

## 灵芝多糖辅助 DNA 疫苗对小鼠肿瘤免疫治疗的影响

刘洋<sup>1</sup>, 陈会英<sup>1,2\*</sup>, 范雪枫<sup>1</sup>, 李佳琪<sup>1</sup>, 朱桐<sup>1</sup>, 张树彪<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>大连民族大学生命科学学院 辽宁大连 116600

<sup>2</sup>大连民族大学 生物技术与资源利用教育部重点实验室 辽宁大连 116600)

**摘要** DNA 疫苗给肿瘤免疫治疗带来了新的希望,合适的助剂有利于进一步提高 DNA 疫苗的免疫效果。本研究提取分离灵芝菌托、菌柄、菌盖多糖,考察不同部位多糖对小鼠免疫功能的促进作用。在此基础上,筛选免疫促进作用显著的灵芝菌盖多糖,考察其辅助 HER2/neu 质粒 DNA 疫苗的肿瘤免疫治疗效果。采用 4T1 荷瘤小鼠为实验动物模型,分为空白对照组、DNA 疫苗对照组以及灵芝多糖组进行研究。灵芝多糖组在进行 DNA 疫苗皮下注射免疫 2 次之前,采用 30 mg/kg 的灵芝多糖连续喂食 3 d 和 21 d 后测定小鼠瘤体大小和体质量,发现相比于 DNA 疫苗组和对照组,瘤体生长显著抑制,体质量增长稳定。T 细胞表型及其亚型分析结果表明,灵芝多糖能够显著促进小鼠对 HER2/neu 质粒 DNA 疫苗的细胞免疫应答,本研究结果为 DNA 疫苗助剂的开发提供参考。

**关键词** 灵芝多糖; DNA 疫苗; 肿瘤; 免疫治疗

**文章编号** 1009-7848(2022)05-0084-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.05.010

肿瘤是威胁人类生命的主要疾病,近年来发病率呈上升趋势。目前常用治疗方式(手术、化疗、放疗)存在复发和转移等问题,亟待寻求新的技术提高肿瘤治疗水平<sup>[1]</sup>。随着 2017 年首个针对血液肿瘤的免疫疗法获得美国 FDA 批准,免疫疗法作为一种革新性的医疗手段,已成为最具市场潜力的肿瘤精准治疗方式<sup>[2-3]</sup>。肿瘤 DNA 疫苗通过呈递亚单位肿瘤抗原刺激患者免疫应答,增强机体抗癌能力,达到预防肿瘤或者控制清除现有肿瘤的目的<sup>[4]</sup>。由于其包含的抗原具有高度限定性,能够以低的反应原性诱导集中的特异性反应,因此,肿瘤 DNA 疫苗已成为肿瘤科研人员研究的热点之一。尽管如此,由于 DNA 亚单位抗原固有的免疫触发缺陷,在临床前肿瘤模型中,DNA 疫苗的治疗效果仍然有待提高。

多糖作为一类由多个单糖分子通过糖苷键连接而成的天然高分子化合物,是构成生命的四大基本物质之一。研究表明,具有免疫调节活性的多糖,能够辅助性增强疫苗的免疫活性<sup>[5]</sup>。灵芝多糖具有广泛的生物活性,其中免疫调节活性被认为

是最重要的生物活性<sup>[6-8]</sup>。由于多糖结构复杂,不同部位提取的多糖存在活性差异,因此本研究以怒江灵芝为例,利用苯酚-硫酸法<sup>[9]</sup>提取其菌托、菌柄、菌盖等不同部位多糖,考察各部位提取物对小鼠的免疫活性调节作用,筛选具有显著免疫促进功能的多糖,研究灵芝多糖作为助剂在荷瘤小鼠动物模型中对 DNA 疫苗的免疫治疗促进功能,为提升 DNA 等核酸疫苗的免疫治疗效果提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

怒江灵芝湿品,泸水怒丰生物科技有限公司;苯酚、浓硫酸、无水乙醇,购自国药集团化学试剂有限公司,均为分析纯级;葡聚糖标准品,阿拉丁试剂有限公司;Balb/c 雌性小鼠(清洁级),体质量 18~22 g,北京维通利华实验动物技术有限公司(实验动物研究及使用计划编号 P2021011);环磷酰胺,上海宝生物科技有限公司;苏木素伊红(HE)染色试剂盒,北京索莱宝生物科技有限公司;4T1 细胞,中科院细胞库;1640 完全培养基,碧云天生物技术有限公司;ELISA 试剂盒、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、INF- $\gamma$  荧光标记抗体,大连万泽贸易有限公司;HER2/neu 质粒 DNA 疫苗,苏州泓迅生物科技股份有限公司。

