

5-氟尿嘧啶联用拟康氏木霉胞外多糖对结肠癌移植瘤小鼠的抑瘤作用

朱 磊^{1,2}, 芦静波^{1,2}, 陈靠山^{1,2}

(皖南医学院 1. 药学院; 2. 安徽省多糖药物工程技术研究中心, 安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 研究拟康氏木霉胞外多糖联用 5-氟尿嘧啶体内抗肿瘤活性。方法: 以 CT26 结肠癌移植瘤小鼠为模型, 检测药物对小鼠 CT26 移植瘤的抑制作用和生理指标的影响。结果: 联合用药组的抑瘤率随拟康氏木霉胞外多糖浓度的升高显示出剂量依赖性且高于 5-氟尿嘧啶单独给药组, 与 5-氟尿嘧啶组相比, 联合用药明显改善小鼠的各项生理指标与生存质量。结论: 拟康氏木霉胞外多糖联用 5-氟尿嘧啶对治疗小鼠结肠癌具有协同与增效减毒作用。

【关键词】拟康氏木霉; 胞外多糖; 抗肿瘤; 免疫调节

【中图分类号】R 285.5 **【文献标识码】**A

【DOI】10. 3969/j. issn. 1002-0217. 2016. 02. 004

Antitumor activity of an exopolysaccharide from *Trichoderma pseudokoningii* complexes carrying 5-fluorouracil on CT26-tumor bearing mice

ZHU Lei, LU Jingbo, CHEN Kaoshan

Department of Pharmacy, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To observe the antitumor effect of exopolysaccharide (EPS) from *Trichoderma pseudokoningii* containing 5-fluorouracil (5-FU) in tumor bearing mice using in vivo technique. **Methods:** CT26-tumor bearing mouse models were developed and the effects of EPS on inhibition of the tumor and physiological indexes were determined. **Results:** Combined EPS with 5-FU significantly inhibited the CT26 tumor growth in a dose-dependent manner, and the inhibition rate in CT26 tumor was higher using the complexes than simple 5-FU. Still, the physiological index and the quality of life were improved in the tumor bearing mice after intervention with EPS plus 5-FU. **Conclusion:** Combined EPS with 5-FU presents enhanced antitumor activity and EPS could attenuate toxicity effect induced by 5-FU.

【Key words】*Trichoderma pseudokoningii*; exopolysaccharide; antitumor activity; immunoregulation

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(1408085MH197); 安徽省高校省级自然科学基金项目(KJ2015A199); 芜湖市科技计划项目(2012jc14)

收稿日期: 2015-10-20

作者简介: 朱 磊(1990-), 男, 2013 级硕士研究生, (电话) 13685532095, (电子信箱) llz4925@163.com;

陈靠山, 男, 教授, 研究生导师, (电子信箱) ksc313@126.com, 通讯作者。

- [4] 郭玉兰, 李善文, 张爱青, 等. 蟾蜍灵对体外培养的大鼠肾小球系膜细胞分泌肿瘤坏死因子- α 与白细胞介素-1 β 的影响[J]. 医药导报, 2009, 28(9): 1114 - 1116.
- [5] NAVANEETHAN S D, NIGWEKAR S U, STRIPPOLI GF. Aldo-sterone antagonists for preventing the progression of chronic kidney disease[J]. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2014, 4(4): 297 - 301.
- [6] QIU W, ZHOU J, ZHU G *et al.* Sublytic C5b-9 triggers glomerular mesangial cell apoptosis via XAF1 gene activation mediated by p300-dependent IRF-1 acetylation [J]. Cell Death Dis, 2014, 5(4): e1176.
- [7] CHEN KC, PENG CC, HSIEH CL *et al.* Exercise ameliorates renal cell apoptosis in chronic kidney disease by intervening in the intrinsic and the extrinsic apoptotic pathways in a rat model[J]. Evid Based Complement Alternat Med 2013, 2013(6): 368450.
- [8] 陈瑜, 刘翠萍, 茅晓东, 等. 糖基化终产物诱导小鼠足细胞内质网应激和细胞凋亡的研究[J]. 医学研究生学报, 2013, 26(11): 1129 - 1133.
- [9] LI X, PABLA N, WEI Q *et al.* PKC-delta promotes renal tubular cell apoptosis associated with proteinuria [J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(7): 1115 - 1124.
- [10] 谭进, 刘华锋, 陈孝文. 自噬与肾脏固有细胞损伤[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2012, 13(9): 836 - 838.
- [11] DONG Z. Introduction: autophagy in kidneys [J]. Semin Nephrol, 2014, 34(1): 1.
- [12] RUBINSTEIN AD, KIMCHI A. Life in balance—a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis [J]. J Cell Sci, 2012, 125(11): 5259 - 5268.
- [13] DING WX, YIN XM. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles and analysis [J]. Biol Chem, 2012, 393(7): 547 - 564.
- [14] ROMAO S, MUNZ C. LC3-associated phagocytosis [J]. Autophagy, 2014, 10(3): 526 - 528.
- [15] PANKIV S, CLAUSEN TH, LUMARK T *et al.* p62/AQATM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy [J]. J Biol Chem, 2007, 282(33): 24131 - 24145.

