陈俊颖, 张奇, 崔明琦, 等. 基于 IL-17 信号通路探讨药用真菌对非小细胞肺癌肿瘤微环境的影响 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(18): 537−545. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025090299
CHEN Junying, ZHANG Qi, CUI Mingqi, et al. Effects of Medicinal Fungi on the Tumor Microenvironment in Non-small Cell Lung Cancer through the IL-17 Signaling Pathway[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(18): 537−545. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025090299

· 食品营养与健康功效 ·

基于 IL-17 信号通路探讨药用真菌对非小细胞肺癌肿瘤微环境的影响

陈俊颖[1], 张　奇[1], 崔明琦[1], 王晓倩[1], 王升厚[2,3], 逄洪波[1], 王　泽[1,2,3,*]
（1.沈阳师范大学生命科学学院, 辽宁沈阳 110034;
2.辽宁省功能性蛹虫草重点实验室, 辽宁沈阳 110034;
3.沈阳市功能性蛹虫草产业技术研究院, 辽宁沈阳 110034）

摘　要: 目的：从肿瘤微环境的角度，探讨灵芝、暴马丁香桑黄和蛹虫草的抗肿瘤新机制。方法：采用水浴浸提结合真空冷冻干燥技术制备灵芝（RL）、暴马丁香桑黄（BJ）和蛹虫草（XG）的水提物（FAE），通过 MTT 法和 Annexin V-FITC/PI 双染法检测 FAE 及各药用真菌条件培养基（CM）对非小细胞肺癌细胞 A549 增殖活性的影响。以 4 mg/mL FAE 处理细胞后，转录组测序并结合 KEGG 通路富集分析 IL-17 信号通路对各 FAE 的响应特征；采用免疫细胞化学染色、抗体封闭实验及 ELISA 实验进一步检测各 FAE 对黏蛋白 MUC5AC 和 MUC5B，趋化因子 IL6、CCL2、CCL20、CXCL8 和 CXCL10 表达量的影响。结果：FAE 和 CM 均可抑制 A549 细胞增殖并诱导其凋亡。转录组测序结果显示，RL 组与 BJ 组以上调基因为主，XG 组以下调基因为主，且均在肿瘤微环境形成相关信号通路存在显著富集；各组 IL-17 信号通路（ko04657）下游关键效应分子表达水平存在显著性改变（$P<0.05$）。三种 FAE 均可显著抑制肺癌细胞的 MUC5B 的表达（$P<0.01$），但 BJ 处理对 MUC5AC 的表达无显著影响（$P>0.05$）。MUC5AC 抗体封闭显著削弱 RL 和 XG 对细胞增殖的抑制作用（$P<0.05$），MUC5B 抗体封闭后，RL 组和 BJ 组对细胞增殖的抑制作用显著下降（$P<0.05$）。此外，三种 FAE 对细胞因子 IL6、CCL2、CCL20 和 CXCL8 的分泌水平具有显著抑制的作用（$P<0.01$）。结论：灵芝、暴马丁香桑黄与蛹虫草均可通过重塑肿瘤微环境，协同发挥抗肿瘤作用，这为其开发为辅助肿瘤治疗的功能性食品提供了新理论支撑。

关键词: 药用真菌, 非小细胞肺癌细胞, 肿瘤微环境, IL-17 信号通路, 细胞因子
中图分类号: R151.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)18−0537−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025090299
本文网刊:

Effects of Medicinal Fungi on the Tumor Microenvironment in Non-small Cell Lung Cancer through the IL-17 Signaling Pathway

CHEN Junying[1], ZHANG Qi[1], CUI Mingqi[1], WANG Xiaoqian[1], WANG Shenghou[2,3], PANG Hongbo[1], WANG Ze[1,2,3,*]
（1.College of Life Science, Shenyang Normal University, Shenyang 110034, China;
2.Liaoning Key Laboratory of Functional Cordyceps Militaris, Shenyang 110034, China;
3.Industrial Technology Research Academy for Cordyceps Militaris with Functional Value of Shenyang, Shenyang 110034, China）

Abstract: Objective: From the perspective of the tumor microenvironment, this study explored the anti-tumor mechanisms of *Ganoderma lucidum*, *Phellinus linteus*, and *Cordyceps militaris*. Methods: Aqueous extracts (FAEs) of *Ganoderma*

收稿日期: 2025−09−25
基金项目: 辽宁省教育厅本科高校基本科研项目平台建设专项（LJ232510166004）; 辽宁省本科高校基本科研项目费创新团队支持计划专项（LJ202410166052）; 辽宁省科技计划联合计划项目（2025-BSLH-372）; 沈阳师范大学博士、引进人才科研项目启动基金项目（BS202526）。
作者简介: 陈俊颖（2001−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 药用真菌资源研究与开发, E-mail: 707498830@qq.com。
*** 通信作者:** 王泽（1979−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 药用真菌资源研究与开发, E-mail: synu.wangze@qq.com。

lucidum (RL), *Phellinus linteus* (BJ), and *Cordyceps militaris* (XG) were prepared via water bath extraction and vacuum freeze-drying. The effects of the FAEs and their conditioned media (CM) on the proliferative activity of A549 non-small cell lung cancer cells were determined using the MTT assay and Annexin V-FITC/PI double staining. Transcriptome sequencing was performed on cells treated with 4 mg/mL FAE, and KEGG pathway enrichment analysis was used to identify the response characteristics of the IL-17 signaling pathway to each extract. Additionally, immunocytochemical staining, antibody blocking assays, and ELISA were used to detect the effects of the FAEs on the expression levels of the mucins MUC5AC and MUC5B and the chemokines IL-6, CCL2, CCL20, CXCL8, and CXCL10. Results: The three FAEs and CM inhibited the proliferation of the A549 cells and induced their apoptosis. Transcriptome analysis results revealed that upregulated genes were predominant in the RL and BJ groups, whereas downregulated genes were predominant in the XG group. All groups showed significant enrichment in signaling pathways related to tumor microenvironment formation. Additionally, significant alterations were observed in the expression levels of key effector molecules downstream of the IL-17 signaling pathway (ko04657) in all groups. All three FAEs significantly inhibited MUC5B expression (P<0.01). However, BJ treatment did not significantly affect MUC5AC expression (P>0.05). MUC5AC antibody blocking weakened the inhibitory effects of RL and XG on cell proliferation (P<0.05), whereas MUC5B antibody blocking significantly reduced the anti-proliferative effects of RL and BJ on the cells (P<0.05). Furthermore, all three FAEs significantly inhibited the secretion of IL-6, CCL2, CCL20, and CXCL8 (P<0.01). Conclusion: In conclusion, *Ganoderma lucidum*, *Phellinus linteus*, and *Cordyceps militaris* can all remodel the tumor microenvironment to synergistically exert anti-tumor effects. This provides a new theoretical basis for their development as functional foods for adjuvant cancer therapy.

