

灵芝 β -葡聚糖的碱提取及其抗肿瘤免疫调节研究

张锦锦^{1,2}, 陈菲菲^{1,2}, 严展鹏^{1,2}, 李 畅^{1,2}, 孙 娥^{1,2}, 罗 毅^{1*}, 谭晓斌^{1,2*}

(1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210028;

2. 江苏省中医药研究院, 国家中医药管理局中药释药系统重点研究室, 江苏 南京 210028)

摘要: 采用 Box-Behnken 中心组合试验设计原理和响应面分析法, 得到碱法提取灵芝颗粒性 β -葡聚糖 (*Ganoderma lucidum* particulate β -glucan, GLG) 最佳条件: 提取温度 55 °C、时间 8 h 和料液比 1:20, 提取得率为 8.57%。本研究在动物实验获得江苏省中医药研究院伦理委员会的批准。体外免疫活性研究表明, GLG 能促进巨噬细胞的激活并分泌促炎细胞因子, 不仅能提高巨噬细胞的吞噬能力, 还能促进巨噬细胞吞噬 GLG 自身, 持续发挥免疫刺激作用; GLG 还能促进小鼠脾淋巴细胞的增殖; 此外, 口服 GLG 能够显著抑制 CT26 荷瘤小鼠肿瘤的增殖, 提高其脾脏中产生 IFN- γ 的 CD4⁺T (Th1) 细胞与 CD8⁺T (CTL) 细胞的比例, 表明 GLG 能够促进具有杀伤肿瘤细胞作用的 Th1 和 CTL 的增殖与分化, 从而增强机体抗肿瘤免疫。

关键词: 灵芝; β -葡聚糖; 响应面; 肿瘤免疫; 免疫调节

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)03-0512-10

Alkali extraction of *Ganoderma lucidum* β -glucan and its anti-tumor immune regulation

ZHANG Jin-jin^{1,2}, CHEN Fei-fei^{1,2}, YAN Zhan-peng^{1,2}, LI Chang^{1,2}, SUN E^{1,2}, LUO Yi^{1*}, TAN Xiao-bin^{1,2*}

(1. Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China; 2. Key Laboratory of New Drug Delivery Systems of Chinese Materia Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

Abstract: In this study, an immunostimulating particulate β -glucan was isolated from a hot alkaline extract of the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. The optimum conditions of 8 hours treatment time, 1:20 solid - liquid ratio and 55 °C for the alkaline extract process were obtained after investigating by single-factor experiments and Box-Behnken design in terms of the *Ganoderma lucidum* particulate β -glucan (GLG) increment, and these conditions resulted in a GLG yield of 8.57%. The experimental protocol was approved by the Medical Laboratory Animal Ethics Committee of Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine. The result showed that resident macrophages were effectively activated by GLG, such as with the up-regulation of co-stimulatory molecules, the secretion of cytokines and phagocytic uptake. GLG could also promote the proliferation of spleen lymphocytes in mice. In addition, IFN- γ production of spleen CD4⁺T cells and cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses were significantly enhanced on GLG orally treatment, which ultimately resulted in significantly decreased tumor burden. Taken together, these data suggest that GLG might act as an immune stimulator to exert antitumor effects.

Key words: *Ganoderma lucidum*; β -glucan; response surface methodology; tumor immunology; immunomodulatory

收稿日期: 2019-09-25; 修回日期: 2019-10-29.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773947, 81804071); 国家中医药管理局基地项目 (JDZX2015195); 江苏省“六大人才高峰”高层次人才项目资助课题 (WSN-042); 江苏省医学创新团队项目 (CXTDB2017003).

*通讯作者 Tel: 86-25-52362115, E-mail: njtxb@hotmail.com;

Tel: 86-25-85637121, E-mail: Robertluoyi@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0778

灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 又名芝草、瑞草, 是担子菌门伞菌纲多孔菌目灵芝科灵芝属真菌。灵芝在中国被称为“仙草”, 《神农本草经》记载“灵芝味甘温, 保神益精, 坚筋骨, 好颜色, 久服轻身不老延年”。现代研究表明, 灵芝中含有约 400 种不同的生物活性物质, 包括多糖类、三萜类、甾醇类、生物碱类、脂肪酸类、蛋白质/多肽类等^[1]。其中多糖类已被确定为灵芝的主要生物活性成分之一^[2]。目前已经从中分离解析出 200 多种多糖, 这些多糖中有一部分为单一葡萄糖组成的聚糖—— β -葡聚糖 (β -glucan), 而大多数为杂多糖, 由葡萄糖、甘露糖、半乳糖、木糖、岩藻糖和阿拉伯糖组成^[3]。 β -Glucan 是公认的免疫应答调节剂, 被归类为病原体相关分子, 可被先天免疫细胞表面的模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 识别^[4,5]。已有数种源自真菌的 β -glucan 被开发成临床使用的处方药, 如香菇多糖注射液、猪苓多糖注射液, 以及酿酒酵母 β -glucan 制剂等, 文献^[6]报道, 许多真菌来源的 β -glucan 能诱导宿主主导的抗肿瘤免疫应答。 β -Glucan 的不同制剂, 包括颗粒和可溶性 β -glucan, 都能与重要的模式识别受体 dectin-1 结合, 但只有颗粒性 β -glucan 才能激活, 显示出更强的免疫刺激能力^[7]。目前经国家食品药品监督管理局 (SFDA) 审批上市的灵芝制剂已经涵盖注射液、口服液、胶囊、分散片、滴丸和颗粒剂等多个剂型, 主要治疗神经官能症、多发性肌炎等, 其中灵芝多糖注射液和灵芝孢子胶囊更是用于减少化疗期间癌症患者的不良反应并改善其生活质量^[1], 但是灵芝 β -glucan 及其肿瘤免疫调节的研究却鲜有报道。巨噬细胞在体内广泛分布, 在突变细胞的识别、结合与吞噬, 肿瘤相关抗原的递呈及特异性继发抗肿瘤免疫中扮演重要的角色^[8]。因此, 本文利用响应面分析法对灵芝颗粒性 β -glucan (*Ganoderma lucidum* particulate β -glucan, GLG) 碱提条件进行优化, 并利用小鼠腹腔巨噬细胞模型和荷瘤小鼠模型, 初步评价 GLG 的免疫调节活性以及对肿瘤免疫的影响, 以期对灵芝及其多糖的临床抗肿瘤应用提供实验依据。

材料与方法

材料与仪器 灵芝子实体购自安徽亳州 (亳州市万珍中药饮片厂, 批号: 1712020), 经江苏省中医药研究院钱士辉鉴定为灵芝属多孔菌科植物赤芝 (*Ganoderma lucidum*) 的干燥子实体。GLG (由本实验室提取); 细胞因子白细胞介素 (IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的 ELISA 试剂盒、Golgiplug、抗小鼠 mAb CD40-PE、CD86-FITC、CD80-PE、MHC-II-FITC、F4/80-PE 及相关的同种型标记物 (加拿大 Biolegend

