

桦褐孔菌多糖 IOP3a 体内抗肿瘤活性及其机制

陈义勇, 黄友如, 刘晶晶, 郑丽雪, 徐兵

(常熟理工学院 生物与食品工程学院, 江苏 常熟 215500)

摘要: 通过建立裸鼠淋巴瘤细胞 Jurkat 模型, 对桦褐孔菌多糖 IOP3a 的体内抗肿瘤活性及其机制进行了研究。实验结果表明, IOP3a 高、中剂量组瘤重与阴性对照组相比均有显著性差异 ($p < 0.05$), 肿瘤抑制率分别为 69.28% 和 57.62%, 具有明显的剂量-效应关系。随着剂量的增加, 脾脏指数有逐步增加的趋势, 具有升高裸鼠 WBC 和淋巴细胞的功能, 同时对巨噬细胞产生的细胞因子 TNF- α 和 L-1 β 均有明显的促进作用。组织病理学观察表明, IOP3a 可使肿瘤组织中呈现明显的肿瘤坏死灶, 瘤组织出现坏死的现象。免疫组化表明, IOP3a 通过促进肿瘤组织细胞中 Bax 蛋白表达、抑制 Bcl-2 表达起到抗肿瘤作用。

关键词: 桦褐孔菌多糖; 体内抗肿瘤; 活性; 机制

中图分类号: R 979.1 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2013)09—0983—06

Studies on Anti-Tumor Activity in Vivo and Its Mechanism of A Polysaccharide Named IOP3a From *Inonotus obliquus*

CHEN Yi-yong, HUANG You-ru, LIU Jing-jing, ZHENG Li-xue, XU Bing

(School of Biology and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China)

Abstract: The aim of this manuscript was to check the antitumor activity of IOP3a and to elucidate the anticancer mechanism in vivo with cancer nude mice transplanted jurkat tumor as model.. it was found that tumor weight of high-dose and middle -dose had significant differences ($p < 0.05$), when compared with the control group. Inhibition rate of tumor was 69.28% and 57.62%, respectively, which had an excellent dose-response relationship. IOP3a could increase the spleen index, white blood cell and lymphocyte with the increase of dosage. IOP3a promoted generation of TNF- α and L-1 β from macrophage of nude mouse obviously. The histopathology of tumors indicated that the tumor cells from the different IOP3a-treated groups had clear necrosis areas in tumor tissues. The anti-tumor mechanism of IOP3a in vivo was that IOP3a could improve the expression of tumor gene Bax and inhibit the the expression of tumor gene Bcl-2 with immuno-histochemistry.

Keywords: *Inonotus obliquus* polysaccharide, anti-tumor in vivo, activity, mechanism

收稿日期: 2013-05-19

基金项目: 2012 年江苏省高校自然科学基金项目(12KJB550001); 苏州市 2011 年应用基础研究计划(农业)项目(SYN201104)。

作者简介: 陈义勇(1974—), 男, 河南西平人, 工学博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事食品科学与天然活性成分方面的研究。

E-mail: chenyyxp@126.com

桦褐孔菌(*Inonotus obliquus*)是一种生长在寒带的药用真菌,寄生于白桦树、银桦等树干或树皮上,主要生长区域为北美、波兰、俄罗斯、中国的黑龙江和吉林、日本北海道等国家和地区^[1]。国内陈义勇等^[2-3]研究表明,桦褐孔菌多糖对 Jurkat 荷瘤具有抗肿瘤活性;金光等^[4]研究表明,桦褐孔菌多糖对小鼠 S₁₈₀ 肉瘤具有较强的抑制作用;张慧丽等^[5]研究发现,桦褐孔菌多糖对肝癌 SMMC7721 细胞株增殖具有抑制作用,且表现出浓度相关性。国外 Kim 等^[6-7]认为,桦褐孔菌多糖对 BDF1 鼠黑色素瘤生长有明显抑制作用,桦褐孔菌菌核多糖直接通过抑制肿瘤细胞生长和蛋白质合成而产生抗癌作用。通过查阅文献发现,桦褐孔菌多糖的抗肿瘤活性主要停留在粗多糖研究层面,而桦褐孔菌多糖单一组分的抗肿瘤活性及其作用机制还未见报道。

