

虫草多糖的结构特征及其抗肿瘤活性

詹忠根*, 叶素丹, 黄伟素

(浙江经贸职业技术学院, 生物制药教研室, 浙江 杭州 310018)

摘要: 多糖是虫草的主要生物活性成分之一, 具有较强的抗肿瘤活性, 能抑制神经母细胞瘤、黑色素瘤、肺癌、结肠癌等多种癌症。最近几十年来, 虫草多糖已引起生物医学领域的极大关注, 并吸引了众多学者开展相关研究。文章在分析虫草多糖结构特征的基础上, 从增强免疫调节作用、抑制肿瘤细胞生长、降低肿瘤转移风险等3个方面综述了虫草多糖的抗肿瘤作用机制, 并提出未来亟待深入研究的科学问题, 以为后续研究提供参考。

关键词: 虫草多糖; 结构特征; 抗肿瘤活性; 免疫调节; 细胞凋亡

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)02-0285-13

Structural characteristics and antitumor activity of polysaccharides from *Cordyceps* species

ZHAN Zhong-gen*, YE Su-dan, HUANG Wei-su

(Biopharmaceutical Laboratory, Zhejiang Institute of Economics and Trade, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Polysaccharides is one of the main bioactive components of *Cordyceps* species, because of the potential clinical value with stronger anti-tumor, such as anti-neuroblastoma, anti-melanoma, anti-lung cancer, anti-colon cancer and so on, its have received widespread attention in biomedical field and increasing research in last decades. According to structural elucidation, this review gives a systematic literature overview on antitumor mechanism of *Cordyceps* species-derived polysaccharides from three aspects, including inhibition of tumor cell growth, enhancement of immunomodulatory activity and reduction of tumor metastasis. Finally, it also puts forward some scientific problems for follow up research.

Key words: polysaccharides from *Cordyceps* species; structural characteristics; antitumor activity; immunomodulatory; apoptosis

虫草是一类寄生于昆虫、少数真菌或植物体的一类真菌的总称, 隶属于虫草菌科 (Cordycipitaceae)、麦角菌科 (Clavicipitaceae)、线虫草菌科 (Ophiocordycipitaceae) 等, 目前已鉴定出 750 余种, 主要分布于亚洲、欧洲和北美^[1]。冬虫夏草 (*C. sinensis*)、蛹虫草 (*C. militaris*) 等药用虫草作为传统的名贵滋补中药已有数百年的历史, 且随着研究的深入, 越来越多的虫草被证

明具有较高的药用价值, 如蝉花虫草 (*C. cicadae*)、粉被虫草 (*C. spruinosa*)、大团囊虫草 (*C. ophioglossoides*)、九洲虫草 (*C. kyushuensis*)、古尼虫草 (*C. gunnii*) 等至少 35 种虫草被报道含有药理活性成分, 并从中分离出核苷、多糖、生物碱和酚类等 200 多种活性物质^[2]。

多糖是虫草重要的生物活性物质之一, 含量丰富, 是虫草产品开发和质量控制的主要目标。通常, 从虫草子实体、僵虫体、菌丝体中提取的多糖称为胞内多糖, 从发酵液中提取的多糖称为胞外多糖, 两类多糖均具有免疫调节、抗肿瘤、降血糖、抗氧化、抗纤维化、抗疲劳、肾脏保护和辐射防护等多种药理作用^[2]。近年来, 多位学者^[1,3-6]分别从不同角度综述了蛹虫草、冬虫

收稿日期: 2022-05-29; 修回日期: 2022-09-21.

基金项目: 浙江省省属高校基本科研业务费项目 (21SBYB08); 浙江省自然科学基金 (LGN18C200026).

*通讯作者 Tel: 86-571-81062694, E-mail: zhgz9321@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0670

夏草等多糖的提取、纯化、化学结构及其生物活性,但除 Lee 等^[7]对蛹虫草多糖的免疫调节活性进行专题综述外,鲜有学者就虫草多糖的抗肿瘤活性单独进行归纳整理。鉴于虫草多糖生产周期短、易于分离纯化,抗肿瘤活性较强,对肺癌、神经母细胞瘤、结肠癌、乳腺癌、黑色素瘤、宫颈癌等均有抑制作用^[8-13],且具有毒性小、作用广、靶点多,以及明显的化疗增敏作用、降低化疗药物不良反应等优势,已在生物医学领域引起了极大关注,并取得显著进展。为此,本文在分析虫草多糖结构特征的基础上,从增强免疫调节作用、抑制肿瘤细胞生长、降低肿瘤转移风险等 3 个方面综述虫草多糖的抗肿瘤作用机制,以期为后续研究提供参考。

1 虫草多糖结构特征

1.1 虫草多糖的单糖组成、分子量及化学结构

根据结构表征,已分离的虫草多糖既有均多糖,也有杂多糖。均多糖以葡聚糖为主,大部分主链结构为 (1→4)- α -D-吡喃葡萄糖 (glucopyranose, Glcp) (如野生冬虫夏草中提取的多糖 NCSP-50^[14]、菌丝体中提取的 OSP^[15]), 少部分为 (1→3)- β -Glcp (如冬虫夏草胞外多糖 EPS1^[16]) 或 (1→4)- β -Glcp (如冬虫夏草菌丝体提取的 UM01-S1^[17]) 等其他结构。杂多糖的单糖组成可分为两类,一类仅由甘露糖 (mannose, Man)、葡萄糖 (glucose, Glc) 和半乳糖 (galactose, Gal) 组成,如蛹虫草多糖 CMP-W1、CMP-S1, 其 Man:Glc:Gal = 2.84:1.00:1.29 和 2.05:1:1.09^[18]; 另一类除 Man、Glc、Gal 外,还含有鼠李糖 (rhamnose Rha)、阿拉伯糖 (arabinose, Ara)、木糖 (xylose, Xyl) 等其他单糖,如冬虫夏草菌丝体多糖 HSP-III, Rha:Ara:Xyl:Man:Glc:Gal = 1.00:2.44:13.11:74.13:13.80:54.39^[19]。

虫草多糖的平均分子量相差较大,介于~1 kDa 到~10³ kDa 之间,低分子量多糖仅为 1 kDa (如野生冬虫夏草中提取的多糖 P3^[20]),高分子量多糖达 5 442 kDa (如冬虫夏草 UM01 中提取的多糖 UM01-S1^[17]),而蝉花虫草菌丝体中提取的多糖 CCP 分子量更是高达 6 907.26 kDa^[13]。

虫草多糖的主链大多含有 (1→4)- α -D-糖苷键。Wu 等^[21]采用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PACE) 结合高效薄层色谱 (HPTLC) 法分析了包括冬虫夏草在内的 7 种虫草的野生个体、人工培养子实体和菌丝体共 36 个样品的多糖,发现野生和人工培养的冬虫夏草、人工培养的蛹虫草、野生黑槌虫草和蝉花虫草中分离的多糖均含有 (1→4)- α -D-糖苷键、(1→4)- β -D-糖苷键和 (1→4)- α -半乳糖苷键。连续分析 39 批人工培养的蛹虫草子实体也证实 (1→4)- α -D-糖苷键、(1→4)- β -D-糖苷键是其多糖的共同特征^[22]。最近, Li 等^[23]通过分析 250 个

样品,从中分离到一种可作为标记物的特异生物活性葡聚糖 CCP,主链为 α -(1→4)-D-Glcp。虽然虫草多糖的主链结构有一定的相似性,但是不同的虫草多糖,其侧链结构通常相差较大,即便是同一种虫草,其野生和人工培养个体中分离的多糖也存在较大差异。如 P1、P2 和 P3 是从野生冬虫夏草分离的多糖,由不同比例的 Man、Glc、Gal 三种单糖组成,结构相似,主链为 (1→4)- α -Glc,侧链为 (1→3)- α -Glc 和 (1→2)- α -Man。而从其菌丝体中分离的多糖 P4,虽然主链也含有 (1→4)- α -Glc 和 (1→4)- α -Gal,但侧链含有 1→2、1→6、1→2,6 和 1→4,6 连接的 Man 残基, (1→5) 连接 Ara 残基, (1→3) 和 (1→4,6) 连接的 Glc 残基^[20]。

虫草多糖的化学结构受多种因素的影响,变化较大。Huang 等^[24]分别以 1/5、2/5、1、2 和 5 体积比的乙醇梯度沉淀冬虫夏草发酵液,相应得到 47 400、4 700、2 870、630 和 16 kDa 等 5 种分子量相差巨大的胞外多糖。Yan 等^[25]比较了热水提取和碱提取的两种冬虫夏草多糖的结构和药理活性差异。虽然两种多糖分子量相近 (分别为 1 180 和 1 150 kDa),均为 (1→4)- α -D-Glcp 结构的葡聚糖,不同的是热水提取的多糖具有 (1→6)- α -D-Glcp 的短支链,而碱提取的多糖是线性葡聚糖,但该多糖具有更强的抗癌和免疫刺激作用。而从冬虫夏草菌丝体分离的两种多糖 CPS1 和 CPS-2,仅纯化条件存在差异,但两者在单糖组成、分子量和主链结构等方面存在很大差异。用规格为 2.5 cm × 28 cm 的 DEAE-52 纤维素柱, 0~1 mol·L⁻¹ NaCl 溶液分步洗脱分离的 CPS1, Glc:Man:Gal = 2.8:2.9:1, 分子量为 8.1 kDa, 主链为 (1→2) 和 (1→4)-Man、(1→3)-Gal、(1→) 和 (1→3,6)-Glc^[26]。用规格为 4.5 cm × 30 cm 的 DEAE-52 纤维素柱, 0.05 mol·L⁻¹ NaCl 溶液以 30 mL·h⁻¹ 速率洗脱分离得到的 CPS-2 分子量为 43.9 kDa, 主链为 (1→4)- α -D-Glc 和 (1→3)- α -D-Man^[27]。另外,分别从培养在大米培养基和蚕蛹上的蛹虫草分离的两种酸性多糖, CM-jd-CPS2 的葡萄糖含量高, Man:Glc:Gal = 1.52:8.53:1.00, 是一种 α -糖苷键连接含有乙酰氨基的硫酸化酸性多糖。而 CM-jd(Y)-CPS2 中 Man 含量高, Man:Glc:Gal = 3.11:1.00:2.12, 通过 β -糖苷键相连, 是一种羧化多糖, 免疫调节活性更强^[28]。上述研究表明, 提取方法、纯化条件、培养基质等多种因素均可对虫草多糖的化学结构产生显著影响。

