

美洲大蠊提取物联合环磷酰胺对 H22 荷瘤小鼠的作用

陈俊雅^{1,2}, 耿玲^{2,3}, 吴道勋¹, 郭美仙^{1*}, 张成桂², 刘光明¹

(1. 大理学院 药学与化学学院, 云南大理 671000;

2. 云南省昆虫生物医药研发重点实验室, 云南大理 671000;

3. 大理学院 基础医学院, 云南大理 671000)

[摘要] 目的:观察美洲大蠊提取物(extract from *Periplaneta americana*, EPA)与环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)联合应用对小鼠 H22 肿瘤生长的影响并探讨其可能的作用机制。方法:采用 KM 小鼠皮下接种 H22 肝癌细胞形成实体瘤模型,分别给予高、中、低剂量(50, 100, 200 mg·kg⁻¹)EPA, 阳性药 CTX(30 mg·kg⁻¹)及二者联合治疗 10 d 后,测定各组小鼠瘤重,肝脏、脾脏指数,通过测定肝脏组织中丙二醛(malondialdehyde, MDA)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)水平检测药物的抗氧化活性,检测血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素 2(interleukin 2, IL-2)的含量,并计数联合用药组小鼠血浆中白细胞的数量,以此评价 EPA 与 CTX 合用的增效减毒作用。结果:与模型组比较,各给药组均能明显抑制 H22 荷瘤小鼠肿瘤的生长($P < 0.05$),尤以 50 mg·kg⁻¹ EPA 与 CTX 联合用药作用最为显著,其抑瘤率达到了 61.96%;单用 EPA 以及 EPA 与 CTX 联合应用均能提高肝组织中 SOD 水平并降低其中的 MDA 含量,明显增加血清中 TNF- α 和 IL-2 的含量($P < 0.05$, $P < 0.01$);各剂量 EPA 均能提高荷瘤小鼠的脾脏指数和胸腺指数,而联合用药各组对荷瘤小鼠脏器指数无明显影响,但是可以提高荷瘤小鼠外周血中白细胞(white blood cells, WBC)的数量。结论:EPA 与 CTX 联合应用对 H22 肝癌小鼠有明显抑瘤作用,其作用的发挥可能与增强免疫、抗氧化作用有关。

[关键词] 美洲大蠊; 环磷酰胺; H22 荷瘤小鼠; 白细胞; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素 2

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)23-0130-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015230130

Synergistic Antitumor Effect of Extract from *Periplaneta americana* and Cyclophosphamide on Mice Bearing-H22

CHEN Jun-ya^{1,2}, GENG Ling^{2,3}, WU Dao-xun¹, GUO Mei-xian^{1*}, ZHANG Cheng-gui², LIU Guang-ming¹ (1. College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China; 2. Yunnan Provincial Key Laboratory of Entomological Biopharmaceutical R&D, Dali 671000, China; 3. College of Basic Medical Sciences, Dali University, Dali 671000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the synergistic antitumor effect and possible mechanism of extract from *Periplaneta americana* (EPA) and cyclophosphamide (CTX) on mice bearing-H22. **Method:** KM mice were inoculated subcutaneously with H22 cells to form solid tumor models and then were treated for 10 days with high dose, middle dose and low dose (50, 100, 200 mg·kg⁻¹) EPA, 30 mg·kg⁻¹ CTX or received combination therapy respectively. 10 days later, the tumor weight, liver index, and spleen index were measured; and the levels of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in liver tissues were measured to detect the antioxidant activity of drugs; the contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin 2 (IL-2), and the number of white blood cells were detected to evaluate the synergistic antitumor effect of EPA and CTX. **Result:** Compared with the model group, all the treatment groups could inhibit the tumor growth ($P < 0.05$), most significantly in combination group of 50 mg·kg⁻¹ and CTX, with the tumor inhibitory rate up to 61.96%. EPA alone and combination of EPA and CTX could increase SOD level in liver tissues, reduce MDA level, and significantly increase serum TNF- α and IL-2 levels ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The various doses of EPA could

[收稿日期] 20150109(011)

[基金项目] 云南省昆虫生物医药研发重点实验室开放课题项目(201406-04)

[第一作者] 陈俊雅, 硕士, 助理实验师, 从事抗肿瘤药物活性筛选及机制研究, Tel:0872-2257412, E-mail:langcjy@126.com

[通讯作者] * 郭美仙, 硕士, 实验师, 从事中药药理学研究, Tel:0872-2257412, E-mail:yndllyo@126.com

improve the spleen index and thymus index of tumor-bearing mice, but combination groups had no significant effect on the organs of tumor-bearing mice, but could enhance the amount of white blood cells in the peripheral blood.