笔者前期分离得到一个桦褐孔菌多糖单一组分 IOP3a,经过活性筛选,发现 IOP3a 具有较强的体外抗肿瘤活性,但是体内抗肿瘤活性及其作用机制还需进一步研究。所以作者以 IOP3a 为研究对象,通过建立移植型裸鼠淋巴瘤细胞 Jurkat 模型,通过研究荷瘤裸鼠的指标(如移植瘤体积变化、抑瘤率、脾指数、外周血白细胞和淋巴细胞、巨噬细胞产生细胞因子 TNF- α 和 L-1 β)以及裸鼠瘤块组织病理学观察,探讨 IOP3a 的体内抗肿瘤活性,通过蛋白质印迹技术检测 IOP3a 处理后不同组荷瘤裸鼠的肿瘤组织中抑癌基因 Bcl-2 蛋白和促癌基因 Bax 蛋白的表达情况,分析桦褐孔菌多糖 IOP3a 可能的体内抗肿瘤作用机制,旨在为其治疗肿瘤及其开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 桦褐孔菌多糖 IOP3a 样品 本实验室前期分离纯化自制,经 HPLC 测定 IOP3a 相对分子质量为 44265 Da,单糖由鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖组成,其摩尔比为 2.5:4.6:1:2.6。

1.1.2 Jurkat 细胞 人 T 淋巴细胞白血病细胞株,购自中国人民解放军军事医学科学院。

1.1.3 Balb/c-nu/nu 裸鼠 购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,许可证号:SCXK-(军)2002-001。

1.2 主要试剂

5-氟尿嘧啶(5-Fu),上海利铂化学技术有限公司提供;RPMI1640 培养液,北京万域美澜科技有限公司提供;白细胞介素-1 β (L-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)检测试剂盒,上海酶联生物科技有限公司提供;鼠抗人 Bcl-2,上海亿欣生物科技有限公司提供;Bax 单克隆免疫组化试剂盒,上海谷研科技有限公司提供;辣根酶标记的山羊抗兔 IgG,杰兰尔试剂上海分公司提供;羊抗人 β -肌动蛋白多克隆抗体,上海今迈生物科技有限公司提供;二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒,天津百浩生物科技有限公司提供;其它试剂均为国产分析纯。

1.3 主要仪器

RM2135 石蜡切片机,德国 Leica 公司产品;DYCZ-25D 型电泳仪,北京市六一仪器厂产品;36XB 光学显微镜,上海光学仪器厂产品;LH750 全自动血细胞分析仪,美国 Beckman Coulter 公司产品;GelDoc-IT TS2 凝胶成像系统,美国 UVP 公司产品。

1.4 实验方法

1.4.1 Jurkat 裸鼠荷瘤模型的建立 Balb/c-nu/nu 裸鼠,雄性,3~5 周龄,体质量(20 $\pm$ 2) g,放置在空气净化室饲养,室温(25 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,实验过程达到无特定病原体(Specific Pathogen Free,SPF)条件,自由摄入无菌水和灭菌标准饲料一周后,裸鼠经 Co60 照射(剂量 250 Gy)3 d 后,在每只裸鼠背部皮下接种 0.2 mL Jurkat 细胞(1×10^7 cells/mL),每只裸鼠两个注射点,每天观察裸鼠肿瘤形成情况,裸鼠皮下 5 d 后出现结节隆起约 5 mm,成瘤率达到 100%。成功建立的 Jurkat 裸鼠荷瘤模型见图 1。



图 1 Jurkat 裸鼠荷瘤模型

Fig. 1 Cancer nude mice transplanted jurkat tumor

1.4.2 动物分组及给药 造模后的 Balb/c-nu/nu 裸鼠随机分为 5 组,包括空白对照组、5-Fu 阳性对照

组(20 mg/(kg·d)、IOP3a 大剂量组(30 mg/(kg·d)、中剂量组(20 mg/(kg·d)和小剂量组(10 mg/(kg·d)),每组5只。空白对照组每只裸鼠注射 0.2 mL 生理盐水,5-Fu 阳性对照组每只裸鼠注射 0.2 mL 5-Fu,调节药物浓度使药量达到 20 mg/kg,采用灌胃法给药,每天一次,连续 28 d。