1.2 虫草多糖化学结构与其抗肿瘤作用

虫草多糖的抗肿瘤活性与 (1→4)- α -D-Glcp 糖基密切相关。具有 (1→4)- α -D-Glcp 糖基的葡聚糖 CCP 在低浓度下即可促进 RAW264.7 巨噬细胞产生一氧化氮 (nitric oxide, NO) 和白细胞介素 (interleukin, IL)-6、

肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α 等细胞因子^[23], 主要由 (1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp, (1 \rightarrow 6)- β -D-Glcp 和 (1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp 糖基构成的 *C. militaris* 多糖 CMP-1 在体外能抑制多种肿瘤细胞增殖^[29]。分别从 *C. militaris* 菌丝体和子实体中提取的多糖 CMPS II、CBPS II, 均具有三螺旋结构、分子量相近、化学结构主链/侧链均为 (1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp/(1 \rightarrow 3)-半乳糖甘露聚糖。然而, 由于 CMPS II 葡萄糖含量更高, 比 CBPS II 拥有更多的 (1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp, 显示出更强的抗肿瘤作用^[30,31]。除含有 (1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp 糖基的多糖外, 含 (1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp 和 (1 \rightarrow 3)- α -D-Glcp 的蛹虫草多糖 CMPB90-1^[32], 含 (1 \rightarrow 2)- α -D-吡喃甘露糖 (mannopyranose, Manp) 和 (1 \rightarrow 6)-Manp 的葡萄糖半乳糖甘露聚糖, 以及其他多种结构的多糖也能通过增强免疫调节活性, 间接发挥抗肿瘤作用^[33,34]。

分子量、单糖组成是影响虫草多糖抗肿瘤活性的另一重要因素。CMPS-4 和 CMPS-80 是从蛹虫草中提取的具有相同单糖组成和 α -糖苷键, 仅分子量 (分别为 188 和 308 kDa) 有差异的两种多糖, 但在相同的实验条件下, CMPS-4 对人食管癌细胞 Eca-109 的抑制效果优于 CMPS-80^[35]。而用碱水提取的蛹虫草多糖 CMPB90-1 (5.8 kDa, Man:Gal:Glc = 3.04:1.00:1.45) 与用热水提取的蛹虫草多糖 CMP-1 (4.3 kDa, Rha:Glc = 0.89:22.5), 平均分子量相近, 但单糖组成差异较大。有趣的是, CMP-1 对脾淋巴细胞增殖能力的免疫刺激活性比 CMPB90-1 更强, 刺激浓度分别为 0.97~62.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 31.2~500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[29,32]。

有文献^[36]表明, 化学修饰可提高虫草多糖的抗肿瘤活性。两种蛹虫草多糖 CPS 和 SeCPS-I, 具有相似单糖组成和化学结构, 但 SeCSP-I 在体外表现出更强的清除羟基和超氧自由基活性。且硒含量分别为 541.3、

863.7 和 623.3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 的 3 种硒多糖 SeCPS-I、SeCPS-II、SeCPS-III, 其抗肿瘤活性依次为 SeCPS-II > SeCPS-III > SeCPS-I, 与硒含量一致^[37]。此外, 硫酸化也可增强虫草多糖的细胞毒性, 蛹虫草子实体多糖 CMPA90-1 [Ara:Man:Gal = 1.00:2.89:2.03, 主链为 (1 \rightarrow 3)- α -D-Gal], 化学改性前该多糖的超微结构显示表面粗糙, 呈片状, 由许多小块状颗粒和不规则孔隙组成, 对 A549 细胞的 IC₅₀ 为 39.08 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。将其硫酸化后, 表面变得光滑, 有孔隙, 主要由直径约为 2 μm 随机分布的单个球形颗粒组成, 细胞毒性显著增强, 对 A549 细胞 IC₅₀ 提高为 17.33 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[38]。

2 虫草多糖抗肿瘤活性

2.1 增强免疫调节作用

免疫治疗被喻为最有希望治愈癌症的新兴医疗手段, 已临床应用的 PD-1 单抗疗法不良反应远低于传统化疗药物。虫草多糖本身细胞毒性不强, 但可触发和/或增强自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞、细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 和巨噬细胞的肿瘤细胞杀伤能力, 刺激巨噬细胞、T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞分泌 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-2 等细胞因子增强免疫调节作用, 间接发挥抗肿瘤活性, 是一种理想的免疫调节剂 (图 1), 分子机制如图 2 所示。

2.1.1 调节先天性免疫功能

2.1.1.1 促进单核细胞分化

单核-巨噬细胞是连接先天性和适应性免疫应答的桥梁, 能吞噬、消化凋亡细胞和病原体, 单核细胞分化为巨噬细胞是早期免疫反应的关键步骤。虫草多糖具有促进单核细胞分化的作用, 可上调单核细胞表面分化抗原 (cluster of differentiation, CD) 协同刺激分子表达, 促进其分化为树突状细胞、巨噬细胞, 进而提高抗原提呈能力。研究表明, 含 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 冬虫草子实体多糖 PSCS 的条件培养基

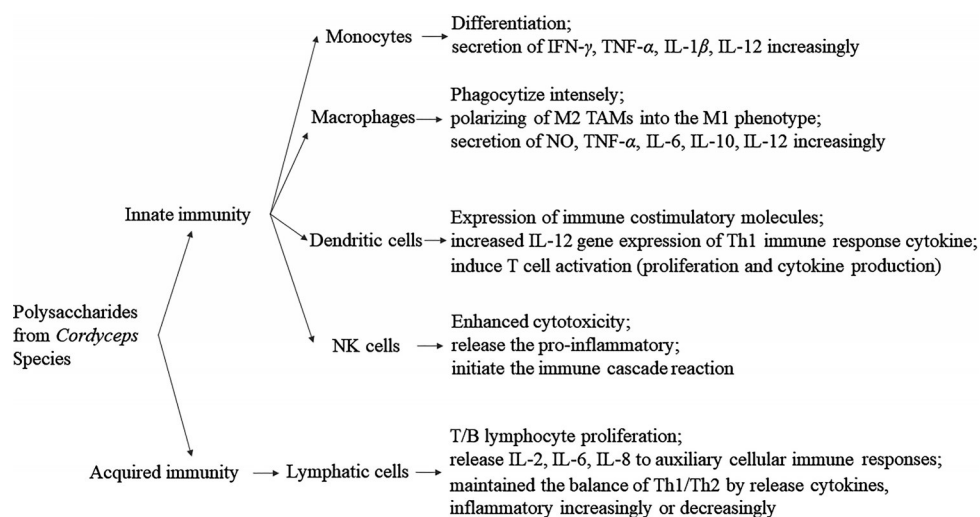


Figure 1 Summary immunomodulatory activity of polysaccharides from *Cordyceps* species. NK cells: Natural killer cells; INF: Interferon; TNF: Tumor necrosis factor; IL: Interleukin; M1/2: Macrophages 1/2; NO: Nitric oxide; Th1/2: Helper T lymphocyte 1/2

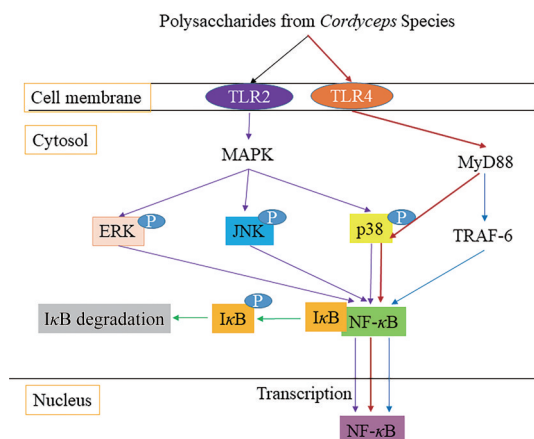


Figure 2 The immunomodulatory activity and antitumor effect of polysaccharides in *Cordyceps* species. Purple arrows represent *Cordyceps* species-derived polysaccharides bind to TLR2, via up-regulation of the MAPK/NF- κ B pathway, including phosphorylation of ERK, JNK and p38. Red and blue arrows indicate it also increases immunomodulatory activity and shows anti-tumor activity indirectly by TLR4/MyD88/p38 axis and TLR4/TRAF6/NF- κ B p65 axis. TLR2: Toll-like receptor 2; NF- κ B: Nuclear factor kappa-B; ERK: Extracellular regulated kinase; JNK: C-Jun kinase; MyD88: Myeloid differentiation factor 88; TRAF6: TNF receptor associated factor 6

能促进外周血单核细胞 (PSCS-MNC-CM) 分泌免疫调节因子 IFN- γ 、TNF- α 、IL-1, 并以 IFN- γ 、TNF- α 为主协同抑制白血病细胞 U937 的增殖 (抑制率为 78%~83%), 同时上调 U937 细胞表面抗原 CD11b、CD14、CD68 和非特异性酯酶表达, 诱导约 50% 的 U937 细胞分化为具有吞噬和产生超氧化物活性的单核细胞/巨噬细胞^[39]。1~100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 蛹虫草阿拉伯半乳糖型酸性多糖 APS [Gal:Ara:Xyl:Rha = 9.1:4.3:1.2:1, 主链为 1 \rightarrow 呋喃阿拉伯糖 (arabinofuranose, Araf)、(1 \rightarrow 5)-Ara、(1 \rightarrow 4)-Galp 和 (1 \rightarrow 4)-半乳糖醛酸 (galacturonic acid, GalAp)] 处理 48 h 后, THP-1 人单核细胞 (TIB202) 细胞表面特征分子 CD36 表达上调, 吞噬能力增强, TNF- α 、IL-12 p40、IL-8 及 TLR2、TLR4 的 mRNAs 水平提高, 诱导 TIB202 向巨噬细胞分化^[40]。50~250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 蛹虫草菌体多糖 PS-MCM 在单核细胞中发挥 M1 样诱导作用, 促进 IL-1 β 和 IFN- γ 等细胞因子产生, 提高 EL-4 T 细胞和 THP-1 单核细胞免疫活性, 减弱化疗药物多柔比星对单核细胞的细胞毒作用^[41]。15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 冬虫草菌丝体多糖 UM01 PS [Glc:Man:Gal = 100:59:17, 由 (1 \rightarrow 6)- α -D-糖苷键连接] 处理小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 24 h 后, 协同刺激因子 CD80/D86, 树突状细胞 (dendritic cells, DCs) 表面特征分子 CD11c 和主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex,