收稿日期: 2021-05-18

基金资助: 国家自然科学基金项目(21908019,21776044);  
精细化工国家重点实验室开放课题(KF1712)

作者简介: 刘洋(1999—),女,硕士生,工程师

通信作者: 陈会英 E-mail: chy@dlnu.edu.cn

JA3003N型电子天平,上海精密科学仪器有限公司;UV-2800型紫外-可见分光光度计、IR Prestige-21红外光谱仪,岛津公司;HH-4型数显恒温水浴锅,国华电器有限公司;3111细胞培养箱,Thermo公司;680酶标仪,Bio-Rad公司;旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器;IX73荧光显微镜,奥林巴斯株式会社。BC-30全自动血细胞分析仪,深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司;1260 Infinity II凝胶渗透色谱仪,安捷伦科技有限公司。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 灵芝多糖提取和分析** 准确称取怒江灵芝湿品菌盖、菌柄、菌托各2g,粉碎机粉碎后,沸水浴煎煮2~4h,冷却后定容至100mL,过滤,冻干。用10mL 80%乙醇洗涤沉淀3次,将沉淀配制成体积分数5%的水溶液并进行反复冻融,初步去除蛋白,配制Sevag溶液,与糖溶液以体积比2:1的比例混合,回收糖溶液,重复此操作直至中间层无蛋白析出,最后将糖溶液装于3500u的透析袋中,流水透析24h,去除葡萄糖、无机盐等小分子杂质,采用DEAE cellulose-52离子交换柱(4.5cm×80cm)和Sephadex G-100凝胶柱(2.6cm×100cm)进行分离、冻干<sup>[6]</sup>。取1/10份冻干粉,用10mL 2mol/L硫酸溶解后,加水定容至50mL,采用1mL体积分数4%苯酚溶液和5mL浓硫酸,以葡聚糖为标准品配置标准溶液,参照文献[9]的方法,计算多糖含量。采用TSKPWXL 4000凝胶色谱柱,以0.3mol/L的NaNO<sub>3</sub>和0.1mol/L的NaH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>(pH 7.0)为流动相,激光光散射检测器和示差检测器测定多糖分子质量。KBr压片法在400~4500cm<sup>-1</sup>波长范围内进行傅里叶红外光谱测定。

## 1.2.2 灵芝多糖免疫功能促进作用考察

**1.2.2.1 免疫抑制小鼠模型建立** 选取4周龄体质量约20g的Balb/c雌性小鼠,随机分为空白组、模型组、盖多糖组、柄多糖组、托多糖组共5组,每组10只。除空白组外,所有组小鼠均连续3d腹腔注射环磷酸胺0.2mL(8mg/mL),构建免疫抑制小鼠模型。空白组灌胃等体积(剂量为每千克体质量10mL)纯净水;模型组灌胃等体积纯净水;盖多糖组、柄多糖组、托多糖组分别灌胃等体积怒江灵芝湿品菌盖、菌柄和菌托多糖提取物

(200mg/kg)。持续灌胃28d。

**1.2.2.2 体质量和免疫器官指数测定** 处死小鼠前,称取小鼠体质量;处死小鼠后,半小时内无菌取出脾脏和胸腺,根据公式(1)和(2)考察免疫器官指数。

脾脏指数(mg/g)=脾脏质量(mg)/体质量(g) (1)

胸腺指数(mg/g)=胸腺质量(mg)/体质量(g) (2)

**1.2.2.3 单核-巨噬细胞功能测定** 随机抽取小鼠,每组5只,持续灌胃25d后,腹腔注射60mg/mL淀粉肉汤1mL;灌胃结束后第2天,腹腔注射鸡红细胞生理盐水悬液( $V_{\text{鸡红细胞}}:V_{\text{生理盐水}}=1:200$ )1mL。半小时后,处死小鼠,取50μL腹腔液,滴于清洁的载玻片上,湿盘内37℃孵育30min后,取出载玻片,用预温的生理盐水漂洗3次,干燥5min,瑞吉染色,显微镜观察并计数,考察巨噬细胞吞噬指数,计算公式如下:

吞噬指数(%)=(被吞噬鸡红细胞数/巨噬细胞总数)×100 (3)

## 1.2.2.4 淋巴细胞免疫功能测定

1) 淋巴细胞增殖能力测定 无菌取脾,置于RPMI-1640培养液中,研磨为匀浆,网筛(200目)后收集滤液,离心15min(1000r/min),弃上清,加入4mL红细胞裂解液,冰浴10min后离心5min(1000r/min),弃上清,RPMI-1640培养液洗涤2次,加入5mL RPMI-1640培养液(含10%胎牛血清),调节细胞浓度为 $2\times 10^6$ 个/mL。在96孔板中按照每孔100μL接种该细胞悬液,分别加入5μL的刀豆蛋白(ConA,5μg/mL)或脂多糖(LPS,10μg/mL),37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下培养48h,采用MTT法<sup>[10]</sup>测定ConA活化的T细胞和LPS活化的B细胞的增殖性能。

