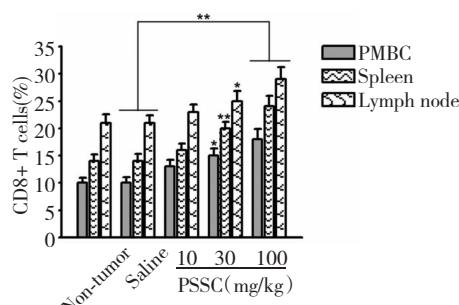


图 2 小鼠组织中 CD8 + T 细胞比例(统计结果)

Fig. 2 Effects of PSSC on the ratios of CD8 + T cells in PMBC, spleens and lymph nodes (determined by statistical analysis)

3.3 PSSC 对 CD8 + T 细胞与 NK 细胞浸润肿瘤组织能力的影响

如图 3 所示,PSSC 剂量依赖性地提高了肿瘤组织切片中 CD49b(NK 细胞表面特异性标记物)和

CD8 抗体染色呈阳性细胞(照片中被染成黄棕色的圆点状结构)的数量。为了进一步证实这一结论,我们对肿瘤组织单细胞悬液进行了流式细胞分析。结果表明,PSSC 剂量依赖性地提高了肿瘤组织中 CD8 + T 细胞和 NK 细胞的数量(图 4 和图 5;与生

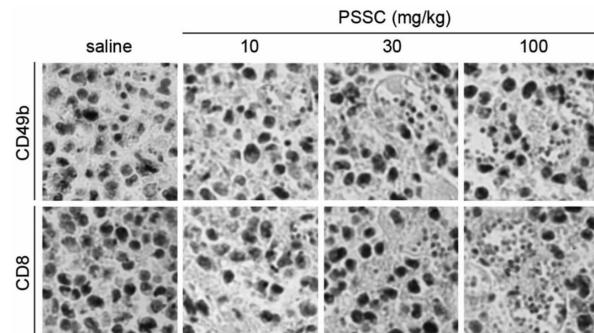


图 3 肿瘤组织切片免疫组化图

Fig. 3 Immunohistochemical staining assay of tumor tissues

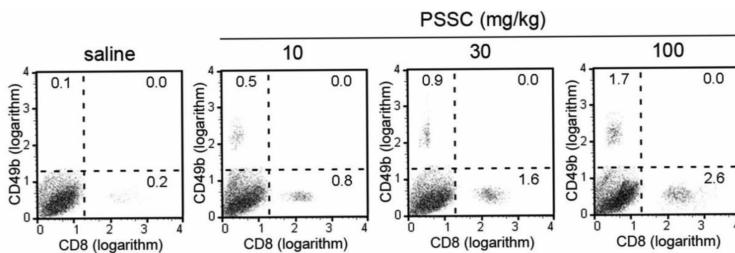


图 4 肿瘤组织中 CD8 + T 细胞和 NK 细胞的数量(流式细胞分析结果)

Fig. 4 Numbers of CD8 + T cells and NK cells in tumor tissues (determined by flow cytometry analysis)

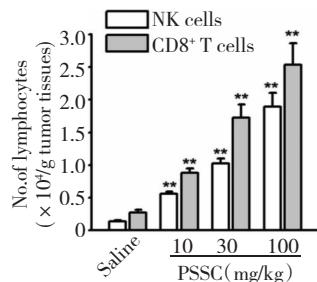


图 5 肿瘤组织中 CD8 + T 细胞和 NK 细胞的数量(流式细胞分析结果)

Fig. 5 Numbers of CD8 + T cells and NK cells in tumor tissues (determined by statistical analysis)

理盐水组相比, PSSC 各剂量组数据均具有统计学意义)。以上结果说明 PSSC 能够增强 CD8 + T 细胞和 NK 细胞对肿瘤组织的浸润能力。

3.4 PSSC 对 CD4 + T 细胞分泌细胞因子的影响

结果如图 6 所示。移植 H22 肝癌细胞后, CD4 + T 细胞分泌 IFN- γ 和 IL-2 量降低, 而分泌 IL-4 和 IL-10 量增加。PSSC 剂量依赖性地加强 CD4 + T 细胞分泌 IFN- γ 和 IL-2 的能力并减弱它们分泌 IL-4 和 IL-10 的能力(与生理盐水组相比, 来自 30 和 100 mg/kg PSSC 给药组的数据具统计学意义)。这一实验结果提示改变 CD4 + T 细胞的细胞因子分泌谱