1.4.3 荷瘤裸鼠移植瘤体积变化 每组裸鼠从给样品后开始,用游标卡尺分别在第 7、14、28 天作一次活体肿瘤大小(包括最大长径 a 和横径 b)测量,根据公式

$$V(\text{mm}^3) = (a \times b^2) / 2$$

计算肿瘤体积(V),以每组裸鼠瘤体积平均值为纵坐标,处理时间为横坐标,绘制移植瘤生长曲线。参见文献[8]。

1.4.4 IOP3a 对荷瘤裸鼠的抑瘤作用 实验第 29 天后处死裸鼠后称重,摘取瘤块,用生理盐水洗涤,然后用滤纸吸干称重,根据公式

$$\text{抑瘤率} =$$

$$\frac{\text{对照组平均瘤质量} - \text{给药组平均瘤质量}}{\text{对照组平均瘤质量}} \times 100\%$$

计算抑瘤率。

1.4.5 IOP3a 对荷瘤裸鼠脾脏的影响 实验第 29 天后处死裸鼠,摘取脾脏,用生理盐水洗涤,然后用滤纸吸干称重,根据公式

$$\text{脾脏指数} = \text{脾质量}(\text{mg}) / \text{体质量}(\text{g}),$$

计算脾脏指数。

1.4.6 IOP3a 对荷瘤裸鼠外周血白细胞和淋巴细胞的影响 实验第 29 天后通过裸鼠眼眶取血,经全自动血细胞分析仪计算白细胞和淋巴细胞数。

1.4.7 IOP3a 对裸鼠巨噬细胞产生细胞因子的影响 详见文献[9]。

1)小鼠腹腔巨噬细胞的制备:裸鼠颈椎脱臼处死,酒精消毒,腹腔注射 5 mL RPMI1640 培养液,轻揉腹腔 3 min,收集腹腔液,2 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用 RPMI1640 培养液调整细胞浓度至 $2 \times 10^6/\text{L}$ 。将巨噬细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下在 5% CO_2 培养箱中孵育 3 h,吸弃培养液,用 RPMI1640 培养液洗去未贴壁的细胞,即得纯化的裸鼠腹腔巨噬细胞。

2)L-1 β 和 TNF- α 含量的测定:将 96 孔培养板中的裸鼠腹腔巨噬细胞分为阴性对照组、阳性对照组和不同剂量的 IOP3a 多糖给药组,吸弃上清液,

阴性对照组加入 150 μL 的 RPMI1640 培养液,阳性对照组加入 150 μL 含 5-Fu 的 RPMI1640 培养液(质量浓度 10 mg/L),给药组每孔分别加入 150 μL 含 IOP3a 多糖的 RPMI1640 培养液(质量浓度分别为 50、100、200 mg/L),每组设 6 个复孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后,吸取上清液,用双抗夹心 ELISA 法测定培养上清液中 L-1 β 和 TNF- α 的水平,操作步骤按检测试剂盒中的说明书进行。

1.4.8 瘤块组织切片病理学观察 取裸鼠 Jurkat 瘤块组织,用体积分数 10% 甲醛固定 24 h,通过常规脱水、石蜡包埋、切片(厚度 4 μm)、苏木精-伊红染色,对裸鼠 Jurkat 瘤块组织进行病理学观察。

1.4.9 蛋白质印迹法检测 Jurkat 肿瘤组织中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达 称取肿瘤组织 0.3 g,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 4 次,将组织剪碎后加入 5 mL 预冷组织裂解液,冰上裂解 60 min,裂解产物在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 5 000 r/min 离心 20 min)后得到细胞蛋白上清液,采用 Bradford 法测定蛋白质浓度,根据蛋白质含量测定结果每孔加入 20 μg 蛋白质,在待测细胞蛋白上清液中加入等体积的加样缓冲液,然后混合,在沸水浴中加热 5 min,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离,电泳结束后用去离子水漂洗凝胶,冰浴条件下将蛋白电转移至硝酸纤维素膜上,用 PBST(质量分数 0.02% Tween-PBS)配制的质量分数 5% 脱脂奶粉溶液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下膜封闭 2 h,然后分别加入一抗(1:200 稀释)鼠抗人 Bax、Bcl-2 和 β -Actin(β -肌动蛋白),确定上样量的一致性,室温下反应 2 h 后用 PBST 清洗 3 次,每次 15 min,再与辣根酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:800 稀释)室温下反应 1 h,用 PBST 充分洗涤后,DAB 室温下显色,利用凝胶成像系统分析免疫组化图片。