Conclusion: Combined application of EPA and CTX has significant antitumor effect in mice bearing-H22, and the mechanism may be associated with antioxidant activity and enhanced immunity.

[**Key words**] *Periplaneta americana*; cyclophosphamide; mice bearing-tumor H22; white blood cell; tumor necrosis factor- α ; interleukin-2

目前肝癌是世界上第5大癌症,是最常见的实体瘤之一^[1],也是许多国家癌症死亡的主要原因,尤其在亚洲和非洲^[2]。导致肝癌发生的因素较多,但主要跟乙肝(HBV),丙肝(HCV)感染,黄曲霉素及过量的乙醇摄入有关^[3]。当前对肝癌治疗的方法有很多,但是由于其复发与转移,目前的治疗方法如放疗或索拉菲尼限制了对肝癌的治疗,因此与其他治疗方法的联合应用目前正在被采用^[4]。美洲大蠊为蜚蠊科药用昆虫,民间又称蟑螂等。目前以美洲大蠊为原料已经开发出3个新药,分别是通利血脉、养阴生肌的康复新液,疏肝理脾、活血解毒的肝龙胶囊,益气活血、通阳利水的心脉隆注射液。研究发现美洲大蠊提取物具有较好的抗肿瘤作用^[5-6],但是关于其对免疫功能的影响^[7]及增效减毒的作用研究较少,因此本研究将美洲大蠊提取物与环磷酰胺联合应用,考察其能否在免疫方面发挥抗肿瘤效果,为将美洲大蠊开发成抗肿瘤治疗的辅助药物提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 KM种小鼠,雌雄各半,体重18~22g,购自昆明医科大学实验动物中心,动物合格证号SCXK(滇)2011-0006。

1.2 药物及试剂 美洲大蠊提取物(EPA,由大理学院刘光明教授提供),注射用环磷酰胺(CTX,山西普德药业股份有限公司,批号04131206),丙二醛(MDA)测试盒(南京建成生物工程研究所,批号20140807),超氧化物歧化酶(SOD)测试盒(南京建成生物工程研究所,批号20140808),肿瘤坏死因子 α (TNF- α)酶联免疫检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20110801),白细胞介素-2(IL-2)酶联免疫检测试剂盒(昆明诺贝生物科技有限公司,批号20110902)。

1.3 仪器 EL104型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),IX-7型倒置相差显微镜(日本Olympus公司),Anthos 2010型酶标仪(奥地利安图斯公司)。

2 方法

2.1 对H22肝癌小鼠肿瘤生长的影响

2.1.1 H22肝癌移植瘤模型的制备 参考文献[8]方法,取第2代腹水保种传代的H22小鼠肝癌细胞,利用台盼蓝拒染实验在光学显微镜下计数活细胞的数量,并选用细胞活率>97%的H22细胞进行动物实验。无菌条件下将细胞密度调整为 $1.0 \times 10^7/\text{mL}$,于小鼠右腋皮下接种0.2 mL。

2.1.2 动物分组及给药 接种第2天,将小鼠随机分组:生理盐水(NS)模型组,30 mg·kg⁻¹ CTX阳性药组,50,100,200 mg·kg⁻¹ EPA 3个剂量组,EPA 3个剂量与CTX联合用药组,每组小鼠10只,雌雄各半。另取10只未接种小鼠作为正常组。其中正常组,NS组 ig 给予0.9%生理盐水,EPA各组 ig 给予各剂量EPA,CTX组隔日腹腔注射环磷酰胺液,联合用药组上午给予EPA,下午给予CTX, ig 剂量均为0.02 mL·g⁻¹,腹腔注射剂量为0.01 mL·g⁻¹。连续给药10 d。

