

芜菁酸性多糖体内抗肿瘤活性研究

The antitumor activity of *Brassica rapa* L. acid polysaccharides in vivo

古丽米拉·卡德尔¹ 阿曼妮萨·麦提如则¹ 李明珠¹

KADEER Gulimila¹ MAITIRUZE Amannisa¹ LI Mingzhu¹

康金森¹ 海力茜·陶尔大洪^{1,2,3}

KANG Jinsen¹ TAOERDAHONG Hailiqian^{1,2,3}

(1. 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆及中亚特色医药资源教育部工程研究中心, 新疆 乌鲁木齐 830011; 3. 新疆天然药物活性组分与释药技术重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830011)

(1. School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China; 2. Engineering Research Center of Xinjiang and Central Asian Medicine Resources, Ministry of Education, Urumqi, Xinjiang 830011, China; 3. Xinjiang Key Laboratory of Natural Drug Active Fraction and Drug Release Technology, Urumqi, Xinjiang 830011, China)

摘要:目的:探究芜菁酸性多糖一组分(BRAP-1)对非小细胞肺癌 H226 细胞荷瘤小鼠的影响。方法:将 60 只小鼠分为模型组(0.1 mL/10 g)、阳性药物顺铂组[3 mg/(kg·d)]、BRAP-1 低剂量组[50 mg/(kg·d)]、BRAP-1 中剂量组[100 mg/(kg·d)]和 BRAP-1 高剂量组[200 mg/(kg·d)]。试验期间观察小鼠肿瘤生长情况,计算抑瘤率、脏器指数;酶联免疫法检测各组小鼠血清中的白细胞介素 18(IL-18)、IL-1 β 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 含量;实时荧光定量核酸扩增法(q-PCR)、免疫印迹试验检测 IL-18、IL-1 β 、受体相互作用蛋白 1(RIP-1)、RIP3、混合谱系激酶结构域样蛋白(MLKL)基因表达情况。结果:与模型组相比较, BRAP-1 低、中剂量组抑瘤效果明显($P < 0.05$),阳性组和 BRAP-1 高剂量组抑瘤率效果显著($P < 0.01$);模型组与其他各组相比较,阳性组和 BRAP-1 高剂量组小鼠血清中 IL-1 β 含量显著增加($P < 0.01$),IL-18、TNF- α 在阳性组中明显降低($P < 0.05$),BRAP-1 各剂量组中显著增加($P < 0.01$);q-PCR、免疫印迹试验结果显示,与模型组相比 IL-1 β 随给药剂量增加 mRNA 相对表达量减少($P < 0.01$),而 IL-18、

MLKL、RIP1、RIP3 的 mRNA 及蛋白相对表达量增加($P < 0.01$)。结论:BRAP-1 可以通过调节免疫细胞因子水平,上调坏死性凋亡相关蛋白 MLKL、RIP1、RIP3 抑制肺鳞癌 H226 细胞体内生长。

关键词:芜菁;多糖;非小细胞肺癌;H226 细胞;荷瘤小鼠

Abstract: Objective: To explore the effects of *Brassica rapa* L. acid polysaccharide 1 (BRAP-1) on H226 cell tumor-bearing mice. Methods: 60 mice were divided into the model group (0.1 mL/10 g), positive cisplatin [3 mg/(kg·d)], BRAP-1 low dose [50 mg/(kg·d)], BRAP-1 medium dose [100 mg/(kg·d)] and BRAP-1 high dose [200 mg/(kg·d)]. During the experiment, the tumor growth of mice was observed, and the tumor inhibition rate and organ index were calculated; The levels of interleukin-18 (IL-18), interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The gene expressions of IL-18, IL-1 β , RIP-1 (receptor-interacting protein-1), RIP3 and MLKL (mixed-lineage kinase domain-like protein 3) were detected by Real-time Quantitative PCR (q-PCR) and Western blot (WB). Results: Compared with the model group, the low and middle dose of BRAP-1 groups had significant tumor inhibition effects ($P < 0.05$), and the positive group and the high dose of BRAP-1 group had significant tumor inhibition effects ($P < 0.01$). Compared with other groups in the model group, the serum levels of IL-1 β in the positive group and the high dose of BRAP-1 group were significantly increased ($P < 0.01$), IL-18 and TNF- α were significantly decreased in the positive group ($P < 0.05$), and were significantly increased in each dose of BRAP-1 group ($P < 0.01$). The results of q-PCR and Western blot showed that

基金项目:国家自然科学基金(编号:81960765);新疆维吾尔自治区重大科技专项项目(编号:2022A03007-3);新疆天然药物活性组分与释药技术重点实验室项目(编号:XJDX1713)

作者简介:古丽米拉·卡德尔,女,新疆医科大学在读硕士研究生。

通信作者:海力茜·陶尔大洪(1963—),女,新疆医科大学教授,学士。E-mail: hailiqian2471@sina.com

收稿日期:2023-06-28 **改回日期:**2024-02-03

compared with the model group, the relative expression of *IL-1 β* mRNA decreased with the increase of BRAP-1 dose ($P < 0.01$), while the relative expression of *IL-18*, *MLKL*, *RIP1*, and *RIP3* mRNA and protein increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** BRAP-1 can inhibit the growth of lung squamous carcinoma H226 cells by regulating the necrotizing apoptosis-related proteins MLKL, RIP1, and RIP3 and regulating immune cytokine levels.

