

· 肿瘤免疫学 ·

壳寡糖抑制肿瘤作用的实验研究^①

官杰 罗晓庆 王琪 李殿俊 (齐齐哈尔医学院免疫教研室, 齐齐哈尔 161042)

中国图书分类号 R931.74 文献标识码 A 文章编号 1000-484X(2007)05-0421-05

[摘要] 目的: 通过建立 H22 肝癌荷瘤鼠作为实验动物模型, 研究壳寡糖对肿瘤抑制作用的影响。方法: 选择小鼠体内注射的方法, 将不同浓度壳寡糖注入荷瘤小鼠体内, 观察肿瘤生长情况, 对其进行免疫功能的测定; 同时通过 MTT 比色法观察壳寡糖对 LH-7 人肺癌细胞的体外生长抑制作用。结果: 壳寡糖对肿瘤的生长有抑制作用; 壳寡糖可提高荷瘤小鼠血清的 IL-2 和 IFN- γ 含量, 增加荷瘤小鼠免疫器官脾脏和胸腺重量; 显微镜观察肿瘤组织出现坏死; 壳寡糖对 LH-7 细胞生长有抑制作用, 抑瘤率与浓度有关, 与时间无关; 透射电镜显示细胞有凋亡趋势。结论: 壳寡糖可抑制肿瘤生长, 提高机体免疫功能; 同时壳寡糖可能诱导 LH-7 肿瘤细胞凋亡。

[关键词] 壳寡糖; 肿瘤; 抑制; 细胞培养

The study on inhibitory effects of chitosan oligosaccharide on tumor growth in vivo and in vitro

GUAN Jie LUO Xiao-Qing WANG Qi LI Dian-Jun Department of Immunology, Qiqihar Medical College, Qiqihar 161042, China

[Abstract] **Objective** To investigate the inhibitory effects of chitosan oligosaccharide on tumor growth in vivo. **Methods** Murine tumor cell line H22 was inoculated into them. Then different doses of chitosan oligosaccharide were injected into the mice bearing H22 liver carcinoma. IL-2 and IFN- γ in the sera were measured by ELISA assay. The in vitro anti-proliferation activity of chitosan oligosaccharide on the lung carcinoma LH-7 cells was evaluated by MTT assay. **Results** Chitosan oligosaccharide inhibited in vivo the growth of H22 tumor cells with increasing the content of IL-2 and IFN- γ in sera of the tumor-bearing mice. The weight of spleen and thymus of the mice were increased when compared with those of control group. Tissue necrosis was observed in the tumor in situ. Chitosan oligosaccharide also inhibited the growth of LH-7 cells in vitro. The inhibitory effect was shown in a concentration dependent pattern, but not correlated with incubation time. The early characteristics of apoptosis of LH-7 cell could be observed under the transmission electron microscopy. **Conclusion** Chitosan oligosaccharide inhibits proliferation of tumor and improves immunity function of the hosts, and might induce apoptosis of LH-7 cells.

[Key words] Chitosan oligosaccharide; Tumor; Inhibition; Cell culture

肿瘤的治疗仍以手术、化疗、放疗为主要方法, 由于其毒副作用强, 限制了临床应用, 使得肿瘤不能根治, 且复发率高, 肿瘤的治疗仍是医学界的一大难题。目前, 开发行之有效, 毒副作用小的新型抗肿瘤药物为当今医务工作者的重要研究方向。由于海洋生物学的研究进展迅速, 人们对于海洋生物利用的重视程度也相应提高, 海洋生物的抗肿瘤研究在医学界也逐渐增加。

壳寡糖为壳聚糖的降解物。作为虾、蟹等甲壳

类、甲虫等的外骨骼及蘑菇等菌类的细胞壁成分, 是广泛存在于自然界的天然高分子物质。具有良好的水溶性, 易被分散和吸收, 而且具有多种生物功能, 如作为植物功能调节剂, 刺激植物生长, 增强植物对病虫害的防御能力并改善肠道微生物的区系分布, 刺激有益菌的生长, 同时它能提高机体的免疫功能和抗癌能力^[1,2]。基于壳寡糖的诸多优点, 本文以 H22 小鼠肝癌细胞和 LH-7 人肺癌细胞为研究对象, 通过体内和体外实验, 观察其对肿瘤细胞生长的抑制、对实验动物免疫器官、细胞因子的影响以及诱导肿瘤细胞的凋亡, 探讨壳寡糖对肿瘤抑制作用及其作用的机理。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂 自动酶标检测仪, Bi-

