

酶法制备壳寡糖及其抗肿瘤活性评价

季珂¹, 李恒^{*1}, 龚劲松¹, 耿燕¹, 丁振中², 蒋敏¹, 许正宏³, 史劲松¹

(1. 江南大学药学院, 江苏无锡 214122; 2. 扬州日兴生物科技股份有限公司, 江苏高邮 225601; 3. 江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214122)

摘要:为进一步分析壳寡糖抗肿瘤活性及其机制, 采用酶法制备工艺获取组分清晰的壳寡糖, 优化酶解条件为酶解时间 4 h、加酶量 120 U/g, 结合乙醇沉淀、超滤和纳滤联用的工艺获得聚合度 2~4 的壳寡糖。比较评价壳寡糖及其与阿霉素联用对 3 种肿瘤细胞的抑制效果, 其中作用最为明显的人乳腺癌 MDA-MB-231 的细胞生存率降低 20%。利用细胞迁移实验和激光共聚焦分析机制, 得出壳寡糖可抑制 MDA-MB-231 细胞迁移并促进阿霉素入核。由此说明, 壳寡糖可增强 MDA-MB-231 细胞对阿霉素的敏感性。

关键词: 壳寡糖; 酶解; 抗肿瘤; 阿霉素; 细胞迁移

中图分类号: R 96 文章编号: 1673-1689(2021)06-0093-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.06.012

Preparation of Chitosan Oligosaccharides by Enzymatic Hydrolysis and Evaluation of Antitumor Activities

Ji Ke¹, Li Heng^{*1}, Gong Jinsong¹, Geng Yan¹, Ding Zhenzhong²,
Jiang Min¹, Xu Zhenghong³, Shi Jinsong¹

(1. School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Yangzhou Rixing Bio-Tech Co., Ltd., Gaoyou 225601, China; 3. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: To further analyze the antitumor activities and mechanism of chitosan oligosaccharides, enzymatic hydrolysis method was applied to obtain chitosan oligosaccharides with clear composition. The optimized enzymatic hydrolysis conditions were 4 h of reaction time and 120 U/g for the ratio of enzyme and substrate dosage. Chitosan oligosaccharides with degree of polymerization 2 to 4 were obtained by ethanol precipitation, ultrafiltration and nanofiltration. Comparative evaluation of inhibitory effect on three tumor cell lines was conducted with chitosan oligosaccharides and its combination with doxorubicin. The most significant effect was observed on the cell viability of human breast cancer MDA-MB-231 with 20% reduction. Cell migration assay and confocal laser scanning microscopy (CLSM) were used for mechanism analysis, which showed that chitosan oligosaccharides could inhibit cell migration and facilitate doxorubicin to enter the nucleus in MDA-MB-231 cells. The results implied chitosan oligosaccharides could enhance the sensitivity of MDA-MB-231 cells to doxorubicin.

Keywords: chitosan oligosaccharides, enzymatic hydrolysis, antitumor, doxorubicin, cell migration

收稿日期: 2020-03-25

基金项目: 国家轻工技术与工程一流学科自主课题资助项目(LITE2018-18); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(JUSRP 22047); 宁夏回族自治区特色农产品生物加工创新团队项目(kjt201701)。

* 通信作者: 李恒(1983—), 女, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为功能糖制造与评价研究。E-mail: liheng@jiangnan.edu.cn

壳寡糖(chitosan oligosaccharides, COS)是一种海洋来源的相对分子质量小于3 000的低聚糖。目前,壳寡糖大都通过化学法(包括酸解法和氧化法)、物理法^[1]以及酶解法(纤维素酶^[2]或壳聚糖酶)降解得到。基于壳聚糖酶的专一性与高效性,用其制备壳寡糖的方法具有良好的应用优势和发展潜力^[3]。

COS相对分子质量低的特性不但改善了其原料水溶性差的问题,同时其也具有广泛的生物功能,包括抗炎^[4]、抗菌^[5]、抗氧化^[6]、降糖^[7]及神经保护等。近年来,针对COS抗肿瘤活性的研究逐渐成为热点。