Keywords: *Brassica rapa* L.; polysaccharide; nonsmall-cell lung cancer; H226 cells; tumor-bearing mice

芜菁(*Brassica rapa* L.)又名恰麻古、蔓菁,属于十字花科芸薹属植物,以块根入药,富含多糖^[1]。芜菁多糖具有润肺、开胸理气的功效^[1],还具有抗氧化^[2-3]、抗衰老^[4]、抗肿瘤^[5]、抗疲劳^[6]等作用。已有研究表明,芜菁酸性多糖在体内具有抗 Lewis 肺癌活性^[7];芜菁多糖有降血糖作用^[8],对 LPS/ATP 诱导的 RAW264.7 细胞焦亡具有抑制作用^[9];芜菁中性多糖能够抑制 LDH 的生成、提高抗氧化酶活性、上调凋亡蛋白表达水平,改善 PC12 细胞氧化应激损伤^[10],能有效提高 D-半乳糖致衰老小鼠模型抗氧化能力,达到延缓衰老的作用^[11]。

非小细胞肺癌是常见的一种肺癌类型。据调查^[12-14],非小细胞肺癌的发病率和致死率均占恶性肿瘤的首位,传统治疗效果不理想、不良反应多,严重影响患者的生活质量。研究^[15]表明,细胞坏死性凋亡可能在癌症中发挥重要作用,作为一种肿瘤抑制效应,坏死性凋亡可作为一种“故障安全”机制,在细胞凋亡受到损害时防止肿瘤发展。在坏死性细胞死亡过程中,坏死性凋亡导致细胞器肿胀、细胞膜破裂及其内容物渗漏到细胞间隙中^[16-17]。但与坏死不同的是,坏死性凋亡中的细胞裂解受到严格调控,其关键调控分子包括受体相互作用蛋白激酶 1 (receptor-interacting protein kinase 1, RIPK1)、RIPK3 和混合谱系激酶域样蛋白 (mixed-lineage kinase domain-like proteins, MLKL),它们共同形成一个复合物激活坏死性凋亡通路^[18]。

研究拟采用人 H226 细胞建立荷瘤小鼠模型,通过体内试验分析芜菁酸性均一多糖对荷瘤小鼠血清中白细胞介素 18 (interleukin-18, IL-18)、IL-1 β 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α) 细胞因子水平、肿瘤组织中坏死性凋亡相关基因表达情况的影响,进一步阐明芜菁酸性均一多糖体内抗肿瘤活性及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

芜菁:采自新疆阿克苏柯坪县;

4~6 周龄 BALB/c 裸鼠:湖南斯莱克景达实验动物有限公司;

H226 细胞株、细胞增殖毒性检测试剂盒 (cell

counting Kit-8, CCK-8)、缓冲液 (PBS):武汉普诺赛生命科技有限公司;

顺铂:北京索莱宝科技有限公司;

DMEM 培养基:美国 Gibco 公司;

0.25% 胰蛋白酶:美国 Gibco 公司;

胎牛血清 (FBS):南京生航生物技术有限公司;

TB Green qPCR 试剂盒:日本 Takara Bio 公司;

酶联免疫试剂盒:武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;

氯化钠注射液:四川科伦药业股份有限公司;

二抗:美国 Affinity 公司;

MLKL、RIP1、RIP3 抗体:兔抗,英国 Abcam 公司;

GAPDH 抗体:兔抗,武汉赛维尔生物科技有限公司;

倒置显微镜:IX71-12FL/PH 型,赛默飞世尔科技公司;

离心机:5424R 型,德国 Eppendorf 公司;

二氧化碳培养箱:Galaxy 170R 型,赛默飞世尔科技公司;

荧光定量 PCR 仪:Quant Studio 6Fle 型,美国 ABI 公司;

电热恒温水槽:SSW-600-2S 型,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;

电热恒温鼓风干燥箱:DHG-9023A 型,上海精宏实验设备有限公司;

全波长酶标仪:TECAN F50 型,赛默飞世尔科技公司。

1.2 试验方法

1.2.1 芜菁酸性多糖提取物制备 芜菁酸性多糖 (*Brassica rapa* L. acid polysaccharides, BRAP) 一组分和二组分 (BRAP-1、BRAP-2) 按课题组前期优化条件提取、分离、纯化、除蛋白后得到^[9],BRAP-1 平均相对分子质量为 6 080,糖醛酸含量为 28.13%,由阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖和半乳糖醛酸组成,摩尔比为 2.07 : 4.53 : 2.20 : 1.00;BRAP-2 平均相对分子质量为 7 590,糖醛酸含量为 20.80%,由鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖和半乳糖醛酸组成,摩尔比为 1.06 : 1.00 : 5.03 : 2.22 : 1.50^[4]。

1.2.2 CCK-8 法检测芜菁酸性多糖对 H226 细胞增殖情况的影响 取对数生长期的 H226 细胞,调整细胞密度为 5×10^4 个/mL,将细胞 100 μ L/孔接种于 96 孔细胞培养板中,设置空白组、对照组、BRAP-1/BRAP-2 各剂量给药组。37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养细胞 24 h 至细胞贴壁,给药 24 h 后吸弃上清液,每组加 100 μ L 完全培养液和 10 μ L CCK-8 试剂,在 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中孵育 1~2 h 后用酶标仪于 450 nm 处测定其 OD 值^[5]。