MHC) II 显著提高, 诱导 RAW264.7 分化为 DC-like 细胞^[42]。上述研究表明, 虫草多糖能有效促进单核细胞分化及其免疫活性。

2.1.1.2 诱导 M1 巨噬细胞极化 活化的巨噬细胞能够识别和裂解包括对化疗耐药细胞在内的肿瘤细胞, 在宿主防御和恶性肿瘤方面发挥重要作用。根据活化状态、发挥功能及分泌因子的不同, 可将巨噬细胞区分为 M1 型和 M2 型。

M1 巨噬细胞由 T 辅助型 1 (Th1) 细胞因子 (如 IFN- γ 、IL-2) 活化, 高表达促炎因子 NO、TNF- α 和细胞表面特征分子 MHC-II、CD86, 在炎症早期承担重要作用, 能杀死病原体和肿瘤细胞。具有 (1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp 糖基的葡聚糖 HSWP-2a 通过激活 p38、c-Jun 末端激酶 (C-Jun N-terminal kinase, JNK) 和 NF- κ B 信号通路, 增强 RAW264.7 巨噬细胞吞噬作用, 增加 NO、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 分泌^[43]。由 (1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp (~70%)、(1 \rightarrow 4, 6)- α -D-Manp 和 (1 \rightarrow 2, 6)- α -D-吡喃半乳糖 (galactopyranose, Galp) 糖基构成的多糖 CMP-III 可上调 MAPK [细胞外信号调节激酶 (extracellular-signal-regulated kinase, ERK)、JNK 和 p38 磷酸化]/NF- κ B 途径促进巨噬细胞提高吞噬能力和分泌 NO、TNF- α 和 IL-6^[44]。(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp 糖基的葡聚糖 CCP 对 TLR4/MyD88/p38 信号通路具有高度选择性^[45]。

M2 巨噬细胞通过 T 辅助型 2 (Th2) 细胞因子 (如抗炎因子 IL-4、IL-13 和 IL-10 及免疫复合物) 活化, 低表达促炎因子而高表达抗炎因子及细胞表面的甘露糖受体 (mannose receptor, MR) 和清道夫受体 (scavenger receptor, SR), 发挥免疫抑制作用。实体瘤中, M1 和 M2 巨噬细胞同时存在, 但肿瘤相关巨噬细胞 (TAM) 大多为 M2 型, 可促进肿瘤血管生成、肿瘤细胞存活和转移, 抑制 T 淋巴细胞介导的 Th1 免疫应答, 并释放免疫抑制因子, 如转化生长因子 (transforming growth factor, TGF)- β , 抑制 NK 细胞的肿瘤毒杀作用。促进巨噬细胞活化, 诱导 M2 巨噬细胞向 M1 极化是虫草多糖发挥免疫调节作用的机制之一。从冬虫草菌丝体分离的一种酸性多糖 APSF (12.5~100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Man:Glc:Gal=3.5:1.00:1.5) 能诱导被小鼠肝癌细胞 H22 极化为 M2 型的巨噬细胞 (Ana-1) TNF- α 、IL-12、iNOS 表达增加, 降低 IL-10 及 SR、MR 表达, 促进巨噬细胞从 M2 型向 M1 型极化^[46]。从人工培养的蛹虫草子实体中提取的低分子量多糖 CMPB90-1, 31.3~500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CMPB90-1 处理巨噬细胞 RAW264.7 48 h 后, 其吞噬活性增加, M1 型巨噬细胞表面特征分子 CD86 和 MHC-II 表达上调而 M2 型巨噬细胞表面特征分子 CD206 表达下调, 并且 TNF- α 、NO 等促炎因子分泌增加, 表明

CMPB90-1 具有诱导巨噬细胞 M1 极化, 提高免疫活性的功能^[32]。进一步研究表明, CMPB90-1 诱导 M2 巨噬细胞向 M1 极化是通过抑制 TAM 细胞表面的程序性死亡配体-1 (programmed death ligand-1, PD-L1) 表达, 从而激活 T 淋巴细胞对肿瘤细胞的杀伤力^[47]。另外, 当 RAW264.7 置于具有 (1→2)- α -D-Manp 主链的蛹虫草子实体多糖 SDQCP-1 ($50\sim 200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 48 h 后, M1 型巨噬细胞表面特征分子 CD86 比 M2 型细胞表面特征分子 CD206 增加更为显著, 表明 SDQCP-1 也具有诱导巨噬细胞向 M1 型极化的能力^[31]。值得注意的是, $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ SDQCP-1 刺激产生的 NO 生成量为 $23.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 比对照提高 37%, $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ SDQCP-1 刺激产生的 IL-10、IL-6 和 TNF- α 分别为 189.6、214.0 和 $220.4\ \text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。而另一具有 (1→2)- α -D-Manp 主链的冬虫夏草菌丝体多糖 UM01-S4 ($0.6\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 刺激产生的 IL-6、IL-10 和 TNF- α 分别为 2 454.6、6 259.1 和 $10\ 924.2\ \text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[48], 显著高于 $1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 主链为 (1→)-Araf、(1→5)-Araf、(1→4)-Galp 和 (1→4)-GalAp 的蛹虫草酸性多糖 APS 的 NO 生成量 (低于 $8.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[49]。上述研究结果可能预示具有 (1→2)- α -D-Manp 主链结构的虫草多糖具有更强的免疫调节能力。

虫草多糖促进 M1 巨噬细胞极化与 TLR 受体、MAPK/NF- κ B 信号通路密切相关。多项研究表明, 虫草多糖被 M2 型巨噬细胞识别后, 刺激 MAPK 信号相关的 ERK、JNK 和 p38 磷酸化, 通过 I κ B-NF- κ B 信号通路上调 M1 型巨噬细胞特征分子表达和释放促炎因子、趋化因子, 实现 M2 型巨噬细胞向 M1 型极化^[32,46,47]。其中, CMPB90-1 促进 M1 型巨噬细胞极化的机制研究最为详细, 即虫草多糖在识别 M2 型巨噬细胞 RAW264.7 或骨髓源巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophages, BMMs) 表面的模式识别受体 TLR2 后被运输进入细胞激活 Ca²⁺ 信号, 随着 Ca²⁺ 的释放, p38、Akt 和 I κ B-NF- κ B 信号通路相关的 p65、I κ B- α 相继被磷酸化, 所释放的 NF- κ B 被转运进入细胞核并作用于 DNA, 调节下游基因表达^[32,47]。

2.1.1.3 诱导 DCs 成熟和活化 DCs 是功能最强大、最有效的抗原递呈细胞, 成熟的 DCs 会迁移到次级淋巴器官的 T 细胞区域, 与 MHC-II、协同刺激分子 (CD40、CD80/86) 等共同致敏 CD8⁺ T 细胞, 发挥监视、杀伤、消灭肿瘤的作用。然而, 肿瘤微环境中的 DCs 受肿瘤细胞分泌的血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、肿瘤生长因子 β (tumor growth factor-beta, TGF- β) 等抑制, 大多呈未成熟状态。肿瘤微环境对 DCs 的抑制作用显著提高了肿瘤的免疫治疗难度, 如何有效诱导 DCs 成熟, 成为癌症治疗研究的热

点之一。目前认为, 包括虫草多糖在内的多种来源的多糖可作为 DCs 成熟的免疫调节剂候选物。研究表明, $10\sim 100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 蛹虫草菌丝体多糖 Cordlan (APS) 处理小鼠未成熟 DCs 24 h 后, 其表型和功能发生 3 种变化^[49,50]: ① 细胞表面特征分子 MHC-I/II 和共刺激分子 CD40、CD80/86 表达增加, 诱导未成熟 DCs 表型成熟; ② 抗原递呈能力下降, 内吞功能减弱, 上调 Th1 免疫反应的主要细胞因子 IL-12、IL-1 β 和 TNF- α 基因表达, 诱导未成熟 DCs 功能成熟; ③ cordlan 处理的 DCs 细胞与 T 细胞混合培养 3~5 天后, T 细胞数量增加, 促进活化后的 T 细胞产生 IFN- γ 和 IL-2 等细胞因子, 活化同种异体 T 细胞。Huang 等^[51] 用 $25\sim 100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 冬虫夏草发酵液胞外多糖 EPS (Man:Glc:Gal = 23:1:2.6) 研究了其对未成熟 DCs 的影响, 发现通过增加 IL-12 和降低 VEGF 水平, 促进未成熟 DCs 细胞表面的白细胞抗原 DR、共刺激分子表达和增强 T 细胞刺激能力。此外, Meng 等^[42]、Song 等^[52] 分别评估了冬虫夏草两种多糖 UM01 PS [Glc:Man:Gal = 100:59:17, 主链为 (1→6)- α -D-糖苷键]、EPS (Man:Glc:Gal = 23:1:2.6) 对小鼠 DCs 的影响, 也发现其具有促进小鼠 DCs 表型和功能成熟的能力。

虫草多糖诱导 DC 成熟可能涉及 TLR4 信号通路和 STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) 磷酸化。Cordlan 诱导 C3H/HeN 小鼠 *Tlr4*^{+/+} DCs 成熟, 但不诱导 C3H/HeJ 小鼠 *Tlr4*^{-/-} DCs 成熟, 表明 TLR4 信号通路参与 Cordlan 诱导 DCs 成熟。Cordlan 与 TLR4 受体结合后, 促进下游信号分子 ERK、p38 和 JNK 磷酸化以及 NF- κ B p50/p65 核易位^[51]。而冬虫夏草胞外多糖 EPS 在提升细胞核内 NF- κ B p65 的同时, 下调 p-JAK2 (Janus kinase 2)、p-STAT3 和细胞质中 NF- κ B p105 水平^[51-53]。以上研究提示, 虫草多糖通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路和促进 TLR4/NF- κ B 信号途径诱导 DCs 成熟。虫草多糖对 DCs 成熟的诱导作用在慢性粒细胞白血病 (CML) 疫苗制备方面有一定的应用潜力, 与多糖孵育的 CML-DC 可通过产生 CD86 和 HLA-DR, 增强异基因混合淋巴细胞反应 (MLR) 中 IL-12 的表达和刺激能力, 提高 T 细胞免疫应答能力^[54]。

