

磷酸化扁藻胞外多糖的修饰及其抗肿瘤活性研究

易志恒¹, 翁正芬¹, 温俊昊¹, 刘梓茂¹, 罗 辉^{1,2,3}, 吴斌华^{1,2,3*} (1. 广东医科大学海洋医药研究院、广东省天然药物研究与开发重点实验室和第一临床医学院; 2. 南方海洋科学与工程广东省实验室; 3. 广东湛江海洋医药研究院, 广东湛江 524023)

摘 要: **目的** 优化扁藻胞外多糖的磷酸化工艺并研究磷酸化扁藻胞外多糖对肿瘤的抑制作用。**方法** 以正交实验分析影响扁藻胞外多糖磷酸化的因素, 分别检测扁藻胞外多糖(PEPs)和磷酸化扁藻胞外多糖(pPEPs)的红外吸光度, 利用MTT法研究扁藻胞外多糖及其磷酸化衍生物对Raw 264.7的生长抑制作用。**结果** 正交实验显示最佳多糖磷酸化工艺条件为: 反应温度为100℃, 反应时间为6h, 磷酸化试剂比例为6:1, pH=8。PEPs与pPEPs样本经红外吸光度扫描显示多糖均为吡喃型多糖, 以共价键形式连接的磷酸化多糖修饰成功。MTT结果显示PEPs与pPEPs均对小鼠巨噬细胞Raw 264.7的增殖具有抑制作用($P<0.05$ 或 0.01), 且以pPEPs的抑制作用更为显著($P<0.05$ 或 0.01)。**结论** 以正交实验统计方法筛选扁藻胞外多糖磷酸化工艺操作简单方便, pPEPs具有体外抗肿瘤作用。

关键词: 扁藻; 胞外多糖; 磷酸化修饰; 正交实验; 抗肿瘤

中图分类号: O 629.12; TS 241 **文献标志码:** A **文章编号:** 2096-3610(2022)05-0498-06

Modification of phosphorylated platymonas exopolysaccharides and its antitumor activity

YI Zhi-heng¹, WENG Zheng-fen¹, WEN Jun-hao¹, LIU Zi-mao¹, LUO Hui^{1,2,3}, WU Bin-hua^{1,2,3*} (1. Institute of Marine Medicine, Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, and the First School of Clinical Medicine, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China; 2. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Zhanjiang), Zhanjiang 524023, China; 3. Guangdong Institute of Marine Medicine, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: **Objective** To optimize the phosphorylation process of platymonas exopolysaccharides (PEPs) and investigate the inhibitory effect of phosphorylated platymonas exopolysaccharides (pPEPs) on tumors. **Methods** The factors affecting the pPEPs were analyzed with orthogonal experiment. The infrared absorbance of the PEPs and pPEPs was detected respectively. The growth inhibition effect of the PEPs and pPEPs on Raw 264.7 cells was studied with the MTT method. **Results** Orthogonal experiments showed that the optimum polysaccharide phosphorylation process conditions were: reaction temperature of 100℃, reaction time of 6h, phosphorylation reagent ratio of 6:1, and pH=8. Infrared absorbance scanning indicated that the PEPs and pPEPs were all pyran polysaccharide, and phosphorylated polysaccharides linked by covalent bonds were successfully modified. MTT results showed that both PEPs and pPEPs had inhibitory effects on the proliferation of mouse macrophage Raw 264.7 ($P<0.05$ or 0.01), and the inhibitory effect of pPEPs was more significant ($P<0.05$ or 0.01). **Conclusion** It is simple and convenient to screen the process of the pPEPs with orthogonal experimental. The pPEPs have anti-tumor effect in vitro.