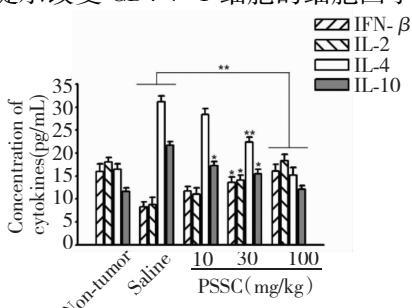


图 6 PSSC 对 CD4 + T 细胞分泌细胞因子的影响

Fig. 6 Effect of PSSC on cytokine profiles secreted from CD4 + T cells

系可能在 PSSC 诱导的机体抗肿瘤免疫反应中起到了关键性作用。

4 讨论与结论

在世界范围内, 肝癌一直是一种发病率和致死率均居高不下的恶性肿瘤性疾病。尽管外科手术是目前临幊上针对肝癌的首选治疗方法, 但由于肝癌病情发展时间长, 许多患者在确诊时就已经错过了手术治疗的最佳时机^[10]。因此, 多数肝癌患者不得不使用化学药物进行治疗。而化疗药物有可能对机体造成巨大的损伤。顺铂是一种经典的抗肿瘤药物。有研究表明, 顺铂对动物的正常组织细胞具有一定的毒性, 从而会对其预后产生不利的影响^[11]。类似的, 在本研究中, 我们观察到顺铂可以降低荷瘤小鼠的脾脏和胸腺指数, 提示顺铂对动物的免疫系统具有一定的毒性。而 PSSC 则可以增加动物的胸腺和脾脏指数并刺激 Con A/LPS 诱导的脾细胞增殖。这些结果表明, 与顺铂不同, PSSC 对动物的脾脏和胸腺不具明显毒性。此外, PSSC 对脾脏和胸腺细胞的增殖还具有潜在的促进作用。这些数据可以为将 PSSC 用于肝癌的辅助治疗提供理论依据。

以往对植物来源的多糖进行的抗肿瘤作用及其对免疫系统的影响, 已经有较多研究报道^[12, 13]。临幊上则已将人参多糖用于晚期胃癌的辅助化疗。尽管人参多糖对患者体内 CD8 + T 细胞百分数无明显影响, 但其能显著提高患者体内 CD4 + T 细胞和 NK 细胞的百分数, 从而提高患者细胞免疫功能^[14]。我们的前期研究表明, PSSC 可提高荷瘤小鼠体内 CD4 + T 细胞的百分数^[8]。在本研究中, 我们又进一步证实 PSSC 能增加荷瘤小鼠体内 CD8 + T 细胞的百分数并提高 NK 细胞和 CD8 + T 细胞对肿瘤组织的浸润能力。我们的研究结果为 PSSC 临床应用可行性提供了理论依据。

一般而言,CD4⁺ T 细胞可以被进一步划分为 Th1(T helper 1) 和 Th2(T helper 2) 两个亚群。划分的主要依据是它们分泌的细胞因子所具有的功能。Th1 亚群主要分泌 IFN-γ 和 IL-2 等免疫促进因子,而 Th2 亚群则主要分泌包括 IL-4 和 IL-10 在内的免疫抑制因子^[15]。Th1 亚群细胞分泌的细胞因子可以上调 CD8⁺ T 细胞、NK 细胞等细胞毒性免疫细胞的肿瘤细胞杀伤活性而增强机体抗肿瘤免疫反应^[16]。反过来,来自 Th2 亚群的细胞因子则诱导机体对肿瘤细胞产生免疫耐受^[17]。CD4⁺ T 细胞从 Th1 亚群向 Th2 亚群的分化在肿瘤的发生发展过程中起到了推波助澜的作用^[18]。在本次实验中,我们观察到 PSSC 能够增加 PMBC、脾脏和淋巴结中 CD8⁺ T 细胞的组分含量,提高 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞对肿瘤组织的浸润能力。这些现象可能与机体整体 Th1 细胞因子 IFN-γ 和 IL-2 的分泌增加,而 Th2 细胞因子 IL-4 和 IL-10 的分泌减少有关。在本次实验中,我们进一步观察到,移植 H22 肝癌细胞后,CD4⁺ T 细胞分泌的 Th2 细胞因子增加,Th1 细胞因子降低。PSSC 则剂量依赖性地上调 CD4⁺ T 细胞分泌 Th1 细胞因子 IFN-γ 和 IL-2 的能力,并降低 CD4⁺ T 细胞对 Th2 细胞因子 IL-4 和 IL-10 的分泌。这些结果提示 H22 肿瘤细胞的移植可能引起了 CD4⁺ T 细胞从 Th1 亚群向 Th2 亚群分化,而 CD4⁺ T 细胞从 Th2 亚群向 Th1 亚群的分化则极有可能在 PSSC 诱导的机体抗肿瘤免疫反应中起到了重要作用。

