

文章编号:1673-1689(2007)04-0067-06

总状蕨藻 *Caulerpa racemosa* 多糖抗肿瘤 和免疫增强活性

吉宏武, 邵海艳, 章超桦, 洪鹏志, 熊皓平

(广东海洋大学 食品科技学院, 广东 湛江 524025)

摘要:以荷 S180 实体瘤的昆明小鼠为模型,研究了总状蕨藻粗多糖(CRP)的抗肿瘤作用及其对免疫器官等的影响,采用细胞培养法研究了 CRP 及其两个主要组分(CRPF1 和 CRPF2)对正常小鼠免疫细胞功能的影响。实验结果显示:总状蕨藻粗多糖对 S180 实体瘤具有显著的抑制作用,其抑瘤率和免疫活性与给药方式、剂量等因素有关,在注射和灌胃给药条件下,当 CRP 剂量分别为 25 mg/(kg·d)和 100 mg/(kg·d)时,其抑瘤率达到最大值,分别为 46.2%和 58.2%,且在注射给药时能显著地增加小鼠的脾脏指数。在 50~200 mg/(kg·d)范围内,灌胃给药时能升高小鼠碳廓清指数;细胞培养结果显示:CRP 能提高正常小鼠的免疫功能,不过,其对静止淋巴细胞增殖的促进作用和对小鼠腹腔巨噬细胞 MΦ 分泌 NO 的促进作用均小于 CRPF1 和 CRPF2。以上事实表明,总状蕨藻多糖具有较强的抗肿瘤和增强小鼠免疫力的作用。

关键词:总状蕨藻多糖;抗肿瘤;免疫增强活性

中图分类号:TS 201.2

文献标识码:A

Antitumor and Immunomodulatory Activities of Polysaccharides from *Caulerpa racemosa*

Ji Hong-wu, SHAO Hai-yan, ZHANG Chao-hua, HONG Peng-zhi, XIONG Hao-ping
(College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: This manuscript with Sarcon 180 KM mice as model animal to investigate the antitumor effect of crude polysaccharides from *Caulerpa racemosa* (CRP). And its influence on mice immune organs and carbon clearance index were studied. Effect of CRP and its two main fractions (CRPF1 and CRPF2) on immune cells functions of normal mice were tested. These results showed that CRP exhibited significantly inhibition effect on S180 tumor of mice transplanted with tumor lines of S180, and anti-tumor and immune activity of CRP were closely related with the dose and provided means. Under intraperitoneal passage, a obvious increment of the spleen index of Sarcon 180 KM mice was observed, and the highest antitumor rate was obtained (46.2%) at the dose of 25 mg/(kg·d). Under the oral passages, a obvious enhancement of carbon clearance index of S180 mice was observed at 50~200 mg/(kg·d), and the highest antitumor rate was 58.2% at the dose of 100 mg/(kg·d). Cell cultivation results indicated that CRP can improve

收稿日期:2006-11-21

基金项目:广东省自然科学基金项目(039213);广东省科技计划项目(2006B20401018)。

作者简介:吉宏武(1962-),男,湖北通山人,工学博士,副教授,主要从事南海海藻活性化学成分及其高值化利用研究。Email: jihw62318@yahoo.com.cn

immune cells functions of normal mice, but it exhibit weaker both promotion effect on inactive spleen lymphocyte proliferation and the abilities of mice peritoneal cavity microphage MΦ excreting NO than CRPF1 and CRPF2. The results presented here demonstrated that polysaccharides from *Caulerpa racemosa* exhibit stronger antitumor and immunomodulation activities.

Key words: polysaccharides from *Caulerpa racemosa*; antitumor; immunomodulatory activities

海藻是生活在海洋中的一类低等隐花植物,在长期的进化过程中形成了许多独特的生理活性物质。海藻多糖不仅是海藻的主要成分,而且是一类重要的生理活性物质,具有抗肿瘤、增强免疫、抗凝血、抗病毒等生理活性,有些海藻多糖已被开发成了新的药物^[1]。总状蕨藻(*Caulerpa racemosa*)属绿藻门(Chlorophyta),是一种大型可食性绿藻,主要分布于热带和亚热带海域低潮间带,在我国湛江、海南、饶平、广西的北海、台湾省等地分布广泛^[2],但至今尚未得到有效利用,对其研究也较少。作者已报道过总状蕨藻化学成分及其营养特性^[3]和多糖的提取工艺^[4],并对其多糖的抗肿瘤与免疫增强活性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