Key words: platymonas; exopolysaccharides; phosphorylation; orthogonal experiment; anti-tumor

多糖的生物活性与其分子结构有关, 对多糖分子结构进行修饰, 可以提高多糖的活性^[1]。分子修饰方法有多种, 其中主要是化学修饰。化学修饰的常见方

法包括硫酸化修饰、烷基化修饰、羧甲基化修饰、磷酸化修饰等^[2]。本文通过参考多糖磷酸化修饰的相关文献^[2-6], 选取影响扁藻多糖磷酸(PEPs)根含量和多糖产

收稿日期: 2021-12-17

基金项目: 广东省科技计划项目(2016B030309002), 广东医学院科研基金项目(2XK14053)

作者简介: 易志恒(1998-), 男, 在读本科生, E-mail: 2521091041@qq.com

共同第一作者: 翁正芬(1998-), 女, 在读本科生, E-mail: 1350139784@qq.com

通信作者: 吴斌华(1974-), 男, 硕士, 讲师, E-mail: wubinhua@gdmu.edu.cn

量的4个因素进行研究,通过正交设计初步确定了扁藻多糖磷酸化的最佳工艺条件,并初步探讨磷酸化扁藻胞外多糖(pPEPs)的抗肿瘤活性,旨在为磷酸化扁藻胞外多糖的研究和开发提供理论依据和实验基础。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

RE-5210A 旋转蒸发仪(上海荣生生化仪器厂)、JXN-300 冷冻离心机(美国Beckman 公司)、FD-1A-50 冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司)、IR-Tracer-100 傅立叶红外吸收光度计(日本岛津公司)、Epoch 酶标仪(BioTek Instrument)等。PEPs(由本实验室提取获得),三偏磷酸钠(分析纯,上海麦克林生化科技有限公司),三聚磷酸钠(分析纯,天津市大茂化学试剂厂),三羟甲基氨基甲烷、氯化镁、盐酸、维生素C、硫酸、钼酸铵、磷酸二氢钾、过氧化氢等试剂均为市售分析纯。

1.2 方法

1.2.1 pPEPs 的制备 参考郑常领等^[3]的方法,略作修改。按比例称取磷酸化试剂(6 g 三聚磷酸钠+1 g 三偏磷酸钠)共7 g,溶解在超纯水中,定容至100 mL,得到总质量浓度为70 g/L的磷酸化试剂。定容后加入精制的PEPs 1 g,硫酸钠5 g,调节pH值和温度至设定值后进行磷酸化反应。反应结束后,用3倍体积的95%乙醇溶液静置沉淀24 h,5 000 r/min 离心10 min 收集沉淀,置于45℃的环境下2 h,以去除残留的乙醇,再于50℃水浴中复溶,后装入截留分子量为1 000 透析袋,透析2 d。得到的溶液预冻后置于冷冻干燥机中冷冻干燥,得到pPEPs。

1.2.2 磷酸根含量的测定 (1)磷酸根标准曲线测定:根据钼蓝比色法^[4]绘制磷酸根含量标准曲线,以浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。(2)pPEPs中的磷酸根测定:取0.10 g 样品于烧杯中,加入1 mL 浓硫酸和1 mL 浓硝酸,加热至冒烟,冷却后加入1 mL 体积分数为30%的H₂O₂溶液,再缓慢加热,重复以上步骤直至烧杯内不再冒烟,溶液呈无色透明或淡黄色,冷却后加入1 mL 浓度为6 mol/L 盐酸,加热使酸彻底分解,转移至50 mL 容量瓶中定容。取适量上述溶液,按照标准曲线操作方法测定吸光度,根据标准曲线回归方程计算磷酸根含量。

1.2.3 PEPs 磷酸化反应正交实验 参考相关文献^[2-7],采用正交试验设计方法,选取磷酸化实验中磷酸化试剂比例(A)、温度(B)、时间(C)和pH(D)为考察因素,

每个因素选取3个水平(见表1),选用L₉(3⁴)正交表进行正交实验。

表1 正交实验因素与水平

水平	磷酸化试剂比例	反应温度/℃	反应时间/h	pH 值
1	4:3	80	4	8
2	5:2	90	6	9
3	6:1	100	8	10

1.2.4 红外光谱分析 使用傅立叶变换红外光谱仪测定多糖的红外光谱。PEPs 及其磷酸化产物分别与干燥的溴化钾研磨均匀后压片,在4 000~500/cm 的波长范围内进行测量。