Key words: medicinal fungi; non-small cell lung cancer; tumor microenvironment; IL-17 signaling pathway; cytokine

肺癌是全球发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一，约占所有癌症相关死亡的 20% 以上。而非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer, NSCLC）作为最常见的类型，在所有肺癌病例中占比超 85%[1]。值得关注的是，肿瘤的发生、发展及转移过程高度依赖于其周围的特定环境，即肿瘤微环境（tumor microenvironment, TME）。TME 是一个由肿瘤细胞及其周围多种细胞（包括成纤维细胞、免疫细胞、内皮细胞等）共同组成复杂的异质系统，同时还包含了大量细胞因子和细胞外基质等非细胞组成[2]。TME 以肿瘤组织为核心，通过动态调控免疫逃逸、炎症反应、血管生成及细胞代谢等关键生物学过程，在肿瘤的发生与发展中发挥核心作用[3]。因此，无论是常规的药物治疗、靶向治疗还是免疫治疗，都需要克服 TME 的屏障作用才能达到预期的抗肿瘤效果。

细胞因子通过协调免疫细胞功能、介导细胞间通信、重塑基质结构以及调控代谢平衡，在 TME 中发挥核心调控作用，从而深刻影响肿瘤的进展、转移及治疗应答进程。研究表明，IL-17 信号通路是临床联合治疗策略中极具应用前景的干预靶点，它是一个通过 JAK-STAT 通路传递信号的经典细胞因子通路，其下游效应分子多为构成 TME 的重要组分，能够迅速调节免疫细胞浸润、炎症因子分泌以及肿瘤血管生成等多个关键生物学过程[4]。研究显示，IL-17E 与其受体结合后激活 TRADD 介导的细胞凋亡通路[5]，IL-17A/F 则能激活靶细胞的 NF-κB 和 MAPK 信号通路，促进靶细胞分泌趋化因子（如 CXCL2、CXCL5、CXCL10 及 CCL7）、细胞因子（如 G-CSF、GM-CSF）、分泌型黏蛋白 MUC5 以及基质金属蛋白酶（如 MMP1、MMP3）[6]。在 Lewis 肺癌小鼠模型中，使用 IL-17A 中和抗体进行治疗可抑制模型小鼠肺部肿瘤的生长[7]。同时，NSCLC 患者外周血中 IL-17 水平显著上调（P<0.05），IL-17 水平的上调与患者不良预后密切相关[8]。以上提示，IL-17 信号通路可能成为基于 TME 开展肺癌治疗的关键调控靶点。

灵芝（*Ganoderma lucidum*）、暴马丁香桑黄（*Phellinus linteus*）和蛹虫草（*Cordyceps militaris*）是国内具有规模化培育工艺的三大主要药用真菌，作为膳食补充剂具有悠久的食用历史和坚实的科学基础[9−11]。近年来，这三种药用真菌凭借其丰富的生物活性成分、较低的食用毒副作用以及多靶点调控潜力的特性，已成为抗肿瘤功能性食品研发的重要真菌资源。灵芝提取物可通过增强 TME 中的自然杀伤细胞和 $CD8^+$ T 细胞亚群的活性，从而增强机体的抗肿瘤免疫反应[12]。桑黄多糖能够诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 特定表达 TIMP-1 功能蛋白，抑制 TME 中的肿瘤侵袭和血管生成，继而调控肿瘤的生长与转移[13]。桑黄多糖还能通过增强细胞免疫功能，抑制 S180 和 H22 荷瘤小鼠体内肉瘤生长[14]。虫草素亦能够抑制结肠癌的肿瘤发展，其作用机制与调控 TME 中的免疫细胞相关，包括促进 NK 细胞、M1 型巨噬细胞、$CD4^+$ T 细胞及 $CD8^+$ T 细胞的活性上调，从而抑制小鼠皮下移植瘤模型中结肠癌的生长[15]。本课题组前期研究表明，蛹虫草主要通过 Caspase 非依赖性线粒体凋亡途径抑制人胃癌细胞 BGC-823 的生长活性[16]。此外，它还通过促进 miR-125b-1-3p、miR-125b-5p 和 miR-145-5p 的表达，靶向调控表皮生长因子受体，进而抑制肺癌 A549 细胞的增殖[17]；同时也可以通过诱导肿瘤细胞衰老的方式发挥抗肿瘤活性[18]，然而，关于上述药用真菌能否通过改变 TME 的细胞因子组成进而发挥抗肿瘤作用，尚缺乏详实的研究。因此，本研究以 IL-17 信号通路为切入

点，以非小细胞肺癌 A549 细胞为模型，探讨灵芝、暴马丁香桑黄和蛹虫草对肿瘤微环境的影响机制，为其开发肿瘤辅助治疗相关的功能性食品进一步提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

人肺癌细胞株 A549、Human IL6、CCL2、CCL20、CXCL8、CXCL10 ELISA 试剂盒、兔抗人 MUC5B 多克隆抗体、兔抗人 MUC5AC、SABC 免疫组化染色试剂盒　武汉博士德生物工程有限公司；药用真菌灵芝（RL）、暴马丁香桑黄（BJ）、蛹虫草（XG）子实体　辽宁省功能性蛹虫草重点实验室栽培提供；DMEM 培养基　美国 Hyclone 公司；胎牛血清　浙江天杭生物科技股份有限公司；DMSO　西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司；RNAiso Plus　日本 Takara 公司；GoScript™ Reverse Transcription System、GoTaq® qPCR Master Mix　普洛麦格（北京）生物技术有限公司；苏木素染液　北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司；TRIzol　美国 Invitrogen 生物技术公司；Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit　南京诺唯赞生物科技股份有限公司；引物序列由北京鼎国昌盛合成（见表 1）。

表 1　qRT-PCR 引物序列

Table 1　Sequences of primers for qRT-PCR

基因名称	引物序列（5’→3’）
IL17RA	F: TCTCCTGACCTCCTTCCAGA
IL17RA	R: CTCCTGGAGATGTAGCCCTG
NFKB1	F: GTGGAGCACGACAACATCTC
NFKB1	R: TCCAGGCACAACTCCTTCAT
NFKBIA	F: TCCTGAGCTCCGAGACTTTC
NFKBIA	R: CCAAGGACACCAAAAGCTCC
TRAF6	F: AGAGGGTCGCCTTGTAAGAC
TRAF6	R: TGCCAGTGTAGAATCCAGGG
RELA	F: CTACGACCTGAATGCTGTGC
RELA	R: CTGCCAGAGTTTCGGTTCAC
GAPDH	F: TCAAGGCTGAGAACGGGAAG
GAPDH	R: TGGACTCCACGACGTACTCA

JTY-2 电热恒温鼓风培养箱　上海龙联科仪器有限责任公司；JF-200 高速粉碎机　奥特莱斯（北京）商业管理有限公司；SCIENTZ-10nd 超低温冷冻干燥机　宁波新芝生物科技股份有限公司；JC-6000 超净工作台　上海博迅医疗生物仪器股份有限公司；HH.CP-7 CO_2 细胞恒温培养箱　德国 Heraeus 公司；5424-R 高速冷冻离心机　德国 Eppendorf 公司；QuantShudio™ 3 实时荧光定量 PCR 仪　美国 Applied Biosystems 公司；N50 Touch 超微量紫外分光光度计　德国 Implen 公司；Infinite F50 酶标仪　瑞士 Tecan 公司；ICX41 倒置生物/荧光显微镜　宁波舜宇光学科技（集团）有限公司；BD Canto Ⅱ流式细胞分析仪　美国 BD 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　药用真菌水提物制备　灵芝（RL）、暴马丁香桑黄（BJ）及蛹虫草（XG）子实体 60 ℃ 烘干至恒重，机械粉碎后过 80 目筛网，将干粉置于 85 ℃ 水浴浸提 3.5 h，4000 r/min 离心 10 min，取上清液，真空冷冻干燥过夜，获得各药用真菌水提物的冻干粉[16]。使用 DMEM 完全培养基（10% 胎牛血清）制备药用真菌水提物的工作液（fungal aqueous extract, FAE），0.22 μm 过滤除菌，4 ℃ 密封保存。