2.1.1.4 提升 NK 细胞毒杀能力 NK 细胞对病毒和肿瘤有很强的清除能力, 能分泌 IFN- γ 等细胞因子促进其他免疫细胞的分化、激活和募集, 以调节天然免疫和适应性免疫, 能抑制肿瘤生长和转移。NK 细胞可被活化的巨噬细胞或 DCs 分泌的 IL-12 激活, 也可由细胞因子 IL-2 诱导 T 细胞分泌的 IFN- γ 来活化。多糖可通过促进其他免疫介质或细胞成分间接激活 NK 细胞, CMPB90-1 ($31.2\sim 500\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理后, 促进 T 淋

巴细胞分泌 IL-2, 提升 NK 细胞对小鼠淋巴瘤细胞 YAC-1 的杀伤力, 增强对肿瘤细胞的非特异性和特异性细胞溶解作用^[32]。给予每只小鼠 20~500 μg 冬虫夏草菌丝体胞外多糖 EPS, 能刺激巨噬细胞活化并分泌 IL-12、TNF- α , 并激活 NK 细胞抑制结肠癌细胞 26-M3.1 肺转移^[55]。500 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 古尼虫草多糖 PPS 处理后, 通过 TLR4/TRAF6/NF- κB p65 信号通路促进 IFN- γ 、IL-2、IL-12、IgG 分泌, 抑制 TGF- β 产生, 提升环磷酰胺 (cyclophosphamide, CTX) 免疫抑制小鼠的 NK 细胞和 CTL 活力, 恢复免疫抑制小鼠的免疫应答能力^[56]。相似的, 50~200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 蝉花虫草孢子多糖 CCSP-2 (Man:Glc = 5.73:94.27) 具有增加脾脏和胸腺指数, 增强巨噬细胞吞噬活性, 刺激脾细胞增殖, 激活巨噬细胞, 刺激 T、B 淋巴细胞增殖, 增强 NK 细胞毒性, 上调 TNF- α 、IL-1 β 表达和 IgA、IgG、IgM 分泌, 改善 CTX 诱导的免疫抑制, 具有良好的免疫调节作用^[57]。

2.1.2 调节获得性免疫功能

I型和II型免疫的相互平衡对身体健康至关重要。I型免疫与细胞毒功能有关, 包括NK细胞、Th1细胞和CD8⁺T细胞的活性, 主要具有清除肿瘤细胞或病原体细胞的作用。II型免疫与TGF- β 的免疫抑制功能相关, 主要具有抗细菌和抗病毒活性。研究表明, 虫草多糖通过促进淋巴细胞增殖和调节辅助性T淋巴细胞Th1/Th2平衡等促进I型和II型免疫保持平衡。

2.1.2.1 促进淋巴细胞增殖 淋巴细胞增殖是反映细胞免疫的重要指标, 常用于检测多糖的免疫增强活性。50~200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 蛹虫草酸性多糖 CM-jd-CPS2 和 CM-jd(Y)-CPS2 能促进小鼠脾细胞分裂, 对 ConA 和 LPS 诱导的小鼠 T、B 淋巴细胞具有协同促进作用^[28], 10~100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 冬虫夏草多糖 Cordysinocan (Glc:Man:Gal = 2.4:2:1) 在诱导 T 淋巴细胞增殖的同时, 还分泌 IL-2、IL-6、IL-8 等细胞因子, 诱导 ERK 磷酸化, 增加巨噬细胞吞噬活性和酸性磷酸酶活性^[58]; 由 (1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp 组成的酸性胞外多糖 AESP-II 通过促进 ERK、p38 和 JNK 的磷酸化, 诱导 T 淋巴细胞分泌 IL-2、IL-4、干扰素 (interferon, IFN)- γ 等细胞因子和 B 淋巴细胞分泌 IgG、IgM、IgA 免疫球蛋白, 发挥免疫调节功能^[59]。5~250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 蛹虫草多糖 CP2-c2-s2 (β -吡喃多糖, 含有 1 \rightarrow 2、1 \rightarrow 4、1 \rightarrow 6 糖基) 通过上调巨噬细胞释放 NO/活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和分泌细胞因子 (IL-1 β 、IFN- γ 和 TNF- α) 刺激 T、B 淋巴细胞增殖, 相同浓度的 CP2-c2-s2 对 T、B 淋巴细胞增殖作用强于香菇多糖^[60,61]。此外, 31.2~500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CMPB90-1 能通过上调 CD4⁺T 辅助淋巴细胞亚群, 提高 CD4⁺/CD8⁺淋巴细胞比值, 改善 T 淋巴细胞免疫功能^[32]。可

见, 虫草多糖促进淋巴细胞增殖的研究是多层面的, 既有 T/B 淋巴细胞的增殖及淋巴细胞亚群调控, 也有细胞因子分泌及抗体表达研究, 但系统的分子机制解析还报道不多, 其免疫应答信号通路仍未明晰。

2.1.2.2 调节 Th1/Th2 细胞平衡 Th1 细胞和 Th2 细胞是 CD4⁺T 细胞的两种效应表型, Th 细胞亚群的免疫应答可通过释放不同类型的细胞因子来调节。其中, Th1 免疫应答产生 IL-2、TNF- α 、INF- γ 、IL-2、IL-12 等细胞因子, Th2 免疫应答产生细胞因子 IL-6、IL-9、IL-10、IL-13。调节 Th1/Th2 细胞平衡是虫草多糖发挥免疫调节作用的重要机制, 研究表明, 50~200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 古尼虫草多糖 PS 通过上调 IFN- γ 和 TNF- α , 下调 IL-4 等关键因子表达来维持 Th1/Th2 平衡^[62]。适当剂量的冬虫夏草多糖 PS (Glc:Man:Ara:Gal = 8:90:1:1) 能上调血清 IgG1 和 IgG2b 水平, 以调节 Th1/Th2 比值^[63]。25~100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Fr.A 可诱导外周血释放促炎因子 TNF- α 、IL-6 和抗炎因子 IL-10, 促进 Th1/Th2 平衡^[64]。50~100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ CS-PS (Man:Rha:Ara:Xyl:Glc:Gal = 38.37:2.51:2.21:5.22:27.44:24.25) 则通过下调 IL-17 和 IL-4 的表达, 上调 IL-5 表达, 促进 B 淋巴细胞增殖, 维持 Th1/Th2 平衡, 以保护机体免受⁶⁰Co 辐照^[65]。

2.2 抑制肿瘤细胞生长

无序生长的肿瘤细胞将破坏周围组织 (组织间隙、淋巴管或血管), 甚至经循环、淋巴系统转移到身体其他部位。虫草多糖通过抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、自噬和细胞周期阻滞等抑制肿瘤细胞生长, 其作用机制如图 3 所示。

2.2.1 抑制肿瘤细胞增殖

抑制细胞内核酸、蛋白质合成或葡萄糖跨膜转运是药物呈现细胞毒作用的机制之一。大量研究表明, 绝大多数虫草多糖的细胞毒性很低, 可以忽略不计, 但也有报道认为虫草多糖具有一定的细胞毒性, 可抑制肿瘤细胞增殖。如经大团囊虫草蛋白多糖 SN-C 处理后, Meth-A 肿瘤细胞的葡萄糖跨膜转运受到抑制^[66,67]。该多糖由 β -(1-3)-D-葡聚糖和 α -(1-4)-半乳糖氨基两部分组成, 因其含有氨基糖组分, 更易黏附于带有较多负电荷的肿瘤细胞表面, 降低细胞膜通透性, 从而抑制葡萄糖跨膜转运^[68,69]。最近研究表明, 蛹虫草多糖 CMPS-II、CBPS-II 通过降低评估细胞增殖的指标性蛋白——核抗原 (nuclear antigen, PCNA) 的 mRNA 水平和蛋白表达, 抑制人非小细胞肺癌细胞 H1299 增殖^[31]。虫草多糖的细胞毒性可能与其分子量有一定关系, 一种高分子量 (3 720 kDa) 的古尼虫草菌丝体多糖 CPS (Rha:Ara:Xyl:Man:Glu:Gal = 3.0:2.6:1.0:1.3:106.0:2.8, 主链为 α -(1 \rightarrow 4)-Glc), 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对 K562 细胞的

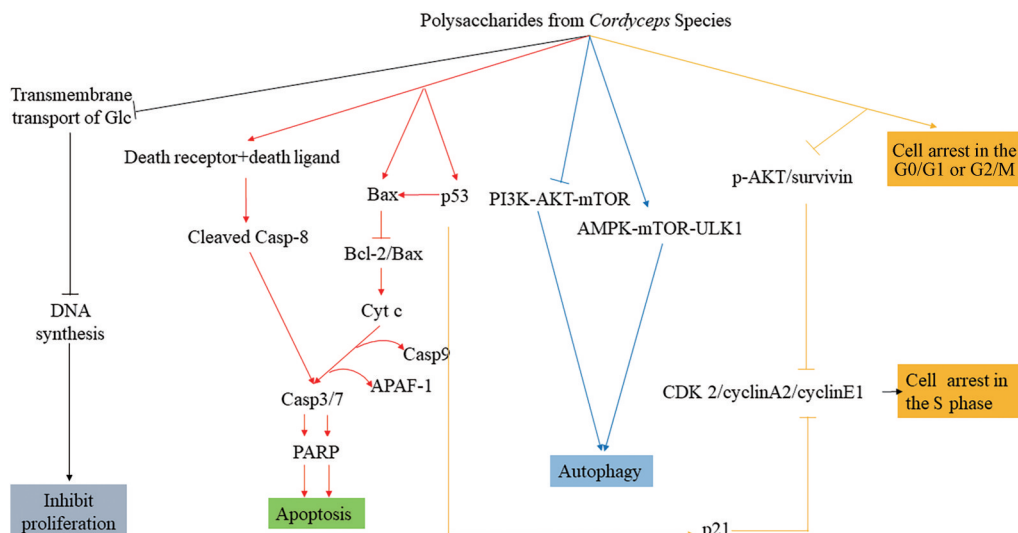


Figure 3 Summary on inhibiting tumor cell growth mechanisms of polysaccharides in *Cordyceps* species. *Cordyceps* species-derived polysaccharides induce cancer cell death by inhibiting proliferations (representation by black arrow), enhancing apoptosis-associated signaling (representation by red arrow), promoting autophagy (representation by blue arrow) and stimulating cell cycle arrest (representation by orange arrow) and so on