2) NK细胞杀伤活性测定 以小鼠脾细胞悬液( $2\times 10^6$ /mL,含NK细胞)为效应细胞,以肿瘤细胞(YAC-1, $2\times 10^5$ /mL)为靶细胞。效靶细胞杀伤试验孔分别加入100μL效应细胞和100μL靶细胞;效应细胞自发释放孔加入100μL效应细胞和100μL培养液;靶细胞自发释放孔加入100μL靶细胞和100μL培养液。分别于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育48h,采用MTT法测定吸光度值(OD),并计算NK细胞杀伤活性(4)。

NK细胞杀伤活性(%)=[1-(OD<sub>效靶细胞</sub>-OD<sub>效应细胞</sub>)]/

OD<sub>[靶细胞]</sub>×100 (4)

3) 体液免疫功能测定 每组剩余 5 只小鼠断颈处死后采血,分离出血清,采用 ELISA 试剂盒测定小鼠血清白细胞介素 2(IL-2),白细胞介素 6(IL-6),肿瘤坏死因子 α(TNF-α)和免疫球蛋白 G(IgG)含量,所有操作均严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.3 灵芝多糖辅助 DNA 疫苗的小鼠肿瘤免疫治疗效果评价 选取 4 周龄体重约 20 g 的 Balb/c 雌性小鼠,皮下注射 4T1 细胞,构建荷 4T1 瘤小鼠模型。瘤体积长到约 100 mm<sup>3</sup> 后,随机分为对照组、DNA 疫苗组、灵芝菌盖多糖组进行研究,每组 5 只。DNA 疫苗组分别在 0 d 和 14 d 以 30 mg/kg 皮下注射 DNA 疫苗进行免疫。灵芝菌盖多糖组在进行 DNA 疫苗皮下注射免疫 2 次之前,使用 30 mg/kg 免疫增强效果显著的灵芝多糖连续喂食 3 d。观察 21 d,检测小鼠体质量和瘤体大小。断颈处死小鼠,快速取出脾脏,置固定液中固定 24 h,水洗、乙醇脱水、二甲苯透明,石蜡包埋,切片(片厚 4~6 μm),经 HE 染色后在显微镜下观察脾脏组织形态变化。收集不同组小鼠脾脏单细胞悬液,采用 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>流式抗体进行标记,采用流式细胞仪测定 T 细胞及亚群;将细胞固定,破膜,然后用 IFN-γ 抗体标记细胞,在荧光显微镜上进一步分析细胞 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>亚型。

### 1.3 数据处理

利用 SPSS 17.0 统计学软件进行试验数据分析。分析结果均以平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。比较采用单因素方差分析(One Way ANOVA)。方差齐性采用 Levene 检验,若方差齐,采用最小显著性差异法(LSD)进行多重比较,若方差不齐,采用保守成对比较检验法(Tamhane's T2)或最大 t 值成对比较检验法(Dunnett's T3)进行多重比较。如果  $P < 0.05$ ,表示试验结果具有统计学差异显著性意义, $P < 0.01$ 则表示试验结果具有统计学差异极显著性意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 灵芝盖、柄、托多糖含量和结构分析

采用葡聚糖为标准品,根据波长 485 nm 处的吸光度值,绘制标准曲线( $R^2=0.994$ ),测得怒江灵

芝样品中菌盖、菌柄、菌托多糖百分含量分别为 2.95%,1.81%和 1.61%,说明灵芝菌盖部位多糖含量高于菌柄和菌托。经 GPC 测定,平均分子量分别为  $1.84 \times 10^4$ (PI=1.13), $1.92 \times 10^4$ (PI=1.22), $2.07 \times 10^4$  u(PI=1.17),结果详见表 1。

表 1 灵芝湿品中多糖质量分数及分子质量测定结果

Table 1 Determination results of mass concentration and molecular weight of polysaccharides in *Ganoderma lucidum* wet products

	菌盖	菌柄	菌托
多糖质量分数/%	2.95	1.81	1.61
多糖分子质量/u	$1.84 \times 10^4$	$1.92 \times 10^4$	$2.07 \times 10^4$