癌症是众所周知的严重危害人类生命健康及威胁社会发展的疾病。随着当今社会人类生活环境日益污染,生活压力的提高,人口老龄化以及人们日常生活饮食习惯变化等导致癌症的病死率升高^[1]。在美国,结直肠癌在癌症发病率和病死率中均排列第三位,2014年大约有71 830名男性和65 000名女性被诊断为结直肠癌,并且将有26 270名男性和24 040名女性死于这种恶性疾病^[2]。化疗药物在癌症的治疗中占主要地位,但大多数化疗药物在杀伤癌细胞的同时也杀灭了机体正常细胞,会对机体造成严重的副作用^[3]。所以研发具有癌症治疗效果同时毒副作用较低的药物或者辅助治疗药物迫在眉睫。

多糖(polysaccharides)是由10个以上的单糖通过糖苷键链接而成的天然高分子聚合物,广泛存在于天然产物与动物中,近年来国内外学者研究发现多糖具有较好的抗肿瘤活性与较低的毒性^[4],且较多的多糖作为免疫调节剂通过提高机体免疫而发挥抗肿瘤活性^[5-11]。拟康氏木霉(*Trichoderma pseudokoningii*)是本课题组从玉米秸秆中分离的一种丝状真菌,由刘世名博士鉴定,属于真菌类半知菌亚门、丝胞纲、木霉属。其生长所需的环境条件比较简单(营养、温度、光照等),且生长迅速。前期实验表明,拟康氏木霉胞外多糖TPS1-4组分能显著促进小鼠脾淋巴细胞的体外增殖及巨噬细胞的吞噬活性、酸性磷酸酶活性、NO产量、促进脾淋巴细胞体外分泌细胞因子,对免疫低下的小鼠具有良好的免疫调节作用^[12]。在体外能够抑制人白血病K562细胞、人白血病HL-60细胞、人胃癌SGC-7901细胞增殖,诱导人白血病K562、人胃癌SGC-7901细胞凋亡^[13]。在此基础上,作为一种免疫调节剂,拟康氏木霉胞外多糖的体内抗肿瘤活性至今尚未被研究。本实验通过建立CT26结肠癌小鼠模型,采用5-氟尿嘧啶(5-FU)联合拟康氏木霉胞外多糖(extracellular polysaccharides of *Trichoderma pseudokoningii*, EPS)对CT26结肠癌移植瘤小鼠体内抗肿瘤活性及机制进行初步研究,为将其开发成为一种抗肿瘤药物或辅助治疗药物提供理论依据和数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品及试剂 EPS由本实验室提供;瘤株CT26购自于中国科学院上海药物研究所;0.25%胰酶消化液购自于Gibco公司;特级胎牛血清、5-FU购自于Sigma公司;RPMI 1640培养基(含青霉素,

链霉素)购自于南京建成生物科技有限公司。

1.1.2 实验动物 BALB/C清洁级雌性小鼠,4~8周龄,体质量18~20g,购自于南京青龙山养殖场。

1.1.3 仪器 超净工作台,苏州净化设备有限公司;CO₂培养箱,日本SANYO公司;倒置显微镜,日本OLYMPUS公司;EYELA N-1100型旋转蒸发器,日本东京理化公司;SHB-III S循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;艾科浦超纯水系统,颐洋企业发展有限公司;LABCONCO冷冻浓缩干燥系统,美国LABCONCO公司;Sigma4K15型离心机,美国Sigma公司;TDL-5-A型低速台式离心机,上海安亭科技仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 EPS的制备 拟康氏木霉接种于PDA培养基,待其活化后,由平板接入液体培养基中,在28℃、120 r/min的摇床振荡条件下培养7d,用四层纱布除去菌丝和孢子后,离心收集上清液,置于旋转蒸发器中旋转蒸发,浓缩至原体积的1/3,加入3倍体积95%乙醇静置过夜,离心收集沉淀,加入蒸馏水后用Sevag法(氯仿:正丁醇=4:1, V/V)脱蛋白,蒸馏除去有机溶剂,过D101大孔树脂,透析后经冷冻干燥得到EPS。