肿瘤抑制率为 56.65%^[70], 而另一种低分子量 (4.3 kDa) 的蛹虫草多糖 CMP-1 对 HT-29、HeLa、HepG2 和 K562 细胞增殖的 IC_{50} 值分别为 137.66、162.59、176.29 和 364.01 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[29], 显示出比 CPS 更强的抑制增殖能力。

2.2.2 诱导肿瘤细胞凋亡

细胞凋亡异常是肿瘤生长的主要机制之一, 靶向诱导肿瘤细胞凋亡是化疗、放疗、免疫治疗或自杀基因治疗的基本策略, 也是抗癌药物开发的重要依据^[21]。现已发现多种虫草多糖具有诱导肿瘤细胞凋亡或协同化疗药物增强细胞凋亡的作用。真核生物细胞凋亡有两条主要途径 [即死亡受体 (death receptor, DR) 介导的外源性凋亡通路和线粒体介导的内源性凋亡通路] 和两条次要途径 [即穿孔素/颗粒酶 (perforin/granzyme) 或内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 介导的凋亡通路]。1 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 蝉花虫草 (*C. cicadae*) 菌丝体多糖 CCP 处理人宫颈癌细胞 HeLa 48 h, 细胞凋亡率为 73.17%。经检测, 该多糖促进死亡受体 (TNF-R1、DR3、Fas、DR5)、死亡配体 (FasL) 和 cleaved Casp-8 表达上调, 以及促进 Bak、Bax、Casp-3/7/9、Puma、Cyt c 表达上调, 下调 Bcl-2、Bcl-x1 和 PARP, 表明该多糖既可通过死亡受体介导的外源性途径诱导 HeLa 细胞凋亡, 也可通过线粒体介导的内源性途径诱导 HeLa 细胞凋亡^[13]。线粒体介导的内源性途径可能是虫草多糖诱导肿瘤细胞凋亡的主要途径, 江西虫草 (*C. jiangxiensis*) 菌丝体多糖 MPCJ 和蜂头虫草 (*C. Sphecocephala*) 菌丝体胞外多糖肽 PPC 也通过降低 Bcl-2/Bax 比值, 诱导胃腺癌细胞 SGC-7901、肝癌细胞 HepG2 和神经母细胞

瘤细胞 SK-N-SH 凋亡^[71,72]。此外, 50~400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 古尼虫草菌丝体硒多糖 SeCPS-II [Rha:Man:Glu:Gal = 4.33:12.62:27.50:18.99, 主链为 α -(1→4)-D-Glc] 处理 SKOV-3、H1299、HepG2 和 H1299 细胞 48 h, p-p53、Bax、cleaved Casp-3/9、cleaved-PARP 蛋白水平上调^[73], 以及 300~500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 蛹虫草多糖菌丝体多糖 CMPS II 和子实体多糖 CBPS II 能上调 Casp-3/9、p53 蛋白水平^[31], 表明 p53 在虫草多糖诱导肿瘤细胞凋亡过程中起重要作用, 可通过 p53-Bax-Casp 途径参与细胞凋亡诱导。对于穿孔素/颗粒酶或 ERS 介导的凋亡通路是否参与虫草多糖诱导肿瘤细胞凋亡, 目前未见详细报道。但虫草多糖药理研究中既有抑制/促进 Ca^{2+} 释放和 ROS 产生的报道^[47,74], 也有活化 CTL 和促进 JNK、c-Jun 磷酸化, 激活 JNK/c-Jun 通路, 诱导肿瘤细胞凋亡的研究^[75,76]。由于这些因子与上述两条凋亡通路密切相关, 是否参与虫草多糖的凋亡诱导仍需作进一步的研究。

2.2.3 调节肿瘤细胞自噬

自噬是细胞对内部受损的细胞器、错误折叠的蛋白质和侵入机体的病原体等进行降解的过程, 能使更多处于“复制危机”的细胞死亡, 降低肿瘤发生风险。自噬失调将产生包括癌症在内的多种疾病, 以调节细胞自噬活性为目的的肿瘤治疗方法已成为热点策略。但自噬在癌症治疗中是把双刃剑, 对肿瘤存在具有促进与抑制双重作用, 即在正常情况下, 自噬能在肿瘤发展的不同阶段抑制其产生和转移, 促进肿瘤细胞程序性死亡或凋亡; 另一方面, 在饥饿、缺氧、能量不足等不利环境中, 自噬可以保护细胞并为细胞生存提供能量,

提高肿瘤细胞对应激的耐受能力,维持其生存^[77]。多糖主要通过两条途径调节肿瘤细胞自噬,一是上调自噬相关基因表达,增加肿瘤细胞自噬量;二是抑制自噬,阻断细胞获取能量,进而诱导细胞凋亡(自噬与凋亡是既相互独立又相互联系两种生物学现象,两者通过 Bcl-2 家族蛋白和 Beclin-1 相互联结)。研究靶点主要集中在磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)、MAPK 和腺苷一磷酸激活蛋白激酶 (adenosine-monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 等信号通路^[78]。

此前,虽有虫草及其菌丝发酵液、虫草素等诱导肿瘤细胞自噬的少量报道^[79,80],但虫草多糖的相关研究还不够深入,仅见具 1,4-Glc 和 1,4-Gal 主链的冬虫夏草菌丝体多糖 CSP (100~800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 诱导结肠癌细胞 (HCT116) 自噬的报道。该研究表明, CSP (P4) 可通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路和激活 AMPK/mTOR/ULK1 (UNC-51-like kinase 1) 信号通路,促进微管相关蛋白轻链 3 积聚,诱导 HCT116 结肠癌细胞自噬和凋亡,两者共同抑制肿瘤细胞增殖^[10]。但该研究对 CSP 诱导细胞自噬和凋亡分子机制的探究,还缺乏基因敲除技术的验证,而且关于 CSP 诱导细胞凋亡和自噬之间的关系研究,仅选用自噬抑制剂而没有使用凋亡抑制剂检测细胞凋亡和生存率的变化,也需作进一步完善。

2.2.4 阻滞肿瘤细胞周期

癌症被认为是一种细胞周期调控异常、正常细胞增殖失控的疾病。细胞周期阻滞有利于细胞损伤修复,避免肿瘤的发生和发展,是癌症治疗的重要手段。Xiao 等^[71]用流式细胞术检测了经 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 江西虫草菌丝体多糖 MPCJ 4 和 MPCJ 5 分别处理人胃腺癌细胞 SGC-7901 8~72 h,发现该细胞被阻滞在分裂周期的 S 期,尤其是 MPCJ 5 能长时间阻滞细胞分裂。Zhu 等^[81]检测了 0.8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 蛹虫草粗多糖处理人肺癌细胞 A549 48 h 后,细胞周期主要调控蛋白—细胞周期蛋白 (cyclins) 和细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinases, CDKs) 基因的 mRNA 转录水平,认为该多糖诱导 A549 细胞 S 期阻滞的主要原因可能是抑制了 cyclin A、CDK4 的表达。Xu 等^[13]以 600 和 1 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 蝉花虫草菌丝体多糖 CCP 处理 HeLa 细胞,进一步研究了虫草多糖处理后肿瘤细胞 S 期的 3 种主要调控蛋白 (cyclin A、cyclin E、CDK2) 和细胞周期相关因子 (Akt/p-Akt、p27、p21、p53、survivin) 的变化情况。结果显示, CDK2、survivin、p27、cyclin E1、cyclin A2 和 p-Akt

表达下调, p21、p53 和 Akt 上调表达。由于 survivin 能阻断 S 期关键蛋白 cyclin、CDK 基因表达,磷酸化的 Akt (p-Akt) 能使 Bad、Casp-9 等失活,促进细胞存活, p53 能激活下游基因 p21,阻断 cyclin A2/CDK2 和 cyclin E1/CDK2 表达,表明 CCP 诱导 HeLa 细胞 S 期阻滞。而蛹虫草子实体多糖 CMP-1 (110 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)、CMP-2 (156 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)、CMP-3 (323 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理肝癌细胞 (SMC-7721)、胃癌细胞 (BGC-823) 和乳腺癌细胞 (MCF-7) 72 h 后,发现浓度低于 IC_{50} 时,诱导肿瘤细胞 G0/G1 期阻滞;浓度高于 IC_{50} 时,将肿瘤细胞 G2/M 期阻滞^[82]。虽然相关作用机制还未见报道,但虫草提取物阻滞细胞周期的相关研究为其作用机制探讨提供了相应的思路。一是检测虫草多糖对细胞周期调控蛋白及相关因子的变化,厘清作用机制。如蛹虫草正丁醇提取物将结肠癌 HT-29 细胞阻滞于 G2/M 期,检测到 cyclin B1 和 Cdc25 基因表达下降^[83]。蛹虫草片段 CMF 诱导口腔鳞状细胞癌 G2/M 期阻滞,降低 cyclin B1、Cdc2、Cdc25c 和 p-Rb 表达,诱导 p21 和 CHK2 蛋白水平升高,但对 p53 的表达无明显影响。表明 CMF 增强 p21 的表达,通过 p53 非依赖性途径诱导 G2/M 期阻滞^[76];二是利用组学方法分析虫草多糖阻滞细胞周期的作用机制。如蝉花虫草水提物处理肝癌 MHCC97H 细胞后,降低 CDK1 基因表达,但对 cyclin B 影响不大。利用 2-DE 和 MALDI-TOF-MS/MS 技术发现与 G2/M 期相关的 9 个蛋白表达上调和 13 个蛋白表达下调^[84],该方法为解释蝉花虫草水提物是通过细胞周期阻滞而不是细胞凋亡导致细胞死亡提供了帮助。

2.3 降低肿瘤转移风险

肿瘤细胞从原发部位侵袭局部组织和跨越组织屏障是肿瘤恶化转移的标志,也是肿瘤治疗的最大障碍和肿瘤患者死亡的主要原因。虫草多糖抑制肿瘤细胞侵袭、转移主要通过抑制 TGF- β 诱导肿瘤上皮细胞向上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT),抑制基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 水解基底膜和细胞外基质蛋白,调控转移相关基因表达和抑制肿瘤新生血管形成等作用,降低肿瘤细胞浸润和转移机会。