公司); 奥沙利铂 (oxaliplatin, OXA, 江苏恒瑞医药股份有限公司); 巯基乙酸盐、荧光素二氯三嗪 (fluorescein dichlorotriazine, DTAF)、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、佛波醇-12-肉豆蔻酸-13-乙酸酯 (phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA)、离子霉素 (ionomycin)、伴刀豆蛋白 A (concanavalin A, Con A) (美国 Sigma-Aldrich 公司); 酵母和蘑菇 β -葡聚糖检测试剂盒 (爱尔兰 Megazyme 公司); 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、2-巯基乙醇、RPMI1640 培养基、DMEM 培养基 (美国 Gibco Life Technologies 公司); 细胞增殖-毒性检测试剂盒 (Cell Counting Kit-8, CCK-8, 日本同仁化学研究所); 多黏菌素 B (polymyxin B sulphate, PMB, 上海蓝木化工有限公司); 苯酚、浓硫酸和氢氧化钠等试剂 (南京化学试剂有限公司)。

全自动酶标仪、Hera cell 150 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo 公司); 5430R 冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); Guava easyCyte 流式细胞仪 (德国 Merck millipore 公司); IX51 Olympus 显微镜 (日本 Olympus 公司)。

动物与细胞株 BALB/c 小鼠 (雄性), 6~8 周龄, 体重 18~22 g, 由扬州大学比较医学中心提供, 许可证号: SCXK (苏) 2017-0007。C57BL/6 小鼠 (雄性), 6 周龄, 体重 18~20 g, 由斯贝福 (北京) 生物技术有限公司提供, 许可证号: SCXK (京) 2016-0002, 在江苏省中医药研究院实验中心饲养。CT26.WT 小鼠结肠癌细胞购自中国科学院细胞库。动物实验获得江苏省中医药研究院伦理委员会的批准。

GLG 的提取 参照 Wang 等^[9]的提取方法并稍加修改, 将灵芝药材干燥粉碎, 过 80 目筛, 取药材粉末 1 000 g, 分别用 10 倍和 8 倍体积的 95% 乙醇于 80 °C 下脱脂处理两次, 每次 2 h, 药材干燥后加入 10 倍体积蒸馏水加热提取两次, 每次提取 2 h; 药材残渣干燥后精密称取 10 g, 加入 1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 200 mL, 充分搅拌, 水浴加热提取 2 次, 过滤并合并滤液; 以乙酸溶液中和滤液, 静置过夜后离心收集沉淀, 洗涤并溶解于 1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液, 重复此操作 3 次; 收集沉淀并洗涤数次后溶解于 1 mol·L⁻¹ NaOH, 经离心、透析和冷冻干燥等步骤得到粉末状 GLG 试样。

GLG 的单因素实验 以 GLG 提取得率为指标, 分别考察不同的提取温度、提取时间和液料比对提取率的影响并进行单因素实验。设定提取温度 65 °C, 料液比 1:15, 提取时间分别为 4、6、8、10 和 12 h; 设定提取温度 65 °C, 提取时间 8 h, 料液比分别为 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30; 设定提取时间 8 h, 料液比 1:15, 温度分别为 25、35、45、55、65 和 75 °C。每组实验重复 3 次, 取平均值考察各因素对 GLG 提取得率的影响。

响应面优化设计 综合单因素实验结果, 根据 Box-Behnken 中心组合实验设计原理, 以 GLG 提取得率为响应值 (因变量), 提取温度、提取时间和液料比为自变量, 应用 Design Expert 8.0.6.1 软件处理数据并进行结果分析, 拟合出 GLG 碱提法的最优提取条件。

总多糖含量测定 采用苯酚-硫酸法测定总多糖含量。精密称取干燥恒重的葡萄糖对照品 10 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 用蒸馏水定容至刻度, 配成 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准品溶液, 分别取上述标准葡萄糖溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2 mL, 加蒸馏水补足至 2.0 mL 并摇匀。然后依次加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL, 充分混匀后迅速加入浓硫酸 5 mL, 置沸水浴中约 10 min, 取出冷却至室温。490 nm 下测定吸光度值, 得到线性回归方程: $y = 8.406x - 0.0087$ ($R^2 = 0.9904$, $n = 3$), 其中 y 为吸光度值, x 为葡萄糖质量浓度。按式 (1) 计算提取 GLG 总多糖得率:

$$Y = (A \times B) / C \times 100\% \quad (1)$$

其中, Y 为多糖得率, A 为由回归方程求得的总多糖浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), B 为总多糖溶液体积 (mL), C 为灵芝药材干品质量 (g)。

β -1,3-glucan 检测方法 及含量测定 精密称取 GLG 提取试样 10 mg, 按照需要配成合适的浓度, 采用 β -glucan 酶法测定所得的试样中 β -1,3-glucan 的含量 (实验方法参照试剂盒说明书)。

GLG 样品的前处理 称取 GLG 样品适量并重悬于 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液, 温室静置 20 min, 用灭菌磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 3 次, 最后重悬于并定容至无 LPS 的去离子水中, 调节质量浓度至 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 经南京迪安医学检验所检测细菌内毒素水平为 $0.09 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

腹腔静息巨噬细胞的分离与给药 颈椎脱臼处死雄性 C57BL/6 小鼠, 75% 乙醇消毒, 腹腔注射 4 mL DMEM 完全培养基, 轻轻按摩腹部后收集腹腔液体, 离心、洗涤后, 制成 1×10^6 个/mL 的细胞悬液备用; 设置空白对照组、LPS 组、GLG 组和 GLG+PMB 组, 按每孔 500 μL 接种于 48 孔板中, 37°C 、5% CO_2 培养箱中孵育, 贴壁 2 h 后, 轻柔震荡培养板, 洗涤细胞, 吸尽上清液, 各加入 500 μL 新鲜培养基, 按不同组别给药, 并于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。

GLG 对体外腹腔静息巨噬细胞毒性的影响 各取上述巨噬细胞 200 μL 接种于 96 孔板, 加入不同浓度的 GLG, 使终质量浓度分别为 0、15.63、31.25、62.5、125、250、500 和 1 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 每组 6 复孔, 置 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h, 每孔各加入 CCK-8 溶液 10 μL , 在培养箱中孵育 2 h, 用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度值。

ELISA 法测定腹腔静息巨噬细胞 IL-6、TNF- α 的分泌 取巨噬细胞培养上清液, 以测定细胞因子 IL-6、TNF- α 的水平。严格按试剂盒说明书进行实验操作, 利用酶标仪检测各实验组细胞因子的吸光度值, 根据标准曲线计算求得浓度。

GLG 对腹腔静息巨噬细胞成熟的影响 收集培养的巨噬细胞, 离心、洗涤, 制备细胞悬液; 用 Fc-blocking 单克隆抗体阻断细胞 15 min 后, 用 F4/80-APC、CD40-PE、CD86-FITC、CD80-PE 和 MHC-II-FITC 单克隆抗体在冰上染色 20 min, 通过流式细胞仪检测分析, 巨噬细胞通过 F4/80 表达来鉴定。

GLG 对腹腔静息巨噬细胞吞噬中性红的影响 取上述腹腔静息巨噬细胞 100 μL 接种于 96 孔板, 加入不同浓度的 GLG, 使终质量浓度分别为 0、31.25、62.5、125、250、500 和 1 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 同时设置 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 对照组, 每组 6 复孔, 置 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h, 用 PBS 洗涤 2 次, 再加入 0.05% 中性红溶液 100 μL , 20 min 后用 PBS 洗 2 次, 加入 100 μL 细胞裂解液 (50% 酒精、49% 水、1% 乙酸) 释放中性红, 用酶标仪在 540 nm 处检测吸光度值。