1.2.5 MTT 实验 采用MTT 法进行检测pPEPs 对肿瘤细胞的活性,检测方法参考相关文献^[8-10]。用胰酶消化处于对数生长期、状态良好的小鼠Raw264.7 巨噬细胞,然后重悬。接种于96 孔培养板内,使每孔细胞密度为1×10⁴个,置于5% CO₂、37℃培养箱中培养16 h 使其贴壁,正常细胞对照组加等量细胞和培养液正常培养,空白对照组加等量培养基而不加细胞,给药组给予PEPs 和pPEPs,质量浓度分别为50、100、150、200、250 mg/L,每个质量浓度设置5个复孔,药物与细胞作用24 h,每孔加入20 μL 的MTT 溶液(5 g/L),并继续放到培养箱中培养4 h;培养结束后弃去上清,每个复孔加入150 μL 的DMSO 溶液,用锡纸包裹避光,于摇床上震荡10 min 使结晶彻底溶解。采用酶标仪检测570 nm 处各孔吸光度值(OD)。细胞存活率=(OD_{样品}-OD_{空白})/(OD_{对照}-OD_{空白})×100%。

1.3 统计学处理

采用SPSS23.0 软件分析,极差分析寻找各水平因素对多糖产率及多糖磷酸根含量的影响,极差较大的因素为对该因变量影响较大的因素。采用Graphpad Prism 8.0 软件分析MTT 实验结果,组间比较采用 t 检验、单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 标准曲线

根据钼蓝比色法绘制的磷酸根含量标准曲线,结果如图1所示。标准曲线方程为 $y=19.265x+0.0214$,相关系数0.9876,显示相关性良好。

2.2 扁藻胞外多糖磷酸化反应正交实验

以产率为指标的结果显示:影响因素B>A>D>C;以磷酸根含量为指标的结果显示:影响因素B>D>A>C。综合两个指标的影响,确定当磷酸化试剂比例为6:1,反应温度为100℃、反应时间为6 h、反应pH=8 时为

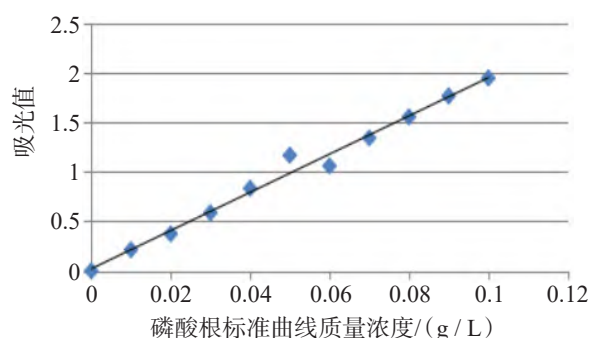


图1 磷酸根标准曲线

最佳的反应条件,见表2。

2.3 红外光谱

采用傅立叶变换红外光谱仪进行红外吸光度检测,在 3 414.0/cm 处存在吸收峰,为-OH 特征吸收峰,较未磷酸化多糖吸收峰强度弱;1 620.21/cm 处出现 C=O 特征吸收峰,并且存在氢键,较未磷酸化多糖吸收峰强度弱;在 999.13/cm 处的相关吸收峰为吡喃环上 C-O-C 的特征吸收峰,此外, pPEPs 在 1 265.30/cm 处出现特征性的 P=O 伸缩振动吸收峰,而 891.11/cm 处出现 P-O-C 键的吸收峰。见图 2、3。