①本文为齐齐哈尔医学院自然科学基金资助项目(项目编号:

XY2004-44-21)

作者简介: 官杰(1967年-), 女, 硕士, 副教授, 主要从事肿瘤免疫研究;

指导教师: 李殿俊(1945年-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤免疫研究。

RAD2550型; 96孔细胞培养板、细胞培养瓶, 美国 Costar产品; 超净工作台, 苏州净化设备厂; 二氧化碳孵箱, 日本 SANYO 公司; OLYMPUS K70-SIF2倒置显微镜, 日本生产; 透射电子显微镜, 日本生产; 壳寡糖, 哈尔滨工业大学提供; RPM I1640 美国 Hyclone公司; 胰蛋白酶、四甲基偶氮唑蓝 (MTT), 美国 Sigma公司产品, 用前以无菌 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 配为 5 mg/ml 抽滤除菌, 避光 4℃ 保存; 二甲基亚砜 (DMSO), 美国 Sigma 公司产品; 小鼠 IL-2 试剂盒、小鼠 IFN- γ 试剂盒, 上海森雄科技实业有限公司产品。

1.2 试验动物 昆明种小鼠, 雌雄各半, 体重 18~22 g 由哈尔滨医科大学第三临床医院提供。

1.3 细胞株 H22小鼠肝癌细胞来自昆明小鼠, 哈尔滨医科大学免疫教研室提供; IH-7人肺癌成系细胞, 哈尔滨医科大学免疫教研室李波老师惠赠。

1.4 体内实验 30只小鼠随机分为3组, 每组10只。H22肝癌细胞复苏后接种于小鼠腹腔内, 传代1次后7~10天的小鼠颈椎脱臼处死。固定于蜡版上, 消毒腹部皮肤, 剪开并剥去腹部皮肤, 用无菌空针抽取腹水, 放入无菌试管内, 用Hanks工作液稀释肿瘤细胞悬液至活细胞数为 $1 \times 10^8 \text{ m}^{-1}$, 备用。30只小鼠随机分为3组, 每组10只, 分别为壳寡糖小浓度组 (0.5%)、壳寡糖大浓度组 (1.5%) 和对照组 (生理盐水)。试验第1天至第7天各组小鼠腹腔分别注射1次药物或生理盐水 0.2 ml (对照组), 第8天抽取H22肝癌细胞 ($1 \times 10^8 \text{ m}^{-1}$) 0.2 ml 接种于每只小鼠背部皮下, 24小时后记录各组小鼠体重。以后每天向各组小鼠腹腔分别注射1次 0.2 ml 的药物或生理盐水。连续给药10天。停药后次日, 摘除眼球取血, 分离血清, 用于测IL-2、IFN- γ , 然后脱颈处死, 剥离瘤块, 称重, 计算抑瘤率。剖取胸腺、脾脏, 计算胸腺指数和脾指数。肿瘤组织经常规固定, 脱水, 石蜡包埋, 切片, HE染色行组织学检查。

1.4.1 因子测定 实验结束后次日, 小鼠眼球取血, 置于离心管中, 3000 r/min 离心5分钟, 分离血清, 按每只冻存管1 ml 分装血清, -20℃ 保存备用。测定时, 具体操作按上海森雄科技实业有限公司提供的细胞因子试剂盒说明书操作。

1.4.2 小鼠免疫器官的检测 实验结束后次日采用颈椎脱臼法处死荷瘤小鼠, 完整取出脾脏和胸腺后在电子天平上精确称取脾脏和胸腺重量, 计算胸腺指数和脾脏指数。

$$\text{胸腺(脾)指数} = \frac{\text{胸腺(脾)重量(mg)}}{\text{体重(mg)}}$$

1.5 体外实验

1.5.1 培养液 本试验采用RPM I1640完全培养液, 其组成为: RPM I1640培养液、10%新鲜小牛血清 (经56℃ 30分钟灭活)、100 $\mu\text{g/ml}$ 青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素、5.6% 碳酸氢钠 (pH 7.4)。

