

油菜花粉多糖对荷瘤鼠脾细胞 IL-2、TNF- α 产生及其 mRNA 表达的影响

杨晓萍¹, 吴谋成²

(¹华中农业大学园艺林学学院/园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070; ²华中农业大学食品科技学院, 武汉 430070)

摘要: 【目的】研究油菜花粉多糖 (LBPP) 对荷瘤鼠脾细胞 IL-2、TNF- α 的诱导及其 mRNA 表达的影响。【方法】通过动物抑制性肿瘤法制备肿瘤模型, 采用双抗体夹心 ELISA 法检测 IL-2、TNF- α 含量, 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 IL-2、TNF- α mRNA 的表达。【结果】LBPP 有明显抗肿瘤作用, 200 mg·kg⁻¹ 高剂量组抑瘤率可达 51.26%, 明显优于环磷酰胺 46.22%; LBPP 可显著促进荷瘤鼠脾细胞 IL-2、TNF- α 分泌 ($P < 0.01$), 提高荷瘤鼠脾细胞 IL-2、TNF- α mRNA 的表达 ($P < 0.01$), 高剂量组提高率分别达 56.37%、105.24%、1364% 和 1289%。【结论】LBPP 通过提高机体 IL-2、TNF- α mRNA 的表达而发挥抗肿瘤作用。

关键词: 花粉; 多糖; 白细胞介素-2; 肿瘤坏死因子- α ; mRNA; 油菜

Effect of Pollen Polysaccharide in *Brassica napus* L. on Production and mRNA Expression of IL-2 and TNF- α in Tumor-bearing Spleen Cells Mice

YANG Xiao-ping¹, WU Mou-cheng²

(¹College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University/Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, Wuhan 430070; ²College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: 【Objective】The effects of LBPP (polysaccharide of pollen of *Brassica napus* L.) on the production and mRNA expression of IL-2 and TNF- α in spleen cells of tumor-bearing mice were investigated. 【Method】Through transplantable animal tumor, two-antibody-sandwich ELISA was used to detect the content of IL-2 and TNF- α , and RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) was used to detect the mRNA expression of IL-2 and TNF- α . 【Result】LBPP could significantly inhibit tumor growth. The inhibition rate of 200 mg·kg⁻¹ dose was 51.26%, obviously superior to that of cyclophosphamid (46.22%). LBPP could significantly improve the production of IL-2 and TNF- α and their mRNA expression ($P < 0.01$), and the improving rates of 200 mg·kg⁻¹ dose were 56.37%, 105.24%, 1364%, and 1289%, respectively. 【Conclusion】The anti-tumor activity of LBPP is due to enhancement of the mRNA expression of IL-2 and TNF- α .

Key words: Pollen; Polysaccharide; IL-2; TNF- α ; mRNA; *Brassica napus* L.

0 引言

【研究意义】肿瘤患者免疫功能的高低不仅影响肿瘤的发生、发展, 而且直接关系到预后。白细胞介素-2 (IL-2) 和肿瘤坏死因子 (TNF- α) 均为反映机体细胞免疫功能的重要指标, 对肿瘤细胞具有直接或间

接杀伤作用, 在肿瘤发生、发展及其治疗中日益受到人们的重视^[1], 而肿瘤患者不仅产生 IL-2、TNF- α 能力低下^[2], 所产生的 IL-2、TNF- α 的活性也下降^[3], 因此, 提高或促进肿瘤患者体内 IL-2、TNF- α 的分泌对肿瘤的预防和治疗具有重要意义。【前人研究进展】自 Caillas 和 Jarvis 等发现蜂花粉有抗癌作用以来, 花

收稿日期: 2006-05-18; 接受日期: 2006-12-15

基金项目: 湖北省“十五”重点科技攻关计划资助项目 (2001AA204A03)

作者简介: 杨晓萍 (1971-), 女, 副教授, 博士, 研究方向为天然产物化学。通讯作者吴谋成 (1940-), 男, 教授, 研究方向为功能食品与分子生物学基础。Tel: 027-63766031; E-mail: yangxp@mail.hzau.edu.cn