1.2.3 H226 细胞荷瘤小鼠模型的建立、分组及给药情况

取对数生长的人肺鳞癌 H226 细胞,调整细胞浓度为 1×10^7 个/mL,将细胞悬液 150 μ L/只皮下注入到小鼠右

腋上侧。造模成功后进行分组, 分组情况: 正常对照组、模型组, 阳性药物顺铂组 [3 mg/(kg · 2 d)], BRAP-1 低剂量组 [50 mg/(kg · d)], BRAP-1 中剂量组 [100 mg/(kg · d)] 和 BRAP-1 高剂量组 [200 mg/(kg · d)], 每组 10 只, 腹腔注射给药^[19-20]。

1.2.4 肿瘤体积、抑瘤率及脾脏指数的计算 给药当天开始每隔 1 d 测量活体肿瘤的大小(肿瘤的最大长径 a 和最小短径 b), 给药结束第 2 天处理小鼠, 眼球采血收集血清、肿瘤、脾脏等, 肿瘤体积、抑瘤率及脾脏指数计算公式:

$$v = a \times b^2 / 2, \quad (1)$$

$$c_1 = \frac{m_2 - m_1}{m_2} \times 100\%^{[21]}, \quad (2)$$

$$s = \frac{m_3}{m_4}, \quad (3)$$

式中:

v ——肿瘤体积, cm^3 ;

a ——肿瘤最大长径, cm ;

b ——肿瘤最小短径, cm ;

c_1 ——抑瘤率, %;

s ——脾脏指数, mg/g ;

m_1 ——给药组平均瘤重, g ;

m_2 ——模型组平均瘤重, g ;

m_3 ——脾脏质量, mg ;

m_4 ——小鼠体质量, g 。

1.2.5 ELISA 法检测小鼠血清中 IL-18、IL-1 β 、TNF- α 含量 小鼠全血静置 2 h, 离心分离血清 (4 $^{\circ}\text{C}$, 1 200 r/min, 20 min) - 80 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱保存。根据试剂盒说明书检测荷瘤小鼠血清中 IL-18、IL-1 β 、TNF- α 的含量。

1.2.6 RT-PCR 法检测小鼠肿瘤组织中 IL-18、IL-1 β 、MLKL、RIP1、RIP3 RNA 表达量 提取各组小鼠肿瘤中的 RNA^[22-24], 按 TB Green q-PCR 试剂盒说明书操作。引物设计如表 1 所示。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称	引物名称	序列 (5' to 3')
IL-18	引物-F	AAAGTGCCAGTGAACCCAGAC
	引物-R	GGTCACAGCCAGTCTCTTACTTC
IL-1 β	引物-F	CTCGCAGCAGCACATCAACAAG
	引物-R	CCACGGGAAAGACACAGGTAGC
MLKL	引物-F	AGAACCTGCCGATGACATTACTG
	引物-R	CATTGCCACACTCACAACTTCC
RIP1	引物-F	TTTGGCACCGTGGTCTCTGAAG
	引物-R	TCCTGTCTCTGATCTCTCTCTTG
RIP3	引物-F	GACACGGCACTCTTGGTATCC
	引物-R	TTGAGGCAGTAGTTCTTGGTGGTG

1.2.7 Western Blot 法检测小鼠肿瘤组织中 MLKL、RIP1、RIP3 蛋白表达量 提取各组小鼠肿瘤中的蛋白^[25-28], 经蛋白定量、制胶并上样、电泳、电转后, 将涂布显影液的 PDVF 膜曝光后保存图片。

1.2.8 统计分析 采用 SPSS、Origin 2022 软件进行数据分析与绘图。

2 结果与分析

2.1 BRAP-1、BRAP-2 对 H226 细胞增殖率的影响

如图 1 所示, BRAP-1 对 H226 细胞增殖率的影响显著, 随着给药质量浓度从 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 增加到 5 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, H226 细胞增殖率逐渐降低, 呈剂量依赖性^[7]。相比 BRAP-1, BRAP-2 对 H226 细胞增殖率的影响较小, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 干预细胞后增殖率仍较高, 而在 50 ~ 5 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的质量浓度范围内, 各组干预浓度虽有明显差别, 但对 H226 细胞增殖率的影响相近。BRAP-1 对 H226 细胞的增殖有更显著的抑制作用, 可能是 BRAP-1 糖醛酸含量较高相对分子质量较小, 有利于其发挥抗炎抗肿瘤作用^[29], 因此后续动物试验以 BRAP-1 给药。