总状蕨藻:2004年4月采于湛江徐闻县琼州海峡。

实验动物:昆明种小白鼠,体重18~22 g,雌雄各半,购自广东医学院动物实验中心;S180瘤株:由广东省海洋药物重点实验室提供。

1.2 主要方法

1.2.1 总状蕨藻粗多糖及其级分的制备 称取一定量的总状蕨藻粉末,按固液比1:10添加水分,并按136.5 U/g加入中性蛋白酶,60℃提取2.5 h后再将固液比调至1:20,将温度升至95℃再继续提取2.5 h,提取液用纱布过滤,滤液真空浓缩至1/4体积时离心(3 000 r/min),上清液透析,透析后的液体用Sevage试剂去除蛋白质,然后加入3倍体积95%的酒精,静置沉淀后离心,沉淀物冷冻干燥,即得总状蕨藻粗多糖(*Caulerpa racemosa* Polysaccharide, CRP);CRP经DEAE-52纤维素离子交换柱柱层析,分别采用蒸馏水、0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mol/L的NaCl进行分段洗脱,将0.5 mol/L和1.0 mol/L NaCl洗脱的两个主要级分进行冷冻干燥,并分别称之为总状蕨藻多糖级分1(*Caulerpa race-*

mosa Polysaccharide Fraction 1, CRPF1)和总状蕨藻多糖级分2(*Caulerpa racemosa* Polysaccharide Fraction 2, CRPF2)。粗多糖及其级分的总糖质量分数参照文献[5]测定,糖醛酸、蛋白质质量分数参照文献[6],硫酸基质量分数参照文献[7]测定,结果见表1。

表1 总状蕨藻粗多糖及其级分基本组成

Tab. 1 Crude polysaccharide from *Caulerpa racemosa* and the chief fractions

样品	总糖 质量 分数/%	糖醛酸 质量 分数/%	蛋白质 质量 分数/%	硫酸基 质量 分数/%
CRP	53.7	7.9	9.9	27.6
CRPF1	36.0	3.9	14.0	45.6
CRPF2	45.1	7.6	2.0	48.3

1.2.2 体内抗肿瘤活性测定 取传代6 d的S180瘤细胞悬液,用生理盐水稀释至细胞浓度为 2×10^7 个/mL,并按0.2 mL/只小鼠的量接种至小鼠左蹠皮下。次日随机分组,每组10只,雌雄各半,于接种24 h后分别采用灌胃和腹腔注射两种途径按不同剂量给药,每日一次,连续14 d。阴性对照组给等量的生理盐水,阳性对照组按30 mg/(kg·d)剂量腹腔注射环磷酰胺,连续14 d。末次给药24 h后,对小鼠进行称重,然后处死小鼠,剥取瘤块和脾脏,用滤纸吸干脏器表面血污,称重,按式(1)计算抑瘤率和脾脏指数^[1]。

$$\text{抑瘤率} = (C - T) / C \times 100\% \quad (1)$$

式中:C为对照组平均瘤重;T为给药组平均瘤重

$$\text{脾脏指数} = \text{脾重} / \text{体重} (\text{mg/g})$$

1.2.3 小鼠碳廓清指数测定 将印度墨汁用生理盐水稀释4倍制成注射用墨汁,称取1.0 g Na_2CO_3 ,加蒸馏水1 000 mL配制成 Na_2CO_3 溶液,接种S180瘤细胞的小鼠给药14 d后,每鼠尾静脉注入注射用墨汁(0.1 mL/10 g体重),注入后立即计时,于注入后2, 10 min分别从眼眶取血20 μL ,加到2 mL Na_2CO_3 溶液中,以 Na_2CO_3 溶液作为空白对

照,用 722S 分光光度计在 650 nm 波长处测光密度,然后按式(2)计算廓清指数 K 。廓清指数

$$k=(\lg A_1-\lg A_2)/(t_2-t_1) \tag{2}$$

式中 A_1 、 A_2 为在时间 t_1 、 t_2 时所取样品的吸光值^[9]。

1.2.4 对静止脾淋巴细胞的转化作用 在无菌条件下用淋巴细胞分离液从小鼠脾脏中分离淋巴细胞,磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗 2 次,用 RPMI1640 培养液调整细胞浓度至 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的脾淋巴细胞悬液。