研究表明,在多株肿瘤细胞(胃癌细胞、肾癌细胞、肺癌细胞、乳腺癌细胞和结肠癌细胞等)中,COS均能达到半数致死的效果^[8]。相对分子质量和去乙酰度影响其抗肿瘤活性,且低相对分子质量表现出更为明显的效果^[9]。在作用机制探索方面,COS可通过诱导HeLa和A549细胞的自噬性死亡而抑制细胞增殖^[10],对A549细胞,COS还可明显降低细胞线粒体膜电位水平而促进细胞凋亡^[11]。此外,COS可通过上调*p21*,下调*PCNA*、*cyclin A*和*cdk-2*基因抑制HepG2细胞的DNA合成速率,抑制细胞增殖^[12];通过诱导SW480细胞阻滞在G2/M期而抑制细胞增殖^[13]。由此可见,COS对不同肿瘤细胞的作用和机制并不完全相同,其对肿瘤细胞的作用还有待进一步研究。

为了进一步了解COS潜在的抗肿瘤作用,首先以壳聚糖酶酶解法自行制备COS,建立基于分级处理的COS优化制备工艺,将获得的低相对分子质量COS产物对不同肿瘤细胞的抗肿瘤活性进行评价初筛,进而在作用最为显著的人乳腺癌MDA-MB-231细胞中进行量效关系评价及初步机制探讨。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

壳聚糖酶:由作者所在实验室自行构建的重组菌*E. coli* Rosetta-gami(DE3)/*ChiE*发酵产酶^[5],经纯化浓缩后得到壳聚糖酶酶液,酶活为2 260 U/mL;COS、氨基葡萄糖、无水乙醇、亚硫酸氢钠、氢氧化钠、酒石酸钾钠、3,5-二硝基水杨酸、冰醋酸、Tris:购自国药集团上海化学试剂公司;盐酸阿霉素:购于上海麦克林生化科技有限公司;DMEM、RPMI 1640基础培养基、FBS胎牛血清、抗生素、胰酶、Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS):购于

美国Gibco公司;纳滤膜:购于美国陶氏化学公司;Transwell小室、Cell Counting Kit-8 (CCK-8)试剂盒:购于美国Thermo Fisher公司。

质量分数1%的胶体COS溶液:取1 g COS粉末加入少量去离子水溶胀,加入30 mL的0.4 mol/L的乙酸溶液搅拌至COS粉末完全溶解,再以2 mol/L的NaOH调节pH至6.0,加水定容至100 mL。

DNS试剂:准确称取244.4 g酒石酸钾钠加到500 mL煮沸的蒸馏水中溶解,然后依次加入3,5-二硝基水杨酸6.3 g、NaOH 21 g、苯酚5 g和亚硫酸氢钠5 g,搅拌至溶解后定容至1 L,棕色瓶中贮存,一周后可使用。

1.2 仪器与设备

pH计:上海Mettler-Toledo公司产品;紫外分光光度计:上海尤尼可仪器有限公司产品;数显恒温水浴锅:金坛区富华电器有限公司产品;高速冷冻离心机:日本日立公司产品;超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱联用仪:美国沃特世公司产品;酶标仪:上海精密科学仪器有限公司产品;细胞培养箱:美国Thermo Fisher公司产品;全自动倒置荧光显微镜(共聚焦超分辨成像系统):日本Nikon公司产品。

1.3 方法

1.3.1 COS的酶法制备 探究酶解时间对酶解效果的影响时,反应体系包含制得的质量分数1% COS溶液10 mL(乙酸钠缓冲液,pH 6.0)和0.3 mL酶液,50 °C下酶解8 h,间隔1 h取样测定还原糖含量。

探究加酶量对酶解效果的影响时,向质量分数1%的COS溶液中分别加入壳聚糖酶60、90、120、150、180 U/g。体系在50 °C下酶解4 h,反应结束后测定还原糖含量。

1.3.2 DNS法测定还原糖质量浓度 以氨基葡萄糖为标样,制作标准曲线:准确称取10 mg氨基葡萄糖,溶解定容至100 mL,再分别吸取0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mL,以去离子水补至1 mL,各加入1 mL DNS,沸水浴5 min,冷却定容至5 mL,于540 nm处测定吸光度。空白组为同样步骤下1 mL去离子水。

分别取1 mL酶解产物,加入1 mL DNS溶液,沸水浴中反应5 min,迅速冷却至室温,在540 nm处测量吸光度。去离子水作为空白对照。

1.3.3 COS的制备工艺 最适酶解条件下得到的

壳寡糖酶解液,经 100 °C 水浴 15 min 后 10 000 r/min 离心除酶。上清液加入体积分数 70% 乙醇后 4 °C 过夜。离心收集的上清液依次经截留相对分子质量 3 000 的膜超滤留取滤过液,经截留相对分子质量 300 的膜纳滤收取截留液后,浓缩并冻干得到 COS 样品。