1.2.2 肿瘤细胞培养 小鼠结肠癌细胞CT26置于RPMI 1640完全培养基中,5%CO₂培养箱中恒温37℃培养。取处于对数期的细胞进行实验。

1.2.3 移植瘤模型的建立 PBS稀释处于对数生长期的CT26细胞,使其密度为2×10⁶个/mL。75%酒精对小鼠右腋下进行消毒擦拭,腋下接种0.2 mL/只,每日观察小鼠右腋,待其出现绿豆粒大小肿块,说明移植瘤模型建立成功。

1.2.4 EPS联用5-FU对小鼠CT26结肠癌移植瘤生长和免疫器官的影响 50只建模成功的雌性BALB/C小鼠随机分成肿瘤模型组(对照组)、5-FU组[20 mg/(kg·d)],EPS低、中、高剂量[50、100、200 mg/(kg·d)+5-FU 20 mg/(kg·d)]组。每日固定时间灌胃给药一次,连续给药10d,末次给药后禁食不禁水12h,计算各组存活小鼠个数(肿瘤模型组存活8只;5-FU组存活7只;EPS低剂量+5-FU组存活7只;EPS中剂量+5-FU组存活7只;EPS高剂量+5-FU组存活7只)并称量,脱颈处死,75%酒精浸泡,剪开其腋下皮肤及胸腔,剥离肿瘤组织和胸腺脾脏,分别称重记录。计算抑瘤率、脾脏指数和胸腺指数及各组小鼠存活率。计算方法如下:

抑瘤率 = [(肿瘤模型组平均瘤质量 - 给药组平均瘤质量) / 肿瘤模型组平均瘤质量] × 100%

脾脏指数 = 脾脏质量(mg) / 终体质量(g)

胸腺指数 = 胸腺质量(mg) / 终体质量(g)

1.2.5 EPS 联用 5-FU 对小鼠心脏、肝脏、肾脏的影响 小鼠末次给药后禁食不禁水 12 h。称重并脱颈处死,75% 酒精浸泡,剪开其胸腔,剥离心脏、肝脏及其肾脏,分别称重记录。

1.2.6 EPS 联用 5-FU 对小鼠血常规的影响 小鼠末次给药后禁食不禁水 12 h,每只小鼠眼球取血并用 EDTA 抗凝管收集,颠倒数次后立即送检。

1.2.7 数据统计处理 所有数据均采用均数 ± 标准差记录,运用 SPSS 11.0 软件分析,多组均数比较,使用单因素方差分析,两组间差异比较采用 Duunnett-t 检验, P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EPS 联用 5-FU 对 CT26 结肠癌小鼠的抑瘤作用及对免疫器官和体质量的影响 结果如表 1 所

示,和肿瘤模型组相比,各用药组小鼠平均体质量均明显下降,其中 5-FU 组下降最为明显,说明单独 5-FU 用药毒性最大;但和 5-FU 组相比,各联合用药组小鼠平均体质量均明显上升,提示 EPS 可以在很大程度上缓解 5-FU 治疗癌症带来的毒性。实验结果也显示,5-FU 组和联合用药组均能明显减少 CT26 小鼠的瘤质量,且和 5-FU 组相比,联合用药中、高剂量组的瘤质量均明显比 5-FU 组较低,且呈剂量依赖性,其中 EPS 高剂量 [200 mg/(kg · d)] 联合 5-FU [20 mg/(kg · d)] 组瘤质量最低(P < 0.001),抑瘤率高达 72.24%,说明 EPS 联合 5-FU 用药对 CT26 结肠癌具有更好的疗效。

表 2 显示,与肿瘤模型组相比,各用药组的胸腺和脾脏质量均明显降低,但和 5-FU 组相比,各用药组的胸腺和脾脏质量均上升,说明 EPS 的摄入提高了小鼠机体的免疫器官质量,提升了小鼠免疫器官指数,增强了小鼠机体的免疫力。