DTAF 标记 GLG 将 GLG 50 mg 加至 2.5 mL 硼酸盐缓冲液 (pH 10.8) 中制成悬浮液, 再加入 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ DTAF 溶液 5 mL, 在室温下搅拌过夜; $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃去上清后沉淀用 PBS 洗涤, 以除去未共价结合的 DTAF; 按相同方法处理去除 LPS 后, 得到 DTAF 标记 GLG (GLG-DTAF), 质量浓度调节至 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 室温下避光保存备用。

3% 巯基乙酸盐肉汤诱导的巨噬细胞对 GLG-DTAF 的结合与吞噬作用 取雄性 C57BL/6 小鼠, 腹腔注射 3% 巯基乙酸盐 1 mL, 4 天后收集腹腔细胞, 将分离的细胞在冰冷的 PBS 中洗涤两次, 细胞重悬于 DMEM 培养基中, 接种在 24 孔板上过夜, 实验前用 PBS 洗涤 3 次。对于吞噬实验的测定, 取 5×10^5 个巨噬细胞与 GLG-DTAF ($20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 在 37°C 下混合 1 h, 然后用冰冷的 PBS 洗涤, F4/80 鉴定巨噬细胞, 通过流式细胞术测定细胞吞噬 GLG-DTAF 的百分比; 对于结合作用的测定, 将 5×10^5 个巨噬细胞与 GLG-DTAF ($20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 在冰上混合 30 min, F4/80 鉴定巨噬细胞, 通过流式细胞术确定细胞结合 GLG-DTAF 的百分比。

GLG 对体外脾细胞增殖的影响 颈椎脱臼处死 C57BL/6 小鼠, 在无菌环境下摘取脾脏, 充分研磨, 经 70 μm 孔径筛网过滤, $1\ 600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清; 加入红细胞裂解液 1 mL, 充分混匀, 静置 30 s 后迅速加入 RPMI 1640 完全培养基 5 mL, 混匀后离心, 用 PBS 缓冲液重复洗涤 2 次, 调整细胞数 5×10^6 个/mL, 每

孔 100 μL 接种于 96 孔板中。

设置 LPS 组、Con A 组与 GLG 不同浓度给药组。LPS 组加入终质量浓度为 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 LPS 诱导 B 细胞; Con A 组加入终质量浓度为 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Con A 诱导 T 细胞; GLG 不同浓度给药组分别加入终质量浓度为 25、50、100、200 和 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 GLG 考察其对脾细胞增殖的影响。每组设置 6 复孔, 每孔终体积为 200 μL , 放入 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 24 h。然后, 每孔加入 CCK-8 10 μL , 在培养箱中孵育 2 h, 采用酶标仪在 450 nm 处检测吸光度值。

小鼠 CT26 肿瘤模型的建立 取健康 BALB/c 小鼠, 于左前肢腋下皮下注射 CT-26 肿瘤细胞 5×10^5 个。24 h 后随机分组, 分别为空白组、模型组、奥沙利铂阳性对照组和 GLG 不同剂量组 (200、400 和 800 $\mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$)。在可触知的肿瘤形成后开始灌胃给药, 连续给药 3 周, 每隔 3 天用卡尺测量肿瘤直径, 当肿瘤直径达到 15 mm 时颈椎脱臼处死小鼠。完整剥离瘤块, 称量瘤体湿重, 按下列公式计算各指标^[10]:

$$V = (L \times W^2) / 2 \quad (2)$$

其中, V 为肿瘤体积, L 和 W 分别为肿瘤的长和宽 (mm)。

$$\text{IR} (\%) = (M_M - M_E) / M_M \times 100\% \quad (3)$$

其中, IR 为肿瘤抑制率 (%), M_M 和 M_E 分别为模型组肿瘤平均质量和各实验组肿瘤平均质量 (g)。

$$\text{TI} = T / W_m, \text{SI} = S / W_m \quad (4)$$

其中, TI 和 SI 分别为胸腺指数和脾脏指数, T 和 S 分别为胸腺质量和脾脏质量 (mg), W_m 为小鼠质量 (g)。

免疫组织化学检测 CT26 肿瘤小鼠中 Ki67 蛋白的表达 剥离小鼠肿瘤组织并制成石蜡病理切片, 经过烘烤、脱蜡水化、抗原修复等步骤进行免疫组化染色, 再利用光学显微镜和 Image pro plus 软件进行拍照和结果分析^[11]。

流式细胞仪检测 CT26 肿瘤小鼠脾脏中 Th1 细胞的分布 取模型组、OXA 组、GLG 高剂量组小鼠脾脏并通过 70 μm 尼龙滤网制成单细胞悬液, 取 24 孔板, 每孔加入细胞悬液 200 μL , 在 Golgiplug 存在条件下, 加入 25 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ PMA 和 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 离子霉素 (ionomycin) 培养 4 h, 用抗 CD4⁺、CD8⁺ 单克隆抗体表面染色, 细胞经过固定后加入抗 INF- γ 抗体染色, 通过流式细胞仪检测脾脏细胞中 Th1 细胞的分布。

统计学方法 对于响应面模型的显著性统计和回归方程式, 采用 Design Expert 8.0.6.1 软件进行分析; 对于免疫相关数据, 采用 SPSS19.0 软件进行分析, 通过单因素方差 One-way ANOVA 分析比较多组间的值以确定统计学上显著性差异, 数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。 $P < 0.05$

被认为具有统计学意义。

结果

1 GLG 提取条件优化

1.1 GLG 提取工艺的单因素考察

为了探究提取时间、温度、料液比对 GLG 提取得率的影响, 选用苯酚硫酸法和 β -glucan 酶法试剂盒检测法对单因素实验进行了考察分析。结果显示, β -glucan 提取得率随着提取时间的增加呈上升趋势, 这可能由于碱液与药材接触时间较短提取不充分, 但在 10 h 后上升水平趋于平稳, 考虑提取得率和时间成本, 故选择提取时间为 10 h 左右; 在料液比 1:10 至 1:20 内, β -glucan 提取得率明显上升, 这可能与药材粉末吸水量大有关, 而 1:20 后得率趋于平稳上升趋势, 根据提取得率和实验操作的实际情况选择料液比 1:20 左右; β -glucan 提取得率在 55 $^\circ\text{C}$ 前呈逐渐升高趋势, 但之后则较大幅度下降, 可能是温度过高对糖类成分有所破坏造成, 所以选择提取温度在 55 $^\circ\text{C}$ 左右。

1.2 响应面优化实验

1.2.1 Box-Behnken 实验模型及分析 在单因素实验结果分析的基础上, 选取提取时间、提取温度和料液比为自变量, 以 GLG 提取率为因变量, 利用响应面法进行三因素三水平试验设计, 结果见表 1。根据 Box-Behnken 模型共设计实验 17 组, 每组重复 3 次, 结果取平均值。实验结果表明, 在提取时间 12 h、提取温度 45 $^\circ\text{C}$ 及料液比 1:15 时, 提取得率最低, 为 4.37%, 在提取时间 10 h、提取温度 45 $^\circ\text{C}$ 及料液比 1:20 时, 提取得率最高, 为 11.00%。