1.3.4 液相色谱-质谱联用法(Liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)测定 COS 样品成分 液相色谱条件:色谱仪 Waters acquity UPLC,检测器 Waters acquity PDA,柱温 45 °C,流量 0.3 mL/min,进样量 10 μL。质谱条件:电喷雾电离(ESI⁺),离子源温度 100 °C,脱溶剂气温度 400 °C,扫描范围:m/z 20~2 000。

1.3.5 细胞培养 HepG2 细胞和 PATU-8988 细胞培养在含体积分数 90% RPMI1640 基础培养基、体积分数 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/L 链霉素的培养基内;MDA-MB-231 细胞基础培养基为 DMEM,其他条件同上。于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 的细胞培养箱中贴壁培养,每 3 d 传一代。

1.3.6 CCK-8 法测定细胞生存率 取汇合度 90% 的细胞,5×10³ 个/mL 的细胞浓度铺板至 96 孔板。考察 1~1 000 μg/mL 质量浓度范围内 COS 对 3 株肿瘤细胞作用 24 h 的生存率影响。COS 与阿霉素(DOX)复合给药时,首先确定 DOX 质量浓度为细胞生存率为 50% 所对应的质量浓度(IC₅₀),即 2.5 μg/mL。以质量浓度为 1、10、100、1 000 μg/mL 的 COS 作用 6 h 后给药 DOX 孵育 24 h。之后每孔加 10 μL CCK-8,孵育 1.5 h 后测 A_{450nm}。阳性对照组为 DOX,空白组为培养基,计算细胞生存率,公式如下:

$$V = \frac{A_P - A_B}{A_C - A_B} \times 100\%$$

式中:V 为细胞生存率,%;A_P 为药物组在 450 nm 处吸光度;A_B 为空白组在 450 nm 处吸光度;A_C 为对照组在 450 nm 处吸光度。

1.3.7 细胞迁移实验 汇合度 90% 的 MDA-MB-231 细胞消化后,以饥饿培养基重悬,以每孔 1×10⁵ 个接种于 24 孔板的小室内。细胞完全贴壁后加入 500 μg/mL COS 培养 24 h,吸去培养基。多聚甲醛固定 30 min,DPBS 洗 3 遍,结晶紫染色 30 min。用流水冲至孔板无色,将小室取出,擦净内部底面后倒置拍照。之后将小室放入 24 孔板中,每孔加 1 mL 体积分数 33% 冰醋酸,振荡,取 200 μL 液体测 A_{570nm}。

1.3.8 激光共聚焦检测细胞对 DOX 的摄取 将对数生长期的 MDA-MB-231 细胞以 1×10⁴ 个/mL 的细胞浓度铺板至激光共聚焦专用培养皿。联用组加入 500 μg/mL COS 1 mL,作用 4 h 后再加入 1 mL 含有 2 倍终质量浓度 DOX 培养基,对照组为 DOX 单独给药组。培养箱中继续孵育 1、3、5 h。吸去培养基,DPBS 洗 1 遍,经多聚甲醛固定和 DAPI 染色各 20 min 后,DPBS 洗 3 遍。包裹锡箔纸,避光拍照。

1.3.9 统计学分析 数据采用平均值±标准差表示。单因素数据采用单向方差分析法分析。显著性差异表示为 *P<0.05,**P<0.01,***P<0.001。用 GraphPad Prism 软件制图分析。

2 结果与讨论

2.1 COS 的酶法制备

考察酶解时间、加酶量对壳聚糖酶解的影响。如图 1 所示,还原糖生成量随酶解时间延长而上升。酶解 4 h 内,还原糖含量快速增加,4 h 之后趋于平稳,最佳酶解时间选定 4 h。由图 2 可知,酶解过程中,还原糖生成量随着加酶量的升高而逐渐增大。在加酶量为 120 U/g 时,还原糖生成量近最大值后稳定。继续增加酶量未能使还原糖质量浓度显著增加。最优加酶量选择为 120 U/g。