1.2.2　MTT 法检测　A549 细胞以 5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板，常规培养 8 h。设置实验组（RL 组、BJ 组、XG 组，以下合称 FAE 组），分别加入 FAE（0.1、0.2、0.5、1、2、4、6、8 或 10 mg/mL），200 μL/孔，对照组（CK 组）加入 DMEM 完全培养基 200 μL/孔。处理 24 h 后，加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL/孔，37 ℃ 孵育 4 h。弃上清，加入 DMSO 150 μL/孔，室温振荡，检测各孔 $OD_{492\ nm}$ 值，根据以下公式计算各 FAE 对 A549 细胞生长的抑制率，参考各组 IC_{50} 数值，获得后续实验的最佳处理浓度。

$$抑制率(\%) = (OD_{对照组} - OD_{实验组})/(OD_{对照组} - OD_{空白组}) \times 100$$

以 4 mg/mL FAE 处理 A549 细胞 24 h 后，DMEM 基础培养基换液，继续培养 24 h，取上清液，4 ℃，4000 r/min 离心 10 min，获得各药用真菌的条件培养基（conditioned medium, CM）。将 A549 细胞以 5×10^3 个/孔密度接种于 96 孔板，常规培养 8 h。设置实验组（CM 组）与对照组（CK-CM 组），CM 组分别加入上述各药物真菌的 CM，200 μL/孔，CK-CM 组加入等量 DMEM 基础培养基，常规培养 24 h，MTT 法检测各组条件培养基对 A549 细胞生长的抑制率，计算公式同上式。

1.2.3　Annexin V-FITC/PI 染色　分别收集各 4 mg/mL FAE 组、CK 组、CM 组和 CK-CM 组细胞，预冷 PBS 清洗，依次加入 500 μL 1×Binding Buffer、5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI 染液，室温避光孵育 10 min。4% 多聚甲醛固定 10 min，倒置荧光显微镜下观察并采集图像，ImageJ 软件计算各组随机 10 个视野的平均荧光强度。

1.2.4　转录组测序分析　A549 细胞以 3×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板，常规培养 8 h。实验组（FAE 组）以 4 mg/mL 各 FAE 换液，2 mL/孔，对照组（CK 组）为完全培养基，处理 24 h 后收集细胞，委托广州基迪奥生物科技有限公司进行文库构建和高通量转录组测序分析。以 $P<0.05$ 且 $|\log_2\text{fold-change}|>1$ 为筛选标准，筛选差异表达基因（differentially expressed genes, DEGs），并通过 KEGG 数据库（https://www.kegg.jp/）对筛选出的 DEGs 进行信号通路富集分析，获得并分析各组在 IL-17 信号通路（ko04657）上相关基因的表达变化特征。

1.2.5 qRT-PCR 检测 随机选取 IL-17 信号通路上的差异表达基因进行检测，以验证转录组测序结果的可靠性，主要包括：*IL17RA*、*NFKB1*、*RELA*、*TRAF6*、*NFKBIA*，以 *GAPDH* 为内参基因。根据试剂盒要求，分别提取 4 mg/mL FAE 组和 CK 组细胞的总 mRNA。然后将提取的 RNA 逆转录合成 cDNA，逆转录反应体系（20 μL）：2×mRNA RT Mix 10 μL，mRNA Enzyme Mix 1.5 μL，总 RNA 4 μg，补充 RNase-free 水至 20 μL。逆转录反应程序：37 ℃ 60 min；85 ℃ 5 min。获得的 cDNA 产物于−20 ℃ 保存。随后进行 qPCR 反应，qPCR 反应体系（20 μL）：SYBR Green Master Mix 10 μL，正反向引物各 0.4 μmol/L，cDNA 模板 2 μL，补充 RNase-free 水至 20 μL。qPCR 反应程序：95 ℃ 10 min；95 ℃ 15 s，60 ℃ 1 min，40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各目标基因的相对表达量。

1.2.6 免疫细胞化学染色 分别收集 4 mg/mL FAE 组和 CK 组细胞，冷丙酮固定 10 min，去离子水洗涤 3 次；3% H_2O_2 室温孵育 8 min，PBS 洗涤 3 次；5% BSA 37 ℃ 孵育 30 min；50 μL MUC5AC 或 MUC5B 一抗工作液（1∶100 稀释）37 ℃ 孵育 2 h，PBS 洗涤 3 次；生物素标记山羊抗兔二抗 37 ℃ 孵育 30 min，PBS 洗涤 3 次；SABC 复合物 37 ℃ 孵育 30 min，PBS 洗涤 3 次；DAB 显色液显色 2 min 后，普通光学显微镜下观察并随机采集 10 个视野的图像，采用 ImageJ 软件计算平均灰度值，用来反映蛋白表达水平。

1.2.7 抗体封闭实验 A549 细胞以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板，常规培养 8 h，设置抗体封闭实验组（Anti-MUC5AC 组/ Anti-MUC5B 组）、实验组（FAE 组）和抗体封闭对照组（Anti-CK 组），Anti-MUC5AC 组/ Anti-MUC5B 组及 Anti-CK 组分别加入以 1∶100 稀释的 Anti-MUC5AC 或 Anti-MUC5B 一抗工作液，常规培养 3 h 后，Anti-MUC5AC 组/Anti-MUC5B 组及 FAE 组分别以 4 mg/mL FAE 换液，200 μL/孔，Anti-CK 组以完全培养基换液，处理培养 24 h 后；根据 1.2.2 描述的 MTT 法，检测各组 $OD_{492\ nm}$ 值并计算抑制率。

1.2.8 ELISA 检测 分别收集 4 mg/mL FAE 组和 CK 组细胞的培养上清液（n=5），加入酶标板 100 μL/孔，37 ℃ 孵育 90 min；弃上清液，分别加入 IL6、CCL2、CCL20、CXCL8、CXCL10 抗体工作液（1∶100 稀释）100 μL/孔，37 ℃ 孵育 60 min；PBS 洗涤 3 次，加入 ABC 工作液 100 μL/孔，37 ℃ 孵育 30 min；PBS 洗涤 3 次，TMB 显色液避光显色，酶标仪检测各孔 $OD_{450\ nm}$ 值。

1.3 数据处理

所有实验均进行 3 次独立生物学重复，以 mean±SD 表示。数据统计分析采用 SPSS 23.0 软件进行单因素方差分析（One-way ANOVA）和组间比较分析（Tukey's HSD 检验），显著性检验水平 α=0.05（*P<0.05，**P<0.01）。通过 GraphPad Prism 8 和基迪奥生物信息云平台（https://www.omicshare.com/）完成绘图及相关生物信息学分析。

2 结果与分析

2.1 FAE 对人肺癌细胞 A549 生长活性的影响

MTT 检测结果显示，在 0.1~10 mg/mL 浓度范围内，灵芝提取物（RL 组）与蛹虫草提取物（XG 组）均能明显抑制 A549 细胞的增殖活性，且抑制作用呈剂量依赖性（图 1A~图 1B）。然而，在 0.1~1 mg/mL 浓度范围内，暴马丁香桑黄提取物（BJ 组）则表现出显著的促增殖效应（P<0.05）（图 1C）。其中，XG 组的最高抑制率为 68.64%，RL 组为 85.99%，BJ 组为 65.68%。经线性回归计算，各组 IC_{50} 值介于 2~6 mg/mL 之间。Annexin V-FITC/PI 双染结果显示，经 4 mg/mL FAE 处理后，各药用真菌提取物均能诱导 A549 细胞发生凋亡。三组红色荧光强度均显著高于绿色荧光（P<0.05），提示各提取物诱导的晚期凋亡细胞比例显著高于早期凋亡细胞（图 1D~