2.3.1 抑制 MMPs 表达

肿瘤侵袭转移是肿瘤-宿主之间一系列复杂步骤相互作用的连续过程,细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 降解和基底膜重塑是该过程的关键环节。MMPs 是降解 ECM 的主要蛋白酶,几乎能降解 ECM 中的各种蛋白成分, MMPs 表达下调意味着 ECM 成分降解减少,组织侵袭能力减弱。MMPs 家族有多个成员, MMP-1 能降解 ECM 中最丰富的蛋白质 (I 型和 III 型胶

原蛋白), 在侵袭性黑色素瘤中高表达。Jayakumar 等^[12]以 250~800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 冬虫夏草菌丝体多糖 CME-1 [Man:Gal = 4:6, 主链为 (1→4)-Man] 处理黑色素瘤细胞 B16-F10 24 h, MMP-1 最多下降 46.3%, 并抑制 ERK1/2 磷酸化和 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK) 表达, 恢复 B16-F10 细胞中 I κ B- α 的降解能力。鉴于 MAPK (ERK、p38 MAPKs) 能激活 MMP 基因表达, NF- κ B 在 MAPK 调节 MMP 表达中扮演重要角色, 以及 NF- κ B 的解离和核转移促进细胞增殖、血管生成和转移, 提高肿瘤侵袭性。推测 CEM-1 可能通过抑制 ERK/p38 MAPK 信号通路实现 MMP-1 表达下调, 从而抑制 B16 黑色素瘤转移。MMP-2 和 MMP-9 也是 MMP 家族的重要成员, 高表达 MMP-2、MMP-9 可促进乳腺癌细胞转移^[85], 以 80 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 蛹虫草粗多糖 CMP 腹腔注射乳腺癌肺转移小鼠 15 天, 病理切片显示肺转移肿瘤结节数减少 39.79%, 转移灶体积明显变小, ELISA 检测血清中 MMP-2、MMP-9 含量分别下降 44.71%、45.10%, 表明蛹虫草多糖抑制乳腺癌肺转移作用可能与抑制 MMP-2 和 MMP-9 的表达有关^[86]。

2.3.2 抑制 EMT 过程

EMT 过程是上皮肿瘤细胞失去黏附能力、获得间充质细胞迁移能力的过程, 是上皮细胞来源的恶性肿瘤发生侵袭和转移的重要途径。研究表明, 以 0.1~10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MHP-1 [Man:Gal:Glc = 5:2:3, 主链为 (1→2)- β -D-Manp、(1,6)- β -D-Glcp 和 (1→3)- β -D-Manp] 处理乳腺癌细胞 (MDA-MB-231、MCF-7 和 MDA-MB-468) 48 h, 发现大部分间质样细胞表型发生改变, 特征分子 (波形蛋白和纤维连接素) 表达显著降低, 驱动乳腺癌 EMT 必需的转录因子 Snail 和 Slug 表达下调, EMT 相关的 TGF- β 信号被选择性抑制, 但上皮特征分子 (E-钙黏蛋白和闭锁小带蛋白 1) 表达增加, 并逆转耐药细胞 EMT 样表型, 降低拓扑替康 (topotecan, TPT) 化疗引起的耐药性^[11]。表明 MHP-1 通过下调 TGF- β 信号传导和 EMT 相关通路显著抑制乳腺癌转移并恢复 TPT 耐药细胞的药物敏感性。

2.3.3 调控转移基因表达

肿瘤转移受不同类型的肿瘤转移基因序贯而协调的调控。肿瘤转移相关基因包括转移促进基因和转移抑制基因, 如促凋亡基因 Bax、Bak、Bad、Bid、Bim, 抑癌基因 p53, 促转移基因 Myc、Ras、Mos、Raf、Fes、Fms、Ser、Fos、p53 突变、erbB2 等。体内研究表明, 隔天腹腔注射 30~120 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 冬虫夏草胞外多糖 EPSF 14 次, 能有效下调 B16 荷瘤小鼠 (C57BL/6) 肺、肝组织中 c-Myc、c-Fos、Bcl-2 基因表达水平^[87,88]。原癌基因 c-Myc、

c-Fos 参与调节细胞有丝分裂, 通常在细胞静止期不表达或表达量非常低, 表达增加则促进肿瘤细胞增殖和浸润。Bcl-2 有抑制细胞凋亡的作用, 其过表达使细胞抵抗正常凋亡, 从而具有致癌作用。EPSF 治疗显著降低小鼠的肺和肝脏中 c-Myc、c-Fos、Bcl-2 表达的强度和密度, 提示该多糖具有控制肿瘤的发生和生长的作用, 可以作为癌症治疗的潜在辅助剂, 但其上调/下调相关基因表达水平的作用机制还需进一步研究。

2.3.4 抑制新生血管生长

血管生成是实体瘤生存、增殖和转移的前提。通常认为, 肿瘤细胞只能在距离血管 100~200 μm 的范围内生长, 如果没有新血管生成, 实体瘤将进入休眠, 不会转移, 抑制血管生成是预防肿瘤生长和转移的重要方法。VEGF 可促进血管化和细胞增殖, 与肿瘤的生长、侵袭和转移密切相关, 控制 VEGF 的表达能有效控制肿瘤的转移。虫草多糖具有较强的抑制肿瘤新生血管生长的作用, 在降低肿瘤细胞浸润和转移方面显示出良好的应用前景。120 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ EPSF 通过抑制 VEGF 基因表达显著降低小鼠黑色素瘤细胞 B16 向小鼠肝、肺组织转移^[87], 在一种 NaCl 诱导的蛹虫草菌丝体多糖 P5 的抗血管生成研究中也发现, 其通过下调 VEGF 的表达以抑制人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 的血管生成与细胞转移^[89]。碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 与 VEGF 相似, 能促进内皮细胞分裂, 是血管生成的有效诱导因子及影响肿瘤血管通透性的主要因素, 在恶性肿瘤中普遍存在。在非小细胞肺癌转移研究中发现, 与顺铂单独治疗相比, 0.1~0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 冬虫夏草多糖 CS [Man:Glc = 1:9, 主链为 (1→4)-Glc 和 (1→3)-Glc] 与顺铂联合治疗效果更好, 能有效地降低细胞活力, 促进肺癌细胞的死亡, 抑制 VEGF 和 bFGF 蛋白及其 mRNA 表达水平, 表明 CS 在顺铂诱导的细胞死亡和抗血管生成中起辅助作用, 可能是非小细胞肺癌治疗的潜在辅助化疗药物^[8]。

3 展望

多糖作为药用虫草的主要活性成分具有多种药理作用, 尤其在抗肿瘤方面具有明显的抑制肿瘤生长和转移, 诱发肿瘤细胞凋亡, 刺激淋巴细胞发挥免疫效应, 提高巨噬细胞、NK 细胞的肿瘤细胞吞噬、毒杀能力, 有效降低化疗药物的毒副作用和耐药性等功效, 是一种安全性高、毒副作用小的抗肿瘤天然产物, 可应用于临床或辅助治疗。然而纵观虫草多糖抗肿瘤机制研究, 还需要在以下三方面继续深入: ① 虽然部分虫草多糖的药理活性已在细胞或动物模型中予以证实, 并研究了相关信号通路及关键基因的表达, 但还未能准确定位关键基因的上下游信号, 需要广泛运用基因沉

默、基因敲除等技术,以便更加完整地揭示整个信号通路,为多糖抗癌药物的研发提供基础理论支撑;②虽然已从药用虫草中分离出多种抗肿瘤活性多糖,但虫草多糖大多是由半乳糖、葡萄糖和甘露糖组成的杂多糖,其化学结构比 β -葡聚糖更复杂。由于单糖组成、分子量、糖苷键类型与连接位置、空间构象等均能影响其活性发挥,且现有研究结果存在一定的交叉或相互矛盾之处。如有研究认为,仅含有 β -(1 \rightarrow 3)-D-葡聚糖、半乳糖胺聚糖或蛋白多糖结构的虫草多糖才具有抗肿瘤活性^[90]。但也有研究发现具有 α -糖苷键连接的蛹虫草多糖比 β -糖苷键连接的多糖具有更强的免疫调节活性和抗肿瘤能力^[28,30,31]。虫草多糖的构效关系不清晰将影响抗肿瘤机制的阐明,并限制抗肿瘤多糖药物的开发;③不同来源、分离纯化方法、生长环境等均会影响虫草多糖的活性,建立系统、稳定的虫草多糖获得方法是深入开展抗肿瘤机制研究和临床应用的前提。虽然前期已相继获得4 $^{\circ}$ C下提取的蛹虫草多糖CMPs-4比80 $^{\circ}$ C提取的CMPs-80具有更强的抗肿瘤活性^[35],碱性条件下培养的蛹虫草菌丝体多糖 β -(1 \rightarrow 6)葡聚糖含量更高,抗氧化性更强^[91],在培养液中添加硫酸钠或氯化钠,可改变虫草多糖合成方式,分离到具有抗血管生成功能的新型虫草多糖等多项研究成果^[89],但这些研究离实际需求还有较大差距,有必要建立一套标准的多糖生产、提取和制备方法来解决这一问题。总之,虫草多糖的结构特征与抗肿瘤活性之间的构效关系仍处于初步讨论阶段,大多数研究仅限于体外和动物实验,尚缺乏临床相关研究。继续深入开展虫草多糖的化学结构解析,构效关系探讨、抗肿瘤机制研究和提高临床应用对人类抵抗肿瘤具有极其重要的意义。