2.2 指标测定

2.2.1 对肿瘤抑制率及脏器指数的影响 给药结束24 h后,眼球取血后颈椎脱臼处死小鼠,剥离肿瘤,取小鼠胸腺、脾脏并称重,按下列公式分别计算肿瘤抑制率和脏器指数。

$$\text{肿瘤抑制率} = (1 - \text{实验组瘤重}/\text{NS组瘤重}) \times 100\%$$

$$\text{脏器指数} = \text{脏器质量}(\text{mg})/\text{小鼠体重}(\text{g})$$

2.2.2 对H22肝癌小鼠外周血中白细胞数量的影响 取小鼠抗凝血0.2 mL,置于已盛有0.38 mL白细胞稀释液的小试管中,轻轻振荡混匀,用移液器取适量混匀液加入计数板中,盖上盖玻片,静置2~3 min待白细胞下沉后,在显微镜下计数白细胞的数量。

$$\text{白细胞数}/\text{L} = 4 \text{大格白细胞数}/4 \times 10 \times 20 \times 10^6$$

2.2.3 对H22肝癌小鼠肝脏组织中MDA和SOD的影响 取小鼠肝脏后,分别称取同一位置的肝脏500 mg,加入含有4.5 mL生理盐水的匀浆器中研磨,制备成10%的肝组织匀浆,4℃,3 000 r·min⁻¹离心10 min,用MDA测试盒测定组织匀浆上清液中

的 MDA 含量。然后将 10% 肝组织匀浆上清用生理盐水按 1:9 稀释成 1% 的组织匀浆,并用总超氧化物歧化酶测试盒测定其中的 SOD 活力,考马斯亮蓝蛋白测试盒测定蛋白含量。

2.2.4 对 H22 肝癌小鼠血清中细胞因子的影响 给药结束后,各组小鼠眼球取血,将全血置于冰浴中 2 h,然后 4 °C,4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,4 °C 保存。然后用 TNF-α 和 IL-2 酶联免疫检测试剂盒分别测定小鼠血清中的 TNF-α 和 IL-2 的含量。

2.3 统计学分析 采用 SPSS 16.0 分析软件进行统计学分析,计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 H22 肝癌小鼠肿瘤抑制率的影响 与模型组比较,各给药组均能明显降低瘤重 ($P < 0.05, P < 0.01$),50 mg·kg⁻¹ EPA 与 30 mg·kg⁻¹ CTX 联合用药抑瘤作用显著,抑瘤率为 61.96%。见表 1。

表 1 EPA 对 H22 肝癌小鼠肿瘤抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of EPA on tumor inhibitor rate of mice bearing H22 cells ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	瘤重 /g	抑瘤率 /%
模型	-	2.68 ± 0.82	-
CTX	30	1.17 ± 0.18 ²⁾	56.41
EPA	50	1.99 ± 0.68 ¹⁾	25.85
	100	1.55 ± 0.63 ²⁾	42.20
	200	1.24 ± 0.55 ²⁾	53.82
EPA + CTX	50 + 30	1.02 ± 0.36 ²⁾	61.96
	100 + 30	1.40 ± 0.46 ²⁾	47.62
	200 + 30	1.47 ± 0.50 ²⁾	44.99

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2~5 同)。

3.2 对 H22 肝癌小鼠脏器指数的影响 与模型组比较,CTX 组小鼠脾脏指数、胸腺指数明显降低 ($P < 0.01$),联合用药组均能明显降低脾脏指数、胸腺指数明显降低 ($P < 0.01$)。见表 2。

3.3 对 H22 肝癌小鼠外周血中 WBC 数量的影响 与正常组比较,模型组小鼠 WBC 数量明显降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,200 mg·kg⁻¹ EPA 与 CTX 联合明显升高小鼠 WBC 数量 ($P < 0.05$)。见表 3。