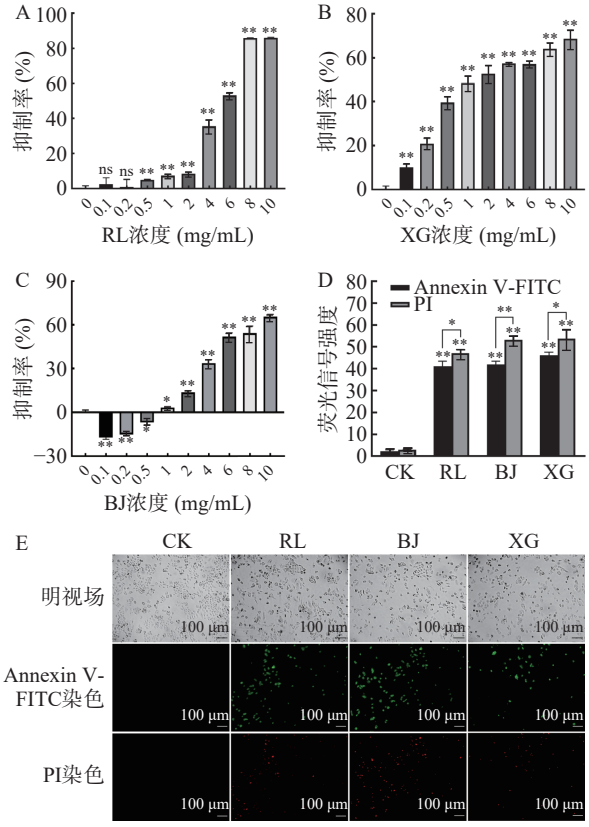


图 1 三种药用真菌对人肺癌细胞 A549 增殖活性的影响

Fig.1 Effects of three medicinal fungi on the proliferative activity of human lung cancer A549 cells

注：A：RL 组；B：XG 组；C：BJ 组；D：Annexin V-FITC/PI 双染荧光信号强度；E：Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡双染图（10×10，比例尺=100 μm）；Annexin V-FITC 染色标记早期凋亡细胞膜（绿色荧光），PI 染色标记中晚期凋亡细胞（红色荧光）。与 CK 组或同组相比，*表示显著差异，P<0.05；**表示极显著差异，P<0.01；ns 表示差异不显著。

图 1E）。因此，后续实验选用 4 mg/mL 作为各药用真菌提取物的最佳处理浓度。

2.2　CM 对人肺癌细胞 A549 生长活性的影响

4 mg/mL 各 FAE 处理 A549 细胞后，收集其条件培养基（CM），用于检测不同药用真菌处理后

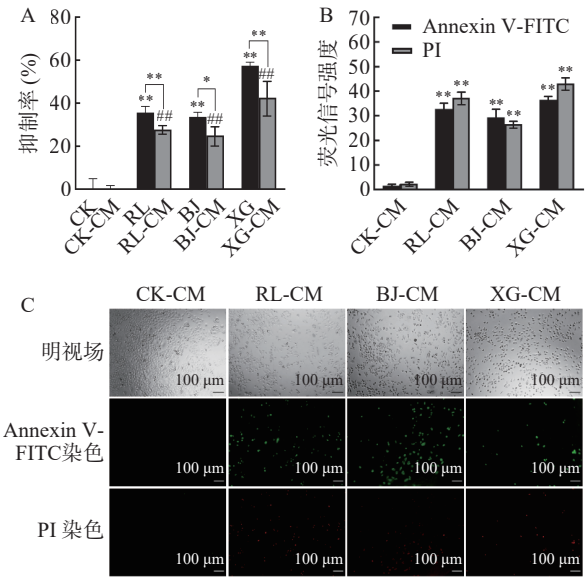


图 2　三种药用真菌 CM 对人肺癌细胞 A549 生长活性的影响

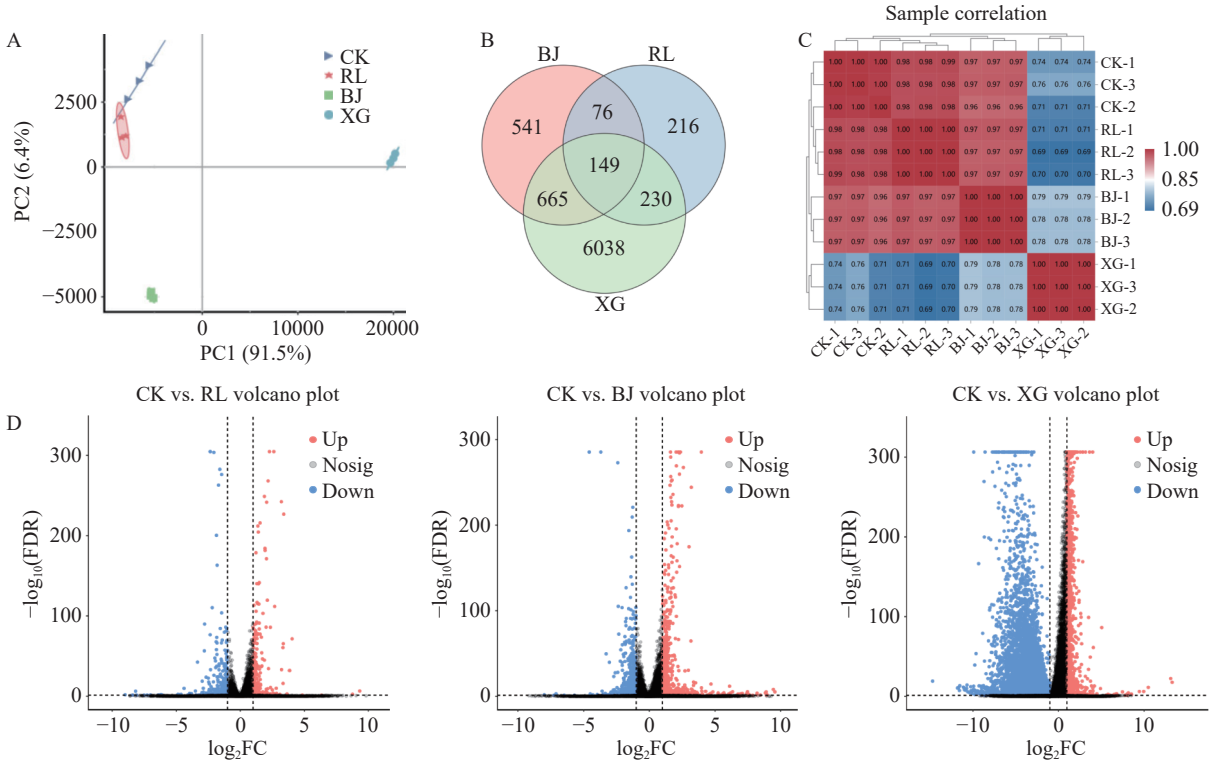
Fig.2　Effects of conditioned medium of three medicinal fungi on the proliferation of human lung cancer A549 cells

注：A：MTT 检测结果；B：Annexin V-FITC/PI 双染荧光信号强度；C：Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡双染图（10×10，比例尺=100 μm）；图 2A：与 CK 组或两组之间相比，*表示显著差异，P<0.05；**表示极显著差异，P<0.01；与 CK-CM 组相比，##表示极显著差异，P<0.01。图 2B：与 CK-CM 组相比，**表示极显著差异，P<0.01。