1.5.2 培养条件 37℃ 饱和湿度, 含5% CO₂ 的孵箱中培养。

1.5.3 细胞培养 将人IH-7肺癌细胞按上述条件培养于5% CO₂ 孵箱中, 细胞呈现贴壁状态, 隔天换液, 细胞长满单层后用0.25% 胰蛋白酶消化传代, 每3天传1代。取已长成致密单层的IH-7肺癌细胞, 倒去培养液, 加入3 ml Hanks液, 轻轻振荡漂洗细胞后倾去, 以去除残留的血清和衰老脱落的细胞及其碎片。加入盖满细胞面的0.25% 胰蛋白酶溶液, 37℃ 消化2~3分钟后, 倒置相差显微镜下观察细胞单层, 待细胞成片收缩, 出现许多空隙时即可倒去消化液。再加Hanks液清洗1遍后倾出。在培养瓶中加入3 ml 培养液, 以终止消化。用吸管反复吹打壁上的细胞层, 直至全部细胞被冲下, 轻轻吹打均匀, 制成单细胞悬液, 按1:2接种到培养瓶内, 再向瓶内补加培养液至5 ml 实验用处于对数生长期的细胞。

1.5.4 细胞计数 用血小板计数板, 按血细胞计数方法进行计数。细胞制成单细胞悬液后, 用无菌吸管吸取1滴细胞悬液, 从计数板边缘缓缓滴入, 使之充满计数板和盖片之间的空隙。稍后将计数板放在低倍镜下 (10×10倍) 观察计数。

1.5.5 MTT法测定IH-7肺癌细胞活性^[3] 调整对数生长期、状态良好的IH-7肺癌细胞数 $1 \times 10^4 \text{ cells/ml}$ 100 μl 接种于96孔培养板中。37℃、5% CO₂ 孵箱中24小时, 稳定后, 试验组每孔加入壳寡糖80 μl 浓度分别为2000、1000、500、250和50 mg/L, 均设4个复孔, 并且设空白对照, 对照组不加壳寡糖, 空白组只加培养液。分别作用12、24、48和72小时后加入5 mg/ml 的MTT 20 μl 孵育4小时 (细胞在SDH作用下将黄色MTT还原成紫蓝色结晶) 后小心弃去上清, 加DMSO 150 μl 振荡 (10~20分钟) 均匀, 于酶标仪490 nm 波长处读OD值, 重复2次, 并计算抑瘤率。将细胞用戊二醛固定, 做电镜观察。

$$\text{细胞生长抑瘤率} = \left(1 - \frac{\text{实验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \right) \times 100\%$$

1.5.6 透射电子显微镜观察细胞形态学的变化 收集各组细胞, 参照文献[4]用PBS洗过的药物作用48小时的IH-7细胞约 5×10^6 个, 置于装有2 ml

完全培养基的 Ependoff 管中, 1 500 r/min 离心 5 分钟, 弃去上清。加入 2% 戊二醛充分吹打细胞, 离心, 弃去戊二醛, 再次加入 2 ml 2% 戊二醛固定过夜。1% 锇酸固定 1 小时, 离心弃去上清, 蒸馏水洗 2 次。2% 醋酸铀预染 1 小时, 离心弃去上清, 蒸馏水洗 2 次。依次过丙酮逐级脱水, 每次 5 分钟。树脂包埋, 超薄切片, 柠檬酸铅染色及电子显微镜观察细胞的形态变化, 并拍片。