粉具有明显抗肿瘤作用引起国内外学者的广泛关注, 初步探明花粉多糖是花粉主要的抑瘤因子。陆明等^[4]采用动物灌胃途径研究表明, 玉米花粉多糖对 S180 腹水型肿瘤有明显的抑制作用, 对瘤细胞数和瘤重的抑瘤率分别为 55.1%、62%, 明显优于玉米花粉组; 王开发等^[5]通过小鼠 Lewis 肺癌(足趾接种)模型静脉给药途径研究表明, 玉米花粉多糖有较明显的抗肿瘤作用, 且能明显提高和促进 Lewis 肺癌小鼠 NK 细胞活性。杨晓萍等^[6,7]通过动物抑制性肿瘤试验研究表明, 油菜花粉多糖能明显抑制 S180 肿瘤细胞生长, 增加荷瘤鼠血清 SOD、GSH-Px 活性, 降低 LDH 活性和 MDA 含量, 增强荷瘤鼠机体抗氧化能力。金丽琴等^[8]研究表明, 玉米花粉多糖对肺泡、胸腔巨噬细胞具有激活作用。耿越等^[9]研究证实, 玉米花粉多糖能提高腹腔巨噬细胞吞噬功能率及小白鼠血清溶血素的含量。杨新跃等^[10]研究表明, 茶叶花粉多糖能提高荷瘤鼠腹腔巨噬细胞的吞噬作用。以上研究表明花粉多糖通过增强荷瘤鼠机体免疫能力和抗氧化能力而发挥抗肿瘤作用。【本研究切入点】尽管近年来, 有关花粉多糖抗肿瘤的研究有了较大进展, 但目前研究多集中在玉米花粉多糖方面, 有关中国主要油料作物油菜 (*Brassica napus* L.) 花粉多糖研究较少, 未见从基因水平阐明抗癌机制的文献报道。【拟解决的关键问题】本文旨在探讨油菜花粉多糖对荷瘤鼠脾细胞 IL-2、TNF- α 的诱导及其 mRNA 表达的影响, 揭示 LBPP 抗肿瘤作用机理, 为油菜副产品的深加工及综合利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

油菜蜂花粉由武汉小蜜蜂保健食品有限公司提供; 注射用环磷酰胺 (Cy) 为江苏恒瑞医药股份有限公司产品; RPMI-1640 购于美国 GIBCO 公司; 小鼠白细胞介素-2 定量 ELISA 试剂盒由上海森雄科技实业有限公司提供 (进口分装); Trizol 总 RNA 提取试剂盒、M-MLV 反转录酶、RNA 酶抑制剂均购自 Invitrogen 公司; Taq DNA 聚合酶购自 Takara 公司; 昆明种小鼠[体重 (20 \pm 2) g, 雌雄各半]由湖北省预防医学科学院实验动物中心提供; S₁₈₀ 细胞由华中科技大学同济医学院病理研究室提供。

1.2 动物分组及处理

无菌抽取对数生长期的 S₁₈₀ 小鼠腹水, 以生理盐水制成每毫升细胞数为 1 \times 10⁶ 的细胞悬液, 每只小鼠

右前腋下接种 0.2 ml。接种次日随机分组, 每试验组 10 只, 设肿瘤对照组 (TC)、20 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹ Cy 组和 LBPP 剂量组 (LBPP-L 50、LBPP-M 100、LBPP-H 200 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹)。同时按试验设计灌胃, 每日 1 次, 每次 0.2 ml, 连续给药 10 d, 肿瘤模型组给等量生理盐水。

1.3 试验方法

1.3.1 花粉多糖的制备 油菜蜂花粉破壁后, 用热水按最佳工艺流程^[11]提取, 合并提取液, 真空浓缩, 加 3 倍体积 95% 乙醇沉淀, 离心; 沉淀以热水溶解, Sevag 法脱蛋白, 再次加入 3 倍体积 95% 乙醇沉淀, 4 $^{\circ}$ C 静置 24 h, 离心, 收集沉淀, 用 95% 乙醇、无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤, 挥干即得 LBPP 粗多糖。