在 96 孔培养板的每孔中加入 150 μL 脾淋巴细胞悬液,实验组同时加入 50 μL 不同浓度的总状蕨藻多糖样品,对照组加入 50 μL PBS,每个实验组设 3 孔重复,置于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 培养 72 h。培养结束前 4 h,每孔加入 20 μL MTT(5 g/L),继续培养 4 h。培养结束后加二甲亚砜 150 μL 。酶联免疫检测仪于 570 nm 测定 OD 值^[10]。

1.2.5 对小鼠腹腔 M Φ 吞噬中性红的影响 颈椎脱臼处死小鼠,体积分数 75% 酒精浸泡 15 min,腹腔注射无血清 RPMI1640 培养液 2 mL,用棉球轻揉腹腔 1~2 min 后,收集腹腔内液,1 000 r/min 离心 10 min,用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液调整细胞浓度至 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 的细胞悬液,加入 96 孔培养板中,每孔 200 μL ,置 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 培养 2 h,吸出上层培养液,用 PBS 洗涤 2 次去除未贴壁细胞,即得巨噬细胞单层。

向含有巨噬细胞单层的 96 孔培养板中加入 0.1 mL 含不同浓度 CRP 的 RPMI1640 培养液,同时以 PBS 和环磷酰胺作为阴性和阳性对照,置 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 培养 24 h,然后向每孔中加入中性红生理盐水液,使终浓度为 1.0 g/L,继续培养 20 min, PBS 洗细胞 3 次,每孔加入细胞溶解液 0.1 mL,室

温放置 2 h,等细胞完全溶解后,酶标仪于 540 nm 处测吸光度 A , A 值的大小表示巨噬细胞吞噬功能的强弱^[11]。

1.2.6 对巨噬细胞分泌 NO 的影响 向含有巨噬细胞单层的 96 孔板的每孔中加入 0.1 mL 含不同浓度 CRPF1 和 CRPF2 的 RPMI1640 培养液,同时以 PBS 和环磷酰胺分别作为阴性和阳性对照,置 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 培养 24 h,取上清液 50 μL ,置另一培养板,加入 Griess 试剂 50 μL ,室温放置 10 min,在 540 nm 处测吸光度 A 值, A 值的大小表示巨噬细胞产生 NO 的多少^[12-13]。

1.2.7 统计分析 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 t 检验分析组间差异的显著性。

2 结 果

2.1 CRP 对荷瘤小鼠 S180 实体瘤和免疫器官的影响

实验结果见表 2。从表 2 可以看出,CRP 以 25~100 mg/(kg·d) 剂量进行注射给药时,其最高抑瘤率为 46.2%,同时也观察到当给药剂量达到 100 mg/(kg·d) 时,2 d 后小鼠全部死亡,对小鼠有一定的毒性。当以 50~200 mg/(kg·d) 剂量进行灌胃给药时,其抑瘤率为 42.7%~58.2%。

CRP 对荷瘤小鼠免疫器官的影响见表 3。从表 3 可知,CRP 对荷瘤小鼠胸腺指数的影响与给药途径无关。在两种给药情况下,与阴性对照组均无显著性差异。但对脾指数的影响与给药途径有关,当以 25~100 mg/(kg·d) 剂量进行注射给药时,荷瘤小鼠的脾指数明显高于阴性对照组,但当以 50~200 mg/(kg·d) 剂量进行灌胃给药时,荷瘤小鼠的脾指数与阴性对照组却无显著相关性。

表 2 总状蕨藻粗多糖 CRP 对荷瘤小鼠 S180 肿瘤的抑制作用

Tab. 2 Effect CRP on the growth of tumor in S180 mice

组 别	小鼠数量/只	给药方式 剂 量/(mg/(kg·d))		平均瘤重/g	抑瘤率/%
阴性对照	10	—	—	0.757 0±0.286 0	—
阳性对照	10	i. p	25	0.325 1±0.071 5**	57.1
	10	i. p	25	0.407 0±0.077 9**	46.2
CRP	10	i. p	50	0.617 6±0.266 8	18.4
	10	i. p	100	/	/
CRP	10	o. p	50	0.433 4±0.200 0*	42.7
	10	o. p	100	0.316 6±0.142 0**	58.2
	10	o. p	200	0.360 8±0.099 2**	52.3

注:[1] i. p 表示腹腔注射给药,o. p 表示灌胃给药。[2] * 表示在 $P<0.05$ 时,与阴性对照组相比为显著差异;** 表示在 $P<0.01$ 时,与阴性对照组相比为极显著差异。