Table 1 Factors and levels for response surface methodology design

Factor	Level		
	-1	0	1
A: Extraction time/h	8	10	12
B: Extraction temperature/ $^\circ\text{C}$	35	45	55
C: Ratio of material and solution/ $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1:15	1:20	1:25

1.2.2 响应面结果分析 响应面曲面可比较直观地反映出各因素交互作用对响应值的影响。GLG 提取的等高线图与响应面 3D 图谱见图 1。圆形表示两因素之间的交互作用不显著, 椭圆表示两因素之间的交互作用显著; 交互作用图的纵切面呈开口向下的抛物线, 说明提取温度、时间与料液比在实验数据误差范围内, 对 GLG 的提取得率的影响显著; 提取温度对 GLG 的提取得率的影响最大, 而提取时间对提取得率的影响也较为明显, 但料液比变化对 GLG 提取得率的影响则最小。

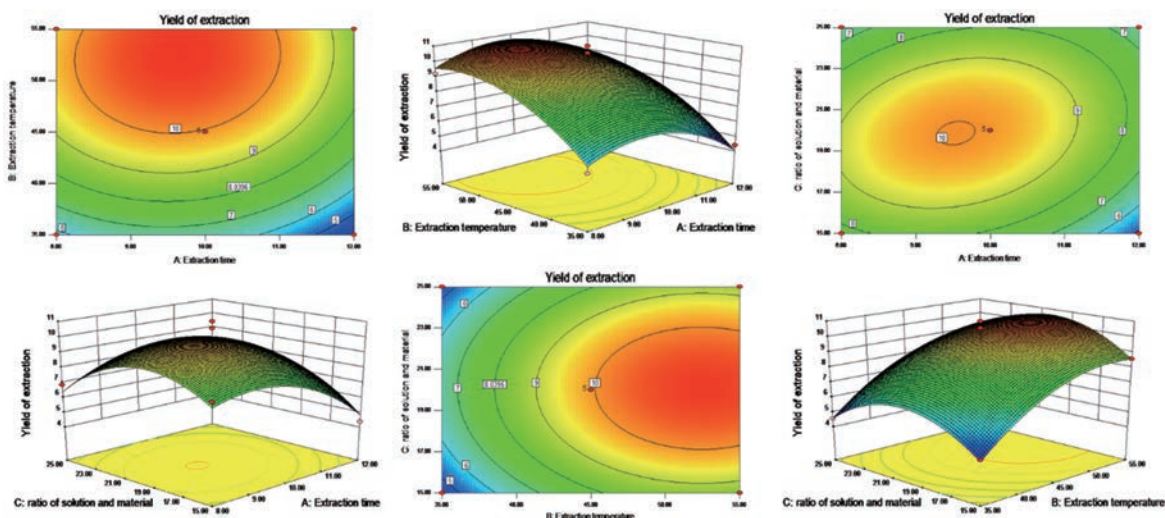


Figure 1 Response surface and contour plots showing the influence of operating parameters on the extraction efficiency of *Ganoderma lucidum* particulate β -glucan (GLG)

使用响应面模型参数评价实验结果,利用软件分析各变量对GLG得率的影响效果,并进行多项式回归拟合,建立提取时间、提取温度和料液比三个因素的二次多项回归方程为: $Y = 9.94 - 0.71 X_A + 2.05 X_B + 0.065 X_C + 0.16 X_{AB} + 0.72 X_{AC} + 0.000 X_{BC} - 1.60 X_A^2 - 1.37 X_B^2 - 2.00 X_C^2$, 回归方程的方差分析表明模型的 F 值为 14.72 ($P < 0.001$), 失拟项 $0.6291 > 0.05$, 差异不显著, 表明该二次多项回归方程选用适当, 该模型总决定系数 $R^2 = 0.9498$, 校正决定系数 $R^2_{adj} = 0.8853$, 说明实验结果与理论预测值相关性较高, 以上各参数表明实验结果具有显著性差异, 模型成立, 可用于GLG优化提取条件的预测和分析。

1.2.3 Box-Behnken法组合优化条件的验证实验 运用 Design Expert 8.0.6.1 软件预测GLG提取的理论最佳条件: 温度 55°C 、时间 8 h 和料液比 1:20。此条件下重复3次实验, 所得多糖得率的平均值为 8.57%, 在此条件下由回归方程所得的GLG提取得率的理论值 8.46%, 相对误差 1.25%。该模型拟合度高, 所得到的提取条件参数可靠, 为GLG的提取提供了参考。

2 GLG免疫调节活性研究

2.1 GLG促进小鼠腹腔静息巨噬细胞的活化及对细胞因子谱的极化作用

为了研究GLG在巨噬细胞中细胞毒性作用, 选用不同浓度的GLG进行CCK-8测定, 发现GLG在实验浓度范围内对巨噬细胞无细胞毒性作用, 且能够促进巨噬细胞的活力增长(图2A)。巨噬细胞被PRR或细胞因子活化后, 能够表达大量的MHC分子和共刺激因子, 发挥抗原递呈的功能, 而且不同的免疫刺激物能够诱导巨噬细胞产生不同的活化状态^[11]。为了评估

GLG对巨噬细胞激活的影响, 采用流式细胞术分析巨噬细胞活化相关表面标志物的表达, 发现GLG可上调巨噬细胞表面共刺激因子CD40、CD80、CD86及主要组织相容性抗原II(MHC II)的表达水平(图2B), 这对于抗原呈递具有关键作用。TNF- α 、IL-6主要是由活化的淋巴细胞、巨噬细胞等免疫细胞表达的炎性细胞因子, 可以通过激活免疫反应而发挥重要的抗肿瘤效果^[12]。GLG刺激后可显著上调巨噬细胞分泌TNF- α 、IL-6的水平(图2C), 说明GLG有助于巨噬细胞分泌免疫细胞因子。

2.2 GLG对巨噬细胞吞噬和结合功能的影响

抗原递呈细胞是固有免疫与适应性免疫的桥梁, 能识别和吞噬突变的肿瘤细胞, 并将肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA)递呈, 触发持久与强烈的TAA特异性抗肿瘤T细胞免疫应答^[13]。巨噬细胞是机体中分布最广泛的抗原递呈细胞, 其活化最显著的特征之一是吞噬活性的增强。作者考察了GLG对腹腔静息巨噬细胞吞噬中性红能力的影响, 结果发现, 与对照组相比, GLG能显著促进巨噬细胞对中性红的吞噬, 并呈浓度依赖性(图3A); 进一步采用荧光染料DTAF标记GLG(GLG-DTAF), 流式细胞术分析考察GLG对3%巯基乙酸盐肉汤诱导巨噬细胞结合与吞噬GLG-DTAF能力的促进作用, 结果发现, GLG可介导巨噬细胞的吞噬作用(图3B); GLG具有结合巨噬细胞的活性(图3C)。

2.3 GLG促进体外脾细胞的增殖

细胞免疫反应和体液免疫反应的激活与淋巴细胞的增殖密切相关^[14], 因此, 以LPS和Con A为阳性对照检测了不同浓度的GLG对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响

