

香菇多糖联合 AdIRF3 通过刺激 IFN- β 表达抑制乳腺癌生长

苏 畅¹, 贾英杰¹, 李小江¹, 刘宏根¹, 张丽丽¹, 郭明歆², 李文杰², 张 晶^{1*}

1. 天津中医药大学第一附属医院 肿瘤科, 天津 300193

2. 天津中医药大学研究生院, 天津 300193

摘要: 目的 利用荷瘤小鼠模型探讨香菇多糖联合干扰素调节因子 3 (IRF3) 表达腺病毒载体治疗肿瘤的价值及潜在的机制。方法 利用荷瘤 Balb/c 小鼠, 分别接种磷酸盐缓冲液 (PBS)、空白对照腺病毒载体 (AdGFP)、香菇多糖、表达活化型 IRF3 的腺病毒载体 (AdIRF3) 及香菇多糖联合 AdIRF3, 观察荷瘤小鼠的肿瘤生长曲线; 利用 Real-time PCR 检测肿瘤组织的 β 干扰素 (IFN- β) 水平, 酶联免疫斑点检测法 (ELISPOT) 检测脾脏淋巴细胞功能, 流式细胞术 (FACS) 检测肿瘤局部淋巴细胞比例; 记录荷瘤 Balb/c 裸鼠的肿瘤生长曲线, 以及 α 干扰素受体 1 (IFNAR1) 抗体封闭 Balb/c 的 IFNAR 后肿瘤生长曲线。结果 与对照组相比, 香菇多糖联合 AdIRF3 可抑制 Balb/c 荷瘤小鼠肿瘤生长, 且肿瘤局部组织中 IFN- β 显著高于对照组; 肿瘤组织浸润 CD8⁺T 细胞比例显著高于对照组, 而调节性 T 细胞 (Treg) 细胞比例在各组间并无显著性差异; ELISPOT 显示联合处理刺激淋巴细胞分泌 γ 干扰素 (IFN- γ) 的能力显著高于对照组; 荷瘤 Balb/c 裸鼠在接受不同组处理后, 各组间的肿瘤生长曲线并无显著差异; 利用 IFNAR1 封闭抗体阻断干扰素作用后, 荷瘤 Balb/c 小鼠再次接受不同组处理, 结果显示封闭抗体处理后可抑制香菇多糖联合 AdIRF3 的肿瘤抑制作用。结论 香菇多糖联合 AdIRF3 通过活化 IRF3-IFN 通路发挥协同抑制乳腺癌肿瘤生长的作用。

关键词: 香菇多糖; 乳腺癌; 干扰素; 免疫治疗; 干扰素调节因子 3

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)05-1145-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.05.018

Role of lentinan combined with AdIRF3 inhibiting breast cancer growth through enhancing IFN- β secretion

SU Chang¹, JIA Ying-jie², LI Xiao-jiang², LIU Hong-gen¹, ZHANG Li-li¹, WU Ming-xin², LI Wen-jie², ZHANG Jing¹

1. Department of Oncology, First Teaching Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China

2. Graduate School, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To investigate the effect of lentinan (LNT) combined with IRF3 expressing adenovirus vector on the anti-tumor therapy, and its underlying mechanism. **Methods** Balb/c bearing TUBO mice were treated with PBS, AdGFP, AdIRF3, LNT, and LNT combined with AdIRF3 to observe the tumor growth curve of mice. qPCR was used to detect the IFN- β level of tumor tissues. ELISPOT was to check the IFN- γ secretion of spleen cells. FACS was used to make sure the percentage of tumor infiltrated T cells. Balb/c-nu mice were inoculated with TUBO cells, and tumor growth was monitored. Anti-IFNAR1 antibody was injected to Balb/c bearing mice, and tumor growth was measured. **Results** Compared with control groups, LNT combined with AdIRF3 can inhibit the tumor growth and increase the IFN- γ secretion of TUBO-bearing mice. There was no significant difference of the percentage of tumor infiltrated Treg among groups, but the tumor infiltrated CD8⁺T was significantly higher in LNT combined with AdIRF3 treated mice group. There was no significant difference of tumor growth between Balb-nu mice inoculated with TUBO cells treated by LNT/AdIRF3 and PBS/AdGFP group. The tumor growth was not inhibited in Balb/c bearing mice injected with anti-IFNAR1 antibody and treated by LNT/AdIRF3. **Conclusion** LNT combined with AdIRF3 can inhibit the tumor growth by activating the IRF3-IFN signaling pathway.