作者贡献: 詹忠根负责获取经费资助、文献调研和手稿撰写,并指导整个研究;叶素丹、黄伟素参与文献调研及论文修改。

利益冲突: 本文的发表不存在任何利益冲突。

References

- [1] Zhang JX, Wen CT, Duan YQ, et al. Advance in *Cordyceps militaris* (Linn) Link polysaccharides: isolation, structure, and bioactivities: a review [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 132: 906-914.
- [2] Olatunji OJ, Tang J, Tola A, et al. The genus *Cordyceps*: an extensive review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology [J]. Fitoterapia, 2018, 129: 293-316.
- [3] Gu CM, Zhang DB, Zhai WJ, et al. Research progress on *Cordyceps militaris* polysaccharides [J]. Food Biosci, 2022, 45: 101503.
- [4] Miao M, Yu WQ, Li Y, et al. Structural elucidation and activities of *Cordyceps militaris* derived polysaccharides: a review [J]. Frontiers, 2022, 9: 898674.
- [5] Yuan QH, Xie F, Tan J, et al. Extraction, structure and pharmacological effects of the polysaccharides from *Cordyceps sinensis*: a review [J]. J Funct Foods, 2022, 89: 104909.
- [6] Shashidhar GM, Giridhar P, Manohar B. Functional polysaccharides from medicinal mushroom *Cordyceps sinensis* as a potent food supplement: extraction, characterization and therapeutic potentials: a systematic review [J]. RSC Adv, 2015, 5: 16050-16066.
- [7] Lee CT, Huang KS, Shaw JF, et al. Trends in the immunomodulatory effects of *Cordyceps militaris*: total extracts, polysaccharides and cordycepin [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 575704.
- [8] Ji NF, Yao LS, Li Y, et al. Polysaccharide of *Cordyceps sinensis* enhances cisplatin cytotoxicity in non-small cell lung cancer H157 cell line [J]. Integr Cancer Ther, 2011, 10: 359-367.
- [9] Lee SH, Hwang HS, Yun JW. Production of polysaccharides by submerged mycelial culture of entomopathogenic fungus *Cordyceps takaomontana* and their apoptotic effects on human neuroblastoma cells [J]. Korean J Chem Eng, 2009, 26: 1075-1083.
- [10] Qi WC, Zhou XT, Wang JQ, et al. *Cordyceps sinensis* polysaccharide inhibits colon cancer cells growth by inducing apoptosis and autophagy flux blockage via mTOR signaling [J]. Carbohydr Polym, 2020, 237: 116113.
- [11] Lin SS, Lyu XD, Yu J, et al. MHP-1 inhibits cancer metastasis and restores topotecan sensitivity via regulating epithelial-mesenchymal transition and TGF- β signaling in human breast cancer cells [J]. Phytomedicine, 2016, 23: 1053-1063.
- [12] Jayakumar T, Chiu CC, Wang SH, et al. Anti-cancereffects of CME-1, a novel polysaccharide, purified from the mycelia of *Cordyceps sinensis* against B16-F10 melanoma cells [J]. J Cancer Res Ther, 2014, 10: 43-49.
- [13] Xu J, Tan ZC, Shen ZY, et al. *Cordyceps cicadae* polysaccharides inhibit human cervical cancer HeLa cells proliferation via apoptosis and cell cycle arrest [J]. Food Chem Toxicol, 2021, 148: 111971.
- [14] Wang JQ, Nie SP, Cui S, et al. Structural characterization and immunostimulatory activity of a glucan from natural *Cordyceps sinensis* [J]. Food Hydrocoll, 2017, 67: 139-147.
- [15] Liu Y, Li QZ, Li LDJ, et al. Immunostimulatory effects of the intracellular polysaccharides isolated from liquid culture of *Ophiocordyceps sinensis* (Ascomycetes) on RAW264.7 cells via the MAPK and PI3K/Akt signaling pathways [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 275: 114130.
- [16] Chen X, Siu KC, Cheung YC, et al. Structure and properties of a (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan from ultrasound-degraded exopolysaccharides of a medicinal fungus [J]. Carbohydr Polym, 2014, 106: 270-275.

- [17] Cheong KL, Wang LY, Wu DT, et al. Microwave-assisted extraction, chemical structures, and chain conformation of polysaccharides from a novel *Cordyceps sinensis* fungus UM01 [J]. *J Food Sci*, 2016, 81: C2167-C2174.
- [18] Luo XP, Duan YQ, Yang WY, et al. Structural elucidation and immunostimulatory activity of polysaccharide isolated by sub-critical water extraction from *Cordyceps militaris* [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 157: 794-802.
- [19] Zhu ZY, Liu XC, Fang XN, et al. Structural characterization and anti-tumor activity of polysaccharide produced by *Hirsutella sinensis* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 82: 959-966.
- [20] Wang J, Nie S, Kan L, et al. Comparison of structural features and antioxidant activity of polysaccharides from natural and cultured [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2017, 26: 55-62.
- [21] Wu DT, Cheong KL, Wang LY, et al. Characterization and discrimination of polysaccharides from different species of *Cordyceps* using saccharide mapping based on PACE and HPTLC [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 103: 100-109.
- [22] Wu DT, Xie J, Wang LY, et al. Characterization of bioactive polysaccharides from *Cordyceps militaris* produced in China using saccharide mapping [J]. *J Funct Foods*, 2014, 9: 315-323.
- [23] Li LF, But GWC, Zhang QW, et al. A specific and bioactive polysaccharide marker for *Cordyceps* [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 269: 118343.
- [24] Huang QL, Siu KC, Wang WQ, et al. Fractionation, characterization and antioxidant activity of exopolysaccharides from fermentation broth of a *Cordyceps sinensis* fungus [J]. *Proc Biochem*, 2013, 48: 380-386.
- [25] Yan JK, Wang WQ, Li L, et al. Physicochemical properties and antitumor activities of two α -glucans isolated from hot water and alkaline extracts of *Cordyceps* (Cs-HK1) fungal mycelia [J]. *Carbohydr Polym*, 2011, 85: 753-758.
- [26] Wang Y, Wang M, Ling Y, et al. Structural determination and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of cultured *Cordyceps sinensis* [J]. *Am J Chin Med*, 2009, 37: 977-989.
- [27] Wang Y, Yin HP, Lv XB, et al. Protection of chronic renal failure by a polysaccharide from *Cordyceps sinensis* [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81: 397-402.
- [28] Wu FY, Yan H, Ma XN, et al. Comparison of the structural characterization and biological activity of acidic polysaccharides from *Cordyceps militaris* cultured with different media [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012, 28: 2029-2038.
- [29] Jing YS, Cui XL, Chen ZY, et al. Elucidation and biological activities of a new polysaccharide from cultured *Cordyceps militaris* [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 102: 288-296.
- [30] Liu XC, Zhu ZY, Tang YL, et al. Structural properties of polysaccharides from cultivated fruit bodies and mycelium of *Cordyceps militaris* [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 142: 63-72.
- [31] Liu XC, Zhu ZY, Liu YL, et al. Comparisons of the anti-tumor activity of polysaccharides from fermented mycelia and cultivated fruiting bodies of *Cordyceps militaris* *in vitro* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 130: 307-314.
- [32] Bi SX, Jing YS, Zhou QQ, et al. Structural elucidation and immunostimulatory activity of a new polysaccharide from *Cordyceps militaris* [J]. *Food Funct*, 2018, 9: 279-293.
- [33] Zhang Y, Zeng Y, Cui YS, et al. Structural characterization, antioxidant and immunomodulatory activities of a neutral polysaccharide from *Cordyceps militaris* cultivated on hull-less barley [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 235: 115969.
- [34] Lee JS, Kwon DS, Lee KR, et al. Mechanism of macrophage activation induced by polysaccharide from *Cordyceps militaris* culture broth [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 120: 29-37.
- [35] Nurmatamat E, Xiao HX, Zhang Y, et al. Effects of different temperatures on the chemical structure and antitumor activities of polysaccharides from *Cordyceps militaris* [J]. *Polymers*, 2018, 10: 430.
- [36] Zhu ZY, Liu F, Gao H, et al. Synthesis, characterization and antioxidant activity of selenium polysaccharide from *Cordyceps militaris* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 99: 1090-1099.
- [37] Liu F, Zhu ZY, Sun XL, et al. The preparation of three selenium-containing *Cordyceps militaris* polysaccharides: characterization and anti-tumor activities [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 99: 196-204.
- [38] Jing YS, Zhu JH, Liu T, et al. Structural characterization and biological activities of a novel polysaccharide from cultured *Cordyceps militaris* and its sulfated derivative [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63: 3464-3471.
- [39] Chen YJ, Shiao MS, Lee SS, et al. Effect of *Cordyceps sinensis* on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells [J]. *Life Sci*, 1997, 60: 2349-2359.
- [40] Park DK, Hayashi T, Park HJ. Arabinogalactan-type polysaccharides (APS) from *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans (GSC) induces innate immune activity of THP-1 monocytes through promoting their macrophage differentiation and macrophage activity [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2012, 21: 1501-1506.
- [41] Lin RK, Choong CY, Hsu WH, et al. Polysaccharides obtained from mycelia of *Cordyceps militaris* attenuated doxorubicin-induced cytotoxic effects in chemotherapy [J]. *Afr Health Sci*, 2019, 19: 2156-2163.
- [42] Meng LZ, Feng K, Wang LY, et al. Activation of mouse macrophages and dendritic cells induced by polysaccharides from a novel *Cordyceps sinensis* fungus UM01 [J]. *J Funct Foods*, 2014, 9: 242-253.
- [43] Rong L, Li GQ, Zhang YX, et al. Structure and immunomodulatory activity of a water-soluble alpha-glucan from *Hirsutella sinensis* mycelia [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 189: 857-868.
- [44] He BL, Zheng QW, Guo LQ, et al. Structural characterization and immune-enhancing activity of a novel high-molecular-