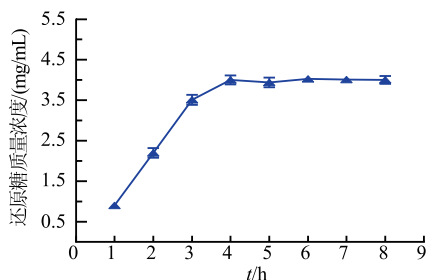


图 1 酶解时间对 COS 水解效果的影响

Fig. 1 Effect of time on chitosan hydrolysis

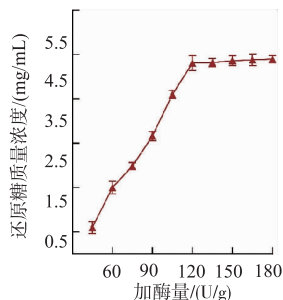


图 2 加酶量对 COS 水解效果的影响

Fig. 2 Effect of ratio of enzyme and substrate dosage on chitosan hydrolysis

对酶解液逐步采用乙醇沉淀、超滤、纳滤进行分级分离,工艺流程如图3,最终得到COS产物,得率约41%。

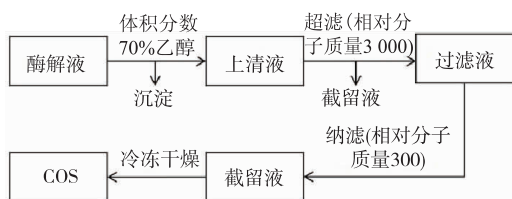


图3 COS的制备工艺

Fig. 3 Protocol of COS preparation

2.2 COS组成分析

采用LC-MS法分析COS产物组成。液相色谱

图中对应3个保留时间有吸收峰(见图4(a)),分别是5.21、6.90、8.36 min。分别对其进行质谱分析,在ESI⁺模式下,质荷比 m/z 341.1、363.1(见图4(b))对应[壳二糖+H]⁺、[壳二糖+Na]⁺的分子离子峰,502.2、524.2(见图4(c))对应[壳三糖+H]⁺、[壳三糖+Na]⁺的分子离子峰,663.3、685.3(见图4(d))对应[壳四糖+H]⁺、[壳四糖+Na]⁺的分子离子峰。依此判断所得COS产物的主要组分为壳二糖、壳三糖和壳四糖。进一步通过峰面积积分计算可知,所得COS组分中壳二糖、壳三糖和壳四糖相对含量的比例约为3:5:2。

通过自行构建的壳聚糖酶酶解,以及多级分级处理工艺获得了低相对分子质量的COS,为后续抗肿瘤活性的分析提供了更为明确和简单的物质基础。

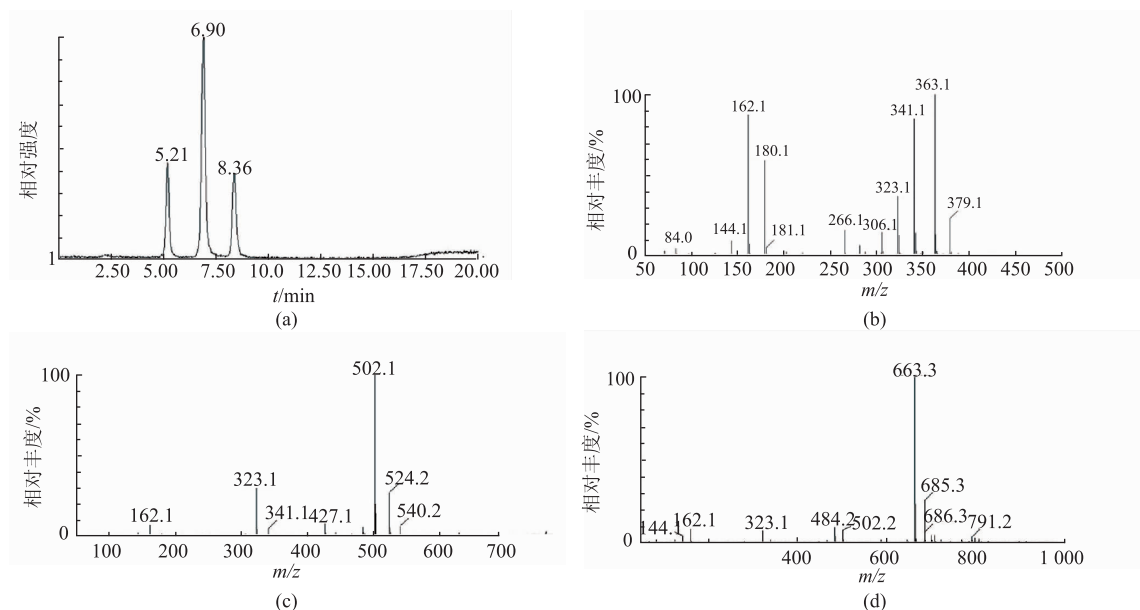


图4 COS的液相色谱-质谱图

Fig. 4 Liquid chromatography-mass spectrometry profile of COS

2.3 COS抗肿瘤作用评价

2.3.1 COS对不同肿瘤细胞的抑制活性 研究COS对人肝癌细胞 HepG2、人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和人胰腺癌细胞 PATU-899 生长的影响(见图5)。在给药质量浓度0~1 000 $\mu\text{g/mL}$ 情况下,未观察到3株肿瘤细胞有生长抑制现象,可以认为低质量浓度的COS对肿瘤细胞生长影响甚微。

