

灵芝抑制肿瘤微环境中 Treg 细胞功能的机制

李 芳, 余梦瑶, 江 南, 贺黎铭, 姚 珂, 罗 霞  
(四川省中医药科学院菌类药材研究所, 菌类药材系统研究与开发实验室,  
中药材品质及创新中药研究四川省重点实验室, 成都 610041)

**摘 要:** 为探究灵芝抑制肿瘤的可能机制, 分别采用灵芝三萜、多糖及三萜多糖配伍对 H22 荷瘤小鼠模型进行干预, 检测瘤体重量、体积, 流式细胞法检测肿瘤组织中 Treg 细胞比例, RT-PCR 法检测趋化因子 CCL22、受体 CCR4 和 FOXP3 mRNA 表达水平, IHC 法检测 FOXP3 蛋白表达水平, ELISA 法检测 IL-10、TGF-β1、IL-2 含量. 结果显示, 灵芝能抑制 H22 肿瘤生长, 配伍组抑瘤率(47.8%)明显高于三萜组(21.4%)和多糖组(30.8%); 灵芝能降低肿瘤微环境中 Treg 细胞比例, 配伍组比例(1.93%)明显低于三萜组(3.04%)和多糖组(2.18%); 灵芝能显著降低相关 mRNA 的表达、FOXP3 和 IL-10、TGF-β1 水平, 增加 IL-2 水平. 因此, 灵芝可通过减少 Treg 细胞向肿瘤组织浸润、抑制其分泌细胞因子, 同时增加 IL-2 水平来促进抗肿瘤免疫, 且三萜和多糖合用可能存在协同作用.

**关键词:** 灵芝; 多糖; 三萜; 肿瘤微环境; Treg 细胞

**中图分类号:** R96      **文献标识码:** A      **DOI:** 10.19907/j.0490-6756.2021.026003

Study on the mechanism of *Ganoderma lucidum* inhibiting Treg cell  
function in the mouse tumor microenvironment

LI Fang, YU Meng-Yao, JIANG Nan, HE Li-Ming, YAO Ke, LUO Xia  
(Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Research and  
Development Laboratory for Fungal Medicinal Systems, Research on the Quality of Chinese Medicinal  
Materials and Innovative Traditional Chinese Medicine Sichuan Key Laboratory, Chengdu 610041)

**Abstract:** To investigate the possible mechanism of *Ganoderma lucidum* inhibiting tumor, the H22 tumor-bearing mice were treated with triterpenoids, polysaccharides and their mixture separately. The tumor weight and volume were measured, and the proportion of Treg cells in tumor tissues was detected by flow cytometry. The expression level of CCL22、CCR4 and FOXP3 were detected by RT-PCR. Immunohistochemical staining was used to detect the expression level of FOXP3 protein, ELISA was used to detect the cytokine content of IL-10, TGF-β1 and IL-2. The results showed the tumor inhibition rate in the mixture group(47.8%) was significantly higher than that in the triterpenoid group (21.4%) and the polysaccharide group (30.8%) . The proportion of Treg cells of the mixture group (1.93%) in the tumor microenvironment was significantly lower than that in the triterpenoid group (3.04%) and polysaccharide group (2.18%). The levels of FOXP3, IL-10, TGF-β1 and related mRNA were significantly reduced in *Ganoderma lucidum* groups. Meanwhile, the IL-2 level was increased in *Ganoderma lucidum*

收稿日期: 2020-08-01  
基金项目: 四川省公益性科研院所基本科研业务专项(A-2018N-18); 四川省十三五中药材育种攻关项目(2016NYZ0036); 国家现代农业产业技术体系四川道地中药材创新团队项目(SCCXTD-2020-19); 四川省科技基础条件平台项目(2019JDPT0012)  
作者简介: 李芳(1990—), 女, 四川资中人, 硕士, 助理研究员, 研究方向为肿瘤药理. E-mail: 1017572762@qq.com  
通讯作者: 罗霞. E-mail: 287748567@qq.com.

groups. Therefore, *Ganoderma lucidum* can inhibit Treg cell function by reducing the infiltration of Treg cells into tumor tissue and inhibiting cytokine secretion in the mouse tumor microenvironment. Meanwhile, *Ganoderma lucidum* can increase the level of IL-2 in the tumor microenvironment to promote an anti-tumor immune response. Besides, the combination of triterpenoids and polysaccharides may have a synergistic effect.