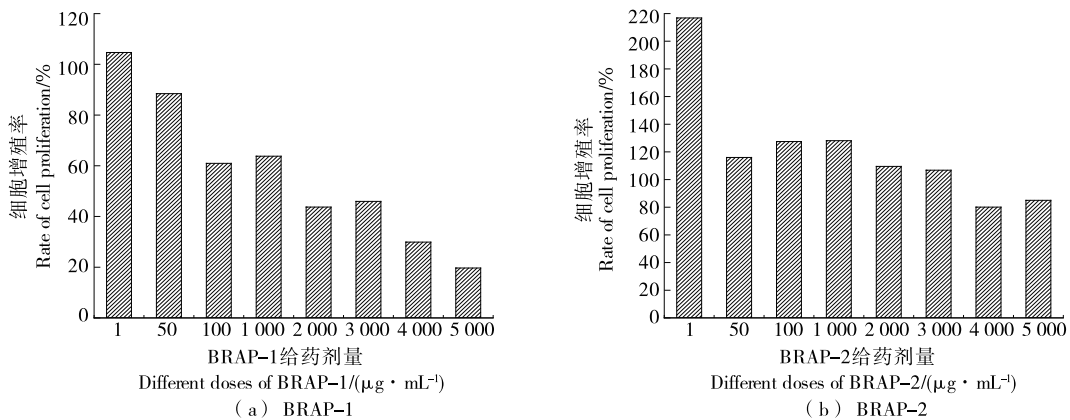
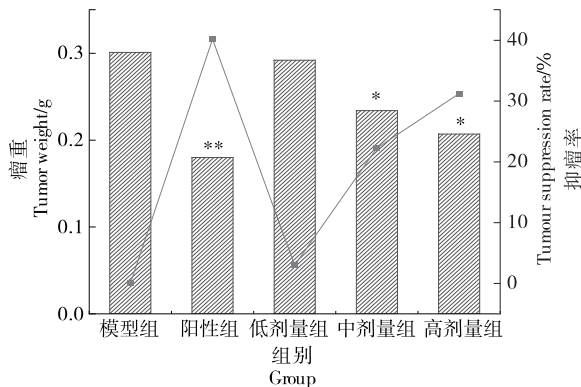


图 1 BRAP-1、BRAP-2 质量浓度对 H226 细胞增殖率的影响

Figure 1 Effects of different concentrations of BRAP-1 and BRAP-2 on the proliferation rate of H226 cells

2.2 BRAP-1 对 H226 细胞荷瘤小鼠肿瘤质量的影响

各组荷瘤小鼠抑瘤率从高到低依次为：阳性组 > BRAP-1 高剂量组 > BRAP-1 中剂量组 > BRAP-1 低剂量组。如图 2 所示，随着 BRAP-1 给药剂量的增加，小鼠肿瘤生长出现迟缓现象，相比模型组，阳性组抑瘤效果显著 ($P < 0.01$)、BRAP-1 中、高剂量组均可减缓肿瘤生长速度，差别有统计学意义 ($P < 0.05$)。BRAP-1 可能通过破坏肿瘤生长微环境、免疫细胞胞间复杂的相互作用网络发挥抗肿瘤作用，抗肿瘤作用呈剂量依赖性^[30-31]。



与模型组比较，* 表示 $P < 0.05$ ，** 表示 $P < 0.01$

图 2 各组荷瘤小鼠肿瘤重及抑瘤率

Figure 2 Tumor weight and tumor suppression rate in tumor-bearing mice in each group

2.3 BRAP-1 对 H226 细胞荷瘤小鼠体重的影响

阳性组小鼠体重下降，可能是化疗药物顺铂在抑制肿瘤的过程中使荷瘤小鼠的食欲减退等毒副作用引起的。与阳性组相比，BRAP-1 各剂量组荷瘤小鼠的体重前后变化较小，说明 BRAP-1 对小鼠毒副作用甚少，可在尽量不损伤机体正常组织的情况下防治肿瘤进一步发展，这便是植物多糖 BRAP-1 优势所在(图 3)。

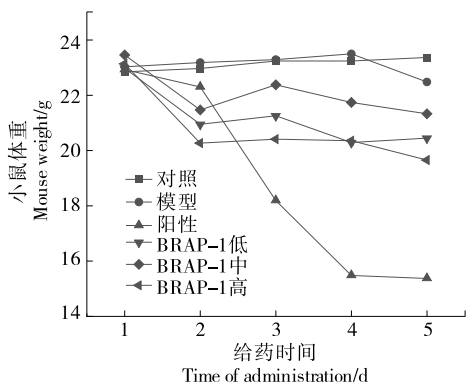
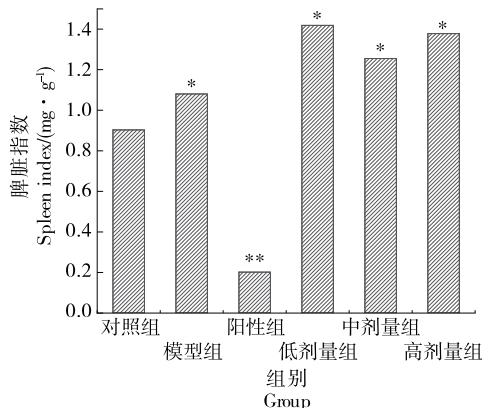


图 3 BRAP-1 对 H226 细胞荷瘤小鼠体重的影响

Figure 3 BRAP-1 for H226 tumor-burdened effect of weight mice

2.4 BRAP-1 对 H226 细胞荷瘤小鼠脾脏指数的影响

与对照组相比，阳性药顺铂组小鼠脾脏指数均降低显著 ($P < 0.01$)，BRAP-1 各剂量给药组的脾脏指数均有所增加，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，其中低、中、高剂量组间无显著差异(图 4)。脾脏是免疫细胞居住的场所，属于外周免疫器官，也是血液循环系统中重要的过滤器器官，可清除血液内的病原体、衰亡的血细胞等^[32-33]。机体免疫功能表现亢进或抑制时，脾脏细胞也相应的增殖或萎缩，因此，脾脏指数可在一定程度上体现 BRAP-1 对机体免疫功能的影响^[34]。