1.3.2 LBPP 的抑瘤作用 连续灌胃给药 10 d, 停药次日小鼠称重, 眼眶取血并处死小鼠, 剥离瘤块, 用滤纸吸干后称重, 计算抑瘤率。

1.3.3 脾细胞培养 停药次日脱颈处死小鼠, 无菌取小鼠脾脏制成脾细胞悬液。将脾细胞悬液培养于 15% 新生牛血清 RPMI-1640 培养液中, 在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 收集培养上清液测定 IL-2、TNF- α 活性或收集细胞提取总 mRNA。

1.3.4 IL-2、TNF- α 含量测定 按小鼠 IL-2、TNF- α 定量 ELISA 试剂盒说明书操作检测 IL-2、TNF- α 含量。

1.3.5 mRNA 的提取 按上述方法制备脾细胞悬液后, 采用 Trizol 试剂盒按说明书操作提取 RNA。所提 RNA 用 DEPC 处理水 50 μ l 溶解, 用 5 μ l 检测 RNA 的完整性, 其余 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.6 逆转录 (RT) 反应合成 cDNA 取上述 mRNA 溶液 10 μ l, 按照逆转录试剂盒操作进行 cDNA 扩增, 反应产物即 cDNA 第 1 链 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.7 引物设计 IL-2 的上下游引物分别为: 5'-ACTCACCAGGATGCTCACAT-3' 和 5'-AGACTTGTCTACCTAATGGA-3', 合成片段长度为 256 bp; TNF- α 的上下游引物分别为: 5'-TCTCGAACCCCGAGTGACAA-3' 和 5'-ACCGCACCTCGACTCTC TAT-3', 合成片段长度为 123 bp; β -actin 的上下游引物分别为 5'-GCATGGAGTCCTGTGGCAT-3' 和 5'-CTAGAAGC ATTTGCGGTGG-3', 合成片段长度为 320 bp。引物由上海生物工程公司合成。

1.3.8 PCR 扩增 以上述 cDNA 第 1 链为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应体系总体积为 50 μ l。PCR 循环条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 54 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 0.5 min, 进行 30 个循环反应; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.3.9 PCR 产物定量 取 PCR 扩增产物 20 μl 经 5% 琼脂糖凝胶电泳, 1% 溴化乙锭显色后用 Multilmage™ Light Cabinet Filter Positions 凝胶扫描仪对电泳凝胶中的 PCR 产物条带进行密度扫描, 以 β -actin(肌动蛋白) 作为 RT-PCR 的质控, 计算 IL-2、TNF- α mRNA 与其对应的 β -actin 峰面积的比值, 从而得出 LBPP 作用荷瘤鼠后 IL-2、TNF- α mRNA 表达的相对变化^[12,13]。

1.4 数据处理

试验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS11.5 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 LBPP 的性状

LBPP 为淡黄色粉末, 溶于水, 不溶于高浓度的

乙醇、乙醚、丙酮等有机溶剂。硫酸-萘酚反应、硫酸-苯酚反应、硫酸-吡啶反应、双缩脲反应为阳性, 斐林试剂反应、碘-碘化钾反应为阴性, 说明 LBPP 为非淀粉类多糖, 含有糖醛酸和蛋白质, 不含有还原性糖。LBPP 分子量为 2.5×10^4 D, 红外光谱检测表明有糖类和蛋白质的特征吸收峰出现, 进一步说明 LBPP 为糖蛋白复合物, 气相色谱分析表明 LBPP 主要由阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成, 其分子摩尔比为 1.0 : 1.45 : 0.44 : 3.22 : 0.03。

2.2 LBPP 的抑瘤作用

接种肿瘤后各组动物增重正常, TC 组平均瘤重大于 1.00 g, 说明肿瘤生长良好, 造模成功。与 TC 组相比, LBPP 各剂量组均有显著抑瘤作用 ($P<0.01$), 200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 剂量组抑瘤率高达 51.26% (表 1)。

表 1 LBPP 的抑瘤作用 (n=10, $\bar{x}\pm s$)

Table 1 Effect of LBPP on tumor growth

	组别 Group				
	TC	Cy	LBPP-L	LBPP-M	LBPP-H
剂量 Dose ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)	-	20	50	100	200
瘤重 Tumor weight (g)	1.19 \pm 0.12	0.64 \pm 0.11**	0.87 \pm 0.16**	0.78 \pm 0.15**	0.58 \pm 0.12**
抑瘤率 Inhibition rate (%)	-	46.22	26.89	34.45	51.26