**Keywords:** *Ganoderma lucidum*; Polysaccharide; Triterpenoid; Tumor microenvironment; Treg cell

## 1 引言

灵芝是我国传统的补益中药,具有扶正固本的作用,现代药理研究表明灵芝具有抑制肿瘤<sup>[1]</sup>和免疫调节作用<sup>[2]</sup>,近年来常被用于肿瘤放化疗的辅助治疗.灵芝多糖和三萜是其主要药效成分,多糖对体外培养的肿瘤细胞无直接抑制作用,其抑瘤作用与免疫调节密切相关:促进树突细胞成熟和分化<sup>[3]</sup>,增强巨噬细胞的吞噬功能<sup>[4]</sup>,促进自然杀伤细胞活性<sup>[5]</sup>等;而灵芝三萜类成分主要通过直接毒杀肿瘤细胞而发挥抗肿瘤作用<sup>[6]</sup>,二者抗肿瘤作用没有直接的可比性,但适宜的配伍能有效提高抗肿瘤作用<sup>[7]</sup>.

调节性 T 细胞(Treg 细胞)是以 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>为特征的 T 淋巴细胞亚群,是体内重要的免疫负调控细胞,是肿瘤免疫逃逸的关键因素<sup>[8]</sup>.研究发现灵芝孢子多糖能有效抑制 Treg 细胞功能.但是灵芝子实体三萜、多糖配伍是否能有效提高对 Treg 细胞功能的抑制作用,目前尚无相关的研究报道.本研究利用前期研究获得的最佳抑瘤配伍剂量<sup>[7]</sup>,开展该方面的深入研究,有利于进一步阐释灵芝抗肿瘤的作用机制.

## 2 材料与方法

### 2.1 主要试剂

二甲亚砜(DMSO)、透明质酸酶、DNA 酶 I、胶原酶 IV、牛血清白蛋白(BSA),购自 sigma 公司.小鼠肿瘤浸润组织淋巴细胞分离液购自上海研谨生物科技有限公司. CD3-PerCP-Cy5. 5、CD4-FITC、CD25-APC、foxp3-PE 流式抗体购自 BD 生物科技有限公司. Foxp3 染色固定透膜液购自 invitrogen 公司. UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒,购自生工生物工程股份有限公司. 琼脂糖 B、4S Red Plus 核酸染色剂、2X SG Fast qPCR Master Mix 购自 BBI 公司;GeneRuler DNA Ladder Mix、反转录试剂盒,购自 Thermo Scientific 公司. ELISA 试剂盒均购自上海苗彩生物科技有限公

司;兔抗 FOXP3 多克隆抗体购自美国 R&D 公司. 多聚甲醛购自国药集团化学试剂有限公司. 苏木素购自北京百灵威科技有限公司. 中性树胶购自中国上海懿洋仪器有限公司. 其余常用化学试剂购自成都科龙化工试剂厂.

### 2.2 方法

2.2.1 实验动物造模和分组 Km(昆明种)小鼠,SPF 级,雄性,体重 18~22 g,由四川省中医药科学院动物中心提供,动物生产证号:SCXK(川)2013-19,饲养于 SPF 级动物房. 灵芝多糖和三萜从赤芝子实体中提取获得. H22 细胞株购自中科院细胞所,于小鼠腹腔内传代保存. 每只小鼠右侧腋窝皮下准确接种 H22 细胞  $2 \times 10^6$  个,接种次日,小鼠随机分成对照组、三萜组、多糖组和配伍组,每组 20 只,分别以溶剂、灵芝三萜(90 mg/kg)、多糖(43 mg/kg)及多糖三萜(90 mg/kg+43 mg/kg)配伍腹腔注射给药,连续给药 15 d,从第 3 d 起每 2 d 检测一次肿瘤直径,末次给药结束后颈椎脱臼处死小鼠,分离腋下肿瘤称重,计算抑瘤率和体积( $0.52 \times \text{长} \times \text{宽}^2$ ),绘制肿瘤生长曲线.

2.2.2 灵芝多糖和三萜的提取 按照《中国药典 2015 版》中灵芝多糖和三萜提取和含量测定方法操作<sup>[9]</sup>,采用 Sevag 法除去提取物中的蛋白质后对灵芝多糖和三萜含量进行测定.