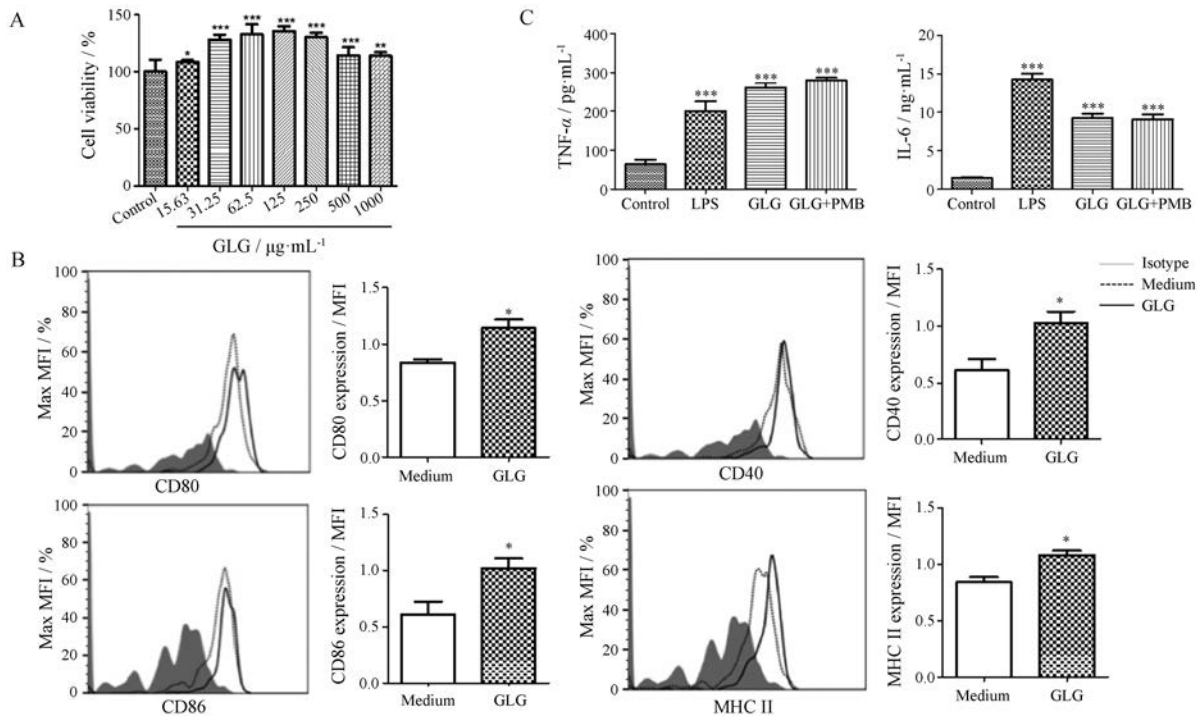


Figure 2 Surface marker expression and cytokines secretion by murine resident peritoneal macrophages stimulated with GLG ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A: Toxic effects of different concentrations of GLG on macrophages. $n = 6$. $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group; B: Murine resident peritoneal macrophages from C57BL/6 mice were collected and stimulated with GLG for 12 hours. The cells were harvested and stained with indicated mAbs F4/80-APC, CD40-PE, CD86-FITC, CD80-PE, MHC-II-FITC or isotype controls. Unstimulated macrophages were used as controls. Co-stimulatory molecules (CD40, CD86 and CD80) and major histocompatibility antigen (MHC II) of resident peritoneal macrophages stimulated with GLG were increased compared with medium group. The histograms are one representative of three independent experiments with similar results and represent median fluorescent intensity (MFI). Cells were gated on F4/80 cells. $n = 3$. $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs medium group; C: Supernatants of GLG stimulated macrophages were collected and detected for cytokines using ELISA kit. The levels of IL-6 and TNF- α were obviously increased compared with control group. LPS: Lipopolysaccharide. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs control group

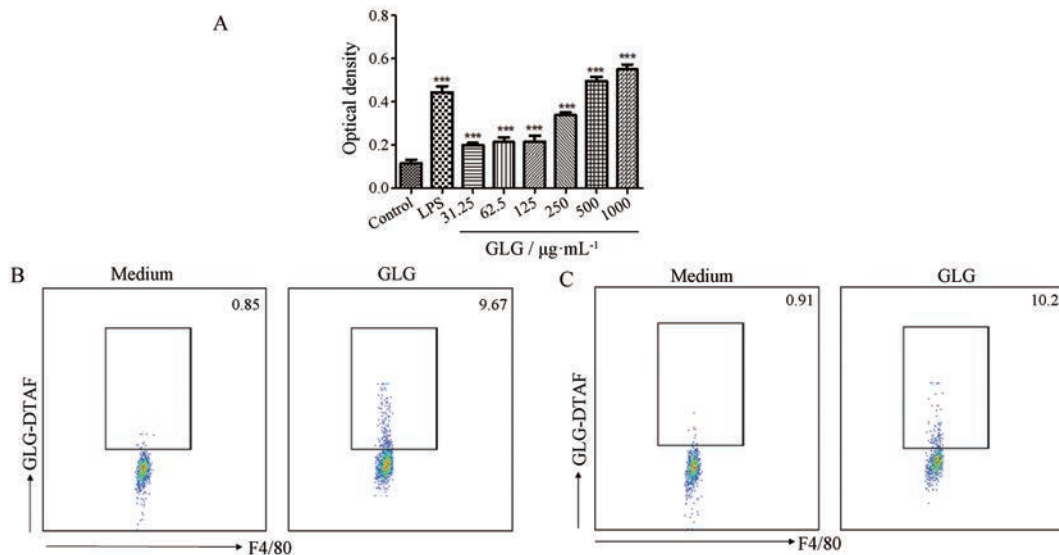


Figure 3 Effect of GLG on phagocytosis and binding function of macrophages. A: Effects of different concentrations of GLG on the phagocytosis of neutral red by macrophages. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs control group; B: GLG phagocytosis on the macrophages. Macrophages were incubated with DTAF-GLG at 37°C and phagocytosis of GLG was assessed by flow cytometry; C: GLG binding on the macrophages. Macrophages were incubated with DTAF-GLG on ice and binding of GLG was assessed by flow cytometry. Percent of GLG positive cells were summarized. Cells were gated on F4/80 cells. The dot plot are one representative of three independent experiments with similar results

响。GLG对脾淋巴细胞的增殖具有浓度依赖性地促进作用,说明GLG能够改善脾脏的免疫功能(图4)。

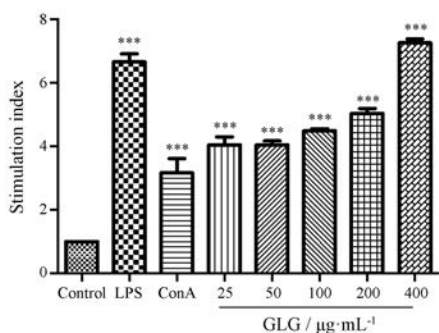


Figure 4 Effects of different concentrations GLG (25, 50, 100, 200, 400 µg·mL⁻¹) on spleen lymphocyte proliferation. Con A: Concanavalin A. *n* = 6, $\bar{x} \pm s$. ****P* < 0.001 vs control group