Key words: lentinan; breast cancer; interferon; immunotherapy; IRF3

收稿日期: 2018-12-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目“基于 IRF3/IFN 通路探讨香菇多糖联合 IRF3 腺病毒载体的抗乳腺癌作用及机制研究”(81503392)

作者简介: 苏 畅 (1988—), 女, 博士研究生, 医师, 研究方向为中西医结合肿瘤学。Tel: 13672049219 E-mail: tjsuchang@163.com

*通信作者 张 晶 (1985—), 女, 医学博士, 主治医师, 主要从事中西医结合肿瘤治疗。Tel: 18522128450 E-mail: zhang.jing.1216@163.com

乳腺癌根据临床分期、病理类型等特征不同,可选择手术、放化疗、免疫治疗或靶向治疗等单一治疗方案或组合方案进行治疗。虽然乳腺癌不属于免疫原性强的肿瘤类型,但最近乳腺癌相关的免疫治疗已有较多报道,包括程序性细胞死亡蛋白-1(programmed death-1, PD-1)及其配体(PD-L1)、细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4(cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA4)阻断剂及肿瘤疫苗等,但多数处于临床前或早期的临床研究。免疫治疗通过扶正祛邪达到治疗肿瘤的目的,与中医治疗肿瘤有异曲同工之妙^[1-2]。

干扰素调节因子 3(interferon regulator factor 3, IRF3)作为 IRF 家族的代表,是诱导干扰素(interferon, IFN)表达的关键转录因子。在细胞内表达组成活化型 IRF3 后可诱导细胞发生凋亡,同时失活状态 IRF3 能够抑制病毒所导致的细胞凋亡,充分说明了 IRF3 活化能够诱导细胞凋亡^[3];另外体内和体外实验都已证实 IRF3 能够抑制肿瘤细胞的增殖^[4]。相对 IRF3 对肿瘤细胞的直接作用,其调节适应性免疫应答的作用被研究的更为广泛,对树突状细胞、CD4⁺T 细胞及 CD8⁺T 细胞等免疫细胞均有调节分化或功能状态的作用^[5],即 IRF3 不仅是肿瘤抑制分子,还是调节抗肿瘤免疫的重要靶点。由于其不仅自身具有上述功能,其诱导表达的 IFN 等也是体内重要的免疫调节分子,且 α 干扰素(IFN- α)等已应用于临床^[6]。因此,本课题选取 IRF3 为靶点,探讨其在体内的抗肿瘤价值及发挥作用的潜在机制。

香菇多糖是从真菌香菇的子实体中分离出来的,其主要有效成分为 β -1,3-葡聚糖,是一种具有免疫调节作用及抑制肿瘤生长的生物调节剂,临床主要用于肿瘤的辅助治疗,起到增强放化疗疗效、减轻毒副作用、提高免疫效应和改善预后等作用^[7-10],在临床上取得了较好的疗效,但其与免疫治疗联合应用鲜有研究^[10]。

鉴于 IRF3 和香菇多糖均具有免疫调节和抑制肿瘤细胞增殖的作用,且可刺激 IFN 的分泌表达间接发挥抗肿瘤作用,本研究以实验室所构建的组成型活化 IRF3 腺病毒载体(AdIRF3)为依托进行局部治疗,联合香菇多糖系统应用,观察联合应用对肿瘤生长的影响以及适应性免疫应答和(或)I 型干扰素在其中的作用,探索香菇多糖联合分子免疫佐剂应用的价值及潜在的分子免疫机制。

1 材料

1.1 药品及试剂

注射用香菇多糖(1 mg,批号 17110108)购于南京绿叶思科药业有限公司;小鼠 TUBO 乳腺癌细胞系由实验室保存;组成型活化 IRF3 S396A 克隆至 pDualGFP-CCM 载体,再利用腺病毒包装系统进行包装,293AD 细胞进行扩增,CsCl 密度梯度离心法进行纯化后得到腺病毒载体,AdGFP 为不含目的基因的空白对照腺病毒载体,病毒滴度经测定后保存于-80 °C 冰箱,病毒滴度检测试剂盒购于 Cell Biolab 公司;胰蛋白酶、DMEM 培养基及胎牛血清购于 Invitrogen 公司;anti-CD4-PE、anti-CD8-FITC 及 anti-FoxP3-APC 购于 Ebioscience 公司;逆转录及 Real-time PCR(qRT-PCR)试剂盒购于 Takara 公司;IFNAR1 封闭抗体购于 Bio X Cell 公司;Elispot 试剂盒购于 B&D 公司;引物由上海生工生物技术有限公司合成;CD8⁺T 细胞分选磁珠及分选柱购于 Miltenyi Bio 公司。

1.2 动物

SPF 级雌性 Balb/c 小鼠,6~8 周龄,体质量 18~22 g,许可证号 SCXK(京)2014-0004;雌性裸鼠,4~6 周龄,体质量 18~20 g,许可证号 SCXK(京)2014-0004,均由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,饲养于天津医科大学附属肿瘤医院 SPF 级动物房。动物实验取得天津中医药大学伦理委员会批准。

1.3 仪器

Synergy 型全自动酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);RT-PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);ABI7500 荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);流式细胞仪 Aria(BD 公司);Elispot 读板仪(美国 Cellular Technology Limited 公司)。