2.2.3 流式细胞术检测 Treg 细胞数量 解剖小鼠肿瘤组织,用 RPMI1640 培养基洗去血污. 称取 1 g 左右的肿瘤组织,加入 4 mL 酶解液,用眼科剪剪碎至 2~5 mm<sup>3</sup> 大小,置 37 °C 酶解 2 h. 取酶解液,以 200 目不锈钢网过滤,除去未酶解完全的组织块. 取玻璃试管,加入 5 mL 小鼠肿瘤浸润淋巴细胞分离液,离心后获得淋巴细胞. 洗涤淋巴细胞两次后加入 CD3、CD4、CD25 抗体室温避光孵育 30 min 后离心 5 min,弃上清. 加入 1 mL 染色缓冲液,重悬细胞,400~600 g 离心 5 min,弃上清. 完成表面抗原染色后的细胞,再加入 1 mL Foxp3 染色固定透膜液,室温孵育 1 h. 加入透膜缓冲液重悬细胞,离心后弃上清,加入 FOXP3 抗体染色后上

流式细胞仪检测。

2.2.4 荧光定量 PCR 检测 mRNA 水平 按 15~25 mg 小鼠肿瘤组织加入 0.5 mL Trizol 用匀浆器匀浆处理,获得的匀浆液按柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒操作步骤进行总 RNA 提取,按照反转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA. PCR 反应体系:2×SybrGreen qPCR Master Mix 10 μL、正反引物各 0.4 μL、cDNA 模板 2 μL、ddH<sub>2</sub>O 7.2 μL. PCR 循环条件:95 ℃预变性 3 min,95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,45 个循环. 为保证结果的精确性,重复三次每个反应。

引物序列:  
GAPDH-F:5'-GGTTGTCTCCTGCGACTTCA-3',  
GAPDH-R:5'-TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC-3';  
CCL22-F:5'-TCTCGTCCTTCTTGCTGTGG-3',  
CCL22-R:5'-GCAGAGGGTGACGGATGTAGT-3';  
CCR4-F:5'-CATCTCGGATTTGCTGTTCG-3',  
CCR4-R:5'-CTGGTGATGACGCCATAGGT-3';  
FOXP3-F:5'-TGGTTTACTCGCATGTTCCG-3',  
FOXP3-R:5'-AACTCAAATTCATCTACGGTCCA-3'.

2.2.5 ELISA 法检测细胞因子含量 将小鼠肿瘤组织研磨成细胞悬液,离心后取上清,然后按试剂盒说明书进行具体操作. 用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值),计算样品浓度。

2.2.6 免疫组化染色法检测肿瘤组织中 FOXP3 蛋白的表达 处死小鼠,解剖下肿瘤组织,放入 4%多聚甲醛溶液中,固定 48 h,常规梯度酒精脱水,石蜡包埋,制备组织切片. 脱蜡后的切片放入染色缸,3%甲醇双氧水室温 10 min;PBS 洗 3 次,每次 5 min;将切片浸入 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0),微波炉中高火加热至沸腾后断电,间隔 5 min 后,反复 1 次,冷却后,PBS 洗 2 次,每次 5 min;滴加山羊血清封闭液,室温 20 min;滴加一抗,4 ℃过夜;滴加生物素化二抗,37 ℃ 30 min;PBS 水洗 3 次,每次 5 min;DAB 显色;使用 DAB 显色试剂盒,混匀试剂后滴加到切片上,室温显色,镜下控制反映时间 2 min,蒸馏水洗涤;苏木素轻度复染,脱水,透明,中性树胶封片. 采用显微成像系统拍照后,以 Image pro plus6.0 软件对阳性表达区域进行累积光密度(IOD)分析。

2.2.7 统计学分析 运用 SPSS17.0 统计分析软件对数据进行分析,所有数据以  $\bar{x} \pm S$  表示,两组之间比较用 t 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 灵芝多糖和三萜的含量测定

3.1.1 灵芝多糖含量 按中国药典中硫酸蒽酮法检测,灵芝多糖标准曲线测定结果如下:

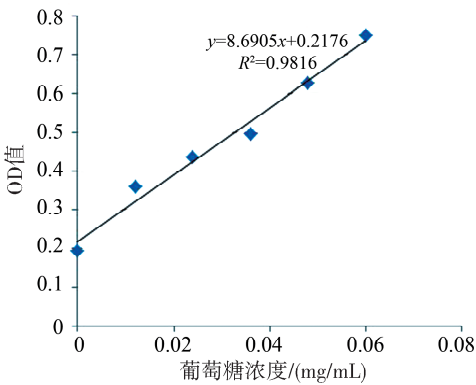


图 1 多糖标准曲线  
Fig. 1 Polysaccharide standard curve

根据样品吸光度由公式  $y = 8.6905x + 0.2176$  计算出提取物样品中多糖含量为 481.90 mg/g.