1.6 统计学方法 所有计量数据应用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析。

2 结果

2.1 体内实验

2.1.1 抑瘤率 抑瘤率 = (对照组瘤重 - 实验组瘤重) / 对照组瘤重 × 100%。壳寡糖大浓度组 (1.5%) 明显抑制实体瘤的生长 ($P < 0.05$)。阴性对照组平均瘤重 > 1 g 说明造模成功, 肿瘤的生长良好。同时还可以观察到壳寡糖大浓度组 (1.5%) 小鼠活动自如, 皮毛光滑, 食量较正常, 说明壳寡糖大浓度组 (1.5%) 对肿瘤生长有一定的抑制作用, 见表 1。

2.1.2 壳寡糖对 H22 荷瘤小鼠血清细胞因子 IL-2 和 IFN- γ 含量影响 壳寡糖大浓度组 (1.5%) 和壳寡糖小浓度组 (0.5%) 均可提高血清 IL-2 含量; 壳寡糖大浓度组 (1.5%) 可明显提高血清 IFN- γ 含量, 而壳寡糖小浓度组 (0.5%) 对血清 IFN- γ 含量有所提高但没有统计学意义, 见表 2。

2.1.3 壳寡糖对 H22 荷瘤小鼠免疫器官脾脏、胸腺指数的影响 壳寡糖大浓度组 (1.5%) 能大幅度地增加 H22 荷瘤小鼠免疫器官脾脏和胸腺重量。壳寡糖小浓度组 (0.5%) 能增加 H22 荷瘤小鼠免疫器官脾脏重量, 见表 3。

2.1.4 形态学观察 肉眼观察: H22 荷瘤小鼠对照组肿块呈结节状, 无胞膜, 肿瘤多为浸润性生长, 切面呈灰白色, 中央常见大小不等的黄色坏死灶。而壳寡糖大剂量组肿块小, 质韧, 有部分小鼠肿瘤消退或未生长, 瘤体大体外观苍白, 与周围组织无黏连, 无水肿现象, 易于剥离。镜下瘤细胞形态学表现如下。对照组: 大量 H22 肿瘤细胞排列呈巢状或索条状, 血管丰富 (似肝血窦), 肿瘤细胞大小不一, 形态各异, 细胞呈圆形或多边形, 胞浆嗜碱性, 核质比增大、核仁明显; 壳寡糖大浓度组 (1.5%): 瘤细胞形态学表现为大部分肿瘤细胞发生坏死, 仅见个别残存的肿瘤细胞; 壳寡糖小浓度组 (0.5%): 瘤细胞形态学表现为部分细胞坏死, 其余肿瘤细胞仍呈巢状或索条状分布, 见图 1-图 3。

表 1 壳寡糖对 H22 荷瘤小鼠瘤重的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of chitosan oligosaccharide on weight of the tumor of H22 solid carcinoma bearing mice ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Tumor weight (mg)	Inhibitory rate of tumor (%)
Negative control	9	1 022.22 ± 759.56	
Chitosan (0.5%)	10	720.00 ± 565.29	29.56
Chitosan (1.5%)	9	539.96 ± 223.44 ¹⁾	47.17

Note: Compared with negative control 1) $P < 0.05$

表 2 壳寡糖对 H22 荷瘤小鼠血清细胞因子 IL-2 和 IFN- γ 含量影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effect of chitosan oligosaccharide on level of IL-2 and IFN- γ in serum of H22 solid carcinoma bearing mice ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	IL-2 (pg)	IFN- γ (pg)
Negative control	9	13.22 ± 1.2	389.7 ± 50.6
Chitosan (0.5%)	10	17.18 ± 2.98 ¹⁾	400.3 ± 52.9
Chitosan (1.5%)	9	18.67 ± 3.96 ²⁾	498.8 ± 47.6 ²⁾

Note: Compared with negative control 1) $P < 0.05$ 2) $P < 0.01$

表 3 壳寡糖对 H22 荷瘤小鼠免疫器官重量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Effect of chitosan oligosaccharide on weight of immune organs of H22 solid carcinoma bearing mice ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Thymus index (mg/kg)	Spleen index (mg/kg)
Negative control	9	2.20 ± 0.23	5.59 ± 0.11
Chitosan (0.5%)	10	2.71 ± 0.16	7.18 ± 0.17 ¹⁾
Chitosan (1.5%)	9	4.58 ± 0.07 ²⁾	8.37 ± 0.20 ²⁾