2.4 对Raw264.7 的生长抑制作用

在 100~250 mg/L 的质量浓度时, PEPs 组和 pPEPs 组的细胞存活率均低于对照组 ($P < 0.05$ 或 0.01), 以

表2 正交实验及结果

实验号	A	B	C	D	产率/%	磷酸根含量/%
1	1	1	1	1	18.174	5.730
2	1	2	2	2	9.532	6.524
3	1	3	3	3	4.978	8.198
4	2	1	2	3	19.956	5.441
5	2	2	3	1	12.156	6.444
6	2	3	1	2	9.362	9.032
7	3	1	3	2	23.706	8.578
8	3	2	1	3	9.344	4.640
9	3	3	2	1	16.108	10.690
产率						
K1	10.895	20.612	12.293	15.479		
K2	13.825	10.344	15.199	14.200		
K3	16.386	10.149	13.613	11.426		
R	5.491	10.463	2.905	4.053		
磷酸根含量						
K1	6.817	6.583	6.467	7.621		
K2	6.972	5.869	7.552	8.045		
K3	7.969	9.307	7.740	6.093		
R	1.152	3.437	1.272	1.952		

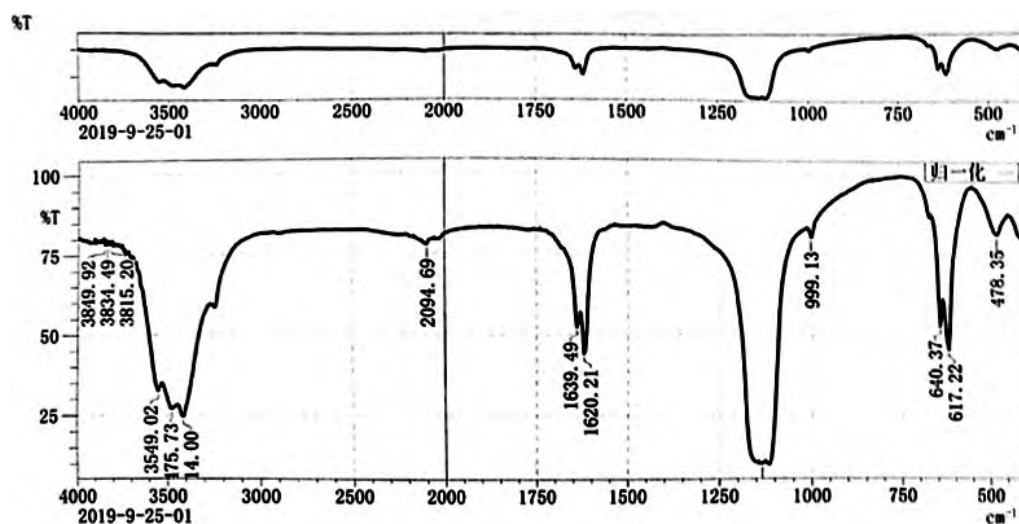


图2 扁藻胞外多糖红外吸收光谱

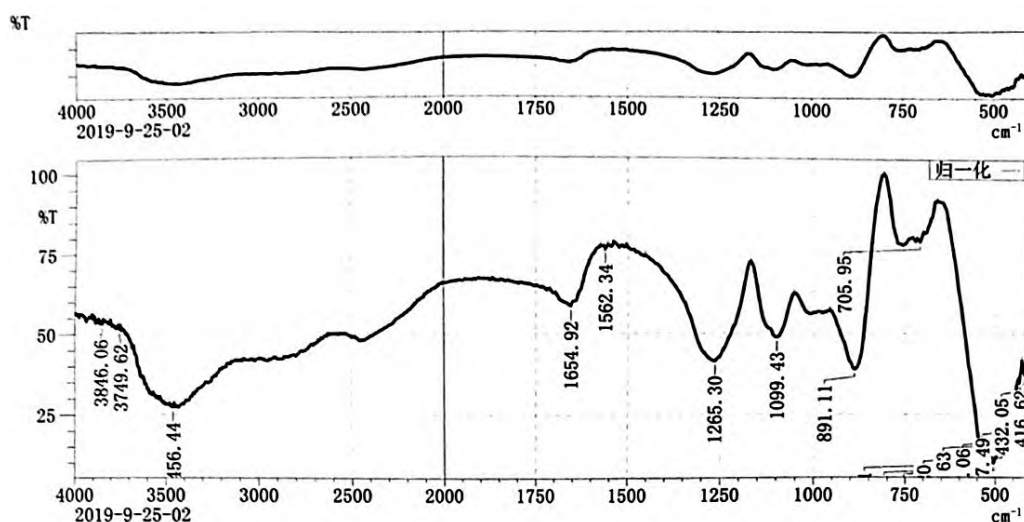
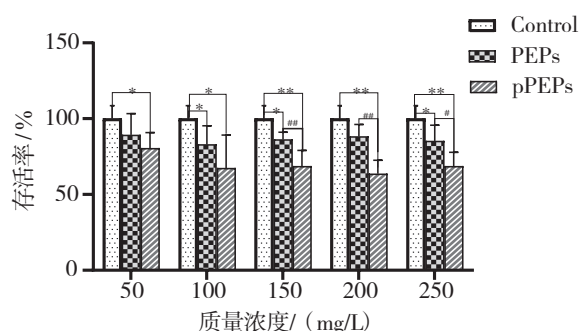