1.4.10 数据统计分析 采用 SAS 软件 AVOVA 程序进行显著性分析,Duncan 程序进行多重比较。

2 结果与讨论

2.1 荷瘤裸鼠移植瘤生长曲线

荷瘤裸鼠移植瘤生长曲线如图 2 所示。可知,与对照组比较,IOP3a 大剂量组瘤体积增长最慢,而对照组裸鼠移植瘤体积持续增长,说明 IOP3a 具有较好的抑制荷瘤裸鼠肿瘤生长的作用。

2.2 IOP3a 对裸鼠 Jurkat 肉瘤的抑制作用

裸鼠连续给药 28 d 后,各组荷瘤裸鼠的瘤质

量、抑瘤率等见表1。统计学分析表明:与阴性对照组的瘤质量相比,IOP3a高、中剂量组瘤质量均有显著性差异($p<0.05$),抑瘤率分别为69.28%和57.62%,随着多糖剂量的增加,裸鼠移植性肿瘤质量下降显著,并存在明显的剂量—效应关系,5-Fu阳性对照组瘤质量与阴性对照组的瘤质量相比差异显著($p<0.05$),发现裸鼠的进食量、行为状态等状况明显差于IOP3a组,这主要是因为5-Fu会对裸鼠的免疫器官造成一定的损害,而桦褐孔菌多糖IOP3a对裸鼠的免疫没有损害。

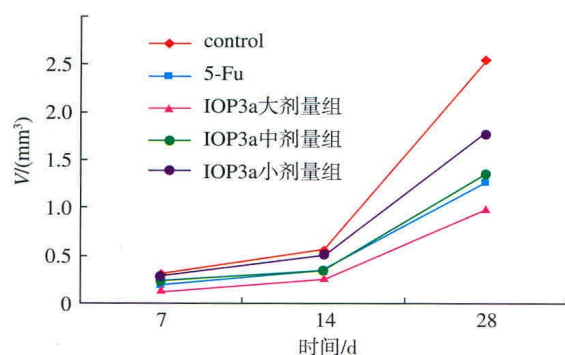


图2 荷瘤裸鼠移植瘤生长曲线

Fig. 2 Growth curve of nude mice transplanted jurkat tumor

表1 IOP3a对裸鼠Jurkat肉瘤的抑制作用($x\pm s, n=5$)

Table 1 Anti-tumor activities of IOP3a against tumor-bearing nude mice ($x\pm s, n=5$)

组别	剂量/(mg/kg)	瘤重/g($x\pm s$)	抑制率/%
阴性对照组	—	8.66 ± 1.25	—
5-Fu	20	3.09 ± 0.166 ^a	64.32
IOP3a	10	5.22 ± 0.889	39.72
	20	3.67 ± 0.358 ^a	57.62
	30	2.66 ± 0.437 ^a	69.28

注:与阴性对照组比较,a: $p<0.05$ 。

2.3 IOP3a对荷瘤裸鼠免疫器官的影响

桦褐孔菌多糖IOP3a对荷瘤裸鼠免疫器官脾脏的影响见表2,可知:与阴性对照组相比,5-Fu阳性组脾脏指数明显降低($p<0.05$),表现出一定的毒副作用,IOP3a治疗组的脾脏指数与阴性对照组均无显著性差异,无明显毒副作用,并且明显高于5-Fu组($p<0.01$),随着剂量的增加,脾脏指数有逐步增加的趋势。

表2 IOP3a对荷瘤裸鼠脾脏指数的影响

Table 2 Effect of IOP3a on spleen index of tumor-bearing nude mice ($x\pm s, n=5$)

组别	剂量/(mg/kg)	脾脏指数/(mg/g)
阴性对照组	—	10.41 ± 1.05
5-Fu	20	7.62 ± 0.59 ^a
IOP3a	10	10.52 ± 1.08 ^b
	20	10.68 ± 1.31 ^b
	30	11.19 ± 1.26 ^b