参考文献

- Lee JB, Ohta Y, Hayashi K, et al. Immuno-stimulating effects of a sulfated galactan from *Codium fragile*. *Carbohydr Res*, 2010, 345:1452-1454.
- Yang WQ (杨维群), Wen YM (温扬敏), Lin WD (林文东), et al. Effect of Polysaccharides from *Coelomactra antiquata* on human carcinoma of esophagus cells transplanted in nude mice. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27:1402-1406.
- Liang W (梁伟), Wang SP (王松坡). Advances of chemical constituents and anti-tumor effects of *Salvia chinensis* Benth. *J Mod Oncol* (现代肿瘤医学), 2014, 22:2492-2494.
- Xiang M, Su H, Hu Y, et al. Chemical composition of total flavonoids from *Salvia chinensis* Benth and their pro-apoptotic effect on hepatocellular carcinoma cells: potential roles of suppressing cellular NF-κB signaling. *Food Chem Toxicol*, 2013, 62:420-426.
- Du L (杜玲), Hu RP (扈瑞平), Mu WJ (穆文静), et al. Effect of polysaccharide from *Spirulina (Arthrospira) platensis* of Chad lake on immunity and anti-tumor activity of S180 ascites sarcoma mice. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26:64-72.
- Hu J (胡菁), Ao MZ (敖明章), Cui YM (崔永明), et al. Anti-tumor effect of polysaccharide from *glycyrrhiza* and its influence on immunological function. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 39:3363-3366.
- Kimura Y, Iijima S, Kato T, et al. TS-1 and lentinan combination immunochemotherapy for advanced or recurrent gastric cancer:a preliminary report. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2003, 30:1791-1793.
- Shu GW, Zhao WH, Yue L, et al. Antitumor immunostimulatory activity of polysaccharides from *Salvia chinensis* Benth. *J Ethnopharmacol*, 2015, 168:237-247.
- Grimm M, Gasser M, Bueter M, et al. Evaluation of immunological escape mechanisms in a mouse model of colorectal liver metastases. *BMC Cancer*, 2010, 10(3):82.
- Zheng XL (郑晓亮), Tu LL (屠凌嵒), Yan DM (颜冬梅), et al. Protective effects of *Chrysomya megacephala* extracts on hepatic carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26:494-498.
- Wang Q (王强), Xu HB (徐辉碧), Zhan ZL (詹志兰). Anti-cancer activity and toxicity of Cisplatin. *Studies Trace Element Health* (微量元素与健康研究), 1997, 14(4):59-60.
- Liang QC (梁启超), Zou GH (邹桂华), Liu S (刘爽), et al. Separation, purification and anticancer activities of polysaccharides from the bark of *Juglans mandshurica*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27:59-60.
- Wu RJ (吴荣杰), Yang LL (杨丽丽), Tong X (佟欣), et al. Antitumor activity of water-soluble polysaccharides from *Codium fragile* and its immunomodulation. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2012, 43:529-533.
- Xu JD (徐菊娣). Effect of ginseng polysaccharide injection combined with chemotherapy on immune function and therapeutic of the patients with advanced gastric cancer. *Central South Pharm* (中南药学), 2015, 13:316-321.
- Du C, Liu C, Kang J, et al. MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Immunol*, 2009, 10:1252-1259.
- Huang H, Hao S, Li F, et al. CD4⁺ Th1 cells promote CD8⁺ Tc1 cell survival, memory response, tumor localization and therapy by targeted delivery of interleukin 2 via acquired pMHC I complexes. *Immunology*, 2007, 120:148-159.

(下转第 915 页)