与对照组比较，* 表示 $P < 0.05$ ，** 表示 $P < 0.01$

图 4 H226 细胞荷瘤小鼠脾脏指数

Figure 4 H226 tumor-burdened mice spleen index

2.5 H226 细胞荷瘤小鼠血清中 IL-18、IL-1β、TNF-α 含量

模型组小鼠血清中 IL-18、IL-1β、TNF-α 的含量均显著增加，阳性组小鼠血清中 IL-18、TNF-α 的含量与模型组相比有降低趋势，而 BRAP-1 各组血清中细胞因子水平具有增长趋势。阳性组和 BRAP-1 高剂量组的 IL-1β 明显增加 ($P < 0.05$)，而 BRAP-1 低、中剂量组小鼠血清中 IL-1β 含量均比模型组低(表 2)。

有研究^[29]表明，肿瘤坏死因子、白介素对肿瘤的增殖、发展具有重要作用。当 IL-1β、IL-18 被消除时，肿瘤生长会延迟。但 IL-1β、IL-18 在肿瘤发生中既可以是协作关系，也可以是对立关系，具体取决于肿瘤类型和背景。在一项肺癌细胞系研究^[30]中，IL-1β 可通过刺激炎症介质(如 IL-6、IL-8 等)促进肿瘤转移，还会增加乳腺癌细胞的侵袭性；TNF-α 主要由活化的巨噬细胞、T 淋巴细胞和自然杀伤细胞产生，其在一些细胞中的表达较低，包括成纤维细胞、平滑肌细胞和肿瘤细胞。综上，BRAP-1 可通过调节肿瘤相关细胞因子水平发挥抗肿瘤作用。

2.6 H226 细胞荷瘤小鼠肿瘤中 IL-18、IL-1β、MLKL、RIP1、RIP3 mRNA 表达量

与模型组比较，阳性药顺铂组小鼠肿瘤组织中 IL-18、MLKL、RIP1、RIP3 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$)，IL-1β mRNA 表达量减小 ($P < 0.05$)；BRAP-1 组

表 2 BRAP-1 对 H226 细胞荷瘤小鼠血清中 IL-18、IL-1 β 、TNF- α 含量的影响[†]

Table 2 BRAP-1 for H226 tumor-burdened mice serum IL-18, IL-1 β , the influence of the content of TNF- α

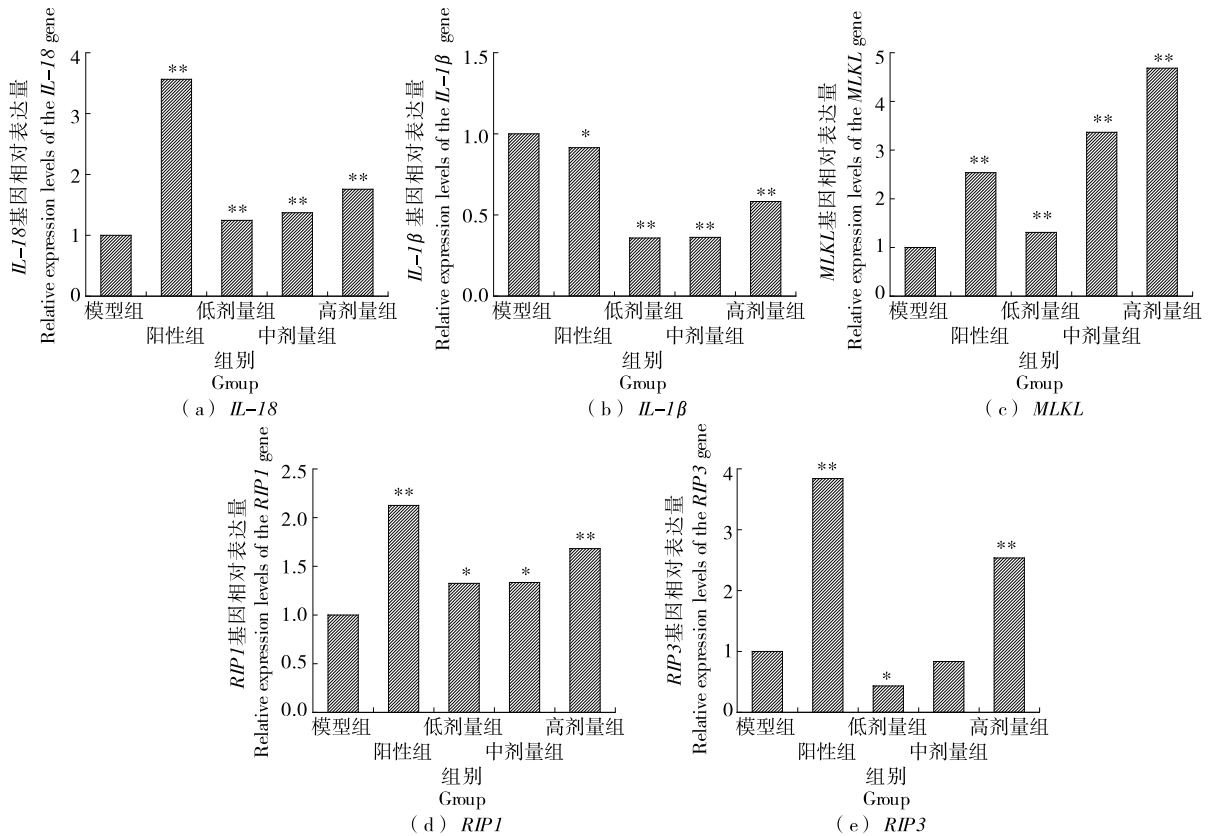
组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	IL-18/(pg · mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg · mL ⁻¹)	TNF- α /(pg · mL ⁻¹)
对照组	—	96.53±31.21	262.88±14.52	93.13±10.60
模型组	—	143.94±93.10	265.63±36.34	101.72±25.94
阳性组	3	87.34±41.22 **	291.72±40.59*	94.91±3.70
低剂量组	50	176.57±72.35*	231.50±20.67*	136.36±52.57**
中剂量组	100	170.76±50.01*	235.72±36.92*	115.73±18.52*
高剂量组	200	393.47±90.12**	305.57±86.42*	180.78±68.40**