注:与阴性对照组比较,a: $p<0.05$;与阳性对照组比较

b: $p<0.01$ 。

2.4 IOP3a对荷瘤裸鼠外周血白细胞和淋巴细胞的影响

桦褐孔菌多糖IOP3a对荷瘤裸鼠外周血白细胞和淋巴细胞的影响见表3,可知:与阴性对照组相比,5-Fu组白细胞和淋巴细胞数均明显降低($p<0.05$);与5-Fu阳性对照组相比,IOP3a作用的荷瘤裸鼠的白细胞和淋巴细胞数高于阳性对照组($p<0.01$),说明IOP3a具有一定的升高裸鼠白细胞和淋巴细胞的功能。

表3 IOP3a对荷瘤裸鼠外周血白细胞和淋巴细胞的影响($x\pm s, n=5$)

Table 3 Effect of IOP3a on white blood cell and Lymphocyte of nude mice ($x\pm s, n=5$)

组别	剂量/(mg/kg)	白细胞数/(1×10^9 cells/L)	淋巴细胞数/(1×10^9 cells/L)
阴性对照组	—	9.31 ± 1.18	5.74 ± 1.13
5-Fu	20	5.21 ± 1.02 ^a	3.38 ± 1.03 ^a
IOP3a	10	8.94 ± 0.56 ^b	5.07 ± 0.57 ^b
	20	9.05 ± 1.13 ^b	6.35 ± 1.63 ^b
	30	9.25 ± 1.02 ^b	6.82 ± 1.46 ^b

注:与阴性对照组比较,a: $p<0.05$;与阳性对照组比较

b: $p<0.01$ 。

2.5 IOP3a对裸鼠巨噬细胞产生细胞因子的影响

IOP3a对裸鼠巨噬细胞产生细胞因子L-1 β 和TNF- α 的影响见表4。可以看出,与阴性对照组相比,IOP3a多糖对巨噬细胞产生的细胞因子TNF- α 和L-1 β 均有明显的促进作用($P<0.01, P<0.05$),且IOP3a多糖对TNF- α 的促进作用具有剂量依赖关系,在IOP3a多糖质量浓度为200 mg/L时最为显著,培养上清液中TNF- α 的质量浓度达(279.35 ±

36.24) ng/L,而IOP3a 多糖对 L-1 β 的促进作用无剂量依赖关系,在 IOP3a 多糖质量浓度为 100 mg/L 时最为显著,培养上清液中 L-1 β 的质量浓度达 (49.32 $\pm$ 12.09) ng/L,与阳性对照 5-Fu 相比无明显差异。

表 4 IOP3a 对裸鼠巨噬细胞产生细胞因子的影响

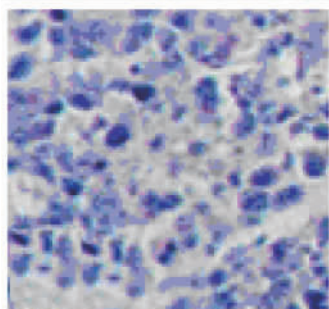
Table 4 Effect of IOP3a on generation of cytokines from macrophage of nude mouse

组别	质量浓度/ (mg/L)	L-1 β / (ng/L)	TNF- α / (ng/L)
阴性对照组	—	19.26 $\pm$ 5.18	99.06 $\pm$ 8.38
5-Fu	10	48.47 $\pm$ 11.21 ^b	265.61 $\pm$ 35.79 ^b
IOP3a	50	35.15 $\pm$ 9.29 ^{a,c}	165.28 $\pm$ 32.18 ^{a,d}
	100	49.32 $\pm$ 12.09 ^b	215.79 $\pm$ 40.28 ^b
	200	47.78 $\pm$ 11.42 ^b	279.35 $\pm$ 36.24 ^b

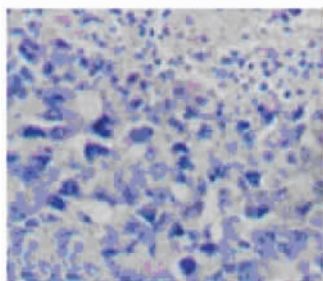
注:与阴性对照组相比,a: $P<0.05$;b: $P<0.01$ 。与 5-Fu 组相比,c: $P<0.05$;d: $P<0.01$ 。