怒江灵芝盖、柄、托多糖的红外光谱测定结果见图 1。从多糖红外光谱可看出,在 3 419,2 920,2 852 cm<sup>-1</sup> 和 1 638 cm<sup>-1</sup> 处存在 -OH 伸缩振动吸收峰、C-H 伸缩振动吸收峰和 -OH 的弯曲振动吸收峰,在 1 421,1 374,1 175 cm<sup>-1</sup> 处存在 CH<sub>2</sub> 的变形吸收峰和 1 316 cm<sup>-1</sup> 处 C-H 弯曲振动吸收峰以及环上 C-O 吸收峰。1 070 cm<sup>-1</sup> 处的吸收峰是醇-OH 的变角振动一起的。1 266 cm<sup>-1</sup> 和 1 269 cm<sup>-1</sup> 处吸收峰是由于 -COOH 中 C=O 的对称伸缩振动引起的,表明灵芝多糖含有 -COOH 基团;在 522,528 cm<sup>-1</sup> 处的吸收峰是 CCO 变形振动<sup>[1]</sup>。盖部多糖在 896 cm<sup>-1</sup> 处强的特征吸收峰,说明盖多糖主要为 β-吡喃糖苷键多糖<sup>[2]</sup>。柄多糖和托多糖 β-吡喃糖苷键多糖则逐渐减少。图 1 结果表明,灵芝盖、柄、托多糖存在结构差异。

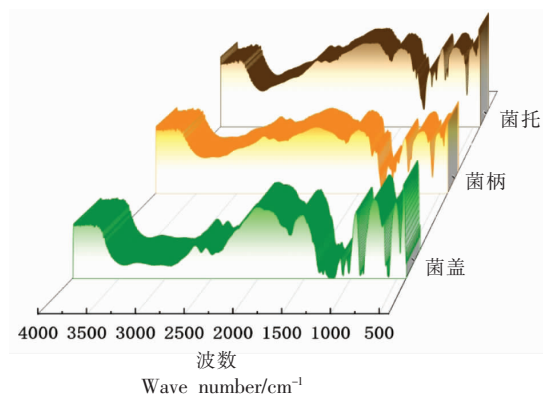


图 1 灵芝菌盖、菌柄、菌托多糖红外谱图

Fig.1 Infrared spectrum of polysaccharide in pleat, stem and cap of *Ganoderma lucidum*

## 2.2 灵芝盖、柄、托多糖对小鼠的免疫促进作用

采用怒江灵芝多糖提取物喂食免疫抑制小鼠,记录小鼠体质量,结果见表 2。环磷酰胺处理的免疫抑制模型组小鼠净体质量低于空白组,而多糖组高于模型组和空白组,且盖部多糖组小鼠体质量高于柄、托多糖组。免疫器官指数是反映免疫功能的重要指标<sup>[13]</sup>,表 2 给出的脾脏指数和胸腺指数的计算结果表明,多糖组脾脏指数和胸腺指数高于空白组,而环磷酰胺处理的免疫抑制模型组脾脏指数和胸腺指数则低于空白对照组,盖多糖组表现出更加明显的免疫器官指数增强。该实验结果表明,怒江灵芝盖多糖具有改善小鼠免疫功能的潜在价值。

鸡红细胞吞噬结果表明(表 2),与模型组相比,盖多糖组小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬指数增加,且高于柄、托多糖组。淋巴细胞增殖作用考察结果见表 3 中,灵芝盖、柄、托多糖对 ConA 活化的 T 淋巴细胞的促增殖作用均较弱,而对 LPS 活化的 B 淋巴细胞的促增殖作用较强,且盖多糖组作用最为显著。相对于柄、托多糖组,盖多糖组脾 NK 细胞活性明显增加,与空白组相比,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。细胞因子 IL-2、IL-6、IgG 及 TNF- $\alpha$  测定结果(表 4)表明,与模型组相比,盖多糖组细胞因子分泌增加。表 2、3 和 4 的实验结果说明灵芝盖多糖具有免疫增强功能。

表 2 灵芝多糖对小鼠净体质量、脾脏指数、胸腺指数和吞噬指数的影响( $n=5$ )

Table 2 Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on body weight, spleen index, thymus index and phagocytosis index of mice ( $n=5$ )

组别	净体质量/g	脾脏指数/mg·g <sup>-1</sup>	胸腺指数/mg·g <sup>-1</sup>	吞噬指数/%
空白组	24.95 ± 1.19	0.62 ± 0.06	0.34 ± 0.05	0.86 ± 0.03
模型组	18.67 ± 1.05	0.33 ± 0.01	0.26 ± 0.04*	0.53 ± 0.07**
盖多糖组	29.32 ± 1.38*	0.58 ± 0.08**	0.21 ± 0.04	0.67 ± 0.04
柄多糖组	28.43 ± 1.56	0.45 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.53 ± 0.09
托多糖组	25.65 ± 1.62	0.43 ± 0.07	0.15 ± 0.06	0.51 ± 0.02*

注:\*表示与空白组相比, $P<0.05$ ;\*\*表示与空白组相比, $P<0.01$ 。

表 3 灵芝多糖对小鼠淋巴细胞增殖和 NK 细胞活力的影响( $n=5$ )