A549 细胞肿瘤微环境的变化。研究结果（图 2）显示，与 CK-CM 相比，三种真菌的 CM 均能显著抑制 A549 细胞的增殖活性（P<0.01）。其中，XG-CM 的抑制率最高，为 42.56%（P<0.01），而 BJ-CM 的抑制率最低，为 25.00%（P<0.01），均低于 4 mg/mL 各 FAE 诱导的抑制率（P<0.05）（图 2A）。Annexin V-FITC/PI 双染结果显示，RL-CM 和 XG-CM 处理组中，红色荧光信号强度普遍高于绿色荧光信号强度，BJ-CM 处理组则相反（P<0.05）（图 2B~图 2C）。这表明 BJ-CM 主要诱导 A549 细胞发生早期凋亡，而 RL-CM 和 XG-CM 则主要诱导晚期凋亡，且晚期凋亡细胞比例显著高于早期凋亡。因此，药用真菌处理诱导人肺癌细胞 A549 形成了具有抗增殖作用的肿瘤微环境。

2.3　FAE 对人肺癌细胞 A549 转录组的影响

PCA 分析结果显示，各组样本组内重复性良好，且组间距离显著大于组内距离（图 3A），表明分组具有明确的生物学意义。基于 CK 组基因表达量筛选 DEGs，RL 组 DEGs 数量最少（671 个），而 XG 组最多（7082 个）。三组间存在 149 个共有 DEGs（图 3B）。RL 组和 BJ 组在 DEGs 的表达趋势上更为相近，以上调 DEGs 为主，而 XG 组主要为下调 DEGs，占比高达 84%（图 3C~图 3D）。KEGG 富集分析结果显示，P 值最小的前 20 条通路主要与肿瘤微环境形成密切相关，包括：细胞因子-细胞因子受体相互作用（Cytokine-cytokine receptor interaction）、TNF 信号通路（TNF signaling pathway）、TGF-β 信号通路（TGF-β signaling pathway）和 Hippo 信号通路（Hippo signaling pathway）等（图 3E）。值得注意



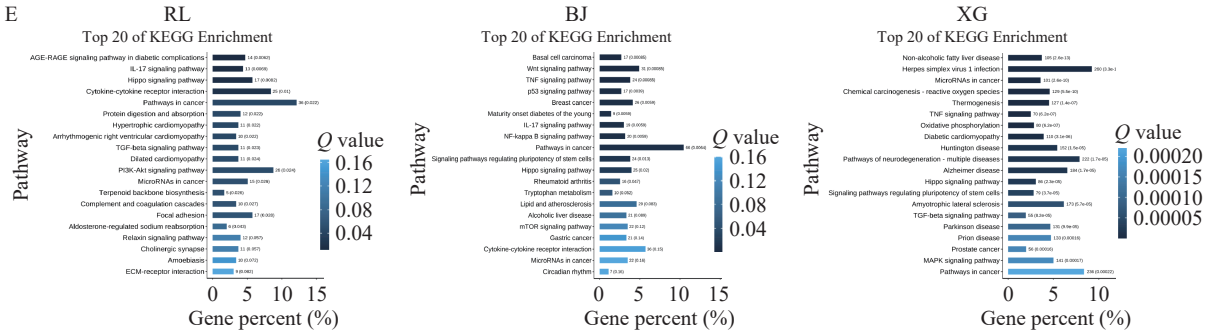


图 3　三种药用真菌对人肺癌细胞 A549 转录组的影响

Fig.3　Effects of three medicinal fungi on the transcriptomic profile of human lung cancer A549 cells

注: A: 样本主成分分析; B: DEGs 的共有情况; C: 样本相关性热图; D: DEGs 分布情况; E: KEGG 富集情况。

的是, 三个实验组的 DEGs 均在 IL-17 信号通路(ko04657)中表现出显著富集, RL 组: P=4.8e-5; BJ 组: P=1.4e-4; XG 组: P=0.0106。因此, 三种药用真菌处理显著影响了人肺癌细胞 A549 的肿瘤微环境, 且 IL-17 信号通路在其中可能扮演关键调控角色。

2.4　人肺癌细胞 A549 IL-17 信号通路对 FAE 的应答

2.4.1　IL-17 信号通路应答的测序分析　如图 4A 所示, 在 IL-17 信号通路中, XG 组筛选到 DEGs 数量最多(34 个), 且主要为下调基因; 而 RL 组和 BJ 组的 DEGs 则以上调基因为主。IL-17 信号通路的下游细胞因子, 如 MUC5AC、MUC5B、IL6、CCL2、CCL20、CXCL8、CXCL10 为肿瘤微环境的重要组成, 转录组测序结果显示, 三种药用真菌处理后, 均可显著改变 A549 细胞 MUC5B、IL6、CCL2、CCL20、CXCL8 的表达水平(P<0.05)(图 4B)。基于蛋白互作(PPI)网络分析(图 4C), 黏蛋白 MUC5AC 与 MUC5B 之间的互作关联最强; 同时, 趋化因子 IL6、CCL2、CCL20、CXCL8、CXCL10 之间也存在紧密的互作关系。推测上述细胞因子可能为药用真菌影响 IL-17 信号通路形成抗增殖肿瘤微环境的关键因素。