Note: Compared with negative control 1) $P < 0.05$ 2) $P < 0.01$

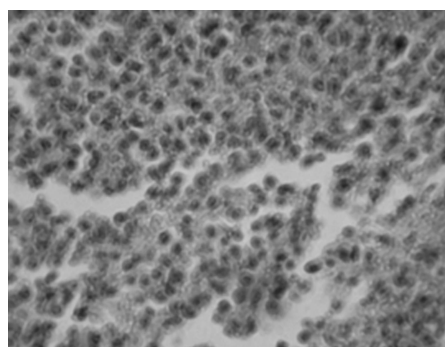


图 1 实体瘤对照组 (10×40 HE 染色)

Fig. 1 Negative control of solid carcinoma (10×40 HE)

2.2 体外实验

2.2.1 抑瘤率 抑瘤率 = (1 - 实验组 OD / 对照组 OD) × 100%。在时间上进行统计学比较分析, 应用 t 检验, 得出结果皆为 $P > 0.05$ 说明壳寡糖对人 H1975 肺癌

表 4 不同浓度壳寡糖对人 LH-7 肺癌细胞的体外抑制作用

Tab. 4 Inhibitory effect of different concentration chitosan oligosaccharide on cells of LH-7 lung cancer in vitro

Group	n	OD				Inhibitory rate of tumor (%)			
		12 h	24 h	48 h	72 h	12 h	24 h	48 h	72 h
Negative control	6	0.415	0.430	0.478	0.527				
50 mg/L	6	0.229	0.204	0.259	0.254	44.82	45.58	45.81	51.80
250 mg/L	6	0.177	0.171	0.228	0.178	57.35	53.25	52.30	66.22
500 mg/L	6	0.155	0.168	0.147	0.190	62.65	60.93	69.24	63.94
1 000 mg/L	6	0.117	0.124	0.159	0.151	71.81	71.16	66.74	71.34
2 000 mg/L	6	0.074	0.193	0.181	0.256	82.16	55.11	62.13	51.42

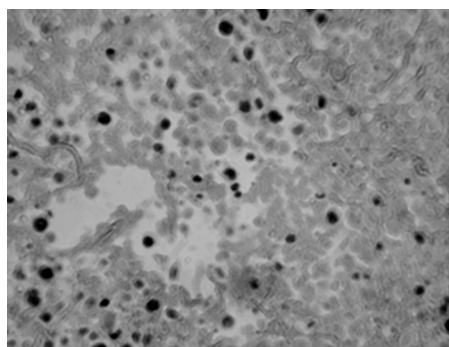


图 2 实体瘤壳寡糖 1.5%组 (10×40 HE 染色)

Fig. 2 1.5% chitosan of solid carcinoma (10×40 HE)

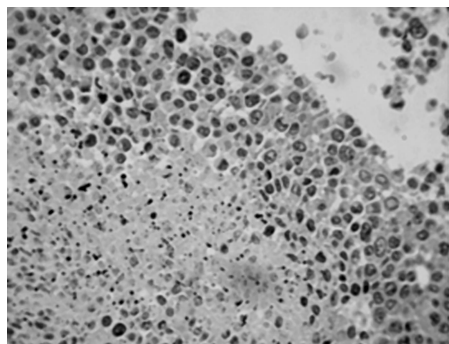


图 3 实体瘤壳寡糖 0.5%组 (10×40 HE 染色)

Fig. 3 0.5% chitosan of solid carcinoma (10×40 HE)

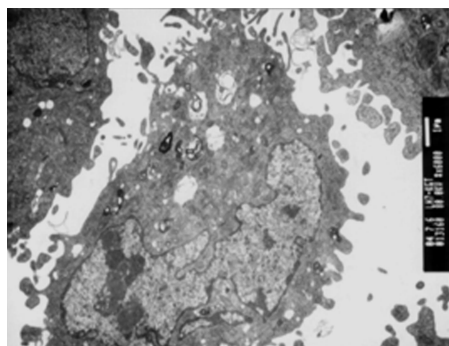


图 4 壳寡糖浓度为 1 000 mg/L 时人 LH-7 肺癌细胞电镜下形态 (×6 000)