3.4 对 H22 肝癌小鼠肝组织中 MDA 含量和 SOD

表 2 EPA 对 H22 肝癌小鼠脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of EPA on organ index of mice bearing H22 cells ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	脾脏指数 /mg·g ⁻¹	胸腺指数 /mg·g ⁻¹
正常	-	3.75 ± 1.03 ²⁾	2.67 ± 0.82
模型	-	10.18 ± 1.85	2.23 ± 0.68
CTX	30	7.13 ± 1.01 ²⁾	0.99 ± 0.33 ²⁾
EPA	50	11.26 ± 2.26	1.95 ± 0.69
	100	9.47 ± 1.99	2.07 ± 1.13
	200	10.38 ± 1.61	2.33 ± 0.88
EPA + CTX	50 + 30	6.04 ± 0.84 ²⁾	0.96 ± 0.35 ²⁾
	100 + 30	6.41 ± 0.70 ²⁾	0.80 ± 0.36 ²⁾
	200 + 30	6.49 ± 1.52 ²⁾	0.87 ± 0.31 ²⁾

表 3 EPA 对 H22 肝癌小鼠外周血中 WBC 数量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of EPA on amount of WBC in mice bearing H22 cells ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	WBC 数量/×10 ⁹ /L
正常	-	28.86 ± 7.71 ²⁾
模型	-	9.47 ± 2.97
CTX	30	6.08 ± 2.93
EPA + CTX	50 + 30	11.71 ± 2.67
	100 + 30	6.38 ± 1.27
	200 + 30	23.09 ± 8.83 ²⁾

水平的影 响 与正常组比较,模型组小鼠 SOD 水平明显降低,MDA 含量明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,各剂量 EPA 及联合用药组均能提高 H22 肝癌小鼠肝组织中的 SOD 水平,并降低 MDA 含量,其中 100 mg·kg⁻¹ EPA,100 mg·kg⁻¹ EPA 与 CTX 联合用药作用最明显 ($P < 0.05$)。见表 4。

3.5 对 H22 肝癌小鼠血清中 TNF-α 和 IL-2 含量的影响 与正常组比较,模型组 TNF-α 和 IL-2 的含量均降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,联合用药各组可以更加明显的提高 H22 肝癌小鼠血清中 TNF-α 和 IL-2 的含量 ($P < 0.05$),单用 EPA 对 TNF-α 作用不明显,但可以显著提高血清中 IL-2 的含量 ($P < 0.05$)。见表 5。

4 讨论

肝癌是世界上常见的恶性肿瘤之一,目前包括肝癌在内的肿瘤治疗方法主要有化疗、放疗、基因疗法、病毒疗法等^[9]。但是手术仅能用于少数病人,而由于辐射敏感度和其他因素,放疗的疗效也并不

表 4 EPA 对 H22 肝癌小鼠 SOD 和 MDA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effects of EPA on contents of SOD and MDA in mice bearing H22 cells ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	MDA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$
正常	-	192.84 ± 18.06 ¹⁾	18.63 ± 3.24 ¹⁾
模型	-	172.03 ± 32.23	36.72 ± 7.46
CTX	30	175.66 ± 30.20	24.16 ± 5.42 ¹⁾
EPA	50	175.65 ± 20.36	25.24 ± 8.62
	100	198.37 ± 34.52 ¹⁾	24.31 ± 9.33 ¹⁾
	200	190.05 ± 27.50	24.18 ± 7.46 ¹⁾
EPA + CTX	50 + 30	180.24 ± 24.12	20.37 ± 6.32 ¹⁾
	100 + 30	205.47 ± 25.56 ¹⁾	20.44 ± 8.56 ¹⁾
	200 + 30	200.66 ± 40.25 ¹⁾	22.77 ± 5.38 ¹⁾

表 5 EPA 对 H22 肝癌小鼠血清中 TNF- α 和 IL-2 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effects of EPA on the TNF- α and IL-2 in serum of mice bearing-tumor H22 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	TNF- α / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	IL-2/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	189.64 ± 35.43	31.93 ± 1.98 ²⁾
模型	-	156.39 ± 39.38	27.64 ± 0.92
CTX	30	188.41 ± 58.15	33.20 ± 5.55 ²⁾
EPA	50	155.06 ± 34.87	28.53 ± 1.17
	100	165.16 ± 18.29	31.11 ± 2.75 ¹⁾
	200	200.65 ± 37.73 ¹⁾	34.24 ± 2.11 ²⁾
EPA + CTX	50 + 30	180.24 ± 24.12	32.37 ± 6.32 ²⁾
	100 + 30	205.47 ± 25.56 ¹⁾	32.44 ± 8.56 ²⁾
	200 + 30	200.66 ± 40.25 ¹⁾	36.77 ± 5.38 ²⁾