2.2 CRP 对荷瘤小鼠碳廓清指数的影响

实验结果见表 4。从表 4 可以看出,阳性对照组和不同剂量的灌胃给药组荷瘤小鼠碳廓清指数明显低于阴性对照组,但采用不同剂量腹腔注射给药给组的荷瘤小鼠的碳廓清指数与阴性对照组不存在显著性差异。

2.3 对静止脾淋巴细胞的转化作用

实验结果见表 5。从表 5 可以看出,CRP、CRPF1 和 CRPF2 对静止脾淋巴细胞增殖均有一定的促进作用,同时也观察到,在 0.02~0.08 mg/mL 剂量范围内,CRP 和 CRPF1 对静止淋巴细胞增殖的促进作用随剂量变化不大,而 CRPF2 对静止脾淋巴细胞增殖的促进作用随剂量的增大反而降低了。

表 3 总状藻藻粗多糖 CRP 对荷瘤小鼠免疫器官的影响
Tab.3 Effect of CRP on immune organ of mice transplanted with tumor lines of S180

组 别	小鼠数量/只	给药方式	剂 量/(mg/(kg·d))	平均瘤重/g	胸腺指数/%
阴性对照	10		—	3.96±0.98	3.41±0.67
阳性对照	10	i. p	25	4.02±1.81	1.79±0.34**
CRP	10	i. p	25	10.89±1.76**	3.46±0.37
	10	i. p	50	13.37±1.69**	3.27±0.49
	10	i. p	100	/	/
CRP	10	o. p	50	4.27±1.01	3.57±0.45
	10	o. p	100	4.09±1.09	3.12±0.80
	10	o. p	200	4.22±0.88	3.84±0.48

表 4 总状藻藻粗多糖 CRP 对荷瘤小鼠碳廓清指数的影响
Tab.4 Effects of CRP on carbon clearance index of S180 mice

组 别	小鼠数量/只	给药方式	剂 量/(mg/(kg·d))	碳廓清指数
阴性对照	10		—	0.165 3±0.080 7
阳性对照组	10	i. p	25	0.094 4±0.034 *
CRP	10	i. p	25	0.170 1±0.071 7
	10	i. p	50	0.139 7±0.033 3
	10	i. p	100	/
CRP	10	o. p	50	0.191 6±0.059 0*
	10	o. p	100	0.210 1±0.070 1*
	10	o. p	200	0.201 4±0.080 3*

注: * 表示在 P<0.05 时,与阴性对照组相比为显著差异; ** 表示在 P<0.01 时,与阴性对照组相比为极显著差异。

表 5 CRP,CRPF1 和 CRPF2 对静止脾淋巴细胞的转化作用
Tab.5 Effects of CRP, CRPF1 and CRPF2 on proliferation of inactive spleen lymphocyte in vitro

组别	水平重复/次	质量浓度/(mg/mL)	OD ₅₇₀ (x±s)	刺激指数 SI
阴性对照组	3	—	0.080±0.002	—
CRP	3	0.02	0.103±0.002**	1.29
	3	0.04	0.090±0.001*	1.13
	3	0.08	0.102±0.006	1.28
CRPF1	3	0.02	0.108±0.002*	1.35
	3	0.04	0.115±0.005**	1.44
	3	0.08	0.116±0.002**	1.45
CRPF2	3	0.02	0.115±0.002**	1.44
	3	0.04	0.111±0.007*	1.39
	3	0.08	0.096±0.003**	1.20

注: * 表示在 P<0.05 时,与阴性对照组相比为显著差异; ** 表示在 P<0.01 时,与阴性对照组相比为极显著差异。

2.4 对小鼠腹腔 MΦ 吞噬中性红的影响

结果见表 6。从表 6 可以看出,环磷酸胺阳性对照组和阴性对照组相比,吞噬中性红的能力明显降低了,而总状蕨藻多糖 CRP 能显著增强小鼠腹腔 MΦ 吞噬中性红的能力,且具有剂量效应关系,从而表明:总状蕨藻多糖 CRP 可增强 MΦ 的吞噬功能。

表 6 总状蕨藻多糖对小鼠腹腔巨噬细胞 MΦ 吞噬中性红的影响

Tab. 6 Effect of CRP on mice peritoneal microphage MΦ eating neutral red

组别	水平 重复/次	质量浓度/ (mg/mL)	OD _{540nm} ($\bar{x} \pm s$)
阴性对照组	3	—	0.015±0.002
阳性对照组	3	0.08	0.008±0.001*
CRP	3	0.08	0.024±0.002**
	3	0.16	0.028±0.004*
	3	0.32	0.032±0.003**