Fig. 4 The appearance of LH-7 lung cancer cell under the electron on 1 000 mg/L chitosan (×6 000)

细胞抑制与时间无关;随着浓度升高,肿瘤细胞增殖抑制率增高,各剂量组均为 $P < 0.05$ 但浓度达 2 000 mg/L 时抑制率呈下降趋势,见表 4。

2.2.2 形态学观察 壳寡糖浓度为 1 000 mg/L 时人 LH-7 肺癌细胞电镜下形态变化 (×6 000) 为瘤细胞体积变小,表面微绒毛变成质膜叶片,胞质浓缩,细胞器变致密,线粒体肿胀,大小不均,嵴残缺或消失,胞质内多见空泡样改变,核染色质边聚,核仁裂解,呈现出瘤细胞凋亡早期形态特点,见图 4。

3 讨论

3.1 壳寡糖对肿瘤细胞的抑制作用 本实验发现体内实验中壳寡糖大浓度组 (1.5%) 明显抑制实体瘤的生长,抑制率达 47.17%, 而小浓度组 (0.5%) 抑制率不明显为 29.56%, 无统计学意义,说明大剂量壳寡糖 (1.5%) 有抑制肿瘤作用。与纪莹等^[5]、杜昱光等^[6]、吴海明等^[7] 的壳寡糖抑制肿瘤的实验结果相似。为了进一步证明壳寡糖对肿瘤的抑制作用,我们又进行了壳寡糖对 LH-7 肺癌细胞体外培养抑瘤作用的实验。研究结果为:壳寡糖对 LH-7 肺癌细胞抑制与时间无关,随着浓度升高肿瘤细胞增殖抑制率增高,呈剂量依赖关系,但浓度达 2 000 mg/L 时抑制率呈下降趋势。说明壳寡糖的抑瘤作用是肯定的,但如何获得最大的抗肿瘤作用有待继续深入研究。

3.2 壳寡糖对荷瘤鼠免疫功能的调节

3.2.1 壳寡糖对荷瘤鼠产生细胞因子的影响 细胞因子是由多种细胞分泌的具有生物活性的小分子多肽,是免疫细胞间的信使分子,它们形成细胞因子网络,在非特异性免疫与特异性免疫应答中具有重要的调节作用。IL-2 主要由 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞产生,是 T 细胞活化的关键分子,通过多种途径调节细胞免疫应答。IL-2 是诱导肿瘤抗原特异性 CTL 所必需的细胞因子。IL-2 能够在体内诱导和增强 CTL 的杀伤活性,促进 NK 细胞的杀伤活性,诱导

IFN- γ 的合成和分泌;促进单核巨噬细胞和NK细胞表达IL-2R,巨噬细胞分泌TNF,增强其对肿瘤细胞的杀伤活性^[8]。IFN- γ 主要由活化的T淋巴细胞和NK细胞产生,能激活巨噬细胞并促进其功能;诱导CTL细胞、NK细胞、LAK细胞的杀伤活性,刺激B细胞分泌抗体;活化中性粒细胞和NK细胞;IFN- γ 可诱导肿瘤细胞表达MHC分子,增强CTL细胞对肿瘤细胞的免疫应答^[9]。同时IFN- γ 能活化多种细胞产生NO,NO调节着多种免疫活性介质如TNF、PGE₂、IL、IFN等的合成分泌,更为广泛地影响机体免疫功能。本实验对荷瘤小鼠血清IL-2及IFN- γ 细胞因子进行测定,结果壳寡糖大浓度组(1.5%)和壳寡糖小浓度组(0.5%)均可提高血清IL-2含量;壳寡糖大浓度组(1.5%)可明显提高血清IFN- γ 含量,而壳寡糖小浓度组(0.5%)对血清IFN- γ 含量有所提高但没有统计学意义。提示壳寡糖能增强荷瘤小鼠分泌IL-2、IFN- γ 的能力,对小鼠的抗肿瘤细胞免疫应答反应有明显的促进作用。