表 1 联合用药对 CT26 结肠癌小鼠体质量、瘤质量及抑瘤率的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/[mg/(kg · d)]	体质量/g	瘤质量/g	抑制率/%
肿瘤模型组	-	26.39 ± 1.34	2.99 ± 0.89	-
5-FU 组	20	18.70 ± 1.56***	1.24 ± 0.62***	58.53
EPS 低剂量 + 5-FU 组	50(EPS) + 20(5-FU)	21.72 ± 1.86***#	1.09 ± 0.36***	63.55
EPS 中剂量 + 5-FU 组	100(EPS) + 20(5-FU)	22.89 ± 2.51***#	0.89 ± 0.51***	70.23
EPS 高剂量 + 5-FU 组	200(EPS) + 20(5-FU)	23.31 ± 2.34*###	0.83 ± 0.49***	72.24
F	-	15.096	16.668	-
P	-	<0.001	<0.001	-

注:与肿瘤模型组相比,* P < 0.05,** P < 0.01,*** P < 0.001;与 5-FU 组相比,#P < 0.05,##P < 0.01,###P < 0.001。

表 2 联合用药对 CT26 结肠癌小鼠免疫器官的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/[mg/(kg · d)]	脾脏质量/g	脾脏指数/(mg/g)	胸腺质量/g	胸腺指数/(mg/g)
肿瘤模型组	-	0.209 ± 0.069	7.83 ± 2.27	0.129 ± 0.024	4.90 ± 0.99
5-FU 组	20	0.050 ± 0.023***	2.68 ± 1.31***	0.070 ± 0.006***	3.75 ± 0.25*
EPS 低剂量 + 5-FU 组	50(EPS) + 20(5-FU)	0.126 ± 0.035***#	5.76 ± 1.40*##	0.116 ± 0.031##	5.27 ± 0.99##
EPS 中剂量 + 5-FU 组	100(EPS) + 20(5-FU)	0.060 ± 0.032***	2.93 ± 1.06***	0.084 ± 0.024**	3.67 ± 0.84*
EPS 高剂量 + 5-FU 组	200(EPS) + 20(5-FU)	0.081 ± 0.028***	3.42 ± 0.95***	0.104 ± 0.027#	4.43 ± 0.90
F	-	18.19	17.50	7.073	4.925
P	-	<0.001	<0.001	<0.001	0.003

注:与肿瘤模型组相比,* P < 0.05,** P < 0.01,*** P < 0.001;与 5-FU 组相比,#P < 0.05,##P < 0.01。

2.2 EPS 联用 5-FU 对 CT26 结肠癌小鼠心、肝、肾的影响 实验结果如表 3 所示,和肿瘤模型组相比,各用药组的脏器质量均下降,其中 5-FU 肝脏质量下降显著(P < 0.01),肾脏质量下降更为显著(P < 0.001),提示 5-FU 对 CT26 结肠癌小鼠肝脏和肾脏毒性最大;和 5-FU 组相比,各联合用药组脏器质量均高于 5-FU 组,虽然差异无统计学意义,但在一定程度上说明 EPS 可以降低 5-FU 对机体心脏、肝脏和

肾脏带来的毒性,对这些脏器具有一定的保护作用。
2.3 EPS 联用 5-FU 对 CT26 结肠癌小鼠血液学参数的影响 如表 4 可以看出,各组之间的红细胞和白细胞总数参数虽然没有统计学差异,但可以看出 EPS 可以一定程度地改善小鼠异常红细胞和白细胞总数,各联合用药组小鼠的血小板总数均低于肿瘤模型组和 5-FU 组,且 EPS 低剂量联合 5-FU 组小鼠血小板总数与 5-FU 组相比具有统计学差异(P <

0.01)。5-FU 组血小板总数最高,提示凝血功能亢进,易发生血管内凝血,进一步加重出血。结果表明

EPS 可以有效降低 CT26 结肠癌小鼠的血小板水平。

表3 联合用药对小鼠心脏、肝脏、肾脏的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/[mg/(kg·d)]	心脏/g	肝脏/g	肾脏/g
肿瘤模型组	-	0.141 ± 0.030	1.325 ± 0.177	0.329 ± 0.030
5-FU 组	20	0.107 ± 0.027	0.931 ± 0.218**	0.237 ± 0.034***
EPS 低剂量 + 5-FU 组	50(EPS) + 20(5-FU)	0.119 ± 0.024	1.189 ± 0.210	0.286 ± 0.040
EPS 中剂量 + 5-FU 组	100(EPS) + 20(5-FU)	0.116 ± 0.029	1.093 ± 0.246	0.279 ± 0.043
EPS 高剂量 + 5-FU 组	200(EPS) + 20(5-FU)	0.126 ± 0.034	1.013 ± 0.202*	0.269 ± 0.052*
F	-	1.476	3.952	5.074
P	-	0.233	0.01	0.003