2.4 GLG抑制CT26结肠癌皮下移植模型小鼠的肿瘤增殖

与模型组相比,400和800 µg·d⁻¹ GLG给药组小鼠的肿瘤负荷均显著降低(图5A~E),抑瘤率分别为36.74%和56.16%;与阳性药OXA组相比,GLG给药各组小鼠体重均无显著下降趋势(图5F)。结果提示,GLG能显著抗结肠癌,并具有较好的安全性。

2.5 GLG对机体免疫器官的影响

随着肿瘤的进展,宿主的免疫系统受到影响,化疗药物的使用会进一步损伤免疫器官,而免疫增强剂则对免疫器官具有保护作用,可以增强宿主免疫应答。在肿瘤发展早期,脾脏具有正向免疫调节作用;在肿瘤晚期,随着肿瘤微环境的变化,脾脏却抑制机体的免疫功能而发挥负向免疫调节作用,出现脾脏肿大等症状。作者考察了GLG对荷瘤小鼠脾脏与胸腺的影响,结果表明,OXA对免疫器官具有明显的抑制作用;GLG对免疫器官几乎无抑制作用,且可以减轻肿瘤小鼠的脾脏肿大症状,逆转肿瘤微环境对免疫细胞的调控作用(图6)。

2.6 GLG降低Ki67在荷瘤小鼠肿瘤组织中的表达

Ki67能够反映癌细胞数量和活跃程度。与模型组相比,400和800 µg·d⁻¹ GLG组荷瘤小鼠肿瘤组织Ki67的表达均显著降低(图7),显示GLG在体内对肿瘤细胞具有一定程度的抑制效果。

2.7 GLG增强CT26荷瘤小鼠抗肿瘤T细胞免疫应答

作为机体最大的免疫器官,脾脏占有全身循环T淋巴细胞的25%,直接参与细胞免疫,并可调节T细胞亚群的分布,是肿瘤免疫中重要的环节。T细胞经诱导可分化为不同的亚群,如CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞,

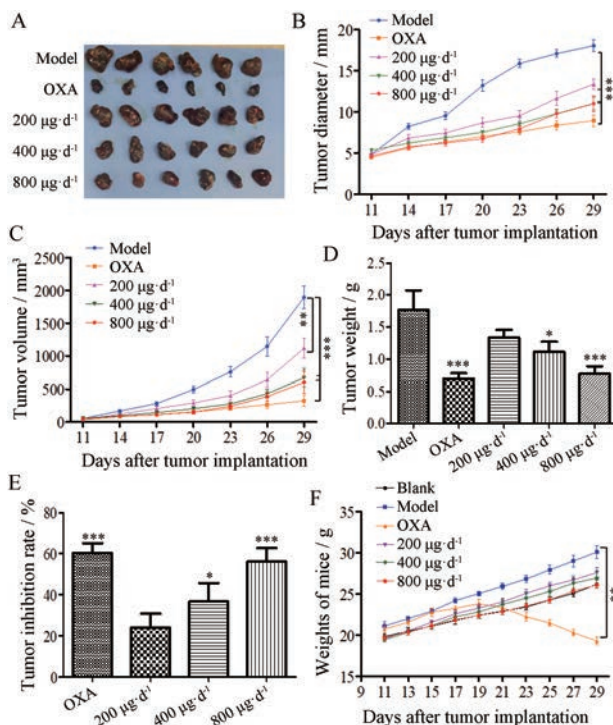


Figure 5 GLG treatment significantly reduces tumor burden. A: Tumor outlook of different groups; B: Tumor diameters change curve from the tumor-bearing mice; C: Tumor volume change curve from the tumor-bearing mice; D: Tumor tissues weight from the tumor-bearing mice; E: Tumor inhibition rate of GLG or OXA in the tumor-bearing mice; F: Body weight change curve of the tumor-bearing mice. OXA: Oxaliplatin. *n* = 6, $\bar{x} \pm s$. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 vs model group

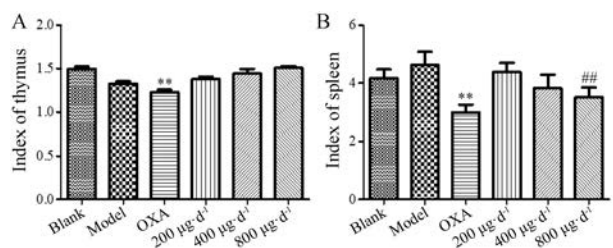


Figure 6 The influence of GLG on spleen and thymus in CT26 tumor-bearing mice. A: Thymus index of the mice; B: Spleen index of the mice. *n* = 6, $\bar{x} \pm s$. ***P* < 0.01 vs blank group; ##*P* < 0.01 vs model group

其中CD8⁺T细胞具有消灭受感染细胞的功能,CD4⁺T细胞具有增强宿主对病原体的免疫性和防御功能^[15]。作者发现GLG给药后CT-26荷瘤小鼠脾脏中产生IFN-γ的CD4⁺T(Th1)细胞与产生IFN-γ的CD8⁺T(CTL)细胞的比例显著高于模型组(图8),表明GLG能促进具有杀伤肿瘤细胞作用的Th1和CTL的增殖与分化,从而增强机体抗肿瘤免疫。

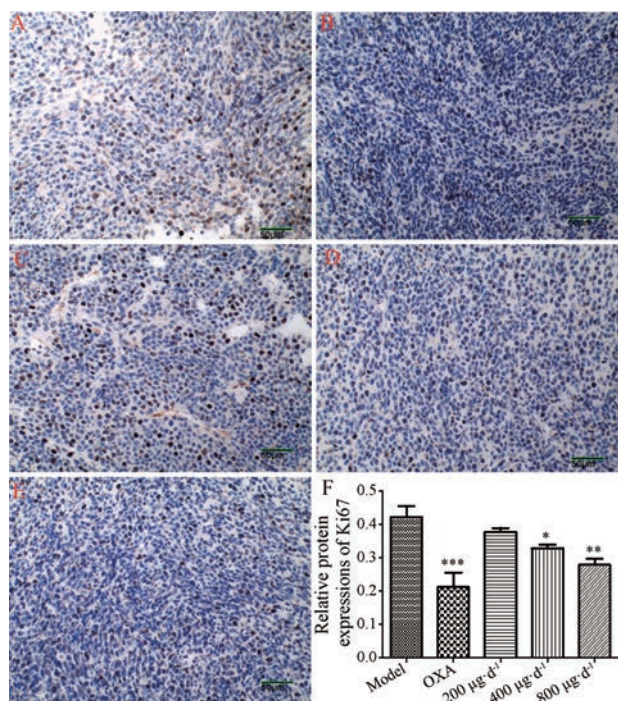


Figure 7 Protein expressions of Ki67 in different groups of mice. Magnification $\times 200$. Inhibiting effects on Ki67 of model group (A), OXA group (B), $200 \mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ GLG group (C), $400 \mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ GLG group (D) and $800 \mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ group (E). F: Relative protein expression of Ki67 of different groups. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs model group