Table 3 Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on lymphocyte proliferation and NK cell activity in mice ( $n=5$ )

组别	T 细胞增殖能力/%	B 细胞增殖能力/%	NK 细胞杀伤活力/%
空白组	0.184 ± 0.02	0.221 ± 0.01	0.34 ± 0.05
模型组	0.163 ± 0.05**	0.173 ± 0.05*	0.26 ± 0.04*
盖多糖组	0.171 ± 0.03*	0.279 ± 0.03**	0.21 ± 0.04*
柄多糖组	0.165 ± 0.06*	0.251 ± 0.07*	0.18 ± 0.02**
托多糖组	0.163 ± 0.04**	0.244 ± 0.06*	0.15 ± 0.06*

注:\*表示与空白组相比, $P<0.05$ ;\*\*表示与空白组相比, $P<0.01$ 。

表 4 灵芝多糖对血清细胞因子的影响( $n=5$ , pg/mL)

Table 4 Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on serum cytokines ( $n=5$ , pg/mL)

组别	IL-2	IL-6	IgG	TNF- $\alpha$
空白组	0.61 ± 0.01	0.36 ± 0.06	0.57 ± 0.03	0.15 ± 0.05
模型组	0.34 ± 0.03**	0.21 ± 0.02*	0.23 ± 0.07*	0.06 ± 0.07
盖多糖组	0.68 ± 0.03*	0.28 ± 0.08**	0.39 ± 0.08*	0.13 ± 0.06
柄多糖组	0.57 ± 0.07*	0.23 ± 0.01*	0.33 ± 0.05**	0.11 ± 0.04
托多糖组	0.52 ± 0.05**	0.22 ± 0.07*	0.31 ± 0.02*	0.08 ± 0.02

注:\*表示与空白组相比, $P<0.05$ ;\*\*表示与空白组相比, $P<0.01$ 。

### 2.3 灵芝多糖辅助 DNA 疫苗对荷瘤小鼠的免疫治疗效果

DNA 疫苗具有较高的安全性和经济性,虽在肿瘤的免疫治疗中被广泛研究,但尚未临床应用,助剂有助于提高其免疫治疗效果<sup>[14]</sup>,有望进一步推动临床转化。表皮生长因子受体 2(HER2)是具有酪氨酸激酶活性的跨膜蛋白,在多种肿瘤细胞表面过表达,是一种重要的肿瘤基因标志物和常用的分子治疗靶点。约 20%~30%的乳腺癌病例存在 *HER2* 基因扩增,影响乳腺癌的侵袭、转移和复发,导致预后不良。赫赛汀是一种单克隆抗体药物,通过抗 *HER2* 分子靶向免疫治疗,极大改善了 *HER2*+乳腺癌病人的预后,是目前 *HER2*+乳腺癌治疗的首选。然而,赫赛汀的原发、继发耐药成为 *HER2*+乳腺癌治疗的瓶颈。本研究尝试利用 *HER2* 重组 DNA 疫苗,选取免疫增强效果显著的灵芝菌盖多糖,以 4T1 荷瘤小鼠为动物模型,考察灵芝多糖辅助 DNA 疫苗的肿瘤免疫治疗效果。

疫苗组和灵芝菌盖多糖组小鼠接种疫苗后,精神状态良好,进食和活动正常,局部注射部位无硬结、出血或溃烂情况,无死亡。纪录各组 21 d 小鼠体质量变化曲线和肿瘤生长曲线,结果见图 2。对照组小鼠体质量增加不到 3%;疫苗组小鼠在第 9 天以后体质量开始明显增加,21 d 后体质量增加约 13%。灵芝盖多糖组在 6 d 后体质量显著增

加,21 d 时体重增率约 18%。肿瘤生长曲线结果表明,对照组肿瘤增长最快,21 d 后肿瘤体积超过 700 mm<sup>3</sup>,灵芝盖多糖组抑瘤效果最明显,且生长缓慢,21 d 后肿瘤体积约 300 mm<sup>3</sup>,显著小于对照组,与疫苗组相比,增长速度也显著降低。各组的抑瘤效果表明,灵芝盖多糖具有较为显著的促进作用。