† 与模型组比较, * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$ 。

小鼠肿瘤组织中 *MLKL*、*RIP1*、*RIP3* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$), 表明 BRAP-1 可激活坏死性凋亡通路, 导致其关键因子基因转录水平升高 (图 5)。坏死性凋亡受 *MLKL*、*RIP1*、*RIP3* 的调控, 研究^[35-36]表明, 癌组织中 *RIPK1* 和 *RIPK3* 的表达量显著低于周围正常组织, 此外, 肿瘤中 *RIPK3* 和 *MLKL* 表达的降低与较差的总体生存率显著相关。BRAP-1 可通过上调 *MLKL*、*RIP1*、*RIP3* 基因的表达, 促进肿瘤细胞发生坏死性凋亡, 从而阻遏肿瘤细胞的进一步增殖及癌症的继续发展。

2.7 H226 细胞荷瘤小鼠肿瘤中 *MLKL*、*RIP1*、*RIP3* 蛋白表达量

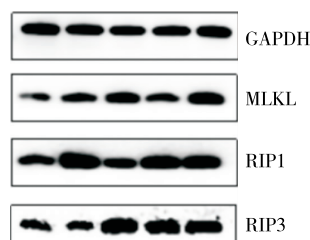
感染、组织损伤、炎症和癌症都会导致 *MLKL*、*RIP3* 表达升高, 虽然 *RIP1*、*RIP3* 是 *MLKL* 的上游蛋白, 但在许多细胞系和组织中 *MLKL* 可在缺乏 *RIP3* 的情况下表达^[37]。与模型组比较, 阳性药顺铂组小鼠肿瘤组织中 *MLKL*、*RIP1* 蛋白表达水平显著升高, *RIP3* 蛋白表达量无明显差别; BRAP-1 组小鼠肿瘤组织中 *MLKL*、*RIP1*、*RIP3* 蛋白表达水平显著升高, 可见 BRAP-1 通过激活坏死性凋亡通路发挥抗肿瘤作用 (图 6)。



与模型组比较, * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$

图 5 小鼠肿瘤中 *IL-18*、*IL-1 β* 、*MLKL*、*RIP1*、*RIP3* mRNA 表达量

Figure 5 Expression levels of *IL-18*, *IL-1 β* , *MLKL*, *RIP1*, and *RIP3* mRNA in the mouse tumors



从左到右分别为模型组、阳性药组、BRAP-1 低剂量组、BRAP-1 中剂量组、BRAP-1 高剂量组

图 6 小鼠肿瘤中 MLKL、RIP1、RIP3 蛋白表达量

Figure 6 Expression levels of MLKL, RIP1, and RIP3 protein in the mouse tumors

3 结论

芡苳酸性多糖一组分可控制 H226 细胞荷瘤小鼠肿瘤生长,升高脾脏指数及荷瘤小鼠血清中的白细胞介素 18、白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子 α 细胞因子水平,上调 *MLKL*、*RIP1*、*RIP3* 基因及其蛋白的表达。通过调控 *MLKL*/*RIP1*/*RIP3* 坏死性凋亡通路,促进肿瘤细胞发生坏死性凋亡,从而抑制癌细胞增殖发挥抗肿瘤作用。