** $P<0.01$, 与 TC 组比 ** $P<0.01$ compared with TC group

2.3 LBPP 对荷瘤鼠脾细胞分泌 IL-2 和 TNF- α 的影响

由表 2 可知, LBPP 各剂量均可显著增强荷瘤鼠脾细胞分泌 IL-2、TNF- α ($P<0.01$), 且在一定范围

内随着 LBPP 浓度增大而增强。Cy 也可一定程度提高荷瘤鼠脾细胞 IL-2、TNF- α 的活性, 但明显较 LBPP 低 (表 2)。

表 2 LBPP 对荷瘤鼠脾细胞分泌 IL-2、TNF- α 的影响 (n=10, $\bar{x}\pm s$)

Table 2 Effect of LBPP on the production of IL-2 and TNF- α in spleen cell of tumor-bearing mice

组别 Group	剂量 Dose ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)	IL-2		TNF- α	
		含量 Content ($\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	提高率 Improving rate (%)	含量 Content ($\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	提高率 Improving rate (%)
TC	-	49.97 \pm 2.74	-	81.31 \pm 12.09	-
Cy	20	54.92 \pm 2.69*	10.02	94.06 \pm 15.26	15.68
LBPP-L	50	57.03 \pm 4.65**	14.13	136.06 \pm 12.77**	67.33
LBPP-M	100	70.25 \pm 5.72**	40.58	156.75 \pm 17.81**	92.78
LBPP-H	200	78.14 \pm 7.74**	56.37	166.88 \pm 17.35**	105.24

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 与 TC 组比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with TC group

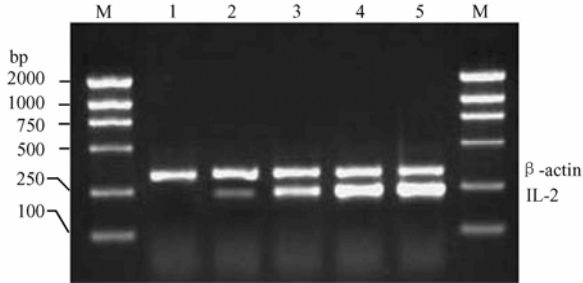
2.4 LBPP 对荷瘤鼠脾细胞 IL-2、TNF- α mRNA 表达的影响

小鼠脾细胞在体外培养 9 h 后即可检测到培养上清液中 IL-2 mRNA 的表达, 12 h 达到高峰, 之后逐渐下降。在 12 h 时, LBPP 可增强荷瘤鼠体内 IL-2 mRNA 的表达, 且在一定浓度范围内随 LBPP 浓度增加, IL-2

mRNA 表达水平提高 (图 1、图 2), 与 TC 组比, LBPP 各剂量对 IL-2 mRNA 表达水平的提高率分别为 6.29、10.92、13.64 倍。

小鼠脾细胞培养 4 h 后可检测到 TNF- α mRNA 的表达, 4.5 h 后达到高峰, 之后逐渐下降。在 4.5 h 时, LBPP 各剂量组脾细胞 TNF- α mRNA 表达水平显著高

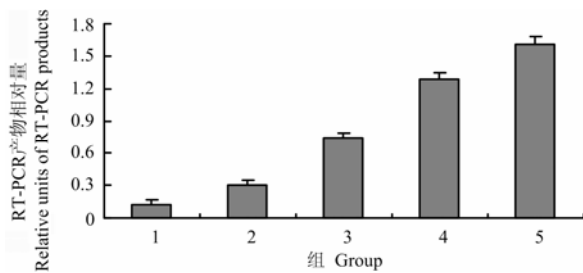
于荷瘤组，且在一定浓度范围内，随 LBPP 浓度增加，TNF- α mRNA 表达水平提高（图 3、图 4），与 TC 组比较，LBPP 各剂量对 TNF- α mRNA 表达水平的提高率分别为 8.53、11.53、12.89 倍。



M. PCR marker; 1. TC; 2. Cy; 3. LBPP-L; 4. LBPP-M; 5. LBPP-H

图 1 IL-2 mRNA RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of IL-2 mRNA RT-PCR