图3 磷酸化扁藻胞外多糖红外吸收光谱

pPEPs 组更为显著 ($P < 0.05$ 或 0.01)。在 $150 \sim 250 \text{ mg/L}$ 的质量浓度时, pPEPs 组的细胞存活率明显低于 PEPs 组 ($P < 0.05$ 或 0.01), 见图 4。



PEPs 组、pPEPs 组 vs Control 组: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; pPEPs 组 vs PEPs 组: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

图4 PEPs 和pPEPs 对Raw264.7 细胞的影响

3 讨论

湛江毗邻南海, 属于热带北缘季风气候, 海洋资源丰富, 扁藻是其丰富的海产之一, 容易获得, 生存力强, 易于培养, 且营养丰富, 具有很高的研究价值。该文通过参考刘梓茂等^[11]的方法培养扁藻并提取其胞外多糖进行研究。

多糖自身的结构可以影响多糖的生物活性, 其中多糖糖苷键的类型、主链的构型、支链的性质是影响多糖活性的主要因素, 改变其化学结构可增强其活性以及靶向性^[12]。已知多糖常用的化学修饰方法有硫酸化、羧甲基化、乙酰化、硒化、磺酰化、磷酸化、双基团衍生化等。各种修饰方法各有优点, 硫酸化修饰多糖的方法种类较多, 硫酸化多糖的突出特点为具有抗病毒(抗 HIV 病毒、流感病毒、巨噬细胞病毒)活性。羧甲基化

修饰具有试剂易得、成本较低、制备过程简单及反应所生成的物质低毒或无毒等优点。甲基化多糖的突出特点为能有效提高多糖的水溶性。乙酰化修饰具有反应速度快、反应温和、产物转换率高等优点, 乙酰化多糖增大了多糖的溶解度, 其具有抗肿瘤、抗氧化、抗凝血及疫调节等活性。硒是人体生命活动的必需元素, 因此硒化多糖兼有硒的强抗氧化性和多糖的抗肿瘤、抗病毒及抗辐射等生物活性。磷酸化多糖具有很强的抗肿瘤、抗病毒及免疫调节等生物活性, 且磷酸化修饰的原料三偏磷酸钠及三聚磷酸钠等磷酸盐廉价易得且不易引起多糖的降解^[13], 所以该文选择了磷酸化来修饰多糖。

采用傅立叶变换红外光谱仪进行红外吸光度检测, 可推断该多糖为吡喃型多糖^[12]。与 PEPs 相比, pPEPs 仍含有 PEPs 的特征性吸收峰, 说明多糖的主体结构未发生明显变化, 仍是吡喃型多糖。此外, pPEPs 在 $1265.30/\text{cm}$ 处出现特征性的 $\text{P}=\text{O}$ 伸缩振动吸收峰, 而 $891.11/\text{cm}$ 处出现 $\text{P}-\text{O}-\text{C}$ 键的吸收峰, 因此可推断该扁藻胞外多糖成功磷酸化修饰^[3, 11]。三聚磷酸钠和三偏磷酸钠在 $480 \sim 550/\text{cm}$ 范围内有其特征性吸收峰 $[\text{PO}_3^{4-}]$ ^[13], 由图 1 和图 2 的对比, 磷酸化后的扁藻胞外多糖红外光谱中, 在 $505/\text{cm}$ 有明显的吸收峰, 而在未磷酸化的多糖红外光谱中未出现过, 说明经磷酸化后, 多糖分子结合上了磷酸基团。