讨论

近年来,免疫治疗已成为继手术、放疗和化疗之后最有前景的癌症治疗策略,被称为肿瘤治疗的“第三次革命”^[16]。有效的肿瘤免疫疗法需要引发抗肿瘤T细胞应答,利用适当的免疫增强剂可以定性和定量的增强T细胞应答^[17]。相关研究表明,颗粒性 β -glucan可作为有效的免疫增强剂,刺激先天性和适应性免疫应答,增强抗肿瘤T细胞活性和肿瘤微环境对Th1应答的改变,其抗肿瘤活性与增强宿主免疫应答密切相关^[18]。灵芝子实体中富含 β -glucan,因此本文研究了灵芝颗粒性 β -glucan的提取及其抗肿瘤免疫调节作用。

目前,常采用酸、碱、酶法或与有机溶剂相结合的方法提取 β -glucan^[19]。酸浸提法粗多糖得率高,但含大量其他多糖及蛋白质,需要后续纯化,工艺复杂,且酸法腐蚀性太大,安全性低^[20];酶法生产成本高且较难批量连续生产;碱法浸提相比于上述提取方法简单,具有成本低、易除去变性蛋白质^[21]等优势,是从蘑菇等大型真菌中有效提取高纯度 β -glucan的理想途径^[22],综上所述,本文采用碱浸提GLG。参考Sone^[23]的方法得到GLG的提取得率为6.23%。在此基础上利用Box-Behnken中心组合试验设计原理和响应面分析法优

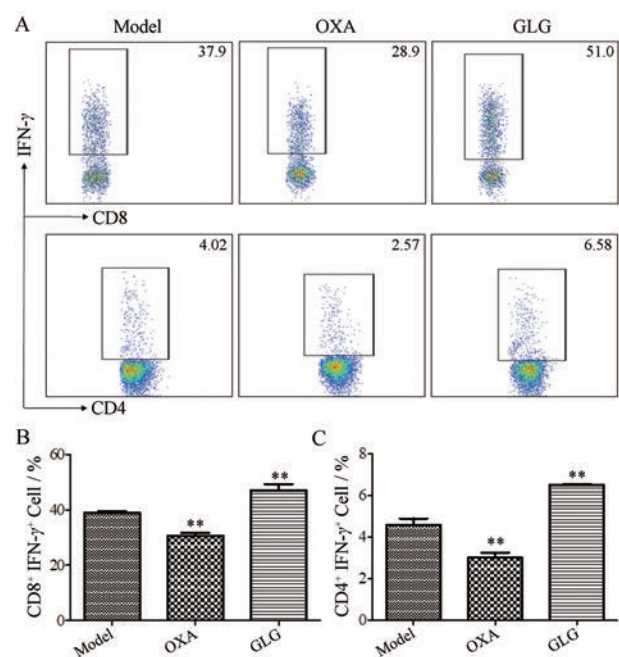


Figure 8 GLG ($800 \mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$) treatment *in vivo* reduces tumor burden and impacts the frequency of T cell in spleens of CT26 tumor-bearing mice. A: Flow cytometry analysis of the frequencies of T cell in the spleens of CT26 tumor-bearing mice treated with phosphate buffer saline (PBS), OXA or GLG; B: Percent of CD8⁺ IFN- γ ⁺ cells; C: Percent of CD4⁺ IFN- γ ⁺ cells. The dot plot are one representative of three independent experiments with similar results. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs model group

选提取条件为提取温度 55°C 、料液比1:20、提取时间8 h, GLG提取得率为8.57%,较原有方法提高了37.56%。利用苯酚-硫酸比色法^[24]测定得到的GLG几乎为纯的葡聚糖,这与Sone等^[23]、Wang等^[25]和Chen等^[26]的实验结果一致。进一步对不同提取条件获得GLG对巨噬细胞活化能力进行筛选,发现 35°C 、 45°C 、 55°C 和 65°C 提取的GLG均能显著促进腹腔静息巨噬细胞分泌IL-6和TNF- α ,且不同GLG之间无显著性差异,提示它们均具有很好的免疫调节能力,因此采用得率最高的 55°C 时提取的GLG进行后续实验。对比苯酚硫酸法和酶法试剂盒法对 β -glucan测定的结果,苯酚硫酸法测定的是总多糖含量,而酶法试剂盒法排除了其他多糖对测定结果的干扰,对 β -glucan的测定具有更强的专一性,因此后续实验采用酶法试剂盒法进行检测^[27]。

巨噬细胞在先天性免疫系统^[28]和适应性免疫系统^[29]中均发挥重要作用。作为肿瘤组织内主要的吞噬细胞,巨噬细胞可将抗原从抗原递呈细胞转移、清除凋亡细胞和碎片并抑制巨噬细胞自身对凋亡细胞吞噬作用的激活,从而诱导抗肿瘤免疫^[30]。相关研究表明,经

口服给药后, 颗粒 β -glucan 可以被巨噬细胞吸收并被转运到脾脏、淋巴组织和骨髓中, 并被骨髓中的巨噬细胞处理释放出小分子可溶性活性 β -glucan, 进一步通过刺激中性粒细胞补体受体 3 (complement receptor 3, CR3), 引发 iC3b 介导的的肿瘤细胞 CR3 依赖性细胞毒性, 这与 β -glucan 在癌症治疗中的作用机制密切相关^[31]。因此, 作者考察了与巨噬细胞活化相关的表面共刺激因子 CD40、CD80、CD86 和 MHC II 的表达变化, 以及促炎细胞因子 TNF- α 、IL-6 的分泌, 证实了 GLG 对巨噬细胞活化的促进作用及对宿主免疫系统功能的活化作用。PRR 存在于固有免疫细胞表面, 是能够识别结合宿主凋亡细胞或病原微生物表面特定分子结构的受体, 具有启动细胞活化、活化补体、吞噬和诱导凋亡等多种生物学功能。吞噬活性的增强也是巨噬细胞活化最显著的特征之一, 活化的巨噬细胞可以与抗原结合, 通过释放溶解酶直接杀灭抗原, 也可以通过巨噬细胞表面 PRR 介导的作用将抗原吞噬摄取^[32]。因此, 考察了 GLG 对腹腔静息巨噬细胞吞噬作用的影响, 发现 GLG 能以浓度依赖性的方式显著促进巨噬细胞对中性红的吞噬; 进一步用巯基乙酸盐肉汤激活巨噬细胞, 并用荧光染料标记 GLG, 观察到 GLG 还能促进巨噬细胞对 GLG-DTAF 的结合与吞噬, 提示 GLG 不仅能提高巨噬细胞的吞噬能力, 还能促进巨噬细胞吞噬 GLG 自身, 提示 GLG 可能在巨噬细胞内进一步裂解为分子量较低的葡聚糖, 持续地发挥免疫刺激作用^[33,34]。

脾脏是成熟淋巴细胞等免疫细胞定居的场所, 也是产生免疫应答的部位。肿瘤特异性效应 T 细胞可以通过淋巴回流从免疫器官转向外周血, 经过一系列的步骤完成肿瘤消除^[35]。在实验中观察到不同浓度的 GLG 能促进小鼠脾淋巴细胞的增殖; 更重要的是, 发现了口服灵芝颗粒性 β -glucan 能够显著提高脾脏中细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocytes, CTL; CD8⁺ IFN- γ ⁺ T cell, T_{eff}) 及辅助性 T 细胞 1 (Th1; CD4⁺ IFN- γ ⁺ T cell) 的分布, 而 CTL 与 Th1 是肿瘤免疫应答中杀伤肿瘤的最关键的细胞^[17]。