类似的结果在前期A549和HCT-116细胞的研究中也有报道。4种来源不同的COS作用时,高质量浓度(1.25~20 mg/mL)明显抑制细胞增长,而低质量浓度(0.078 125~1.25 mg/mL)呈现负抑制作用^[8]。

其中相对分子质量在1 500~2 000的COS样品即使在高质量浓度(1.25~20 mg/mL)下对A549细胞依然无细胞毒性。综观已报道的研究结果,多数报道可显著抑制细胞生长的研究中使用的COS质量浓度较高,如相对分子质量1 000~3 000的COS在质量浓度5.0 mg/mL 时对MDA-MB-231细胞抑制效果最佳^[14];2~5 mg/mL 的COS对HepG2细胞抑制率有剂量依赖关系^[15]。COS的肿瘤抑制活性因自身相对分子质量、给药质量浓度以及评价用细胞株的不同而各异,因此有必要进行更为细致地考察和分析。

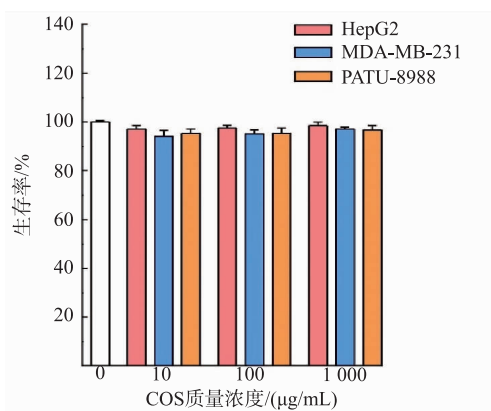


图5 COS对肿瘤细胞生存率的影响

Fig. 5 Effect of COS administrated against various tumor cell lines

2.3.2 COS联合DOX对不同癌细胞的抑制活性

近期研究发现,在多株骨肉瘤细胞中,甘露糖与DOX或顺铂联用可通过下调Bcl-2家族的Mcl-1和Bcl-X_L蛋白质表达水平而增强肿瘤细胞内在凋亡途径,提高抗肿瘤作用^[16]。DOX是治疗乳腺癌、肝癌等实体瘤的一种常用化疗药物^[17]。DOX的非靶向性可对正常细胞造成损伤^[18]。因此,新的方案建议可与其他药物或天然产物联用降低用量以减少其副作用^[19]。受此启示,将COS与DOX复合给药以评价其效果。如图6所示,相较于DOX组50%的细胞生存率,COS仅在人乳腺癌细胞MDA-MB-231上表现出增强DOX抑制作用的效果,且在较低质量浓度下细胞生存率可下降20%~30%。由此选定MDA-MB-231细胞为后续实验的模型,进一步探讨复合给药的效果和机制。