影响多糖磷酸化结果的因素有反应时间、反应温度、磷酸化试剂比例和 pH 值, 参考相关文献的单因素实验^[3, 5, 14], 多糖磷酸化的最适反应条件区间分别为: 反应时间 $4 \sim 8 \text{ h}$, 反应温度 $80 \sim 100 \text{ }^\circ\text{C}$, 磷酸化试剂比例 $4:3 \sim 6:1$, pH 值 $8 \sim 10$ 。该文选取这些区间为

反应条件经行正交实验,得出扁藻胞外多糖pPEPs的磷酸根含量的主次因素为反应温度>pH值>磷酸化试剂比例>反应时间。影响pPEPs产率的主次因素为反应温度>磷酸化试剂比例>pH值>反应时间。综合考虑反应条件对磷酸根含量和产率的影响,确定制备pPEPs的最佳工艺条件为m(三聚磷酸钠):m(三偏磷酸钠)=6:1、反应温度为100℃、反应时间为6h、pH值=8,磷酸化扁藻胞外多糖中磷酸根质量分数平均为10.69%。通过参考文献^[2, 4, 15]进行比较,得出本实验中的磷酸根质量分数处于较高的水平。猜测可能与实验中三偏磷酸钠占比较高,使得多糖分子能结合较多的磷酸基团有关,并且本实验中透析时间较长,能更好的滤过磷酸化试剂和未磷酸化的多糖,从而提高了产率。

细胞的死亡具有多种不同的发生机制,包括凋亡、坏死性凋亡、焦亡、铁死亡、自噬等^[16]。近期研究表明多糖类成分抗肿瘤作用是通过抑制肿瘤细胞生长、免疫调节及细胞凋亡等途径实现^[17-18]。Lyuksutova等^[19]对(1-3)-β-D-葡聚糖进行磷酸化修饰,研究发现其免疫生物活性机制为磷酸化β-D-葡聚糖通过与膜受体细胞的相互作用而结合免疫细胞,激发机体多种自然免疫反应。Huang等^[20]对(1-3)-α-D-葡聚糖进行磷酸化修饰,研究发现磷酸化多糖的增强抗肿瘤活性的机制为激活机体的免疫应答,促进免疫细胞的增殖与分化。其体外抗S-180肿瘤细胞IC₅₀可达0.01g/L。张忠等^[21]采用单磷酸盐法对灵芝β-葡聚糖进行磷酸化修饰,发现所制得的磷酸化衍生物对肿瘤细胞K562和L1210增殖在一定程度上有抑制作用,且抑制作用与其磷酸根取代度有关,取代度越大,抑制作用越强。本研究采用体外MTT法考察了PEPs和pPEPs对raw 264.7细胞增殖的抑制作用。实验发现,在100~250mg/L的质量浓度时,PEPs组和pPEPs组的细胞存活率均低于对照组($P<0.05$ 或 0.01),以pPEPs组更为显著($P<0.05$ 或 0.01)。在150~250mg/L的质量浓度时,pPEPs组的细胞存活率明显低于PEPs组($P<0.05$ 或 0.01),说明PEPs与pPEPs对Raw 264.7细胞的增殖均具有一定的抑制作用,且pPEPs组的细胞抑制率高于PEPs组。表明磷酸化修饰的方法能提高扁藻胞外多糖的抗肿瘤活性,磷酸化扁藻胞外多糖具有一定的抗肿瘤应用前景,本研究可为扁藻胞外多糖相关功能食品、医药产品和化学工业品的开发提供理论参考。