采用鼠抗小鼠 CD3、CD4、CD8 的单克隆抗体,经间接免疫荧光染色,利用流式细胞仪检测总 T 细胞和诱导性 T 细胞及抑制性 T 细胞亚群。检测结果表明,与对照组相比,疫苗组和灵芝盖多糖组能够有效促进 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>细胞的扩增。尤其是灵芝盖多糖组,CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 细胞比率分别增加了 9.8 倍和 4.3 倍,CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比例明显升高,该实验结果表明机体细胞免疫性能增加<sup>[15]</sup>。由于 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup> T 细胞具有免疫激活功能的细胞亚型主要分泌 INF- $\gamma$  细胞因子,因此采用 INF- $\gamma$  抗体进行双标记,确定 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>细胞亚型,根据荧光统计计数确定亚型含量(图 3),该结果表明具有免疫促进功能的 Th1 亚型 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 Tc1 亚型 CD8<sup>+</sup>细胞数量占绝对优势,并且与疫苗对照组相比,在两次疫苗免疫前喂食不同剂量灵芝盖多糖,显著增加 Th1 亚型 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 Tc1 亚型 CD8<sup>+</sup>细胞,说明灵芝多糖辅助疫苗促进了机体免疫功能<sup>[16]</sup>。

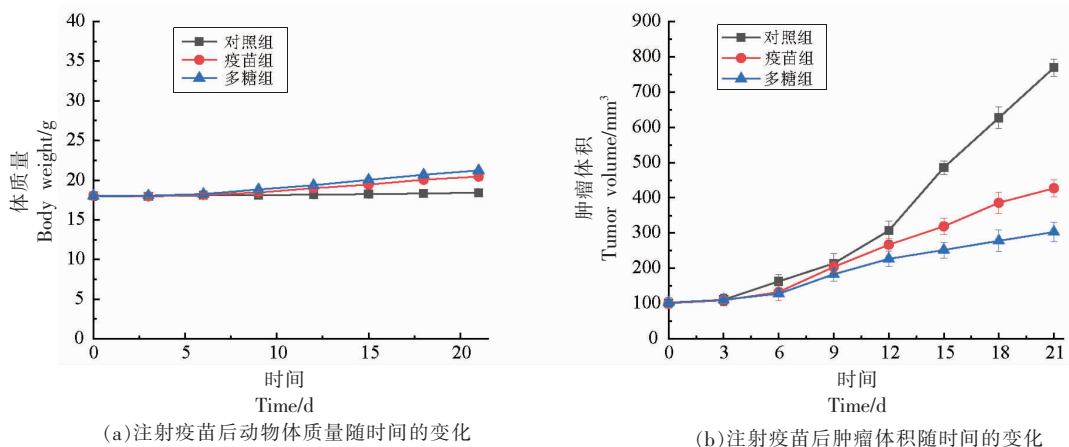
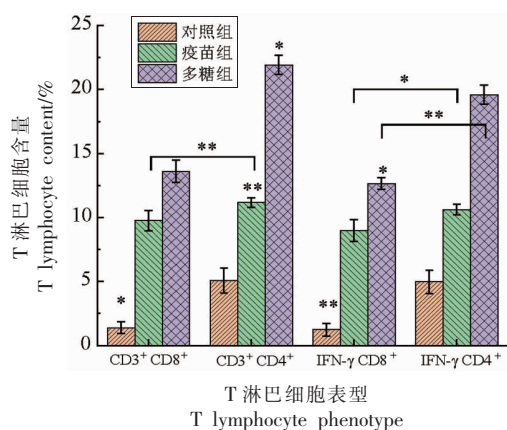


图 2 疫苗和灵芝多糖辅助疫苗对 4T1 肿瘤的免疫治疗效果

Fig.2 Immunotherapeutic effects of vaccine and *Ganoderma lucidum* polysaccharide adjuvant vaccine on 4T1 tumor bearing mice



注: \* 表示具有差异显著性 ( $P < 0.05$ ), \*\* 表示具有极显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

图 3 荷瘤小鼠脾脏淋巴细胞测定结果 ( $n=5$ )

Fig.3 Spleen lymphocyte evaluation of tumor bearing mice ( $n=5$ )