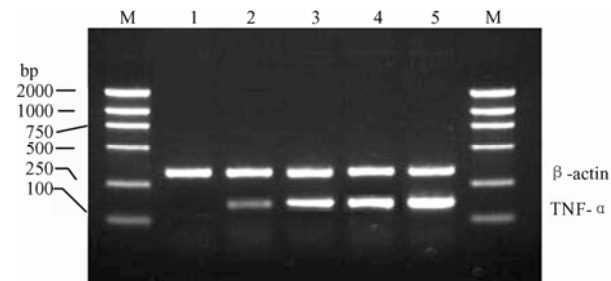


$P < 0.01$, t 检验表明 LBPP-L、LBPP-M 和 LBPP-H 与 TC 差异达极显著水平

1. TC; 2. Cy; 3. LBPP-L; 4. LBPP-M; 5. LBPP-H. Discrepancy of LBPP-L group and LBPP-M group and LBPP-H group compared with TC group indicating $P < 0.01$, respectively, as determined by t test

图 2 LBPP 对荷瘤鼠脾细胞 IL-2 mRNA 表达的影响

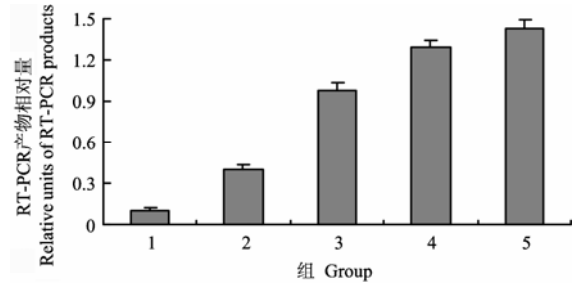
Fig. 2 Effect of LBPP on IL-2 mRNA expression in spleen cell of tumor-bearing mice



M. PCR marker; 1. TC; 2. Cy; 3. LBPP-L; 4. LBPP-M; 5. LBPP-H

图 3 TNF- α mRNA RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of TNF- α mRNA RT-PCR



$P < 0.01$, t 检验表明 LBPP-M 和 LBPP-H 与 TC 差异达极显著水平; $P < 0.05$, LBPP-L 与 TC 差异达显著水平

1. TC; 2. Cy; 3. LBPP-L; 4. LBPP-M; 5. LBPP-H. Discrepancy of LBPP-L group and LBPP-M group and LBPP-H group compared with TC group indicate $P < 0.01$, respectively, as determined by t test. Discrepancy of Cy group compared with TC group indicating $P < 0.05$

图 4 LBPP 对荷瘤鼠脾细胞 TNF- α mRNA 表达的影响

Fig. 4 Effect of LBPP on TNF- α mRNA expression in spleen cell of tumor-bearing mice

3 讨论

3.1 特定细胞因子 mRNA 表达水平的检测有助于判断细胞表达该细胞因子的水平。本试验采用体内刺激体外诱生^[15]的方法来检测荷瘤鼠脾细胞 IL-2、TNF- α 的分泌及其 mRNA 的表达，发现灌服 LBPP 后可使脾细胞 IL-2、TNF- α 的分泌及其 mRNA 的表达增加，且脾细胞分泌 IL-2、TNF- α 的变化规律与 mRNA 表达一致，可见灌服 LBPP 可提高荷瘤鼠脾细胞 IL-2、TNF- α mRNA 表达，IL-2、TNF- α mRNA 表达的增加是导致脾细胞 IL-2、TNF- α 分泌增加的重要原因。