3.1.2 灵芝三萜含量 按中国药典中方法检测,灵芝三萜标准曲线测定结果如下:

根据样品吸光度由公式  $y = 12.634x + 0.0106$  计算出提取物中三萜含量为 434.40 mg/g.

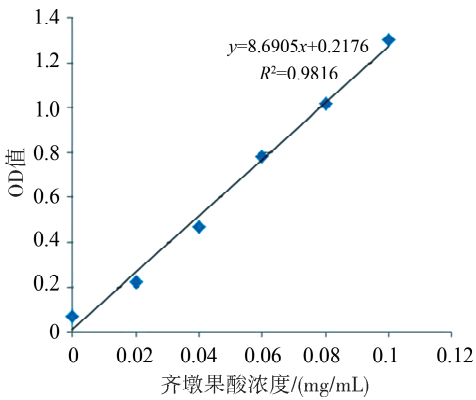


图 2 三萜标准曲线  
Fig. 2 Triterpene standard curve

3.2 H22 荷瘤小鼠瘤体生长情况

小鼠处死后立即解剖下肿瘤组织,称重,各组小鼠瘤重及肿瘤体积分别见表 1 和图 3. 与对照组相比,各给药组解剖下的小鼠瘤重都明显更轻,其中灵芝多糖组具有显著性差异( $P < 0.05$ ),配伍组具有极显著性差异( $P < 0.01$ );配伍组抑瘤率明显高于多糖组和三萜组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). 各给药组肿瘤体积均较对照组减

小( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 配伍组肿瘤体积明显小于多糖组和三萜组, 差异具有统计学意义(图 1,  $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). 表明灵芝多糖和三萜均能抑制小鼠 H22 瘤体生长, 二者配伍给药能增强抑瘤作用.

表 1 小鼠瘤体重量及抑瘤率( $n=20, \bar{x} \pm S$ )  
Tab. 1 Tumor weight and tumor inhibition rate in mice ( $n=20, \bar{x} \pm S$ )

| 组别  | 三萜剂量<br>/(mg/kg) | 多糖剂量<br>/(mg/kg) | 瘤重/g                     | 抑瘤率/% |
|-----|------------------|------------------|--------------------------|-------|
| 对照组 | /                | /                | 3.94±0.49                | —     |
| 三萜组 | 90               | /                | 3.09±0.83 $\Delta\Delta$ | 21.4  |
| 多糖组 | /                | 43               | 2.75±0.87 $\Delta$       | 30.8  |
| 配伍组 | 90               | 43               | 2.06±0.32 $**$           | 47.8  |

注: 与对照组比较, \* 表示  $P<0.05$ , \*\* 表示  $P<0.01$ ; 与配伍组比较,  $\Delta$  表示  $P<0.05$ ,  $\Delta\Delta$  表示  $P<0.01$ .

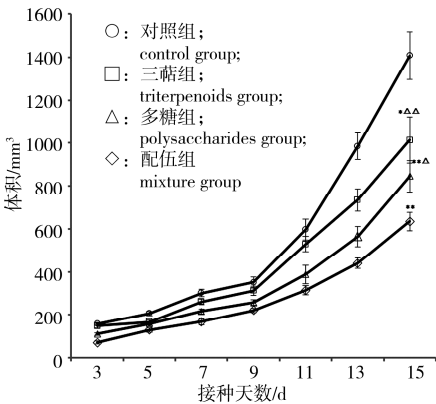


图 3 肿瘤生长曲线图  
与对照组比较, \* 表示  $P<0.05$ , \*\* 表示  $P<0.01$ ; 与配伍组比较,  $\Delta$  表示  $P<0.05$ ,  $\Delta\Delta$  表示  $P<0.01$ .  
Fig. 3 Tumor growth curve

3.3 灵芝对小鼠肿瘤微环境中 Treg 细胞数量的影响

经流式细胞法测定小鼠肿瘤组织中 Treg 细胞( $CD4^+CD25^+foxp3^+$ )在  $CD4^+$  细胞中的比例,

统计结果如表 2 所示, 流式结果图见图 4. 与对照组相比, 各给药组小鼠肿瘤微环境中 Treg 细胞比例均有所降低, 差异具有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); 配伍组 Treg 细胞比例明显低于三萜组和多糖组, 差异具有统计学意义( $P<0.05$ ). 结果表明, 灵芝多糖和三萜均能降低肿瘤微环境中 Treg 细胞比例, 二者配伍给药具有协同效应.