正交法制备磷酸化扁藻胞外多糖的工艺简单,原

料容易获得,在今后开发中有一定的优势,这为其在工业中的应用提供一定的基础。实验显示,扁藻胞外多糖经磷酸化修饰后能增强其抑制肿瘤细胞增殖的作用,这可能是由于多糖经过磷酸化修饰后其分子结构发生了衍生,增加了药物的活性,增强了抗肿瘤细胞增殖的作用。而且磷酸化可以提高药物的溶解稳定性,减少药物的应用浓度和剂量,但磷酸化扁藻胞外多糖具体的抗肿瘤机理目前尚不明确,仍需进行进一步探讨研究。

参考文献:

- [1]刘好,侯放,杨丽丽. 海洋藻类多糖的生物活性研究进展[J]. 安徽农学通报(下半月刊), 2009, 15(8): 47-48.
- [2]路垚. 磷酸化姬松茸多糖的制备及药理作用研究[D]. 天津: 天津农学院, 2016.
- [3]郑常领,赵柄舒,王玉华,等. 黑木耳多糖的磷酸化修饰及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2019(17): 134-141.
- [4]YE M, YUAN R Y, HE Y L, et al. Phosphorylation and anti-tumor activity of exopolysaccharide from Lachnum YM123[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 97(2): 690-694.
- [5]季舒婷,谢静茹,赵培,等. 松树茸多糖磷酸化修饰工艺及其抗氧化活性[J]. 常熟理工学院学报, 2018, 32(5): 106-114.
- [6]李益,钱慈,郭明,等. 香菇多糖磷酸化修饰的工艺研究[J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2013, 30(5): 664-670.
- [7]孙雪,潘道东,曾小群,等. 浒苔多糖的磷酸化修饰工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(24): 73-77.
- [8]蔡文涛. MTT法和CCK-8法检测中药抗病毒活性成分细胞毒性的比较[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2017, 39(3): 305-310.
- [9]岳文华,徐坤,冯育林,等. 白头翁皂苷D体外抗肝癌作用及其机制研究[J]. 中草药, 2014, 45(22): 3295-3301.
- [10]邵明惠. 松花粉多糖酯化前后对H22荷瘤小鼠抗肿瘤及免疫调节的研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2019.
- [11]刘梓茂,温俊昊,潘荣华,等. 应用正交实验优化扁藻胞外多糖硒化工艺的研究[J]. 广东医科大学学报, 2019, 37(5): 501-505.
- [12]陈金龙. 化学修饰羊肚菌多糖生物活性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2017.
- [13]丁鹏. 磷酸盐对蛇纹石的分散作用研究[D]. 长沙: 中南大学, 2011.
- [14]艾绿叶,任天宝,冯雪研,等. 响应面优化烟叶多糖磷酸化工艺及保润性评价[J]. 精细化工, 2018(12): 2065-2071.
- [15]钱慈. 香菇深层发酵及其多糖的分离纯化,磷酸化研究[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2013.
- [16]陈梦,戴海明. 细胞程序性死亡与炎症发生[J]. 中国细胞生物学学报, 2020, 42(12): 2205-2214.
- [17]苏畅,李小江,贾英杰,等. 香菇多糖的抗肿瘤作用机制研究

(下转第507页)

熟 miRNA 基因序列中的 SNPs 可能导致成熟 miRNA 水平变化、新 miRNA 产生和 miRNA 与靶序列结合效应改变,影响 miRNA 对靶基因的调控,进而对肿瘤发病风险和进展产生影响。位于 pre-miRNA 的 miR-423 rs6505162 位点的 SNP 被发现与多种肿瘤的发生、发展和预后相关,但在结果上存在较大的分歧。Yin 等^[9]研究发现 miR-423 rs6505162 CA/AA 基因型可降低中国非吸烟女性人群肺癌的发病风险, A 等位基因可能是一个保护性因素。但另一项研究则显示该多态性与增高的乳腺癌发病风险相关^[10], CA/AA 基因型被发现与较差的肿瘤预后相关^[11]。本研究对湖南汉族人群中 miR-423 rs6505162 SNP 与 NPC 发病风险进行了分析,发现 rs6505162 各基因型与鼻咽癌发病风险无明显相关性,但在等位基因模型中,与 C 等位基因相比, A 等位基因可增加 NPC 易感性。本次对照组中的 miR-423 rs6505162 最小等位基因频率(minor allele frequency, MAF)为 0.226,与已报道中国南方人群 MAF (0.229)接近,但明显高于中国北京汉族人群(0.150)(<https://asia.ensembl.org/>)。这种分布的地区差异是否与鼻咽癌发病风险有关,尚有待进一步证实。