3.2 研究表明，多糖类成分对肿瘤细胞无直接抑制作用，大多是通过提高宿主的免疫功能而发挥作用。IL-2 是 T 淋巴细胞的自分泌或旁分泌生长因子，可促进 T 细胞、B 细胞增殖，刺激 NK 细胞生长，诱导 CTL、LAK 等多种杀伤细胞分化等，从而发挥抗肿瘤作用。TNF- α 对肿瘤细胞具有直接的细胞毒作用和生长抑制作用^[14]，可直接杀伤肿瘤细胞，介导免疫应答，以及引起肿瘤微血管损伤和抑制肿瘤血管形成，继而引起肿瘤出血坏死等途径来发挥抗肿瘤作用。因此，IL-2、TNF- α 是目前公认的两种重要的抗肿瘤作用细胞因子。本试验结果也表明 LBPP 不仅有明显抗肿瘤作用，且在体内抗肿瘤有效剂量下，明显刺激荷瘤鼠脾细胞分泌 IL-2 和 TNF- α ，增强荷瘤鼠脾细胞 IL-2、TNF- α mRNA 的表达，这可能是油菜花粉多糖抗肿瘤作用的机制之一。

3.3 恶性肿瘤患者不仅产生 IL-2、TNF- α 能力低下, 所产生的 IL-2、TNF- α 活性也降低, 此即输入外源性 IL-2、TNF- α 治疗肿瘤的理论依据。但细胞因子具有多向性特点, 其在发挥抗肿瘤效应时, 其它生物学特性必然带来不相关的副作用, 同时, 由于效应细胞发挥和维持抗肿瘤作用需要较高浓度的细胞因子, 故临床上需大剂量冲击疗法和长期应用, 这种治疗量的细胞因子带来的毒性反应相当严重, 因此细胞因子在临床上的推广应用和疗效均受到限制, 通过用诱生剂提高或促进肿瘤患者体内 IL-2、TNF- α 的分泌不失为一种可行的方法。本试验结果表明油菜花粉多糖可剂量依赖性地提高 IL-2、TNF- α 的分泌及其 mRNA 的表达, 可作为 IL-2、TNF- α 的诱生剂预防和治疗肿瘤。

3.4 由于 IL-2 是通过自分泌或旁分泌方式发挥其生物学效应的, 在生理性免疫应答过程中, IL-2 不出现在血液等体液中, 故体液中 IL-2 含量极少, 难以直接测定, 通常是通过检测体外诱生的 IL-2 来反映体内 IL-2 活性水平^[1]。在体内 TNF- α 主要来源于活化的单核巨噬细胞, TNF- α 可进入体液成为分泌型 TNF- α , 也可与细胞膜结合成为跨膜型, 因此可通过检测体内或体外诱生的 TNF- α 来反映体内 TNF- α 活性水平。本试验统一采用体内刺激体外诱生的方法来检测反映体内 IL-2、TNF- α 活性水平。

4 结 论

4.1 从油菜蜂花粉中提取分离得到活性成分油菜花粉多糖 LBPP, 该多糖有明显的抗肿瘤活性。

4.2 LBPP 通过促进荷瘤鼠脾细胞 IL-2、TNF- α 的诱生, 提高荷瘤鼠脾细胞 IL-2、TNF- α mRNA 的表达而发挥抗肿瘤作用, 此为其作用机理之一。

4.3 油菜为中国主要油料作物之一, 资源十分丰富, 利用其副产品蜂花粉来开发防癌抗癌活性成分或功能食品能大大增加油菜的附加值, 具有较高的实用价值和广阔的应用前景。

References

- [1] 杨 镇. 肿瘤免疫学. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998: 42-45.
Yang Z. *Tumor Immunology*. Wuhan: Hubei Science and Technology Press, 1998: 42-45. (in Chinese)
- [2] 马 焱, 姜 训, 严 杰. 胎盘转移因子对荷瘤小鼠脾脏 IL-2 诱生水平和外周血 TNF 活性的调节作用. 上海免疫学杂志, 1994, 14(3): 148-150.
Ma Y, Jiang X, Yan J. Effect of placenta transfer factor on production