3.2.2 壳寡糖对荷瘤鼠免疫器官的影响 胸腺在免疫系统中占有极为重要的地位,它是T细胞分化和发育成熟的主要场所。脾是机体最大的外周免疫器官,是机体进行免疫应答的主要场所。脾内的B细胞占淋巴细胞总数的55%,T细胞占40%,此外还有一些LAK细胞和NK细胞等。本实验通过测定壳寡糖对荷瘤小鼠免疫器官脾脏、胸腺指数的影响,结果为壳寡糖大浓度组(1.5%)能大幅度地增加荷瘤小鼠免疫器官脾脏和胸腺重量,提示壳寡糖对免疫器官无损害作用,相反有减除肿瘤对宿主免疫器官的损害和抑制作用,且能提高宿主的免疫功能。因此可见,通过增强机体的免疫功能是壳寡糖抗肿瘤作用的重要机制之一。

3.3 壳寡糖对肿瘤细胞作用的形态学改变

3.3.1 体内实验 壳寡糖大剂量组肿块小,质韧,有部分小鼠肿瘤消退或未生长,瘤体大体外观苍白,与周围组织无黏连,无水肿现象,易于剥离。镜下瘤细胞形态学表现为壳寡糖大浓度组瘤细胞形态学表现为大部分肿瘤细胞发生坏死,仅见个别残存的肿瘤细胞,可见壳寡糖可以抑制肿瘤细胞的生长,使肿

瘤细胞死亡,是否有直接细胞毒作用机制有待进一步研究。

3.3.2 体外实验 壳寡糖浓度为1 000 mg/L时人IH-7肺癌细胞电镜下形态变化($\times 6 000$)呈现出瘤细胞凋亡早期形态特点。本实验表明壳寡糖可具有抑瘤形态学表现,能促进肿瘤细胞发生凋亡,但这种作用未经体内免疫系统参与,是否与壳寡糖影响人类肿瘤细胞的分化、增殖、凋亡和信号转导而引起细胞生长抑制有关,待进一步研究。

本研究结果提示,壳寡糖有显著的抗肿瘤作用,其作用的发挥与剂量密切相关。壳寡糖抗肿瘤可能是通过增强荷瘤鼠免疫功能间接实现的,同时壳寡糖对体外培养的肿瘤细胞有明显抑制作用,在一定剂量范围内呈剂量依赖性,并观察到肿瘤细胞有凋亡趋势。本实验未观察到壳寡糖的毒性作用,机制有待进一步研究。壳寡糖资源丰富,毒副作用小,应用广泛,其开发前景是十分广阔的。

4 参考文献

- 杜昱光,白雪芳,虞星炬 *et al* 寡聚糖类物质生理活性的研究 [J]. 中国生化药物杂志, 1997; 18(5): 268-270.
- 张 虎,杜昱光,虞星炬. 几丁寡糖与壳寡糖的制备和功能 [J]. 中国生化药物杂志, 1999; 20(2): 99-100.
- 姜圣亮,朱上林,王天翔 *et al* MTT法应用于肝癌化学免疫治疗敏感性研究 [J]. 肿瘤, 2004; 21(1): 23-25.
- 张均田. 现代药理实验方法(下) [M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1999; 2: 1087-1088.
- 纪 莹,赵 铁,周 翔 *et al* 壳寡糖的制备及组分分析 [J]. 中国现代应用药学, 2003; 20(3): 195-196.
- 杜昱光,白雪芳,金宗濂 *et al* 壳寡糖抑制肿瘤作用的研究 [J]. 中国海洋药物, 2002; 86(2): 18-21.
- 吴海明,华晓阳,何登全. 壳寡糖抗肿瘤作用及免疫调节机理的研究 [J]. 中华医学研究杂志, 2005; 5(8): 39-40.
- 何 维. 医学免疫学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005; 108-109.
- 龚非力. 医学免疫学 [M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 2000; 71-72.

[收稿 2006-03-31 修回 2006-06-22]

(编辑 张晓舟 徐 杰)

本刊承接国内外医药卫生、
医疗器械、生物制剂的广告业务