参考文献

- [1] 唐伟敏, 金露, 谢亮华, 等. 芡苳多糖的分离纯化、化学结构及其抗疲劳动物试验研究[J]. 中国食品学报, 2018, 18(12): 22-31. TANG W M, JIN L, XIE L H, et al. Isolation, purification, chemical structure and fatigue resistance research of *Brassica rapa* L. polysaccharides[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(12): 22-31.
- [2] 侯宝林. 维药恰麻古儿多糖抗氧化及抗肿瘤作用的实验研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2010: 12-36. HOU B L. Experimental study on the antioxidant and antitumor effects of *Brassica rapa* L. polysaccharide[D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2010: 12-36.
- [3] 王花, 吴萍, 文绍敦. 高原玉树地区药食两用植物芡苳的抗衰老作用[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(11): 2 328-2 329. WANG H, WU P, WEN S D. Anti-aging effect of *Brassica rapa* L. in the plateau Yushu region[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2012, 32(11): 2 328-2 329.
- [4] CHEN Z E, WUFUER R, JI J H, et al. Structural characterization and immunostimulatory activity of polysaccharides from *Brassica rapa* L[J]. J Agric Food Chem, 2017, 65(44): 9 685-9 692.
- [5] 李亚童, 阿依夏古丽·巴卡斯, 李改茹, 等. 新疆芡苳酸性多糖分离纯化、抗氧化活性研究及红外表征[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(4): 1 050-1 057. LI Y T, BAKASI A Y X G L, LI G R, et al. Isolation and purification, antioxidant activity and infrared characterization of *Brassica rapa* L. acid polysaccharide in Xinjiang[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(4): 1 050-1 057.
- [6] XU Y, WU Y J, SUN P L, et al. Chemically modified

polysaccharides: Synthesis, characterization, structure activity relationships of action [J]. International Journal of Biological Macromolecules: Structure, Function and Interactions, 2019, 132: 970-977.

- [7] 阿依夏古丽·巴卡斯, 胡晟, 陈莉, 等. 芡苳酸性多糖 BRAP-2 体内抗 Lewis 肺癌活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(15): 5 111-5 116. BAKASI A Y X G L, HU S, CHEN L, et al. In vivo anti-Lewis lung cancer activity of the *Brassica rapa* L. acid polysaccharide BRAP-2 [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(15): 5 111-5 116.
- [8] 艾克拜尔江·阿巴斯, 李冠, 王静. 新疆芡苳多糖降血糖作用的研究[J]. 新疆农业科学, 2011, 48(3): 471-479. ABASI A K B E J, LI G, WANG J. Study on the hypoglycemic effect of *Brassica rapa* L. polysaccharide in Xinjiang[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2011, 48(3): 471-479.
- [9] 古丽米拉·卡德尔, 阿吉然姆·阿布拉, 任国瑞, 等. 芡苳多糖除蛋白及抑制 RAW264.7 巨噬细胞焦亡作用研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(2): 183-190. KADEER G L M L, ABULA A J R M, REN G R, et al. Deproteinization, effect of *Brassica rapa* L. polysaccharide and inhibiting pyroptosis in RAW264.7 macrophages[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(2): 183-190.
- [10] 海力茜·陶尔大洪, 李欢欢, 任国瑞, 等. 芡苳中性多糖对 PC12 细胞氧化损伤保护作用机制的初步研究[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(5): 852-857. TAOERDAHONG H L Q, LI H H, REN G R, et al. Preliminary study of the mechanism of *Brassica rapa* L. neutral polysaccharide on oxidative damage protection in PC12 cells[J]. Natural Product Research and Development, 2023, 35(5): 852-857.
- [11] 李欢欢, 陈春丽, 海力茜·陶尔大洪. 芡苳中性多糖对 D-半乳糖致衰老小鼠的抗氧化作用[J]. 食品科技, 2021, 46(5): 168-173. LI H H, CHEN C L, TAOERDAHONG H L Q. Antioxidative effects of *Brassica rapa* L. neutral polysaccharide on D-galactose-induced aging mice[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(5): 168-173.
- [12] GONG Y T, FAN Z Y, LUO G P, et al. The role of necroptosis in cancer biology and therapy[J]. Mol Cancer, 2019(18): 100.
- [13] CHEN J, KOS R, GARSEN J, et al. Molecular insights into the mechanism of necroptosis: The necrosome as a potential therapeutic target[J]. Cells, 2019(8): 1 486.
- [14] QIN X, MA D, TAN Y X, et al. The role of necroptosis in cancer: A double-edged sword? [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2019, 1 871: 259-266.
- [15] CHOI M E, PRICE D R, RYTER S W, et al. Necroptosis: A crucial pathogenic mediator of human disease [J]. JCI Insight, 2019 (4): e128834.
- [16] ONIZAWA M. The ubiquitin-modifying enzyme A20 restricts ubiquitination of the kinase RIPK3 and protects cells from necroptosis[J]. Nat Immunol, 2015(16): 618-627.