注: * 表示在 $P<0.05$ 时,与阴性对照组相比为显著差异; ** 表示在 $P<0.01$ 时,与阴性对照组相比为极显著差异。

2.5 对小鼠腹腔巨噬细胞 MΦ 分泌 NO 的影响

实验结果见表 7。从表 7 可以看出,在 0.04~0.16 mg/mL 的剂量范围内,CRP、CRPF1 和 CRPF2 均可明显促进小鼠腹腔巨噬细胞 MΦ 分泌 NO,CRP 和 CRPF1 具有剂量关系,即随药物质量浓度升高,其促进作用增强,而 CRPF2 随着剂量的增加促进作用变化不明显。

表 7 总状蕨藻多糖对小鼠腹腔巨噬细胞 MΦ 分泌 NO 的影响

Tab. 7 Effect of CRP on mice peritoneal cavity microphage MΦ producing Nitro Oxide (NO)

组别	水平 重复/次	质量浓度/ (mg/mL)	OD _{540nm} ($\bar{x} \pm s$)
性对照组		—	0.226±0.001
阳性对照组	3	0.04	0.135±0.010**
	3	0.04	0.287±0.010*
CRP	3	0.08	0.430±0.081
	3	0.16	0.458±0.041**
	3	0.04	0.532±0.082*
CRPF1	3	0.08	0.549±0.037**
	3	0.16	0.829±0.072**
	3	0.04	0.447±0.043**
CRPF2	3	0.08	0.450±0.008**
	3	0.16	0.459±0.005**

注: * 表示在 $P<0.05$ 时,与阴性对照组相比为显著差异; ** 表示在 $P<0.01$ 时,与阴性对照组相比为极显著差异。

3 讨 论

体内实验结果证实,总状蕨藻粗多糖 CRP 对 S180 实体瘤的抑制作用与给药途径与多糖剂量有关,这与文献[15]报道一致。在注射和灌胃给药条件下,当多糖剂量分别为 25 mg/(kg·d) 和 100 mg/(kg·d) 时,其抑瘤率达到最大值,分别为 46.2% 和 58.2%。采用注射给药,总状蕨藻粗多糖 CRP 能显著增加荷瘤小鼠的脾指数,灌胃给药能增加荷瘤小鼠的碳廓清指数。体外结果证实,CRP 也能促进小鼠静止脾淋巴细胞的转化和小鼠腹腔巨噬细胞 MΦ 分泌 NO 的量,并能显著地提高小鼠腹腔巨噬细胞 MΦ 吞噬中性红的能力,这些事实表明,总状蕨藻粗多糖 CRP 的抗肿瘤作用很有可能是通过启动或增强机体的免疫功能完成的,这与大多数文献报道相符[1,13,14]。

动物实验显示,在注射给药条件下,当多糖剂量达到 100 mg/(kg·d) 时,2 d 后小鼠全部死亡,这说明总状蕨藻粗多糖 CRP 具有一定的细胞毒性,灌胃给药是否也存在细胞毒作用有待于证实。

化学分析结果显示,CRP、CRPF1 和 CRPF2 都是蛋白硫酸多糖聚合物,CRP、CRPF1 和 CRPF2 的硫酸基含量分别为 27.6%,45.6% 和 48.3%。研究表明,在一定范围内,硫酸多糖的抗肿瘤与免疫活性同其硫酸基质量分数具有正相关性[1]。作者从试验中观察到,CRP、CRPF1 和 CRPF2 均能促进静止淋巴细胞的增殖和增加小鼠腹腔巨噬细胞 MΦ 分泌 NO 的量,但对静止淋巴细胞的增殖的影响,CRP 与 CRPF1 随剂量增加变化不明显,而 CRPF2 却随剂量的增大反而降低。对小鼠腹腔巨噬细胞 MΦ 分泌 NO 的影响,CRP 和 CRPF1 具有量效关系而 CRPF2 随着剂量的增加促进作用变化不明显。这些事实似乎表明,当硫酸基质量分数在小于 46% 时,硫酸多糖的免疫功能与其质量分数有一定的正相关,大于 46% 时,则呈现负相关,不过,其真实性有待进一步研究。