明显^[8]。因此,肝癌的治疗已经引起全世界的关注。目前临床上使用 CTX 对恶性肿瘤进行化疗有较好疗效,但是同时会导致许多副作用,特别是骨髓移植和免疫功能低下,造成白细胞水平下降^[9],免疫力降低,从而引起感染。因此在恶性肿瘤的治疗中调节机体抗病能力,尤其是癌症化疗引起的白细胞减少,成为提高抗癌治疗质量的关键因素^[10]。

美洲大蠊为蜚蠊科昆虫,民间又称偷油婆,菜婆虫等,属于蟑螂(又称蜚蠊)的一种。美洲大蠊作为中品入药最早记录于《神农本草经》,后在《本草纲目》中又被列为入药昆虫。目前利用美洲大蠊已经分离出抗病毒、强心等的活性成分,制成创面修复剂“康复新液”,治疗乙肝的“肝龙胶囊”和治疗心衰的“心脉隆注射液”。本研究既对 EPA 进行单独的抗

肿瘤作用考察,又对 EPA 与 CTX 联合应用进行了考察,结果发现:单用 CTX 的抑瘤率为 56.41%,200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ EPA 的抑瘤率为 53.82%,而二者联合应用抑瘤率可以达到 61.96%,说明 EPA 与 CTX 联合应用可以有效增强抑瘤效果,且可以明显增加荷瘤小鼠外周血中白细胞的数量,但是并不能改善 CTX 产生的胸腺抑制状况,这是否说明 EPA 增强免疫的作用主要与细胞免疫有关,对体液免疫影响不大,还是由于给药时间短,其对胸腺的改善作用未能体现出来,这些都有待于进一步研究。另外,联合用药可以提高荷瘤小鼠肝组织中 SOD 水平,并降低 MDA 的含量,提示具有抗氧化作用,因此可以引起肿瘤细胞死亡和凋亡^[11],这种作用与体外研究结果^[12]一致。癌症的发生与机体免疫功能的下降有关。肿瘤细胞常常会分泌一些免疫抑制因子到肿瘤微环境中,而肿瘤微环境的存在可以改变宿主的免疫功能和抑制免疫应答,并且肿瘤细胞可以避免免疫监视并通过传递凋亡信号给淋巴细胞,从而引起免疫细胞的凋亡^[13-14]。有活化的 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞产生的具有广泛生物活性的细胞因子 IL-2^[15],是所有 T 细胞亚群的生长因子,并且可以促进活化 B 细胞的增殖,是调控免疫应答的重要因子,也参与抗体反应、造血和肿瘤监视^[16-17]。而 TNF- α 来自于单核巨噬细胞,是巨噬细胞介导细胞毒效应的细胞因子,在体内也具有广泛的生物学活性:作为免疫应答中的一种中间介质,既有抗病效应,又有致病效应;可引起肿瘤出血坏死;可刺激成纤维细胞增殖;可促进 B 细胞的增殖及分化,增加 IL-2 受体的表达。在小鼠 H22 肝癌移植瘤模型中,单用 EPA 可以使荷瘤小鼠免疫器官的质量增加,器官指数提高,血清中 TNF- α 的含量增加,IL-2 的表达增强,从而使荷瘤小鼠的免疫力提高,抵抗肿瘤细胞的侵袭。

尽管与美洲大蠊提取物直接有关的研究很多,但本研究首次考察了美洲大蠊与 CTX 联合用药的抗肿瘤效果。本研究结果表明,美洲大蠊提取物对 H22 荷瘤小鼠具有一定的增效、减毒及增强免疫、抗氧化作用。尽管单用 EPA, EPA 与 CTX 联合应用抑瘤效果较好,但是由于中药成分与作用的复杂性,其抑瘤作用并没有形成剂量依赖关系,为了更好的验证两者联合应用的效果,需进一步考察美洲大蠊提取物对肝癌小鼠的免疫增强作用,并探讨其作用机制。

[参考文献]

[1] Ganslmayer M, Konturek P, Herold C, et al.