- [17] LIU Z Y. Necrostatin-1 reduces intestinal inflammation and colitis-associated tumorigenesis in mice[J]. *Am J Cancer Res*, 2015(5): 3 174-3 185.
- [18] YUAN J, AMIN P, OFENGEIM D. Necroptosis and RIPK1-mediated neuroinflammation in CNS diseases [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2019(20): 19-33.
- [19] HAN R S, GUO H Y, SHI J P, et al. Tumour microenvironment changes after osimertinib treatment resistance in non-small cell lung cancer[J]. *European Journal of Cancer*, 2023, 189: 112919.
- [20] YUKA M, SEIJI Y, HISATSUGU G, et al. ZD6474, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase, inhibits growth of experimental lung metastasis and production of malignant pleural effusions in a non-small cell lung cancer model [J]. *Oncology Research*, 2006, 16(1): 15-26.
- [21] 张文超. 黄腐酚调节 Th1/Th2 平衡促进小鼠抗肿瘤免疫[D]. 兰州: 兰州大学, 2016: 10-17.
ZHANG W C. Poranl regulates Th1/Th2 balance to promote anti-tumor immunity in mice[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2016: 10-17.
- [22] 王胜奇, 李晶, 王能, 等. 死亡细胞释放信号对肿瘤进展的影响及中医药干预[J]. *中华中医药学刊*, 2023, 41(6): 26-31.
WANG S Q, LI J, WANG N, et al. Effect of dead cells on tumor progression and TCM intervention [J]. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*, 2023, 41(6): 26-31.
- [23] SHOWALTER A, LIMAYE A, OYER J L, et al. Cytokines in immunogenic cell death: Applications for cancer immunotherapy [J]. *Cytokine*, 2017, 97: 123-132.
- [24] DE SOUSA E, LÉRIAS J R, BELTRAN A, et al. Targeting neoepitopes to treat solid malignancies: Immunotherapy[J]. *Front Immunol*, 2022, 12: 592031.
- [25] CAI J Y, ZHONG M J, XU J H, et al. Codelivery of triptolide and IFN- γ to boost antitumor immunity for triple-negative breast cancer[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 120: 110346.
- [26] 凌晓颖, 丁雅荔, 陶嘉磊, 等. 清肺口服液黄酮类成分对呼吸道合胞病毒感染小鼠坏死性凋亡的影响[J]. *中草药*, 2022, 53(13): 4 019-4 027.
LING X Y, DING Y L, TAO J L, et al. Effect of flavonoid components of clear lung oral fluid on necrotizing apoptosis in respiratory syncytial virus-infected mice [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2022, 53(13): 4 019-4 027.
- [27] 宋瑞婧, 张欣欣, 高飞, 等. 加味升降散通过介导 RIP1/RIP3/MLKL 通路抑制坏死性凋亡减轻糖尿病肾病大鼠肾脏纤维化[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(17): 33-42.
SONG R J, ZHANG X X, GAO F, et al. Flavoring and relieving renal fibrosis by inhibiting necrotizing apoptosis by mediating RIP1/RIP3/MLKL pathway to reduce renal fibrosis in rats with diabetic nephropathy [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2022, 28(17): 33-42.
- [28] 程婷婷, 李岩, 陈贵元. 地参多糖对非小细胞肺癌 A549 细胞抗肿瘤作用及机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(3): 83-90.
- CHENG T T, LI Y, CHEN G Y. Antitumor effects and mechanisms of ground reference polysaccharide in non-small cell lung cancer A549 cells[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2022, 28(3): 83-90.
- [29] 吴芳霞. 魔芋葡甘聚糖的氧化改性及相关糖醛酸寡糖的抗阿尔兹海默症构效关系研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2022: 26-30.
WU F X. Oxidative modification of konjac glucomannan and related gluconacid oligosaccharides against Alzheimer's disease [D]. Suzhou: Suzhou University, 2022: 26-30.
- [30] 刘华英, 夏雪, 张孟维, 等. 双脱甲氧基姜黄素通过调节 HIF-1 α 介导衰老诱导非小细胞肺癌细胞凋亡并抑制细胞增殖[J]. *中国癌症防治杂志*, 2023, 15(3): 291-297.
LIU H Y, XIA X, ZHANG M W, et al. Bisdesethoxycurcumin induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells and suppresses cell proliferation by regulating HIF-1 α [J]. *Chinese Journal of Oncology Prevention and Treatment*, 2023, 15(3): 291-297.
- [31] 唐健波, 吕都, 潘牧, 等. 微波辅助提取刺梨多糖工艺优化及抗肿瘤活性研究[J]. *食品与机械*, 2021, 37(9): 160-167.
TANG J B, LU D, PAN M, et al. Optimization on microwave-assisted extraction of Rosa Roxburghii Tratt polysaccharide and its antitumor activity[J]. *Food & Machinery*, 2021, 37(9): 160-167.
- [32] WUFUER R Z Y M, BAI J, LIU Z, et al. Biological activity of Brassica rapa L. polysaccharides on RAW264.7 macrophages and on tumor cells[J]. *Bioorg Med Chem*, 2020, 28(7): 115330.
- [33] 王迪, 李钧, 侯兵乔, 等. 中药多糖对肿瘤微环境中免疫细胞调节作用研究进展[J]. *中草药*, 2023, 54(13): 4 346-4 358.
WANG D, LI J, HOU B Q, et al. Progress in the regulation of TCM polysaccharides on immune cells in tumor microenvironment [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2023, 54(13): 4 346-4 358.
- [34] LIN S R, CHANG C H, HSU C F, et al. Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: Preclinical evidence[J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177(6): 1 409-1 423.
- [35] PANG Y L, LIN Y S, WANG X Q, et al. Inhibition of abnormally activated HIF-1 α -GLUT1/3-glycolysis pathway enhances the sensitivity of hepatocellular carcinoma to 5-caffeoylquinic acid and its derivatives[J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 920: 174844.
- [36] DEMARCO B, GRAYCZYK J P, BJANES E, et al. Caspase-8-dependent gasdermin D cleavage promotes antimicrobial defense but confers susceptibility to TNF-induced lethality [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(47): eabc3465.
- [37] MARTINEZ-OSORIO V, ABDELWAHAB Y, ROS U. The many faces of MLKL, the executor of necroptosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(12): 10108.