注:与肿瘤模型组相比,* P<0.05,** P<0.01,*** P<0.001。

表4 联合用药小鼠血常规参数的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/[mg/(kg·d)]	红细胞/(10 ¹² /L)	白细胞/(10 ⁹ /L)	血小板/(10 ⁹ /L)
肿瘤模型组	-	9.33 ± 0.73	3.91 ± 0.178	601.00 ± 0.115.56
5-FU 组	20	8.85 ± 0.24	2.21 ± 1.41	642.57 ± 176.53
EPS 低剂量 + 5-FU 组	50(EPS) + 20(5-FU)	8.38 ± 1.41	2.37 ± 1.34	418.86 ± 81.94*##
EPS 中剂量 + 5-FU 组	100(EPS) + 20(5-FU)	9.08 ± 0.50	2.82 ± 1.03	454.86 ± 122.67#
EPS 高剂量 + 5-FU 组	200(EPS) + 20(5-FU)	8.87 ± 0.16	2.96 ± 0.80	568.00 ± 108.31
F	-	1.597	1.895	4.223
P	-	0.200	0.136	0.008

注:与肿瘤模型组相比,* P<0.05;与5-FU 组相比,#P<0.05 ##P<0.01。

3 讨论

具有抗肿瘤活性的天然动物及植物多糖广泛存在于自然界中,而将其开发成为一种新型抗肿瘤药物往往要以开发及消耗其他的天然资源为代价来获得。自从1969年日本学者报道香菇多糖具有抗肿瘤活性后,天然真菌多糖越来越受到国内外学者的广泛关注,之后又有约两百多种具有抗肿瘤活性的真菌多糖陆续被发现^[14],我国真菌资源丰富,对真菌多糖的研究近年取得很大的进展,除了传统的大型真菌来源的真菌多糖,许多研究表明霉菌来源的多糖也同样具有多种生物学活性,因其开发所需成本低廉、生长所需环境简单、消耗资源少、培养易操作等优势,开始受到关注。拟康氏木霉是一种丝状真菌,生长期间能够产生大量胞外多糖,并且其生长所需环境条件简单且生长迅速,成本低廉^[15]。本实验室前期实验已经证明 EPS 具有多种生物学活性:可显著提高番茄和黄瓜叶片水杨酸含量,激活植物的活性氧爆发使之产生诱导抗性及系统抗性,起到预先免疫的作用^[16-17]。该多糖体外能显著诱导脾淋巴细胞增殖,促进巨噬细胞的吞噬活性,抑制白血病细胞 K562 的增殖,提高机体免疫力^[12,18]。在细胞水平实验和动物实验中,发现该多糖能显著刺激

小鼠脾淋巴细胞增殖,促进小鼠脾淋巴细胞分泌 IL-2,增强小鼠巨噬细胞的吞噬作用,对正常小鼠及免疫低下模型小鼠的体液免疫及细胞免疫均有良好的促进作用^[12],并且对肿瘤细胞凋亡有显著的诱导作用^[18]。

化疗药物是治疗肿瘤的传统药物,而目前临床上大部分的化疗药物在杀伤肿瘤细胞的同时也杀死了机体正常的细胞,缺乏靶向性,对造血系统、免疫系统造成很大伤害。5-FU 作为目前临床上最有效的化学治疗药物之一,由于其毒性的累积性,连续使用会造成机体极大的伤害。此外,本研究在对小鼠肿瘤治疗的日常观察中发现,单纯灌胃 5-FU 给药组的小鼠体态日渐瘦弱,毛色发黄无光泽且凌乱,行动及反应迟缓,嗜睡,而联合给药组小鼠生存状态明显较好,体态较 5-FU 给药组丰盈,毛色自然柔顺,行动及反应迅速,说明 EPS 在一定程度上减轻了 5-FU 治疗肿瘤中给机体带来的毒性伤害,改善了小鼠生存质量。从实验数据提示,联合给药组的抑瘤率较 5-FU 组高且呈剂量依赖性,小鼠免疫器官指数、心脏、肝脏和肾脏质量也在一定程度上较 5-FU 组高,这些结果显示 EPS 与 5-FU 联用具有协同作用,同时一定程度上减轻了 5-FU 单独用药对机体带来的