同时, qRT-PCR 验证结果显示, IL17RA、TRAF6、

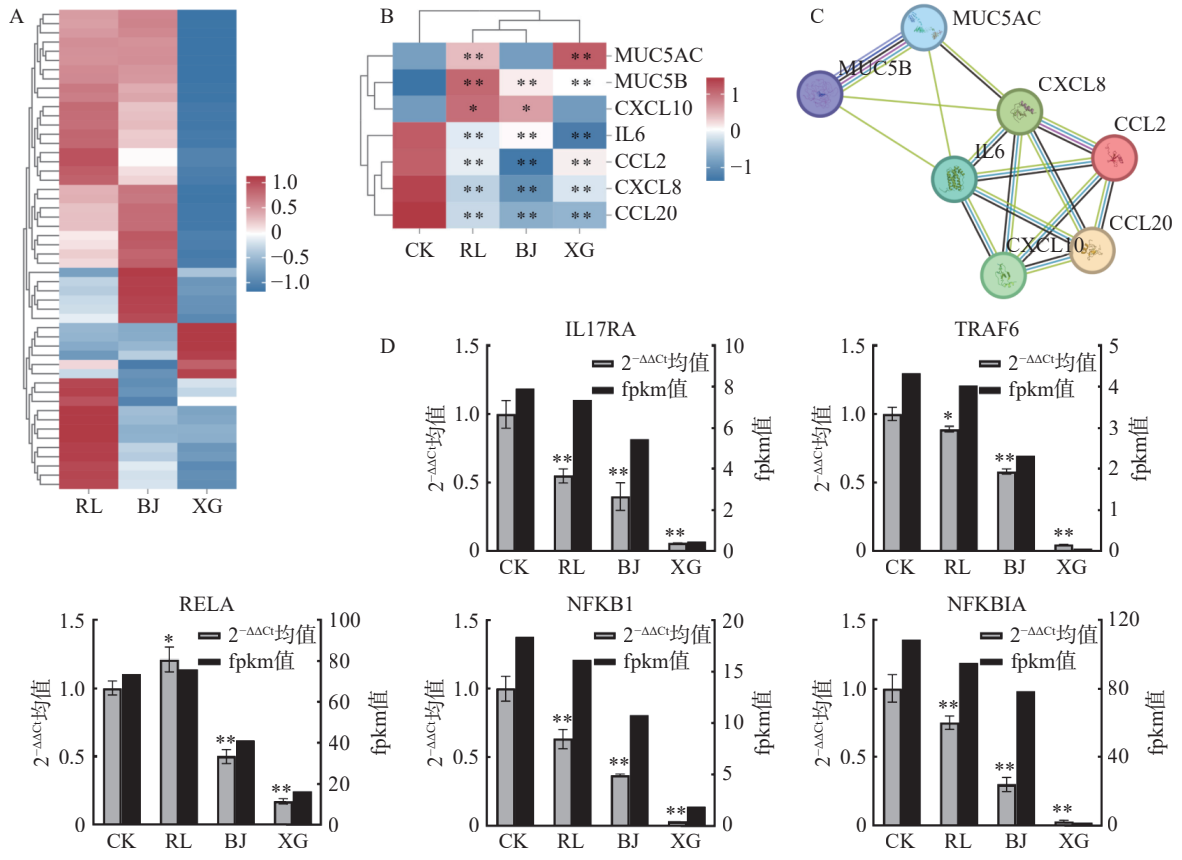


图 4　三种药用真菌影响 IL-17 信号通路的转录组测序分析

Fig.4　Transcriptome sequencing analysis of the effects of three medicinal fungi on the IL-17 signaling pathway

注: A: DEGs 表达量热图; B: IL-17 信号通路下游细胞因子表达量热图; C: IL-17 信号通路下游细胞因子 PPI 网络关系; D: 转录组基因表达验证; 与 CK 组相比, *表示显著差异, P<0.05; **表示极显著差异, P<0.01。

NFKB1 和 NFKBIA 在各处理组中表达均显著下调（P<0.05）。RELA 在 RL 组显著上调（P<0.05），在 BJ 组和 XG 组显著下调（P<0.01）（图 4D）。5 个检测基因表达水平的变化趋势与 RNA-seq 分析结果高度一致，证实了本转录组数据的准确性和可重复性。

2.4.2　人肺癌细胞 A549 分泌型黏蛋白 MUC5AC 和 MUC5B 表达量的改变　MUC5AC 和 MUC5B 隶属于分泌型凝胶形成相关的黏蛋白家族，是高分子量、高度糖基化的蛋白聚合物。免疫细胞化学染色结果显示，RL 和 XG 处理后，A549 细胞的 MUC5AC 表达量显著低于 CK 组（P<0.01），BJ 组无显著性改变（P>0.05），各实验组 MUC5B 的表达量则受到显著抑制（P<0.01）（图 5A~图 5B）。抗体封闭实验结果进一步证实，MUC5AC 和 MUC5B 抗体封闭处理可显著抑制 A549 细胞的增殖能力（P<0.01）。经 MUC5AC 抗体封闭处理后，RL 和 XG 对A549 细胞增殖的抑制作用显著减弱（P<0.05）；而 BJ 的抑制率未见明显变化（P>0.05）（图 5C）。这一结果表明，MUC5AC 可能介导了 RL 和 XG 对 A549 细胞增殖的抑制效应，但未参与 BJ 的作用过程。而 MUC5B 抗体封闭后，RL 和 BJ 对 A549 细胞增殖的抑制率显著降低（P<0.05），而 XG 的抑制率出现小幅升高（P<0.05），但升高幅度未达到 Anti-CK 组的水平（P>0.05），说明蛹虫草的抗肿瘤活性可能部分依赖于 MUC5B 介导的信号通路。

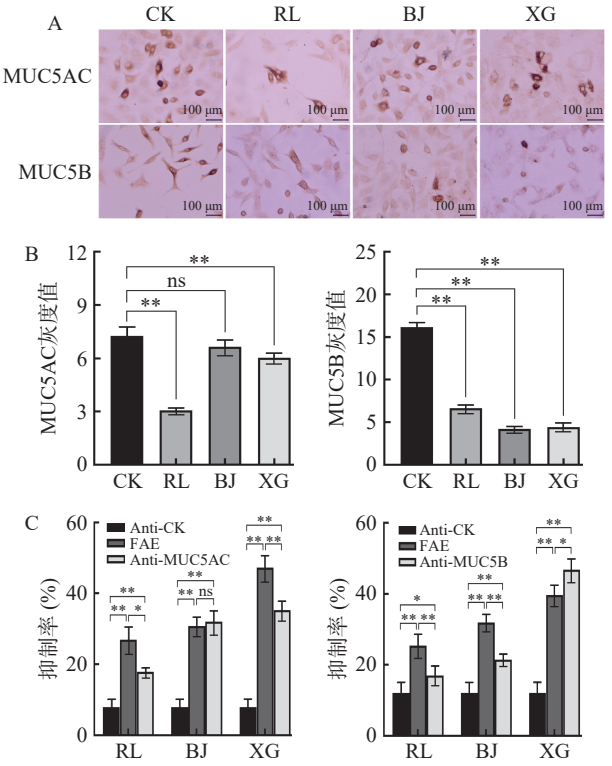


图 5　药用真菌对肺癌细胞 A549 MUC5AC 和 MUC5B 表达量的影响

Fig.5　Effects of medicinal fungi on the expression levels of MUC5AC and MUC5B in A549 lung cancer cells

注：A：免疫细胞化学染色（10×20，比例尺=100 μm）；B：MUC5AC/MUC5B 阳性灰度值；C：MUC5AC/ MUC5B 抗体封闭对 FAE 肿瘤抑制率的影响；*表示显著差异，P<0.05；**表示极显著差异，P<0.01。

2.4.3　肿瘤微环境中趋化因子含量的改变　ELISA 检测结果显示，各药用真菌提取物处理后，A549 细胞 IL6、CCL2、CCL20 和 CXCL8 的分泌量均显著降低（P<0.01），RL 和 BJ 处理可增强 A549 细胞 CXCL10 蛋白的分泌水平（P<0.01），XG 组 CXCL10 蛋白的分泌水平无显著变化（P>0.05）（图 6）。这表明药用真菌可通过调控这些分泌性细胞因子影响肿瘤微环境的组成。

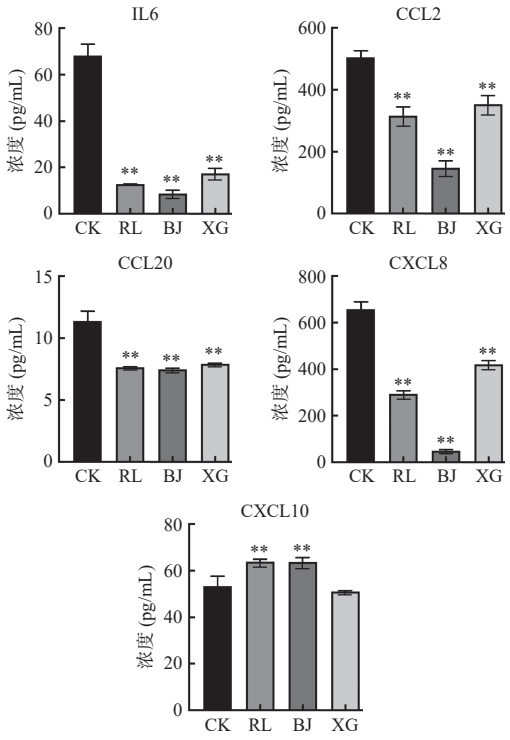


图 6　药用真菌对 IL-17 信号通路下游趋化因子表达量的影响

Fig.6　Effects of medicinal fungi on expression of downstream chemokines in the IL-17 signaling pathway