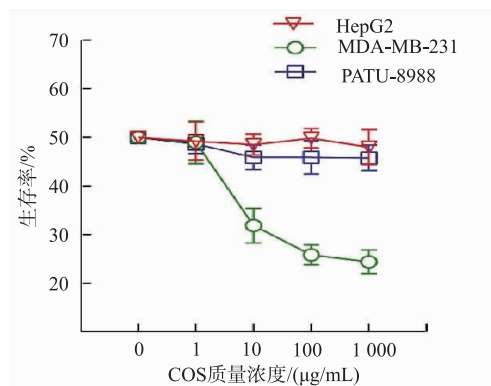


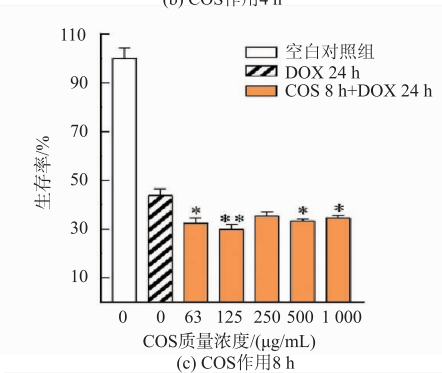
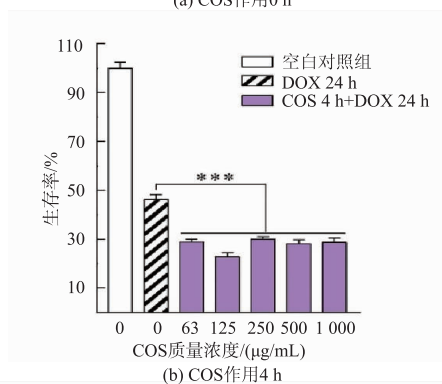
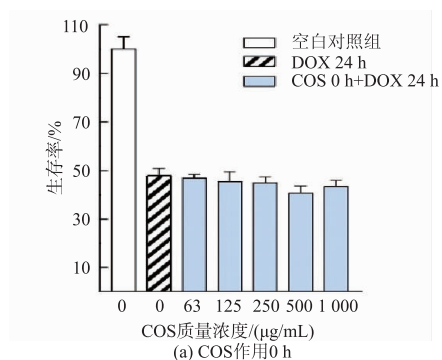
图6 复合给药对肿瘤细胞生存率的影响

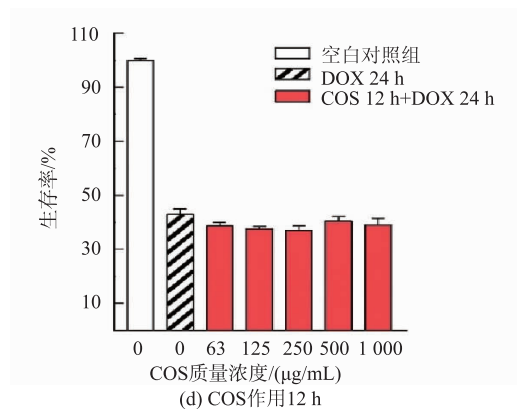
Fig. 6 Effect of combination treatment on tumor cell viability

2.3.3 COS作用时间对其联合DOX抑制MDA-MB-231细胞生存率的影响

在MDA-MB-231细

胞中,进一步分析COS作用时间对细胞生存率的影响。由图7所示,与初始状态下的细胞生存率相比(见图7(a)),COS短时间作用后细胞生存率显著降低,表现出增强细胞对DOX敏感性的能力。其中,给药时间4h条件下(见图7(b)),COS质量浓度在0~125 µg/mL时细胞生存率呈质量浓度依赖性下降,250~1000 µg/mL时趋于平稳,与阳性药物DOX组相比均有极大的显著性差异($***P<0.001$);作用8h(见图7(c)),COS质量浓度在0~125 µg/mL时细胞生存率约下降20%,与DOX组相比有较大显著性差异($**P<0.01$),增大质量浓度在250~1000 µg/mL时有显著性差异($*P<0.05$)。继续延长时间至12h并不能降低细胞的生存率(见图7(d))。COS在MDA-MB-231细胞中增强其对阿霉素敏感性的机制有待进一步分析。





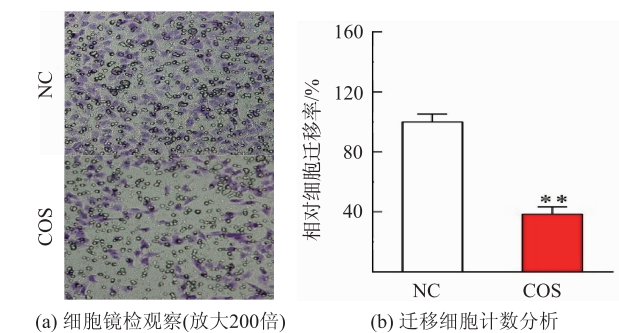
相较于阳性对照组, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图7 COS作用时间对MDA-MB-231细胞生存率的影响
Fig. 7 Effect of COS treated time on MDA-MB-231 cells viability

2.4 COS联合DOX抑制MDA-MB-231细胞生存率的机制初探

2.4.1 COS对MDA-MB-231细胞迁移能力的影响

考虑到MDA-MB-231细胞的高迁移特性,首先以小室迁移实验体外考察COS能否抑制肿瘤细胞扩散。如图8所示,500 $\mu\text{g/mL}$ COS作用后,相较于空白对照组(NC),COS组的细胞迁移数量明显减少(** $P < 0.01$)。说明COS可有效抑制MDA-MB-231细胞迁移,这与Nam等^[20]报道的研究现象一致。此外,COS抑制肿瘤细胞迁移的现象也存在于成纤维HT1080细胞^[21]和MCF-10A乳腺上皮细胞^[22]。由此确认了COS抑制肿瘤细胞迁移的作用。



(a) 细胞镜检观察(放大200倍)