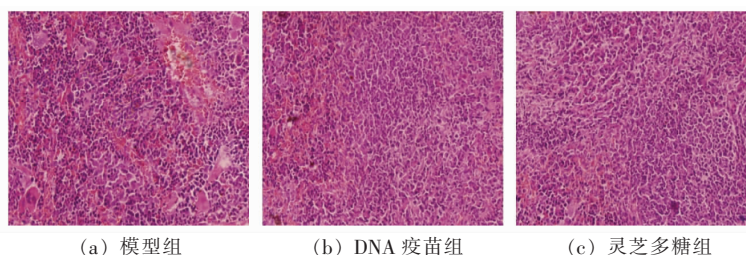


图 4 脾脏 H&E 染色的代表性结果

Fig.4 Representative results of H&E staining of spleen

### 3 结论

相对传统疫苗而言, DNA 等核酸疫苗具有设计方便、安全性好等优点, 是肿瘤治疗的前沿技术。然而, DNA 疫苗在临床过程中免疫应答效率尚不足。本研究提取分离了灵芝盖、柄、托各部位多糖, 发现多糖结构和分子质量存在差异, 盖多糖分子质量最小, 对小鼠的免疫增强最大。因此, 选取灵芝盖多糖作为辅助试剂, 在 HER2/neu 质粒 DNA 首次免疫之前, 喂食小鼠 3 d 后, DNA 疫苗体液免疫指标和细胞免疫指标均有明显的提升, 小鼠体质量略有增加、肿瘤体积减小, 说明肿瘤生长被抑制, T 细胞表型和亚型分析结果表明, 灵芝多糖进一步促进了疫苗的细胞免疫和体液免疫功能。该结果表明, 灵芝盖多糖能促进小鼠对 HER2/neu 质粒 DNA 疫苗的免疫应答, 本研究将为新型 DNA 疫苗助剂的开发提供一定的理论参考。

免疫器官是免疫系统的重要组成部分, 脾脏是十分重要的外周免疫器官, 是免疫细胞居住和产生应答的部位<sup>[7]</sup>。H&E 染色是通过观察各种组织和细胞形态结构特点进行病变判断和研究的重要手段<sup>[8]</sup>。对脾脏进行 HE 染色处理, 利用显微镜进行观察, 考察灵芝盖多糖组小鼠的脾脏组织形态, 进一步分析灵芝盖多糖辅助 DNA 疫苗的免疫促进作用, 结果见图 4。图 4a 模型组脾脏红、白髓分界模糊、红髓相对较少, 脾小体形态结构不完整, 脾小体出现黏连、周围边缘区域不完整。灵芝盖多糖组(图 4c), 脾脏结构变得清晰, 红髓增加, 脾小体结构完整, 黏连减少, 脾脏改善效果优于 DNA 疫苗组。该结果表明, 灵芝多糖具有促进 DNA 疫苗免疫增强的作用。

### 参 考 文 献

- [1] WAKS A G, WINER E P. Breast cancer treatment: A review[J]. JAMA, 2019, 321(3): 288-300.
  - [2] NOGRADY B. Gene therapy delivers hope[J]. Nature, 2018, 563(7731): S42-S43.
  - [3] DUNBAR C E, HIGH K A, JOUNG J K, et al. Gene therapy comes of age[J]. Science, 2018, 359(6372): eaan4672.
  - [4] LOPES A, VANDERMEULEN G, PRÉAT V. Cancer DNA vaccines: Current preclinical and clinical developments and future perspectives[J]. J Exp Clin Canc Res, 2019, 38(4): 146.
  - [5] 欧阳洁, 胡云章, 钱子刚. 中药免疫活性多糖作为疫苗佐剂的研究进展[J]. 云南中医学院学报, 2002, 25(2): 14-17.
- OUYANG J, HU Y Z, QIAN Z G. Immune polysaccharides of traditional Chinese medicine as vaccine