表 2 小鼠肿瘤微环境中 Treg 细胞比例( $n=10, \bar{x} \pm S$ )  
Tab. 2 Treg cell ratio in mouse tumor microenvironment ( $n=10, \bar{x} \pm S$ )

| 组别  | 三萜剂量<br>mg/kg | 多糖剂量<br>mg/kg | Treg 细胞比例(%)         |
|-----|---------------|---------------|----------------------|
| 对照组 | /             | /             | 4.91±0.31            |
| 三萜组 | 90            | /             | 3.04±0.25 $\Delta$   |
| 多糖组 | /             | 43            | 2.18±0.21 $**\Delta$ |
| 配伍组 | 90            | 43            | 1.93±0.22 $**$       |

注: 与对照组比较, \* 表示  $P<0.05$ , \*\* 表示  $P<0.01$ ; 与配伍组比较,  $\Delta$  表示  $P<0.05$ ,  $\Delta\Delta$  表示  $P<0.01$ .

3.4 Treg 细胞趋化相关关键基因的 RT-PCR 检测

经检测小鼠肿瘤微环境中 Treg 细胞趋化相关关键基因: 趋化因子 CCL22 及其受体 CCR4 和 FOXP3 在肿瘤组织中的表达, 结果如图 5 所示. 与对照组相比, 灵芝三萜组和多糖组中相关基因的表达无明显变化, 配伍组相关基因的表达明显降低, 差异具有统计学意义( $P<0.01$ ), 配伍组的 CCL22、CCR4 和 FOXP3 基因表达水平都明显低于三萜组和多糖组, 差异具有统计学意义( $P<0.01$ ). 结果表明, 灵芝三萜、多糖配伍给药能降低 Treg 细胞趋化相关关键基因的表达, 减少 Treg 细胞向肿瘤微环境中趋化.

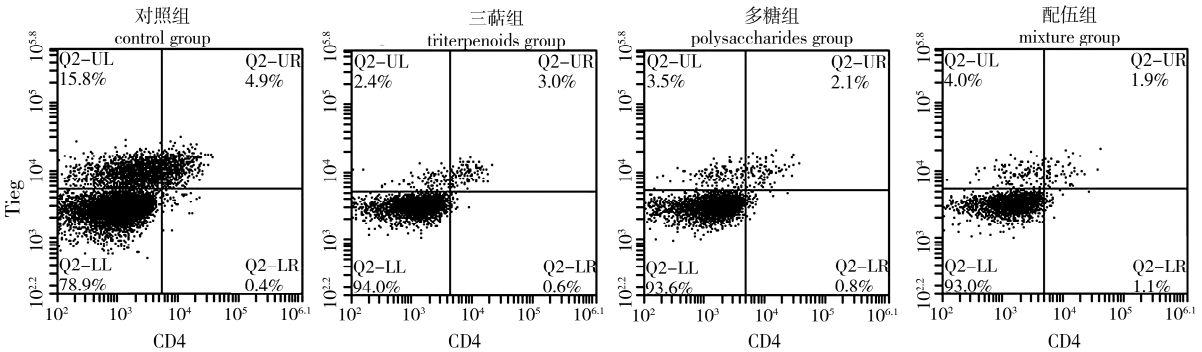


图 4 小鼠肿瘤微环境中 Treg 细胞比例流式图  
Fig. 4 FACS analyses of Treg cell ratio in mouse tumor microenvironment



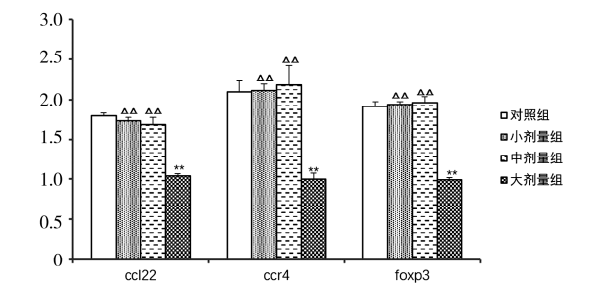


图 5 肿瘤微环境中基因表达分析图

Fig. 5 Gene expression analysis in tumor microenvironment

注:与对照组比较,\*\*表示  $P<0.01$ ;与配伍组比较, $\Delta\Delta$ 表示  $P<0.01$ .

3.5 肿瘤微环境中细胞因子水平

经检测肿瘤组织中细胞因子 IL-10、TGF- $\beta$ 1 和 IL-2 含量,统计结果如图 6 所示.与对照组相比,各给药组的 IL-10 和 TGF- $\beta$ 1 的含量均有所降低,其中多糖组和配伍组差异具有统计学意义( $P<0.05$ );配伍组 IL-10 和 TGF- $\beta$ 1 水平明显低于三萜组和多糖组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ).与对照组相比,各给药组的 IL-2 的含量均有所降低,多糖组和配伍组差异具有统计学意义,配伍组 IL-2 水平明显高于三萜组和多糖组( $P<0.05$ ).结

果表明,灵芝三萜和多糖均能降低 IL-10 和 TGF- $\beta$ 1 水平,同时增加 IL-2 水平.