2.6 组织病理学观察

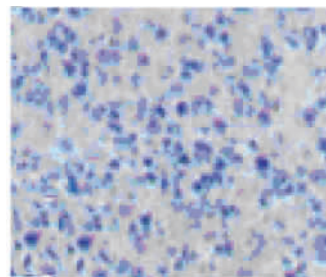
裸鼠连续给药 28 d 后,裸鼠 Jurkat 肉瘤病理组织学观察见图 3。可以看出:阴性对照组肿瘤结构无明显改变,生长旺盛,IOP3a 组、5-Fu 组肿瘤体积明显小于阴性对照组,瘤块组织松脆,IOP3a 组瘤组织出现坏死,有明显的肿瘤坏死灶,5-Fu 阳性组瘤组织大面积坏死,结构不清。



(a)Jurkat肉瘤阴性对照组



(b)Jurkat肉瘤桦褐孔菌多糖 IOP3a处理组(30 mg/kg)



(c)Jurkat肉瘤5-Fu处理组

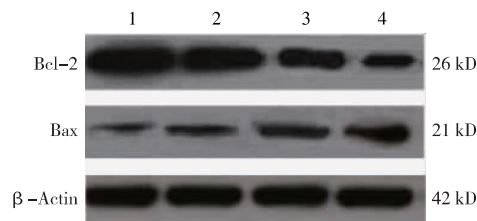
图 3 裸鼠 Jurkat 肉瘤病理组织学(400 $\times$)

Fig. 3 Histopathology of tumors from transplanted tumor nude mice(400 $\times$)

2.7 IOP3a 对裸鼠 Jurkat 肿瘤组织中 Bax 和 Bcl-2 基因蛋白表达的影响

Bcl-2 家族蛋白根据其功能分为两类:一类以 Bax、Bad、Bak、Bid 为代表,促进细胞凋亡;另一类以 Bcl-2、Bcl-xl 为代表,抑制细胞凋亡,Bcl-2 家族蛋白通过二聚体网络形式相互作用,调控细胞的凋亡^[10-11]。IOP3a 对裸鼠 Jurkat 肿瘤组织中 Bax 和 Bcl-2 基因蛋白表达的影响结果见图 4 和表 5。

由图 4 可知: β -Actin(β -肌动蛋白)基因表达量不随药物处理变化,呈现稳定的表达,随着 IOP3a 处理浓度的增大,Jurkat 肿瘤组织细胞中 Bax 基因表达条带变宽、变深,光密度值与阴性对照组相比不断增大,差异显著($p<0.05$),见表 5,明显抑制 Bcl-2 基因的表达($p<0.05$)。5-FU 组显著地促进肿瘤组织细胞中 Bax 基因蛋白的表达,同样明显抑制 Bcl-2 基因的表达($p<0.05$)。表明 IOP3a 通过促进肿瘤组织细胞中 Bax 蛋白表达、抑制 Bcl-2 表达起到抗肿瘤作用。



1. 阴性对照组;
2. 5-Fu组;
3. 20 mg/(kg·d)IOP3a组;
4. 30 mg/(kg·d) IOP3a组

图 4 IOP3a 对裸鼠 Jurkat 肿瘤组织中 Bax 和 Bcl-2 基因蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of IOP3a on expression of Bax and Bcl-2 in Jurkat tumors from the transplanted tumor nude mice through immunohistochemical analysis

表 5 不同组 Bax、Bcl-2 基因蛋白表达定性分析

Table 5 Quantitative analysis of the expression of Bax
and Bcl-2 proteins

组别	剂量/ (mg/kg)	平均光密度值	
		Bax 基因蛋白	Bcl-2 基因蛋白
对照组	0	0.092±0.022	0.536±0.037
5-Fu	20	0.151±0.072 ^a	0.412±0.028 ^a
IOP3a	20	0.199±0.037 ^a	0.307±0.012 ^a
	30	0.259±0.042 ^a	0.199±0.018 ^a

注:与阴性对照组相比,a: $p < 0.05$ 。

3 结 语

通过对 IOP3a 体内抗肿瘤作用及其机制进行研究,得出如下结论:

参考文献:

- [1] 陈义勇,顾小红,汤坚. 桦褐孔菌多糖 IOP3a 的分离纯化及其体外抗肿瘤活性研究[J]. 食品科学,2010,31(15):91-94.
CHEN Yi-yong, GU Xiao-hong, TANG Jian. Isolation, purification and anti-tumor activity of a polysaccharide, IOP3a from *Inonotus obliquus*[J]. **Food Science**, 2010, 31(15): 91-94. (in Chinese)
- [2] 陈义勇,顾小红,汤坚. 桦褐孔菌多糖的抗肿瘤活性研究[J]. 食品与生物技术学报,2011,30(1):65-69.
CHEN Yi-yong, GU Xiao-hong, TANG Jian. Study on anti tumor activities of polysaccharides from *Inonotus obliquus*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011, 30(1): 65-69. (in Chinese)
- [3] Chen Y Y, Gu X, Huang S Q, et al. Optimization of ultrasonic/microwave assisted extraction (UMAE) of polysaccharides from *Inonotus obliquus* and evaluation of its anti-tumor activities [J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2010, 46: 429-435.
- [4] 金光,杨恩月,金晴昊,等. 桦褐孔菌多糖的抗肿瘤作用实验研究[J]. 延边大学医学学报,2004,27(4):257-259.
JIN Guang, YANG En-yue, JIN Qing-hao, et al. Studies on antitumor activities of *Fuscoporia oblique* polysaccharide[J]. **Journal of Medical Science Yanbian University**, 2004, 27(4): 257-259. (in Chinese)
- [5] 张慧丽,杨松,李玉,等. 桦褐孔菌多糖的提取及对肝癌细胞 SMMC7721 的抗增殖的研究[J]. 中国食用菌,2006,25(2):31-33.
ZHANG Hui-li, YANG Song, LI Yu, et al. Extraction of *inonotus obliquus* polysaccharide and the effect of anti-proliferation on SMMC7721 cells of lung cancer[J]. **Edible Fungi of China**, 2006, 25(2): 31-33. (in Chinese)
- [6] Kim Yong Ook, Hanb Sang Bae, Lee Hong Woen, et al. Immuno-stimulating effect of the endo-polysaccharide produced by submerged culture of *Inonotus obliquus*[J]. **Life Sciences**, 2005, 77: 2438-2456.
- [7] Kim Yong Ook, Park Hae Woong, Kim Jong Hoon, et al. Anti-cancer effect and structural characterization of endo-polysaccharide from cultivated mycelia of *Inonotus obliquus*[J]. **Life Sciences**, 2006, 79: 72-80.
- [8] Liu Jun-Jen, Huang Tien-Shang, Hsu Ming-Ling, et al. Antitumor effects of the partially purified polysaccharides from *Antrrodia camphorata* and the mechanism of its action[J]. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2004, 201: 186-193.
- [9] 杜小燕,侯颖,覃华,等. 绞股蓝多糖的抗肿瘤作用及其机制研究[J]. 科学技术与工程,2009,20(9):5968-5972.
DU Xiao-yan, HOU Ying, QIN Hua, et al. Studies on the anti-tumor activity of polysaccharide from *Gynostemma pentaphyllum* and its mechanism[J]. **Science Technology and Engineering**, 2009, 20(9): 5968-5972. (in Chinese)
- [10] Hale A J, Smith C A, Suthefiand L C, et al. Apoptosis: molecular regulation of cell death [J]. **European Journal of Biochemistry**, 1996, 236: 17-26.
- [11] Lindsten T, Ross A J, King A, et al. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members Bak and Bax are essential for normal development of multiple tissues[J]. **Molecular Cell**, 2000(6): 1389-1399.

1)通过建立裸鼠 Jurkat 模型评价 IOP3a 的体内抗肿瘤效果,IOP3a 可以明显地抑制荷瘤裸鼠肿瘤体积,具有很好的抑制肿瘤生长的作用。IOP3a 高、中剂量组瘤质量与阴性对照组的瘤质量相比均有显著性差异($p < 0.05$),肿瘤抑制率分别为 69.28%和 57.62%,有明显的剂量—效应关系,随着剂量的增加,脾脏指数有逐步增加的趋势,具有升高裸鼠白细胞和淋巴细胞的功能,IOP3a 多糖对巨噬细胞产生的细胞因子 $TNF-\alpha$ 和 $L-1\beta$ 均有明显的促进作用,组织病理学观察表明,IOP3a 可使肿瘤组织中呈现明显肿瘤坏死灶、瘤组织出现坏死的现象。

2)免疫组化表明,IOP3a 通过促进肿瘤组织细胞中 Bax 蛋白表达、抑制 Bcl-2 表达起到抗肿瘤的作用。