- of IL-2 in spleen of mice with tumor-bearing and TNF activity of peripheral blood. *Shanghai Journal of Immunology*, 1994, 14(3): 148-150. (in Chinese)
- [3] Yan M, Chen G, Fang L L, Liu Z M, Zhang X L. Immunologic changes to autologous transfusion after operational trauma in malignant tumor patients: Neopterin and Interleukin-2. *Journal of Zhejiang University Science*, 2005, 6B(1): 49-52.
- [4] 陆 明, 王开发. 花粉、花粉多糖、灵芝孢子抑制肿瘤作用的对比研究. 蜜蜂杂志, 2002, (11): 5-6.
Lu M, Wang K F. Studies on the maize pollen, polysaccharides of maize pollen and maize spores inhibiting effect to the proliferation of sarcoma 180 cells. *Journal of Bee*, 2002, (11): 5-6. (in Chinese)
- [5] 王开发, 支崇远, 严惠芳, 陆宏祺, 卜华祥, 左其芳. 花粉多糖注射剂临床前抗肿瘤药效学预试. 蜜蜂杂志, 2004, (6): 3-4.
Wang K F, Zhi C Y, Yan H F, Lu H Q, Bu H X, Zuo Q F. Pretesting for preclinical antineoplastic pharmacodynamics of injection of pollen polysaccharides. *Journal of Bee*, 2004, (6): 3-4. (in Chinese)
- [6] 杨晓萍, 罗祖友, 吴谋成. 油菜花粉多糖的制备及其对荷瘤小鼠的影响. 食品科学, 2005, 26(12): 202-204.
Yang X P, Luo Z Y, Wu M C. Study on preparation of rape pollen polysaccharide and its effect on tumor-bearing mice. *Food Science*, 2005, 26(12): 202-204. (in Chinese)
- [7] 杨晓萍, 吴谋成. 油菜蜂花粉多糖抗肿瘤作用的研究. 营养学报, 2006, 28(2): 160-162.
Yang X P, Wu M C. Study on the antitumor effect of rape bee-pollen polysaccharide in tumor-bearing mice. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2006, 28(2): 160-162. (in Chinese)
- [8] 金丽琴, 吕建新, 俞 康, 袁 谦, 谢克俭, 王开发, 张玉兰. 玉米花粉多糖对人胸腔巨噬细胞的激活作用. 中国病理生理杂志, 2000, 16(8): 726-729.
Jin L Q, Lü J X, Yu K, Yuan Q, Xie K J, Wang K F, Zhang Y L. The activation effect of maize pollen polysaccharides on human thoracic cavity macrophages. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2000, 16(8): 726-729. (in Chinese)
- [9] 耿 越, 王开发. 玉米蜂花粉多糖对小白鼠免疫功能影响. 山东师范大学学报(自然科学版), 1999, 14(2): 184-186.
Geng Y, Wang K F. Influences of polysaccharides of bee pollen of maize on the immunological function of mouse. *Journal of Shandong Normal University (Natural Science)*, 1999, 14(2): 184-186. (in Chinese)
- [10] 杨新跃, 刘志勇, 汪礼国, 戴黎光, 谢国秀, 周银平, 曾志将. 蜂花粉多糖液抑制肿瘤作用的实验研究. 江西农业大学学报, 2006, 28(2): 293-294.
Yang X Y, Liu Z Y, Wang L G, Dai L G, Xie G X, Zhou Y P, Zeng Z J.

- Studies on the inhibiting effect of honeybee pollen polysaccharide on the proliferation of sarcoma 180 cells in tumor-bearing mice. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2006, 28(2): 293-294. (in Chinese)
- [11] 杨晓萍, 罗祖友, 吴谋成. 油菜花粉多糖提取工艺条件研究. *食品科学*, 2004, 25(9): 128-132.
Yang X P, Luo Z Y, Wu M C. Polysaccharide extraction study on rape pollen. *Food Science*, 2004, 25(9): 128-132. (in Chinese)
- [12] Dukas K, Sarfati P, Vaysse N, Pradayrol L. Quantitation of changes in the expression of multiple genes by simultaneous polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 1993, 215(1): 66-72.
- [13] Babu J S, Kanangat S, Rouse B T. Limitations and modifications of quantitative polymerase chain reaction. *Journal of Immunology Methods*, 1993, 165(2): 207-216.
- [14] Petrova E E, Valyakina T I, Simonova M A, Komaleva R L, Khaidukov S V, Makarov E V, Blokhin D Y, Ivanov P K, Andronova T M, Nesmeyanov V A. Muramyl peptides augment cytotoxic effect of tumor necrosis factor-alpha in combination with cytotoxic drugs on tumor cells. *International Immunopharmacology*, 2006, 6(9): 1377-1386.

(责任编辑 曲来娥)