注：与 CK 组相比，**表示极显著差异，P<0.01。

3　讨论与结论

现代药理学研究证实，蛹虫草、灵芝及桑黄均表现出较为广谱的抗肿瘤活性，已成为抗肿瘤膳食补充剂开发的重要真菌资源。本研究采用非小细胞肺癌 A549 细胞模型，证实在 0.1~10 mg/mL 浓度范围内，三种药用真菌均可抑制肿瘤细胞的增殖活性，并诱导形成了具有显著抗肿瘤活性的肿瘤微环境。这一发现提示，肿瘤微环境的重塑可能是上述三种药用真菌发挥抗肿瘤效应的重要作用机制之一。

肿瘤微环境与肿瘤细胞之间存在复杂的相互作用，这种互作关系影响着肿瘤的发生、发展和转移等过程[19]。值得注意的是，IL-17 信号通路下游的多种效应分子均被证实是 TME 的重要组成部分，如趋化因子 CXCL2、CXCL5、CXCL10、CCL7[4,20]、细胞因子 G-CSF、GM-CSF[21] 以及分泌型黏蛋白

MUC5 等[22]。转录测序分析结果显示，经 4 mg/mL 药用真菌处理后，各组 DEGs 均在多个与 TME 形成密切相关的信号通路出现显著富集，主要包括 IL-17、Hippo、TNF 和 TGF-β 等。三种药用真菌处理对 MUC5AC、MUC5B、CCL2、CCL20、IL6 和 CXCL8 等关键因子的表达水平产生了显著的影响(P<0.05)。基于这些发现，本研究选取 IL-17 信号通路作为切入点，深入探究三种药用真菌通过调控 TME 发挥其抗肿瘤作用的具体机制。

黏蛋白家族(mucins, MUCs)是一类高分子量糖蛋白，已被证实参与构建促癌微环境。这类蛋白通过形成黏液层捕获生长因子和细胞因子，从而干扰免疫系统与肿瘤细胞间的相互作用，最终加速肿瘤的恶性进展[23]。研究显示，MUC5AC 和 MUC5B 在正常组织中几乎不表达，但在多种肿瘤组织中呈现显著高表达的特点[24]。MUC5AC 上调可诱导结直肠癌对 5-氟尿嘧啶产生耐药性[25]；在肺腺癌中，MUC5AC 和 MUC5B 的高表达与肿瘤异质性增加及不良预后密切相关[26−27]；此外，MUC5B 的异常表达还被证实可促进肿瘤侵袭，其机制涉及化疗耐药和抗肿瘤免疫应答受损[28]。本研究的转录测序结果显示，三种药用真菌处理在不同程度上调了 MUC5AC 和 MUC5B 的 mRNA 表达，但抗体封闭实验结果显示，MUC5AC 和 MUC5B 的抗体封闭处理会不同程度减弱蛹虫草和灵芝的抗肿瘤效应，直接证实了这两种黏蛋白在促进肺癌细胞增殖中起到关键调控作用。同时，各组 MUC5B 的表达水平呈现显著下调(P<0.01)，且蛹虫草和灵芝处理也使得 MUC5AC 的表达量下调(P<0.01)，提示上述两种药用真菌可能通过调控 MUC5AC/MUC5B 介导的信号通路网络来发挥其抗肿瘤作用，但暴马丁香桑黄的抗肿瘤作用与 MUC5B 的相关性更高。

已有大量研究表明，细胞因子在肿瘤恶性进展中发挥关键作用，CCL2 可通过促进肿瘤转移、侵袭及免疫逃逸，继而促进癌症的发展进程[29]，在炎性乳腺癌模型中，CCL2 基因敲除可显著抑制肿瘤生长和肺转移[30]；CCL20 在三阴性乳腺癌异种移植模型中表现出促增殖和促侵袭特性[31]；CXCL8 作为多效性细胞因子，参与调控乳腺癌、前列腺癌、肺癌、结直肠癌和黑色素瘤等多种恶性肿瘤的发生发展过程[32]；而 IL-6 则可以通过促进肿瘤细胞增殖、侵袭转移及抑制凋亡等机制参与肿瘤微环境调控[33−34]。经三种药用真菌处理后，A549 细胞培养上清中 IL-6、CCL2、CCL20 和 CXCL8 等细胞因子的分泌水平均出现显著下调(P<0.01)。因此，三种药用真菌可能通过抑制 IL-17 信号通路的下游效应因子的表达，从而重塑肿瘤微环境，使人肺癌细胞的肿瘤微环境转变为抑癌表型，进而负反馈实现对 A549 细胞增殖的抑制作用。

综上，本研究基于生物信息学分析与实验验证相结合的研究策略，不仅证实 IL-17 通路是灵芝、暴马丁香桑黄和蛹虫草三种药用真菌的抗癌作用靶点，更进一步揭示了其诱导形成抑癌特性肿瘤微环境的生物学功能，将对药用真菌抗肿瘤作用机制的认识从传统直接细胞毒性作用拓展至对肿瘤生态微环境的间接调控，深化了对药用真菌多靶点、系统性作用机制的理解，为上述药用真菌开发成抗肿瘤功能性食品奠定了坚实的理论基础。此外，本研究尚存在一些待解决的问题，如本研究采用的是真菌复合水提取物，靶向调控 IL-17 通路关键小分子的分离和鉴定是后续研究的主要内容；同时需要在更复杂的动物模型中进行深入验证，以推动其向功能性产品的精准应用转化。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] HAN Bingfeng, ZHENG Rongshou, ZENG Hongmei, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. Journal of the National Cancer Center, 2024, 4(1): 47−53.

[2] CHEN Yuqian, FAN Wenshuang, ZHAO Yanyan, et al. Progress in the regulation of immune cells in the tumor microenvironment by bioactive compounds of traditional Chinese medicine [J]. Molecules, 2024, 29(10): 2374.

[3] SONG Xinyu, LI Zongjuan, WANG Xuanhe, et al. SLC40A1+ macrophages contribute to the immunosuppressive tumor microenvironment in EGFR-mutated lung cancer[J]. Science Bulletin, 2025, 70(1): 47−50.

[4] ZHANG Xingru, LI Bangjie, LAN Tian, et al. The role of interleukin-17 in inflammation-related cancers[J]. Frontiers in Immunology, 2025, 15: 1479505.

[5] SONG Xinyang, HE Xiao, LI Xiaoxia, et al. The roles and functional mechanisms of interleukin-17 family cytokines in mucosal immunity[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2016, 13(4): 418−431.

[6] LI Ruiyuan, GUO Lipeng, LIANG Bin, et al. Review of mechanisms and frontier applications in IL-17A-induced hypertension[J]. Open Medicine (Poland), 2025, 20(1): 1−12.

[7] WALCH-RÜCKHEIM B, MAVROVA R, HENNING M, et al. Stromal fibroblasts induce CCL20 through IL6/C/EBPβ to support the recruitment of Th17 cells during cervical cancer progression[J]. Cancer Research, 2015, 75(24): 5248−5259.

[8] WANG J X, XU X J, ZHU Z M, et al. IL-17A as a new circulating bioindicator for non-small cell lung cancer diagnosis and prognosis[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2023, 27(24): 12004−12011.