综上所述, miR-423 CNV 可能参与了 HNSC 的发生,并且 rs6505162 A 等位基因可能对鼻咽癌易感性产生一定的影响,将为鼻咽癌遗传学机制研究提供实验依据。但由于本研究纳入的样本量较少,结果存在一定的局限性,尚需进一步扩大样本量进行验证。

参考文献:

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] BEI J X, ZUO X Y, LIU W S, et al. Genetic susceptibility to the endemic form of NPC [J]. Chin Clin Oncol, 2016, 5(2): 15.
- [3] SHAO X, LV N, LIAO J, et al. Copy number variation is highly correlated with differential gene expression: a pan-cancer study [J]. BMC Med Genet, 2019, 20(1): 175.
- [4] KE R S, LV L Z, ZHANG S Y, et al. Functional mechanism and clinical implications of microRNA-423 in human cancers [J]. Cancer Med, 2020, 9(23): 9036-9051.
- [5] KLOPOCKI E, MUNDLOS S. Copy-number variations, noncoding sequences, and human phenotypes [J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2011, 12: 53-72.
- [6] XIA W F, LIU Y, DU Y Y, et al. MicroRNA-423 drug resistance and proliferation of breast cancer cells by targeting ZFP36 [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 769-782.
- [7] SUN X J, WANG M C, LIU H Y, et al. MicroRNA-423 enhances the invasiveness of hepatocellular carcinoma via regulation of BRMS1 [J]. Am J Transl Res, 2017, 9(12): 5576-5584.
- [8] JIA W Z, YU T, AN Q, et al. MicroRNA-423-5p inhibits colon cancer growth by promoting caspase-dependent apoptosis [J]. Exp Ther Med, 2018, 16: 1225-1231.
- [9] YIN Z H, CUI Z G, REN Y W, et al. Association between polymorphisms in pre-miRNA genes and risk of lung cancer in a Chinese non-smoking female population [J]. Lung Cancer, 2016, 94: 15-21.
- [10] ARANCIBIA T, MORALES-PISON S, MALDONADO E, et al. Association between single-nucleotide polymorphisms in miRNA and breast cancer risk: an updated review [J]. Biol Res, 2021, 54(1): 26.
- [11] DING H X, LV Z, YUAN Y, et al. MiRNA polymorphisms and cancer prognosis: A systematic review and Meta-analysis [J]. Front Oncol, 2018, 8: 596.
- [12] 进展[J]. 中草药, 2019, 50(6): 1499-1505.
- [13] 万茜淋, 任雨贺, 吕瑞娜, 等. 香菇多糖对神经胶质瘤 SHG-44 细胞增殖、周期, 凋亡及迁移的影响[J]. 中成药, 2019, 41(11): 2614-2619.
- [14] LYUKSUTOVA O I, MURPHEY E D, TOLIVER-KINVCSKY T E, et al. Glucan phosphate treatment attenuates burn-induced inflammation and improves resistance to Pseudomonas aeruginosa burn wound infection[J]. Shock, 2005, 23(3): 224-232.
- [15] HUANG Q L, ZHANG L. Preparation, chain conformation and anti-tumor activities of water-soluble phosphated (1→3)-α-d-glucan from Poria cocos mycelia [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 83(3): 1363-1369.
- [16] 张忠, 张劲松, 唐庆九, 等. 灵芝β-葡聚糖磷酸化衍生物体外抑制肿瘤细胞增殖的作用[J]. 食用菌学报, 2020, 27(1): 63-68.

(上接第 502 页)