- Antitumoral efficacy of four histone deacetylase inhibitors in hepatoma *in vitro* and *in vivo* [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32 (12):5263-5269.
- [2] Du Y M, Kong G Y, You X N, et al. Elevation of highly up-regulated in liver cancer (HULC) by hepatitis B virus X protein promotes hepatoma cell proliferation via down-regulating p18 [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287 (31):26302-26311.
- [3] Chae S Y, Kim Y B, Lee J S, et al. Resistance to paclitaxel in hepatoma cells is related to static JNK activation and prohibition into entry of mitosis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 302 (9):G1016-G1024.
- [4] Jeong K Y, Lee E J, Yang S H, et al. Combination of macrophage inflammatory protein 1 alpha with existing therapies to enhance the antitumor effects on murine hepatoma [J]. *J Radiat Res*, 2015, 56(1):37-45.
- [5] 陈俊雅,耿玲,张旭强,等. 美洲大蠊提取物 CII-3 对 H22 肝癌小鼠血管生成作用的研究[J]. *肿瘤学杂志*, 2012, 18(4):274-276.
- [6] 张晓巍,朱艳. 苦参总碱和美洲大蠊提取物对孕激素受体阴性的子宫内膜癌细胞株 JEC 的作用研究[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(11):2210-2213.
- [7] 周琼,吴珍泉,李忠荣,等. 美洲大蠊对低免疫力小鼠免疫功能的影响[J]. *福建农林大学学报:自然科学版*, 2008, 37(5):519-522.
- [8] 魏伟,吴希美,李元建. *药理实验方法学*[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社, 2010:1581-1592.
- [9] Cai Y, Liu X R, Huang W D, et al. Synergistic antitumor effect of TRAIL and IL-24 with complete eradication of hepatoma in the CTGVT-DG strategy [J]. *Acta Bioch Bioph Sin*, 2012, 44 (6):535-543.
- [10] Jin X D, Li Q, Wu Q F, et al. Radiosensitization by inhibiting survivin in human hepatoma HepG2 cells to high-LET radiation [J]. *J Radiat Res*, 2011, 52 (3):335-341.
- [11] 应军,肖百全,杨威,等. 鸡血藤提取物对环磷酰胺致白细胞低下大鼠的影响[J]. *中草药*, 2011, 42(4):752-755.
- [12] 李海花. 低聚甘露糖醛酸升高白细胞作用及机理研究[D]. 青岛:中国海洋大学, 2013.
- [13] Tutino V, Caruso M G, Messa C, et al. Antiproliferative, antioxidant and anti-inflammatory effects of hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 and Hep3B cell lines [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32 (12):5371-5377.
- [14] 张成桂,何正春,焦春香,等. 美洲大蠊抗癌活性成分体外抗氧化活性分析[J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(9):2249-2250.
- [15] Suyu S, Gregory E P, John C K, et al. Tumor immunology[J]. *J Am Med Assoc*, 1997, 278 (22):1972-1981.
- [16] Bhattacharyya A, Mandal D, Lahiry L, et al. Black tea protects immunocytes from tumor-induced apoptosis by changing Bcl-2/Bax ratio[J]. *Cancer Lett*, 2004, 209 (2):147-154.
- [17] Geok C S, Natalia M O, Lei J, et al. IL-2 therapy promotes suppressive ICOS⁺Treg expansion in melanoma patients [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124 (1):99-110.
- [18] Philippe S, Micael D M, Pierre L, et al. Immunotherapy of established tumors in mice by intratumoral injection of an adenovirus vector harboring the human IL-2 cDNA: induction of CD8⁺ T-cell immunity and NK activity [J]. *Cancer Gene Ther*, 2001, 8 (5):321-332.
- [19] Ha K, Byunguk K, Jeong I S. Combined stimulation of IL-2 and 4-1BB receptors augments the antitumor activity of E7 DNA vaccines by increasing Ag-specific CTL responses [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (12):1-13.

[责任编辑 周冰冰]