本文采用碱提法作为提取方式, 利用响应面优化法来提高灵芝颗粒性 β -glucan 的提取得率, 并对其肿瘤免疫调节活性进行了初步评价, 为灵芝及其多糖的临床抗肿瘤应用提供研究思路, 具有重要的医学价值和实际意义。

References

- [1] Zeng P, Guo Z, Zeng X, et al. Chemical, biochemical, preclinical and clinical studies of *Ganoderma lucidum* polysaccharide as an approved drug for treating myopathy and other diseases in China [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22: 3278-3297.
- [2] Zhang X, Shao J, Ma D, et al. Research on antitumor active components and mechanisms of natural products [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2019, 54: 1-19.
- [3] Xu Z, Chen X, Zhong Z, et al. *Ganoderma lucidum* polysaccharides: immunomodulation and potential anti-tumor activities [J]. *Am J Chin Med*, 2011, 39: 15-27.
- [4] Batbayar S, Lee D, Kim H. Immunomodulation of fungal β -glucan in host defense signaling by dectin-1 [J]. *Biomol Therapeut*, 2012, 20: 433-445.
- [5] Reid DM, Gow NA, Brown GD. Pattern recognition: recent insights from Dectin-1 [J]. *Curr Opin Immunol*, 2009, 21: 30-37.
- [6] Jiang Y, He A, Liu Y, et al. Development of Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (higher basidiomycetes) polysaccharides injection formulation [J]. *Int J Med Mushrooms*, 2014, 16: 411-419.
- [7] Qi C, Cai Y, Gunn L, et al. Differential pathways regulating innate and adaptive antitumor immune responses by particulate and soluble yeast-derived beta-glucans [J]. *Blood*, 2011, 117: 6825-6836.
- [8] Lin Y, Zhao JL, Zheng QJ, et al. Notch signaling modulates macrophage polarization and phagocytosis through direct suppression of signal regulatory protein alpha expression [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1744.
- [9] Wang J, Zhang L, Yu Y, et al. Enhancement of antitumor activities in sulfated and carboxymethylated polysaccharides of *Ganoderma lucidum* [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57: 10565-10572.
- [10] Wang C, Su J, Cai J, et al. Response surface analysis for the optimization of extraction condition for polysaccharides from *Epimedium* polysaccharides and studies on its tumor immune activities [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2016, 51: 1464-1471.
- [11] Wang C, Feng L, Su J, et al. Polysaccharides from *Epimedium koreanum* Nakai with immunomodulatory activity and inhibitory effect on tumor growth in LLC-bearing mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 207: 8-18.
- [12] Ataie-Kachoei P, Morris DL, Pourgholami MH. Minocycline suppresses interleukine-6, its receptor system and signaling pathways and impairs migration, invasion and adhesion capacity of ovarian cancer cells: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e60817.
- [13] Li B, Cai Y, Qi C, et al. Orally administered particulate β -glucan modulates tumor-capturing dendritic cells and improves antitumor T-cell responses in cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16: 5153-5164.
- [14] Li H, Sun M, Xu J, et al. Immunological response in H22 transplanted mice undergoing *Aconitum coreanum* polysaccharide treatment [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 55: 295-300.
- [15] Melssen M, Slingluff CL. Vaccines targeting helper T cells for cancer immunotherapy [J]. *Curr Opin Immunol*, 2017, 47: 85-92.

- [16] Falzone L, Salomone S, Libra M. Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1300.
- [17] Berner VK, duPre SA, Redelman D, et al. Microparticulate β -glucan vaccine conjugates phagocytized by dendritic cells activate both naïve CD4 and CD8 T cells *in vitro* [J]. *Cell Immunol*, 2015, 298: 104-114.
- [18] Devaud C, John LB, Westwood JA, et al. Immune modulation of the tumor microenvironment for enhancing cancer immunotherapy [J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2: e25961.
- [19] Varelas V, Lioumi M, Calokerinos AC, et al. An evaluation study of different methods for the production of beta-D-glucan from yeast biomass [J]. *Drug Test Anal*, 2016, 8: 46-55.
- [20] Ishimoto Y, Ishibashi K, Yamanaka D, et al. Production of low-molecular weight soluble yeast β -glucan by an acid degradation method [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 107: 2269-2278.
- [21] Zheng Z, Huang Q, Luo X, et al. Effects and mechanisms of ultrasound- and alkali-assisted enzymolysis on production of water-soluble yeast β -glucan [J]. *Bioresource Technol*, 2019, 273: 394-403.
- [22] Ruthes AC, Smiderle FR, Iacomini M. D-glucans from edible mushrooms: a review on the extraction, purification and chemical characterization approaches [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 117: 753-761.
- [23] Sone Y, Okuda R, Wada N, et al. Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum* [J]. *Agric Biol Chem*, 1985, 49: 2641-2653.
- [24] Dubois M, Gilles K, Hamilton JK, et al. A colorimetric method for the determination of sugars [J]. *Nature*, 1951, 168: 167.
- [25] Wang J, Zhang L. Structure and chain conformation of five water-soluble derivatives of a β -D-glucan isolated from *Ganoderma lucidum* [J]. *Carbohydr Res*, 2009, 344: 105-112.
- [26] Chen J, Zhou J, Zhang L, et al. Chemical structure of the water-insoluble polysaccharide isolated from the fruiting body of *Ganoderma lucidum* [J]. *Polym J*, 1998, 30: 838-842.
- [27] Danielson ME, Dauth R, Elmasry NA, et al. Enzymatic method to measure β -1,3- β -1,6-glucan content in extracts and formulated products (GEM assay) [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 10305-10308.
- [28] Li B, Cramer D, Wagner S, et al. Yeast glucan particles activate murine resident macrophages to secrete proinflammatory cytokines *via* MyD88- and Syk kinase-dependent pathways [J]. *Clin Immunol*, 2007, 124: 170-181.
- [29] Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression [J]. *Genes Dev*, 2018, 32: 1267-1284.
- [30] DeNardo DG, Ruffell B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy [J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19: 369-382.
- [31] Hong F, Yan J, Baran JT, et al. Mechanism by which orally administered beta-1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models [J]. *J Immunol*, 2004, 173: 797-806.
- [32] Tang J, Zhen H, Wang N, et al. Curdlan oligosaccharides having higher immunostimulatory activity than curdlan in mice treated with cyclophosphamide [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 207: 131-142.
- [33] Germic N, Frangez Z, Yousefi S, et al. Regulation of the innate immune system by autophagy: monocytes, macrophages, dendritic cells and antigen presentation [J]. *Cell Death Different*, 2019, 26: 715-727.
- [34] Goodridge HS, Reyes CN, Becker CA, et al. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse' [J]. *Nature*, 2011, 472: 471-475.
- [35] de Graaff P, Govers C, Wichers H J, et al. Consumption of beta-glucans to spice up T cell treatment of tumors: a review [J]. *Exp Opin Biol Ther*, 2018, 18: 1023-1040.