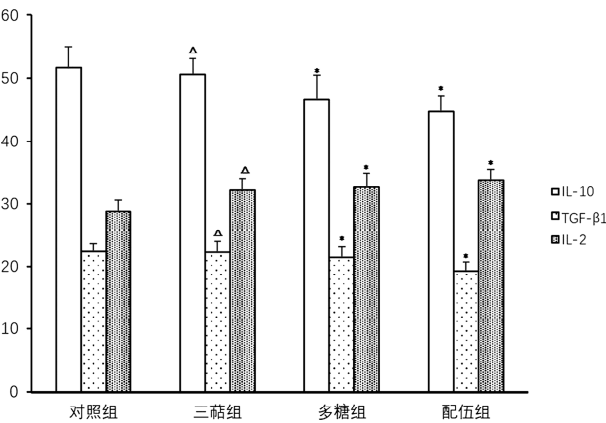


图 6 小鼠肿瘤组织中细胞因子含量

与对照组比较,\*  $P<0.05$ ;与配伍组比较, $\Delta$ 表示  $P<0.05$ .

Fig. 6 Cytokine content in mouse tumor tissue

3.6 肿瘤微环境中 FOXP3 蛋白表达水平

各组肿瘤组织中 FOXP3 阴性细胞呈蓝色,底物呈白色,阳性细胞呈黄色或棕黄色,FOXP3 阳性产物主要分布在细胞核、细胞质及细胞间质.与对照组相比,各给药组 FOXP3 均呈现较弱的表达水平(图 7).

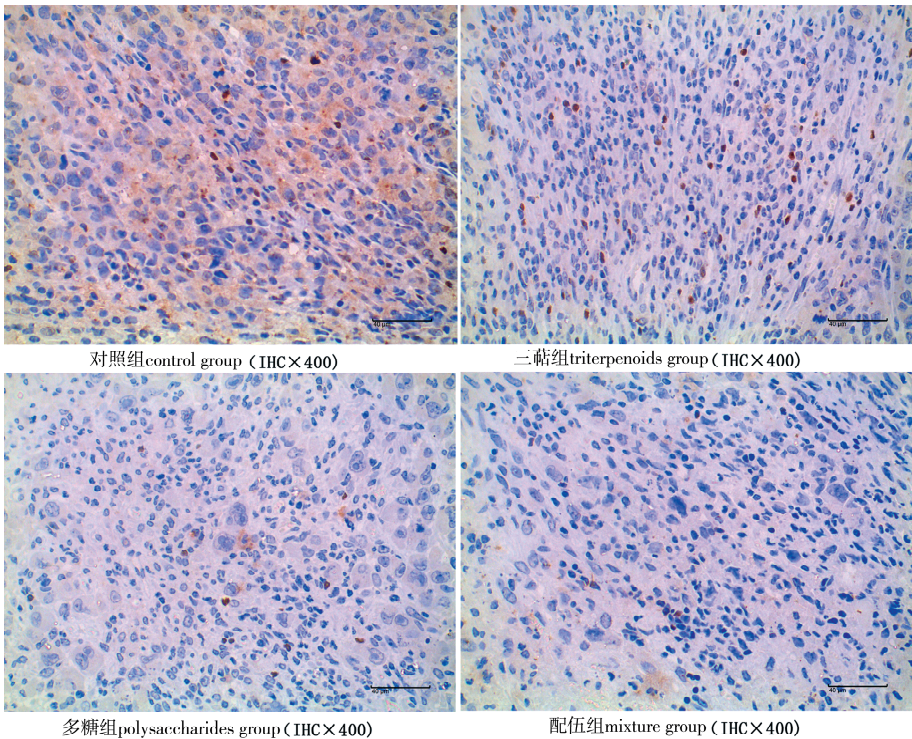


图 7 小鼠肿瘤微环境中 FOXP3 蛋白表达

Fig. 7 Expression of FOXP3 protein in mouse tumor microenvironment

平均光密度统计结果(表 3)显示,与对照组相比,各给药组小鼠肿瘤组织 FOXP3 蛋白含量均有降低,其中三萜组和配伍组差异具有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );配伍组小鼠肿瘤组织

FOXP3 蛋白含量明显低于三萜组和多糖组,其中多糖组与配伍组差异具有统计学意义( $P<0.05$ ).结果表明,灵芝三萜和多糖均能降低小鼠肿瘤组织中 FOXP3 蛋白的表达,二者配伍给药具有协同效果.