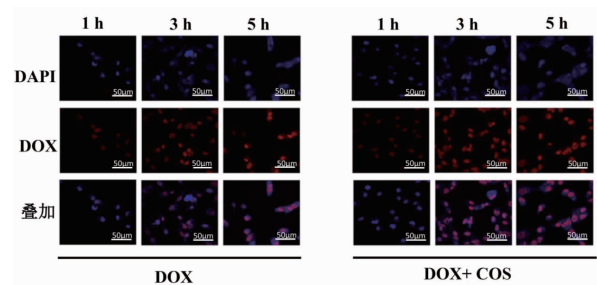
(b) 迁移细胞计数分析

图8 COS抑制MDA-MB-231细胞的小室迁移分析
Fig. 8 Transwell migration assay of MDA-MB-231 cells with COS

2.4.2 COS对DOX入核的影响 DOX作用于肿瘤细胞时,作为拓扑异构酶II抑制剂,进入细胞核干扰DNA复制而发挥作用^[21]。借助DOX自带红色荧光的特点,通过激光共聚焦显微镜观察复合COS给药时,MDA-MB-231细胞对DOX的摄取效果,结果

如图9所示。随着DOX作用时间的延长,无论是否给药COS,细胞内DOX荧光强度均呈时间依赖性增强。进一步与复合给药相比,1h时,两组都观察到轻微的DOX入核量,且差异不明显。而在3h时,COS与DOX复合给药组较DOX单独给药组显示出更强的核内红色荧光。5h时,两组的细胞核内红色荧光均达到最强但无显著差异。由此说明,COS具有促进DOX快速富集于MDA-MB-231细胞核的作用。推测这一过程可能与COS带正电荷有关,由于静电作用靶向改变了肿瘤细胞膜表面负向电子流,从而影响信号传导通路^[23]。此外,COS的这种增强DOX诱导细胞凋亡的作用也在负载DOX的含COS纳米材料中被发现和报道^[24]。

总结以上结果可以推测,在MDA-MB-231细胞中,COS与DOX的复合给药通过抑制肿瘤细胞迁移,并促进阳性药物DOX的入核而发挥抗肿瘤活性。二者的联用具有一定协同增效作用。



比例尺为50 μm 。

图9 MDA-MB-231细胞对DOX的摄取
Fig. 9 Uptake of DOX incubation with MDA-MB-231 cells

3 结语

COS具有良好的生物相容性和广泛的生物学活性。COS的抗肿瘤作用是研究的热点,但其作用与机制因糖的组成以及细胞种类等而各异,有必要进一步在特定细胞上探讨COS的作用与机制。

基于前期在细胞水平发现的糖与化疗药物联用提高药效的研究结果^[6],本研究中在酶法制备得到聚合度2~4的低相对分子质量COS的基础上,采用COS与DOX复合给药的方式评价COS的抗肿瘤作用。体外抗肿瘤活性评价结果显示,单独给药低质量浓度COS对所选用的3株肿瘤细胞并无显著抑制效果;当与DOX复合给药时,低质量浓度COS即可显著降低人乳腺癌MDA-MB-231细胞生存率。进一步的机制分析推测了COS可通过抑制人

乳腺癌细胞迁移,同时促进 DOX 入核而增强肿瘤细胞对化疗药的敏感性,发挥协同抗肿瘤特性。这为功能糖等膳食补充剂与化疗药物联用的治疗方案提供了数据参考和理论支撑。

由于 COS 的抗肿瘤作用与机制较为复杂,受糖

本身性质以及细胞株影响较大,未来对于 COS 抗肿瘤作用的深入解析还有待从特定糖的结构、糖与细胞作用的靶点、可能影响的关键基因和信号通路等分子水平进一步阐释和验证。

参考文献:

- [1] XING R, LIU Y L, LI K C, et al. Monomer composition of chitooligosaccharides obtained by different degradation methods and their effects on immunomodulatory activities[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2017, 157:1288-1297.
- [2] TEGL G, OHLKNECHT C, VIELNASCHER R, et al. Commercial cellulases from *Trichoderma longibrachiatum* enable a large-scale production of chito-oligosaccharides[J]. **Pure and Applied Chemistry**, 2016, 88(9):865-872.
- [3] 费忠, 李恒, 龚劲松, 等. 基于宏基因组学壳聚糖酶挖掘研究[J]. *应用与环境生物学报*, 2014, 20(4):597-601.
- [4] AZUMA K, OSAKI T, MINAMI S, et al. Anticancer and anti-inflammatory properties of chitin and chitosan oligosaccharides[J]. **Journal of Functional Biomaterials**, 2015, 6(1):33-49.
- [5] DUTTA J, TRIPATHI S, DUTTA P K. Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligosaccharides; a systematic study needs for food applications[J]. **Food Science and Technology International**, 2012, 18(1):3-34.
- [6] NGO D H, KIM S K. Antioxidant effects of chitin, chitosan, and their derivatives[J]. **Advances in Food and Nutrition Research**, 2014, 73:15-31.
- [7] KARADENIZ F, KIM S K. Antidiabetic activities of chitosan and its derivatives; a mini review[J]. **Advances in Food and Nutrition Research**, 2014, 73:33-44.
- [8] PAN Z, XIN Y, YANXIN Z, et al. Antitumor effects of orally and intraperitoneally administered chitosan oligosaccharides (COSs) on S180-bearing/residual mouse[J]. **Journal of Food Science**, 2016, 81(12):H3035-H3042.
- [9] PARK J K, CHUNG M J, CHOI H N, et al. Effects of the molecular weight and the degree of deacetylation of chitosan oligosaccharides on antitumor activity[J]. **International Journal of Molecular Sciences**, 2011, 12(1):266-277.
- [10] 周艳芬, 韩绍芳, 倪志华, 等. 壳寡糖对 HeLa 细胞和 A549 细胞自噬性死亡的影响[J]. *科学技术与工程*, 2015, 15(7):24-29.
- [11] 李贤, 周长忍, 赵名艳, 等. 壳寡糖通过降低线粒体膜电位促进 A549 细胞凋亡[J]. *功能材料*, 2011, 42(4):635-638.
- [12] SHEN K T, CHEN M H, CHAN H Y, et al. Inhibitory effects of chitooligosaccharides on tumor growth and metastasis[J]. **Food and Chemical Toxicology**, 2009, 47(8):1864-1871.
- [13] HAN F S, YANG S J, LIN M B, et al. Chitooligosaccharides promote radiosensitivity in colon cancer line SW480[J]. **World Journal of Gastroenterology**, 2016, 22(22):5193-5200.
- [14] NAM K S, SHON Y H. Effect of chitosan oligosaccharides on proliferation of breast cancer cells, aromatase activity, and nitric oxide production[J]. **Journal of Chitin and Chitosan**, 2008, 13(4):215-218.
- [15] HAN F S, CUI B H, YOU X F, et al. Anti-proliferation and radiosensitization effects of chitooligosaccharides on human lung cancer line HepG2[J]. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 2015, 8(9):742-746.
- [16] GONZALEZ P S, O'PREY J, CARDACI S, et al. Mannose impairs tumour growth and enhances chemotherapy[J]. **Nature**, 2018, 563(7733):719-723.
- [17] BISHT S, MAITRA A. Dextran-doxorubicin/chitosan nanoparticles for solid tumor therapy[J]. **Wiley Interdisciplinary Reviews—Nanomedicine and Nanobiotechnology**, 2009, 1(4):415-425.
- [18] 刘晓, 邵方元, 陈宏远. 阿霉素抗肿瘤分子机制的研究进展[J]. *中国医药生物技术*, 2012, 7(5):373-375.
- [19] PRSA P, KARADEMIR B, BICIM G, et al. The potential use of natural products to negate hepatic, renal and neuronal toxicity induced by cancer therapeutics[J]. **Biochemical pharmacology**, 2020, 173:113551.
- [20] NAM K S, SHON Y H. Suppression of metastasis of human breast cancer cells by chitosan oligosaccharides[J]. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2009, 19(6):629-633.
- [21] VAN TA Q, KIM M M, KIM S K. Inhibitory effect of chitooligosaccharides on matrix metalloproteinase-9 in human fibrosarcoma cells(HT1080)[J]. **Marine Biotechnology**, 2006, 8(6):593-599.
- [22] XU Q S, WANG W J, QU C, et al. Chitosan oligosaccharides inhibit epithelial cell migration through blockade of N-acetylglucosaminyltransferase V and branched GlcNAc structure[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2017, 170:241-246.
- [23] HUANG R, MENDIS E, RAJAPAKSE N, et al. Strong electronic charge as an important factor for anticancer activity of chitooligosaccharides(COS)[J]. **Life Sciences**, 2006, 78(20):2399-2408.
- [24] 刘欢, 江静怡, 王丽灵, 等. 阿霉素壳寡糖纳米粒的制备及体外抗肿瘤研究[J]. *中国生化药物杂志*, 2015, 35(1):25-29.