- adjuvant[J]. Journal of Yunnan College of Traditional Chinese Medicine, 2002, 25(2): 14-17.
- [6] 熊川, 罗强, 金鑫, 等. 人工栽培灵芝中多糖的部分理化性质及免疫调节作用[J]. 微生物学通报, 2018, 45(4): 825-835.
- XIONG C, LUO Q, JIN X, et al. Physicochemical properties immunoregulatory effects of the polysaccharides from *Ganoderma lingzhi*[J]. Microbiology China, 2018, 45(4): 825-835.
- [7] 黄青, 李丽媛, 刘晴晴, 等. 灵芝多糖和猪苓多糖及其复方的免疫调节作用研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(17): 275-282.
- HUANG Q, LI L Y, LIU Q Q, et al. Advances in immunoregulation effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharide and/or polyporus umbellatus polysaccharide[J]. Food Science, 2020, 41(17): 275-282.
- [8] 余钰骢, 姚菊明, 应铁进. 灵芝结构多糖水解物促进细胞免疫的功能研究[J]. 中国食品学报, 2019, 19(6): 46-53.
- YU Y C, YAO J M, YING T J. Immune bioactivities of structural polysaccharides hydrolysate from *Ganoderma lucidum*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(6): 46-53.
- [9] ZHU L N, LUO X, TANG Q J, et al. Isolation, purification, and immunological activities of a low-molecular-weight polysaccharide from the lingzhi or reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (higher basidiomycetes) [J]. Int J Med Mushrooms, 2013, 15(4): 407-414.
- [10] CHEN H Y, FAN X F, ZHAO Y N, et al. Stimuli-responsive polysaccharide enveloped liposome for targeting and penetrating delivery of survivin-shRNA into breast tumor [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2020, 12(19): 22074-22087.
- [11] 赖长江生, 周融融, 余意, 等. 基于近红外分析和化学计量学方法对不同产地灵芝快速鉴别及多糖含量测定的研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(16): 3243-3248.
- LAI C J S, ZHOU R R, YU Y, et al. Rapid identification of geographical origins and determination of polysaccharides contents in *Ganoderma lucidum* based on near infrared spectroscopy and chemometrics [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2018, 43(16): 3243-3248.
- [12] ZHANG Z, TANG Q J, WU D, et al. Regioselective sulfation of beta-glucan from *Ganoderma lucidum* and structure-anticoagulant activity relationship of sulfated derivatives[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 155(7): 470-478.
- [13] 张珊珊, 童微, 胡婕伦, 等. 铁皮石斛多糖不同分级组分对小鼠免疫调节及肠道健康的影响[J]. 中国食品学报, 2019, 19(12): 14-21.
- ZHANG S S, TONG W, HU J L, et al. Immunomodulation of polysaccharide fractions from *Dendrobium officinale* and their effects on colon health of mice [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(12): 14-21.
- [14] 周寒鹏, 陶薇, 傅婷, 等. 板蓝根多糖对单纯疱疹病毒-2型DNA疫苗免疫效果的影响[J]. 中国生物制品学杂志, 2020, 33(6): 609-613.
- ZHOU H P, TAO W, FU T, et al. Influence of isatis root polysaccharide on immune effect of herpes simplex virus type-2 DNA vaccine [J]. Chinese Journal of Biologicals, 2020, 33(6): 609-613.
- [15] 王滨, 边瑞民, 魏传梅, 等. 头孢地嗪增加老年细菌性肺炎患者外周血 CD4/CD8 和 Th1/Th2 细胞比例 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(4): 528-531.
- WANG B, BIAN R M, WEI C M, et al. Cefodizime increases peripheral blood CD4/CD8 and Th1/Th2 ratios in senile patients with bacterial pneumonia [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2015, 31(4): 528-531.
- [16] 徐雅, 张景瑜, 刘杜霞, 等. 麻花秦艽醇提物对小鼠免疫功能的影响[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(3): 111-115.
- XU Y, ZHANG J Y, LIU D X, et al. Effects of ethanol extracts from *Gentiana straminea* on mice immune function in mice [J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2020, 36(3): 111-115.
- [17] QU C, YANG G H, ZHENG R B, et al. The immune-regulating effect of Xia'er Qixingcha in constipated mice induced by high-heat and high-protein diet [J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2017, 17(3): 185.
- [18] 陆海霞, 孙玲莉, 陈迪, 等. 水产品源创伤弧菌腹腔感染小鼠的损伤作用及靶器官分析[J]. 中国食品学报, 2015, 15(4): 30-37.
- LU H X, SUN L L, CHEN D, et al. The injury of viscera and location of *Vibrio vulnificus* isolated

from aquatic product after infection *in vivo* of mice Technology, 2015, 15(4): 30–37.  
[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and

### Effects of *Ganoderma lucidum* Polysaccharide on Immunotherapeutic Performance of DNA Vaccine in Tumor Bearing Mice

Liu Yang<sup>1</sup>, Chen Huiying<sup>1,2\*</sup>, Fan Xuefeng<sup>1</sup>, Li Jiaqi<sup>1</sup>, Zhu Tong<sup>1</sup>, Zhang Shubiao<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Science, Dalian Minzu University, Dalian 116600, Liaoning

<sup>2</sup>Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization of Ministry of Education, Dalian Minzu University, Dalian 116600, Liaoning)

**Abstract** DNA vaccine has brought new hope to tumor immunotherapy, and appropriate adjuvants can further improve the immune effect of it. In this study, the polysaccharides extracted from pleat, stem and cap of *Ganoderma lucidum* were isolated. The immune function promoting effects of the polysaccharides from different parts were investigated in mice model. Then the facilitating ability of the *Ganoderma lucidum* polysaccharide on tumor immunotherapy effect of HER2/neu plasmid DNA vaccine were investigated with the significant immune promoting polysaccharide. 4T1 tumor bearing mice were divided into control group, DNA vaccine group and *Ganoderma lucidum* polysaccharide group. *Ganoderma lucidum* polysaccharide group were given 30 mg/kg *Ganoderma lucidum* polysaccharide for 3 days before subcutaneous injection of DNA vaccine twice. After 21 days, the tumor size and weight of mice were measured. Compared with DNA vaccine group and control group, the tumor growth of polysaccharide group was significantly inhibited and the weight growth was stable. T cell phenotype and its subtype analysis showed that *Ganoderma lucidum* polysaccharide could significantly promote the cellular immune response of mice to HER2/neu plasmid DNA vaccine. This study will provide a theoretical reference for the development of DNA vaccine adjuvants.

**Keywords** *Ganoderma lucidum* polysaccharide; DNA vaccine; tumor; immunotherapy