表 3 小鼠肿瘤组织 FoxP3 平均光密度统计结果( $n=6, \bar{x} \pm SD$ )

Tab. 3 Average optical density of FoxP3 in mouse tumor tissue

| 组别  | OD( $\bar{x} \pm SD$ )含量/(pg/mL) |
|-----|----------------------------------|
| 对照组 | 0.2156 $\pm$ 0.0083              |
| 三萜组 | 0.2037 $\pm$ 0.0078*             |
| 多糖组 | 0.2074 $\pm$ 0.0082 $\Delta$     |
| 配伍组 | 0.2016 $\pm$ 0.0089**            |

注:与对照组相比,\*表示  $P<0.05$ ,\*\*表示  $P<0.01$ ;与配伍组比较, $\Delta$ 表示  $P<0.05$ .

## 4 讨论

灵芝多糖类制剂近年来常被用于临床肿瘤患者放化疗的辅助治疗,在提高患者对放化疗的耐受性、增强免疫、减轻副反应等方面的效果都已被临床初步证实<sup>[10-11]</sup>,而灵芝三萜类成分目前尚无临床应用报道.灵芝多糖、三萜配伍使用能显著提高抑瘤效果,目前已在动物实验得到证实<sup>[12]</sup>,在获得灵芝多糖、三萜抗肿瘤最佳配伍剂量的基础上,开展二者配伍使用的内在机制研究,可为灵芝辅助治疗肿瘤提供理论依据与指导.

肿瘤微环境(TME)是支持肿瘤产生、生长和转移的复杂肿瘤生态系统,包含肿瘤细胞、成纤维细胞、免疫细胞、细胞间质、微血管以及浸润其中的生物分子<sup>[13]</sup>.近年在 TME 中发现了新的靶点,可以帮助指导和改善各种癌症治疗的作用,特别是通过增强宿主抗肿瘤免疫反应而起作用的免疫疗法<sup>[14]</sup>,是近年免疫治疗研究热点.Treg 细胞是肿瘤微环境中一类免疫负调控细胞,主要是 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>细胞,原本在胸腺、骨髓、淋巴结以及外周血中自然产生,经趋化因子 CCL22 与其受体 CCR4 的结合,将其趋化至肿瘤微环境中<sup>[15]</sup>.Treg 细胞能够直接接触抑制靶细胞活性,通过分泌 IL-10 及 TGF- $\beta$  等细胞因子抑制 Th 细胞的增殖分化及其分泌细胞因子,抑制效应细胞的免疫应答,是肿瘤免疫逃逸的关键因素<sup>[16]</sup>.

Sun 等<sup>[17]</sup>的体外实验研究发现,灵芝孢子多

糖可使 B16F10 黑素瘤细胞培养液中的 IL-10 及 TGF- $\beta$  生成显著减少,有效抑制 Treg 细胞活性.Li 等<sup>[18]</sup>研究表明,灵芝多糖能显著抑制肝癌小鼠肿瘤生长,抑制肿瘤微环境中 FOXP3 的表达,减少 Treg 细胞向肿瘤组织中募集,消除 Treg 细胞的免疫抑制,使肿瘤微环境中免疫平衡偏向效应性 T 细胞.本研究发现灵芝子实体多糖同样能减少 IL-10、TGF- $\beta$  生成及 FOXP3 的表达,Treg 细胞向肿瘤组织中募集,三萜本身无此作用,但通过三萜、多糖配伍使用后作用效果增强,因此,三萜能协同增强多糖对肿瘤微环境中 Treg 细胞功能抑制效应.

灵芝三萜能快速增强机体抗肿瘤免疫活性,促进肺癌小鼠机体产生白介素-2(IL-2),并提高自然杀伤(NK)细胞的免疫活性<sup>[19]</sup>.Treg 细胞主要表面抗原 CD25,是白介素 2 受体  $\alpha$  链(IL-2R $\alpha$ ),能竞争性与 IL-2 结合,使肿瘤微环境中效应 T 细胞因为缺乏 IL-2 受到抑制<sup>[20]</sup>.本研究发现灵芝三萜及配伍均提高了肿瘤微环境中 IL-2 水平,三萜可能通过增加 IL-2 的分泌或解除 Treg 细胞引起的 IL-2 竞争,对多糖抑制 Treg 细胞功效起到协同作用.