- weight polysaccharide from *Cordyceps militaris* [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 145: 11-20.
- [45] Zhang QW, Liu M, Li LF, et al. *Cordyceps* polysaccharide marker CCP modulates immune responses via highly selective TLR4/MyD88/p38 axis [J]. Carbohydr Polym, 2021, 271: 118443.
- [46] Chen WX, Yuan FJ, Wang KC, et al. Modulatory effects of the acid polysaccharide fraction from one of anamorph of *Cordyceps sinensis* on Ana-1 cells [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 142: 739-745.
- [47] Bi SX, Huang WJ, Chen S, et al. *Cordyceps militaris* polysaccharide converts immunosuppressive macrophages into M1-like phenotype and activates T lymphocytes by inhibiting the PD-L1/PD-1 axis between TAMs and T lymphocytes [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 150: 261-280.
- [48] Cheong KL, Meng LZ, Chen XQ, et al. Structural elucidation, chain conformation and immuno-modulatory activity of glucogalactomannan from cultured *Cordyceps sinensis* fungus UM01 [J]. J Funct Foods, 2016, 25: 174-185.
- [49] Ohta Y, Lee JB, Hayashi K, et al. *In vivo* anti-influenza virus activity of an immune-modulatory acidic polysaccharide isolated from *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55: 10194-10199.
- [50] Kim HS, Kim JY, Kang JS, et al. Cordlan polysaccharide isolated from mushroom *Cordyceps militaris* induces dendritic cell maturation through toll-like receptor 4 signalings [J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48: 1926-1933.
- [51] Huang J, Song D, Yang A, et al. Differentiation and maturation of human dendritic cells modulated by an exopolysaccharide from an anamorph of *Cordyceps sinensis* [J]. Biomed Prev Nutr, 2011, 1: 126-131.
- [52] Song D, Lin YF, Yuan J, et al. *Ex vivo* stimulation of murine dendritic cells by an exopolysaccharide from one of the anamorph of *Cordyceps sinensis* [J]. Cell Biochem Funct, 2011, 29: 555-561.
- [53] Song D, He ZY, Wang CH, et al. Regulation of the exopolysaccharide from an anamorph of *Cordyceps sinensis* on dendritic cell sarcoma (DCS) cell line [J]. Eur J Nutr, 2013, 52: 687-694.
- [54] Huang ZL, Jin J, Tong XM, et al. The immunomodulatory effects of *Cordyceps sinensis* on dendritic cells derived from chronic myelogenous leukemia (CML) [J]. J Med Plants Res, 2011, 5: 5925-5932.
- [55] Yoon T, Yu KW, Shin KS, et al. Innate immune stimulation of exo-polymers prepared from *Cordyceps sinensis* by submerged culture [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 80: 1087-1093.
- [56] Meng M, Wang HY, Li ZB, et al. Protective effects of polysaccharides from *Cordyceps gunnii* mycelia against cyclophosphamide-induced immunosuppression to TLR4/TRAF6/NF- κ B signalling in BALB/c mice [J]. Food Funct, 2019, 10: 3262-3271.
- [57] Zheng Y, Li SY, Li C, et al. Polysaccharides from Spores of *Cordyceps cicadae* protect against cyclophosphamide-induced immunosuppression and oxidative stress in mice [J]. Foods, 2022, 11: 515-532.
- [58] Cheung JK, Li J, Cheung AW, et al. Cordysinocan, a polysaccharide isolated from cultured *Cordyceps*, activates immune responses in cultured T-lymphocytes and macrophages: signaling cascade and induction of cytokines [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 124: 61-68.
- [59] Yu Y, Wen Q, Song A, et al. Isolation and immune activity of a new acidic *Cordyceps militaris* exopolysaccharide [J]. Int J Biol Macromol, 2022, 194: 706-714.
- [60] Liu JY, Feng CP, Li X, et al. Immunomodulatory and antioxidative activity of *Cordyceps militaris* polysaccharides in mice [J]. Int J Biol Macromol, 2016, 86: 594-598.
- [61] Liu XJ, Huang YC, Chen YJ, et al. Partial structural characterization, as well as immunomodulatory and anti-aging activities of CP2-c2-s2 polysaccharide from *Cordyceps militaris* [J]. RSC Adv, 2016, 6: 104094-104103.
- [62] Zhu ZY, Chen J, Si CL, et al. Immunomodulatory effect of polysaccharides from submerged cultured *Cordyceps gunnii* [J]. Pharm Biol, 2012, 50: 1103-1110.
- [63] Wu YL, Sun HX, Qin F, et al. Effect of various extracts and a polysaccharide from the edible mycelia of *Cordyceps sinensis* on cellular and humoral immune response against ovalbumin in mice [J]. Phytother Res, 2006, 20: 646-652.
- [64] Kuo MC, Chang CY, Cheng TL, et al. Immunomodulatory effect of exo-polysaccharides from submerged cultured *Cordyceps sinensis*: enhancement of cytokine synthesis, CD11b expression, and phagocytosis [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 75: 769-775.
- [65] Zhang JL, Yu YC, Zhang ZF, et al. Effect of polysaccharide from cultured *Cordyceps sinensis* on immune function and anti-oxidation activity of mice exposed to ^{60}Co [J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11: 2251-2257.
- [66] Ohmori T, Tamura K, Tsuru S, et al. Antitumor activity of protein-bound polysaccharide from *Cordyceps ophioglossoides* in mice [J]. Jpn J Cancer Res, 1986, 77: 1256-1263.
- [67] Ohmori T, Tamura K, Takaoka H, et al. Component analysis of protein-bound polysaccharide (SN-C) from *Cordyceps ophioglossoides* and its effects on syngeneic murine tumors [J]. Chem Pharm Bull, 1988, 36: 4505-4511.
- [68] Ohmori T, Tamura K, Wakaiki A, et al. Dissociation of a glucan fraction (CO-1) from protein-bound polysaccharide of *Cordyceps ophioglossoides* and analysis of its antitumor effect [J]. Chem Pharm Bull, 1988, 36: 4512-4518.
- [69] Ohmori T, Tamura K, Fukui K, et al. Isolation of galactosaminoglycan moiety (CO-N) from protein-bound polysaccharide of *Cordyceps ophioglossoides* and its effects against murine tumors [J]. Chem Pharm Bull, 1989, 37: 1019-1102.
- [70] Zhu ZY, Liu NS, Si CL, et al. Structure and anti-tumor activity of a high-molecular-weight polysaccharide from cultured mycelium of *Cordyceps gunnii* [J]. Carbohydr Polym, 2012, 88: 1072-1076.

- [71] Xiao JH, Zhong JJ. Inhibitory effect of polysaccharides produced by medicinal macrofungus *Cordyceps jiangxiensis* on cancer cells via apoptotic pathway and cell cycle arrest [J]. J Food Agricul Environ, 2008, 6: 61-67.
- [72] Oh JY, Baek YM, Kim SW, et al. Apoptosis of human hepatocarcinoma (HepG2) and neuroblastoma (SKN-SH) cells induced by polysaccharides-peptide complexes produced by submerged mycelial culture of an entomopathogenic fungus *Cordyceps sphecocephala* [J]. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18: 512-519.
- [73] Sun HQ, Zhu ZY, Tang YL, et al. Structural characterization and antitumor activity of a novel Se-polysaccharide from selenium-enriched *Cordyceps gunnii* [J]. Food Funct, 2018, 9: 2744-2754.
- [74] Shen WB, Song D, Wu JY, et al. Protective effect of a polysaccharide isolated from a cultivated *Cordyceps* mycelia on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in PC12 cells [J]. Phytother Res, 2011, 25: 675-680.
- [75] Xiao JH, Liang ZQ, Liu AY, et al. Immunosuppressive activity of polysaccharides from *Cordyceps gunnii* mycelia in mice *in vivo/vitro* [J]. J Food Agricul Environ, 2004, 2: 69-73.
- [76] Xie WS, Zhang Z, Song LY, et al. *Cordyceps militaris* fraction induces apoptosis and G2/M arrest via c-Jun N-terminal kinase signaling pathway in oral squamous carcinoma KB cells [J]. Pharmacogn Mag, 2018, 14: 116-123.
- [77] Xu HY, Liu LY, Ding M, et al. Effect of *ganoderma applanatum* polysaccharides on MAPK/ERK pathway affecting autophagy in breast cancer MCF-7 cells [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 146: 353-362.
- [78] Xu HY, Liu LY, Jin ZY, et al. Advances in studies on the regulation of polysaccharides on autophagy in tumor cells [J]. Food Sci (食品科学), 2020, 41: 311-318.
- [79] Yang CH, Kao YH, Huang KS, et al. *Cordyceps militaris* and mycelial fermentation induced apoptosis and autophagy of human glioblastoma cells [J]. Cell Death Dis, 2012, 3: e431.
- [80] Chen YY, Chen CH, Lin WC, et al. The role of autophagy in anti-cancer and health promoting effects of cordycepin [J]. Molecules, 2021, 26: 4954-4973.
- [81] Zhu JX, Zhong S, Li YG, et al. Effect of crude polysaccharides from *Phellinus spp.* and *Cordyceps sinensis* on synergistic induction of S-phase arrest and apoptosis of lung adenocarcinoma cell A549 [J]. Sci Sericult (蚕业科学), 2017, 43: 318-326.
- [82] Chen C, Wang ML, Jin C, et al. *Cordyceps militaris* polysaccharide triggers apoptosis and G0/G1 cell arrest in cancer cells [J]. J Asia Pac Entomol, 2015, 18: 433-438.
- [83] Mollah ML, Park DK, Park HJ. *Cordyceps militaris* grown on germinated soybean induces G2/M cell cycle arrest through downregulation of cyclin B1 and Cdc25c in human colon cancer HT-29 cells [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 2012: 249217.
- [84] Wang HL, Zhang J, Sit WH, et al. *Cordyceps cicadae* induces G2/M cell cycle arrest in MHCC97H human hepatocellular carcinoma cells: a proteomic study [J]. Chin Med, 2014, 9: 15.
- [85] Min KW, Kimi DH, Do SI, et al. Expression patterns of stromal MMP-2 and tumoural MMP-2 and 9 are significant prognostic factors in invasive ductal carcinoma of the breast [J]. J Pathol Microbiol Immunol, 2014, 122: 1196-1206.
- [86] Guo XC, He ZY, Deng YG, et al. Study on the inhibitory effects and mechanisms of *Cordyceps militaris* polysaccharide on breast cancer metastasis [J]. J Hunan Univ Chin Med (湖南中医药大学学报), 2019, 39: 827-831.
- [87] Yang JY, Zhang WY, Shi PH, et al. Effects of exopolysaccharide fraction (EPSF) from a cultivated *Cordyceps sinensis* fungus on c-Myc, c-Fos, and VEGF expression in B16 melanoma-bearing mice [J]. Pathol Res Pract, 2005, 201: 745-750.
- [88] Zhang W, Yang J, Chen J, et al. Immunomodulatory and anti-tumour effects of an exopolysaccharide fraction from cultivated *Cordyceps sinensis* (Chinese caterpillar fungus) on tumor-bearing mice [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2005, 42: 9-15.
- [89] Zeng YY, Han ZG, Qiu PJ, et al. Salinity-induced anti-angiogenesis activities and structural changes of the polysaccharides from cultured *Cordyceps militaris* [J]. PLoS One, 2014, 9: e103880.
- [90] Xiao AH, Zhong JJ. Secondary metabolites from *Cordyceps* species and their antitumor activity studies [J]. Recent Pat Biotechnol, 2007, 1: 123-137.
- [91] Liu YT, Li YW, Zhang HL, et al. Polysaccharides from *Cordyceps militaris* cultured at different pH: sugar composition and antioxidant activity [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 162: 349-358.