采用细胞培养方法检测总状蕨藻粗多糖及其级分对正常小鼠巨噬细胞 MΦ 和静止淋巴细胞功能影响时使用了不同的剂量,这是根据预实验的结果设置的,由此也证实,总状蕨藻多糖的体外免疫活性也与其剂量具有密切的关系。

4 结 语

总状蕨藻粗多糖具有较显著的抑瘤作用和增

强小鼠免疫功能,但其效应与给药途径、剂量及多糖的硫酸基含量密切相关。总状海藻粗多糖其抗肿

瘤作用方式可能通过激活巨噬细胞和淋巴细胞而实现,具体作用机制及构效关系有待于进一步研究。

参考文献(References):

- [1] Gefei Zhou, YuePing Sun, Hua Xin, et al. In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*[J]. **Pharmacological Research**, 2004, 50: 47—53.
- [2] 中国科学院海洋研究所编. 中国经济海藻志[M]. 北京: 科学出版社, 1962: 50—51.
- [3] 古宏武, 赵素芬. 南海3种可食用绿藻化学成分及其营养评价[J]. 湛江海洋大学学报, 2005, 3(25): 19—23.
JI Hong-wu, ZHAO Shu-fen. Chemical constituent analysis of three kinds of edible green algae in South China Sea and their nutrition evaluation[J]. **J. of Zhanjiang Ocean University**, 2005, 3 (25): 19—23. (in Chinese)
- [4] 邵海艳, 吉宏武, 章超桦. 总状海藻多糖提取工艺的研究[J]. 湛江海洋大学学报, 2005, 2(26): 1—5.
SHAO Hai-yan, JI Hong-wu, ZHANG Chao-hua. Extraction technology of polysaccharides in *Caulerpa racemosa*[J]. **J Zhanjiang Ocean University**, 2005, 2(26): 1—5. (in Chinese)
- [5] 魏绍云, 齐惠玲, 王继伦, 等. 硫酸苯酚法测定白芨多糖[J]. 天津化工, 2000(3): 55—56.
WEI Shao-yun, QI Hui-ling, WANG Ji-lun, et al. Determination of polysaccharide contents in Baiji by using phenol-sulfate method [J]. **Tianjin Chemical Industry**, 2000(3): 55—56. (in Chinese)
- [6] 大连轻工业学院等合编, 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994: 152—214; 152—214.
- [7] 张惟杰主编, 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999: 91—92.
- [8] 柳忠旭, 战松梅, 姚如水, 等. 海生素注射液抗肿瘤作用的实验研究[J]. 中国海洋药物杂志, 2004, 23(5): 35—37.
LIU Zhong-xu, ZHAN Song-mei, YAO Ru-shui, et al. Study on anti-tumor effect of Haishengsu injection [J]. **Chinese Journal of Marine Drugs**, 2004, 23(5): 35—37. (in Chinese)
- [9] 陈宇. 灵芝多糖调节免疫作用的实验[J]. 江苏调味副食品, 2005, 2(22): 12—18.
CHEN Yu. Test on the immunity-moderating function of *Ganoderma Liciudm* polysaccharide[J]. **Jiangsu Condiment and Subsidiary Food**, 2005, 2(22): 12—18. (in Chinese)
- [10] 宋锦平, 钟萍, 汪涛, 等. 测定淋巴细胞增殖的MTS和XTT比色法的建立[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2001, 17(3): 292—295.
SONG Jin-ping, ZHONG Ping, WANG Tao, et al. Establishment of MTS and XTT colorimetric assay for determination of lymphocytic proliferation[J]. **J Cellular and Molecular Immunology**, 2001, 17(3): 292—295. (in Chinese)
- [11] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1420—1456.
- [12] 赵卫红. 一氧化氮与免疫调节[J]. 上海免疫学杂志, 1996, 16(6): 373—395.
ZHAO Wei-hong. NO and immunity moderating effect[J]. **J. Shanghai Immunology**, 1996, 16 (6): 373—395. (in Chinese)
- [13] Chang H M. Advance in Chinese Med Materia Research. Singaport: World Sci. Publ Co., 1985: 159.
- [14] 李芹, 王睿. 多糖抗肿瘤作用研究新进展[J]. 中国药物应用与监测. 2005, 2: 58—61.
LI Qin, WANG Rui, A new advance of anti-tumor effect of polysaccharide[J]. **China Pharmaceutical Application and Survey**, 2005, 2: 58—61. (in Chinese)

(责任编辑: 李春丽)