[9] 李佳雪, 李程, 宋晓兵, 等. 灵芝多糖饮料对高脂联合 STZ 诱导的糖尿病小鼠糖脂代谢的改善作用[J]. 食品工业科技, 2024, 45(19): 9−16. [LI Jiaxue, LI Cheng, SONG Xiaobing, et al. Improvement in the glycolipid metabolism of diabetic mice induced by high-fat diet with streptozotocin supplemented with *Ganoderma lucidum* polysaccharide beverage[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(19): 9−16.]

[10] 刘锦程, 弓志青, 杨鹏, 等. 桑黄营养成分、活性成分及多糖性质分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(22): 241−248. [LIU

Jincheng, GONG Zhiqing, YANG Peng, et al. Analysis of nutritional components, active components and polysaccharide properties of *Phellinus igniarius*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(22): 241−248.]

[11] 于凤莅, 王佳妮, 廖思晴, 等. 蛹虫草对小鼠抗生素性肠道屏障损伤的改善作用[J]. 食品工业科技, 2025, 46(15): 383−391. [YU Fengli, WANG Jiani, LIAO Siqing, et al. Ameliorating effect of *Cordyceps militaris* on antibiotic intestinal barrier injury in mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(15): 383−391.]

[12] ZHONG Chunlian, LI Yumei, LI Wulin, et al. *Ganoderma lucidum* extract promotes tumor cell pyroptosis and inhibits metastasis in breast cancer[J]. Food and Chemical Toxicology, 2023, 174: 113654.

[13] YOON S K, SUNG S K, LEE D H, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and IL-23 induced by polysaccharide of the black hoof medicinal mushroom, *Phellinus linteus* (Agaricomycetes)[J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2017, 19(3): 213−223.

[14] CHEN Li, PAN Jingzhi, LI Xue, et al. Endo-polysaccharide of *Phellinus igniarius* exhibited anti-tumor effect through enhancement of cell mediated immunity[J]. International Immunopharmacology, 2011, 11(2): 255−259.

[15] DENG Qifeng, LI Xinrui, FANG Chunqiang, et al. Cordycepin enhances anti-tumor immunity in colon cancer by inhibiting phagocytosis immune checkpoint CD47 expression[J]. International Immunopharmacology, 2022, 107: 108695.

[16] 崔明琦, 于凯雯, 宋扬, 等. 蛹虫草水提物影响人胃癌细胞 BGC-823 不同 RCD 通路的转录组分析[J]. 食品工业科技, 2025, 46(4): 10−18. [CUI Mingqi, YU Kaiwen, SONG Yang, et al. Transcriptome analysis of effect of *Cordyceps militaris* aqueous extract in human gastric cancer cell BGC-823 on different RCD pathways[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(4): 10−18.]

[17] 崔明辉, 张奇, 陈俊颖, 等. 基于转录后调控筛选蛹虫草靶向作用 egfr 的 miRNA[J]. 食品工业科技, 2026, 47(8): 427−436. [CUI Minghui, ZHANG Qi, CHEN Junying, et al. Investigating the post-transcriptional regulation of egfr in non-small cell lung cancer A549 cells by *Cordyceps militaris* based on miRNA[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(8): 427−436.]

[18] 王泽, 崔明辉, 廖思晴, 等. 四类虫草诱导人胃癌细胞 BGC-823 衰老的转录组预测分析[J]. 沈阳师范大学学报(自然科学版), 2024, 42(6): 537−543. [WANG Ze, CUI Minghui, LIAO Siqing, et al. Transcriptome prediction analysis of four *Cordyceps* species inducing senescence in human gastric cancer BGC-823 cells[J]. Journal of Shenyang Normal University (Natural Science Edition), 2024, 42(6): 537−543.]

[19] 李东东, 刘海燕, 宿抱玉, 等. 桑黄多糖对肿瘤微环境影响的研究[J]. 泰山医学院学报, 2020, 41(4): 318−320. [LI Dongdong, LIU Haiyan, SU Baoyu, et al. Effect of *Phellinus igniarius* polysaccharide on tumor microenvironment[J]. Journal of Taishan Medical College, 2020, 41(4): 318−320.]

[20] CHEN J, YE X Y, PITMON E, et al. IL-17 inhibits CXCL9/10-mediated recruitment of $CD8^+$ cytotoxic T cells and regulatory T cells to colorectal tumors[J]. Journal for Immunotherapy of Cancer, 2019, 7(1): 324.

[21] TAI Y S, LEUNG J H, WANG S Y, et al. Association of granulocyte colony-stimulating factor treatment with risk of brain metastasis in advanced stage breast cancer[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(19): 10756.

[22] GHORBANI RANJBARY A, MEHRZAD J, DEHGHANI H, et al. Impact of IL-17a on apoptosis and mucinosis-related molecules in the microenvironment of colorectal cancer[J]. Archives of Medical Research, 2025, 56(5): 103220.

[23] YUAN Qinghong, CAI Sirui, CHANG Yuanhang, et al. The multifaceted roles of mucins family in lung cancer: From prognostic biomarkers to promising targets[J]. Frontiers in Immunology, 2025, 16: 1608140.

[24] RICO S D, HÖFLMAYER D, BÜSCHECK F, et al. Elevated MUC5AC expression is associated with mismatch repair deficiency and proximal tumor location but not with cancer progression in colon cancer[J]. Medical Molecular Morphology, 2021, 54(2): 156−165.

[25] POTHURAJU R, RACHAGANI S, KRISHN S R, et al. Molecular implications of MUC5AC-CD44 axis in colorectal cancer progression and chemoresistance[J]. Molecular Cancer, 2020, 19(1): 37.

[26] DONG Yujie, ZHOU Lijuan, ZHAO Dan, et al. MUC5AC enhances tumor heterogeneity in lung adenocarcinoma with mucin production and is associated with poor prognosis[J]. Japanese Journal of Clinical Oncology, 2020, 50(6): 701−711.

[27] YUAN Shuai, LIU Qingyun, HU Zeyao, et al. Long noncoding RNA MUC5B-AS1 promotes metastasis through mutually regulating MUC5B expression in lung adenocarcinoma[J]. Cell Death & Disease, 2018, 9: 450.

[28] GARCÍA E P, TISCORNIA I, LIBISCH G, et al. MUC5B silencing reduces chemo-resistance of MCF-7 breast tumor cells and impairs maturation of dendritic cells[J]. International Journal of Oncology, 2016, 48(5): 2113−2123.

[29] YOSHIMURA T. The chemokine MCP-1 (CCL2) in the host interaction with cancer: A foe or ally?[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2018, 15(4): 335−345.

[30] ROGIC A, PANT I, GRUMOLATO L, et al. High endogenous CCL2 expression promotes the aggressive phenotype of human inflammatory breast cancer[J]. Nature Communications, 2021, 12: 6889.

[31] CHEN Weilong, QIN Yuanyuan, WANG Dong, et al. CCL20 triggered by chemotherapy hinders the therapeutic efficacy of breast cancer[J]. PLoS Biology, 2018, 16(7): e2005869.

[32] LIU Qian, LI Anping, TIAN Yijun, et al. The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer[J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2016, 31: 61−71.

[33] LI Chenghui, PENG Xiang, PENG Zhiyong, et al. circBGNaccelerates gastric cancer cell proliferation and invasion via activatingIL6/STAT3signaling pathway[J]. The FASEB Journal, 2022, 36(11): e22604.

[34] MIYAKE M, FURUYA H, ONISHI S, et al. Monoclonal antibody against CXCL1 (HL2401) as a novel agent in suppressing IL6 expression and tumoral growth[J]. Theranostics, 2019, 9(3): 853−867.