综上所述,本研究从肿瘤微环境中 Treg 细胞数量、特异蛋白表达、趋化因子 mRNA 水平及细胞因子水平等方面分别考察灵芝多糖、三萜对 Treg 细胞功能的影响研究,确认了灵芝三萜、多糖对肿瘤微环境中 Treg 细胞功能的抑制作用,有利于促进机体抗肿瘤免疫.

## 参考文献:

[1] Zhao R, Chen Q, He Y M. The effect of Ganoderma lucidum extract on immunological function and identify its anti-tumor immunostimulatory activity based on the biological network [J]. Sci Rep, 2018, 8: 12680.

[2] 林志彬. 灵芝抗肿瘤作用的免疫学机制及其临床应用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2015, 29: 865.

[3] Meng J, Hu X, Shan F, *et al.* Analysis of maturation of murine dendritic cells (DCs) induced by purified Ganoderma lucidum polysaccharides (GLPs) [J]. Int J Biol Macromol, 2011, 49: 693.

[4] Sun L X, Lin Z B, Lu J, *et al.* The improvement of M1 polarization in macrophages by glycopeptide derived from Ganoderma lucidum [J]. Immunol Res, 2017, 65: 658.

[5] Zhu X L, Chen A F, Lin Z B. Ganoderma lucidum

polysaccharides enhance the function of immuno-logical effector cells in immunosuppressed mice [J]. J Ethnopharmacol, 2007, 111: 219.

[6] 李娇妹,郑纺,翟丽娟,等. 三萜类化合物抗肿瘤活性研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45: 2265.

[7] 李芳,余梦瑶,向生霞,等. 基于全因子实验设计的灵芝抗肿瘤有效组分配伍研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34: 73.

[8] Liu C, Workman C J, Vignali D A. Targeting regulatory T cells in tumors [J]. Febs J, 2016, 283: 2731.

[9] 周吉华,张庆华. 灵芝孢子对老年宫颈癌患者外周血 T 淋巴细胞亚群及 VEGF 的影响[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29: 2021.

[10] 国家药典委员会 2015 中华人民共和国药典(第 1 部)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015: 188.

[11] Zhao H, Zhang Q, Zhao L, *et al.* Spore powder of *Ganoderma lucidum* improves cancer-related fatigue in breast cancer patients undergoing endocrine therapy: a pilot clinical trial [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 2012: 809614.

[12] 宋师花. 灵芝有效组分配伍的抗肿瘤作用及其复合微乳的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2009.

[13] Gajewski T F, Schreiber H, Fu Y X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment [J]. Nat Immunol, 2013, 14: 1014.

[14] Pitt J M, Marabelle A, Eggermont A, *et al.* Targeting the tumor microenvironment: removing obstruction to anticancer immune responses and immunotherapy [J]. Ann Oncol, 2016, 27: 1482.

[15] Yoshie O, Matsushima K. CCR4 and its ligands: from bench to bedside [J]. Int Immunol, 2015, 27: 11.

[16] Theresa L W. The role of regulatory T cells in cancer immunology [J]. Immunotargets Ther, 2015, 4: 159.

[17] Sun L X, Lin Z B, Duan X S, *et al.* Enhanced MHC class I and costimulatory molecules on B16F10 cells by *Ganoderma lucidum* polysaccharides [J]. J Drug Target, 2012, 20: 582.

[18] Li A, Shuai X, Jia Z, *et al.* *Ganoderma lucidum*, polysaccharide extract inhibits hepatocellular carcinoma growth by downregulating regulatory T cells accumulation and function by inducing microRNA-125b [J]. J Transl Med, 2015, 13: 1.

[19] Wang G, Zhao J, Liu J, *et al.* Enhancement of IL-2 and IFN-gamma expression and NK cells activity involved in the anti-tumor effect of ganoderic acid Me in vivo [J]. Int Immunopharmacol, 2007, 7: 864.

[20] Yoshiko T, Hiroyoshi N. Roles of regulatory T cells in cancer immunity [J]. Int Immunol, 2016, 28: 401.

引用本文格式:

中 文: 李芳,余梦瑶,江南,等. 灵芝抑制肿瘤微环境中 Treg 细胞功能的机制[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2021, 58: 026003.

英 文: Li F, Yu M Y, Jiang N, *et al.* Study on the mechanism of *Ganoderma lucidum* inhibiting Treg cell function in the mouse tumor microenvironment [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 2021, 58: 026003.