免疫系统损伤和对脏器的毒性。从本实验对血液学参数的结果分析可以看出,单纯 5-FU 给药的 CT26 移植瘤小鼠血液中红细胞和白细胞总数较低,而 EPS 联用 5-FU 可以改善 CT26 移植瘤小鼠血液中红细胞和白细胞总数,同时血小板参数说明 EPS 联用 5-FU 一定程度上遏制了 CT26 结肠癌小鼠凝血功能的亢进。

本实验对 EPS 联用 5-FU 治疗 CT26 结肠癌移植瘤小鼠进行了初步的分析,联合用药的协同与增效减毒的作用为将 EPS 开发为一种有效的癌症辅助治疗药物与免疫佐剂提供了理论依据与数据支持,也为进一步深入研究该多糖联用 5-FU 的抗肿瘤机制奠定了实验基础。

【参考文献】

- [1] WANG JB ,JIANG Y ,LIANG H *et al.* Attributable causes of cancer in China[J]. *Ann Oncol* 2012 ,23(11) :2983 -2989.
- [2] SIEGEL R ,DESANTIS C ,JEMAL A. Colorectal cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin* 2014 ,64(2) :104 -117.
- [3] DRAKE CG ,ANTONARAKIS ES. Update: immunological strategies for prostate cancer[J]. *Curr Urol Rep* 2010 ,11(3) :202 -207.
- [4] 林俊,李萍,陈靠山. 近 5 年多糖抗肿瘤活性研究进展[J]. *中国中药杂志* 2013 ,38(8) :1116 -1125.
- [5] ZENG G ,JU Y ,SHEN H *et al.* Immunopotentiating activities of the purified polysaccharide from evening primrose in H22 tumor-bearing mice [J]. *International Journal of Biological Macromolecules* 2012 ,52(1) :280 -285.
- [6] DENG Y ,YI Y ,ZHANG LF *et al.* Immunomodulatory Activity and Partial Characterisation of Polysaccharides from *Momordica charantia* [J]. *Molecules* 2014 ,19(9) :13432 -13447.
- [7] REN Z ,HE C ,FAN Y *et al.* Immune-enhancing activity of polysaccharides from *Cyrtomium macrophyllum* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules* 2014 ,70: 590 -595.
- [8] SUN X ,GAO RL ,XIONG YK *et al.* Antitumor and immunomodulatory effects of a water-soluble polysaccharide from *Lilii Bulbus* in mice [J]. *Carbohydrate Polymers* 2014 ,102: 543 -549.
- [9] YANG B ,XIAO B ,SUN T. Antitumor and immunomodulatory activity of *Astragalus membranaceus* polysaccharides in H22 tumor-bearing mice [J]. *International Journal of Biological Macromolecules* , 2013 ,62: 287 -290.
- [10] DENG C ,FU H ,TENG L *et al.* Anti-tumor activity of the regenerated triple-helical polysaccharide from *Dictyophora indusiata* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules* ,2013 ,61: 453 -458.
- [11] YANG JY ,LI X ,XUE Y *et al.* Anti-hepatoma activity and mechanism of corn silk polysaccharides in H22 tumor-bearing mice [J]. *International Journal of Biological Macromolecules* 2014 ,64: 276 -280.
- [12] 孔梦丽. 拟康氏木霉胞外多糖对小鼠的免疫增强活性研究 [D]. 济南: 山东大学 2011.
- [13] 黄涛涛. 拟康氏木霉胞外多糖诱导癌细胞凋亡的研究 [D]. 济南: 山东大学 2012.
- [14] 李丽华,陈靠山,喻丽珍,等. 拟康氏木霉胞外多糖抗肿瘤活性研究 [J]. *中国临床药理学与治疗学* 2013 ,18(3) :282 -285.
- [15] 郭敏,陈靠山. 拟康氏木霉胞外多糖发酵培养基及培养条件的研究 [J]. *中国农学通报* 2006 ,22(10) :58 -61.
- [16] 魏广金,石磊,张鹏英,等. 拟康氏木霉胞外多糖对黄瓜内源水杨酸的诱导作用 [J]. *曲阜师范大学学报: 自然科学版* 2009 ,35(2) :94 -97.
- [17] 魏广金,相海英,陈靠山. 拟康氏木霉胞外多糖的分离纯化及其对黄瓜幼苗活性氧的诱导 [J]. *临沂师范学院学报* ,2009 ,31(3) :101 -104.
- [18] HUANG TT ,LIN J ,CAO JF *et al.* An exopolysaccharide from *Trichoderma pseudokoningii* and its apoptotic activity on human leukemia K562 cells [J]. *Carbohydrate Polymers* ,2012 ,89(2) :701 -708.