2 方法

2.1 荷瘤小鼠模型制备

选取 6~8 周 Balb/c 和 4~6 周裸鼠雌性小鼠,饲养于天津医科大学附属肿瘤医院 SPF 动物房。收集对数生长期 TUBO 细胞,皮下接种于小鼠右侧肋部,每只小鼠接种 3×10^5 个细胞。隔天观察并记录肿瘤长径及短径,计算肿瘤体积,绘制肿瘤生长曲线。肿瘤生长至第 8 天后给药。

2.2 香菇多糖 ip 给药

取注射用香菇多糖,PBS 溶解香菇多糖后配制质量浓度为 0.1 mg/mL,按照 1 mg/kg 剂量(中等有

效剂量) 给药, 药物稀释至 0.2 mL 进行 ip 给药, 对照组采用 PBS 0.2 mL ip 给药, 每天 1 次, 连用 3 d。

2.3 腺病毒载体肿瘤内注射

将 AdGFP (空白腺病毒载体) 和 AdIRF3 调整滴度为 2×10^{10} PFU/mL, 第 8 天开始取 50 μ L 隔天进行肿瘤内注射, 共计 3 次; 根据分组不同, 第 8 天开始同时每天 1 次 ip 香菇多糖或 PBS 进行治疗, 连续 3 d。具体分组如下: 第 8 天根据肿瘤大小将 Balb/c 荷瘤小鼠随机分组, 分别为 PBS 组 (肿瘤内注射 PBS 50 μ L + ip PBS 0.2 mL)、AdGFP 组 (肿瘤内注射 AdGFP 50 μ L + ip PBS 0.2 mL)、AdIRF3 组 (肿瘤内注射 AdIRF3 50 μ L + ip PBS 0.2 mL)、香菇多糖组 (肿瘤内注射 PBS 50 μ L + ip 香菇多糖 0.2 mL) 及 AdIRF3 联合香菇多糖组 (肿瘤内注射 AdIRF3 50 μ L + ip 香菇多糖 0.2 mL), 每组 6 只。隔天测量肿瘤大小, 记录肿瘤生长曲线。在荷瘤裸鼠实验中, 第 8 天依据肿瘤大小随机分组, 具体分组如下: 香菇多糖 + AdIRF3 组 (肿瘤内注射 AdIRF3 50 μ L + ip 香菇多糖 0.2 mL) 和 PBS + AdGFP 组 (肿瘤内注射 AdGFP 50 μ L + ip PBS 0.2 mL), 依分组进行病毒载体肿瘤内注射, 注射方法及剂量同上。

2.4 IFNAR1 封闭抗体应用

在封闭抗体应用实验中, 选取抗 IFNAR1 封闭抗体, 分别于第 7、9 及 11 天 ip 封闭抗体, 设置不同的浓度梯度, 依次为 0、0.5、1.0、2.0 mg 组, 每组中 3 次注射封闭抗体剂量相同。

2.5 qRT-PCR

第 26 天 CO₂ 吸入法牺牲小鼠后, 剥离右侧肋部肿瘤组织, 取 1/2 肿瘤组织经研磨、组织蛋白酶消化、滤过后制备单细胞悬液, 取 1/2 单细胞悬液用于 qRT-PCR 检测, TRIzol 提取 RNA, 分光光度计测定 A_{260}/A_{280} , 计算 RNA 含量; MMLV 合成 cDNA, qRT-PCR 检测细胞内 IFN- β , 18 S 为内参基因。

2.6 流式细胞术检测肿瘤局部浸润淋巴细胞比例

第 26 天 CO₂ 吸入法牺牲小鼠后, 剥离右侧肋部肿瘤组织, 取 1/2 肿瘤组织经研磨、组织蛋白酶消化、滤过后制备单细胞悬液, 取 1/2 单细胞悬液用于流式细胞术检测。预冷 1% BSA/PBS 1 mL 洗涤所获取的肿瘤细胞, 1 200 r/min 离心后重悬于 500 μ L 1% BSA/PBS 中, Fc 段封闭细胞表面非特异抗原后进行染色, 标记 CD8-FITC、CD4-PE 及 FoxP3-APC 抗体后, 避光冰上孵育 30 min 后, 洗涤后重悬于 400 μ L 1% BSA/PBS 溶液中, 上机检测。

2.7 ELISPOT 法检测 IFN- γ 分泌

第 26 天 CO₂ 吸入法牺牲小鼠后, 获取小鼠脾脏, 研磨法制备单细胞悬液, 充分裂解红细胞后, 通过磁珠分选方法 (MACS) 分离 CD8⁺T 细胞, 利用所获取的 CD8⁺T 细胞为效应细胞, 种于 ELISPOT 的 96 孔板, 5×10^5 个/孔。小鼠淋巴瘤 EL4 细胞负载 TUBO 细胞裂解物, 经 X 线照射后为抗原提呈细胞, 用于刺激效应细胞分泌 IFN- γ 。抗原提呈细胞与效应细胞的比例分别设为 1:40、1:20 及 1:10。经过孵育、洗板、一抗及二抗染色、显色及读板后, 统计各孔阳性斑点数进行比较。

2.8 统计分析

所有实验均重复 3 次以上, 采用 GraphPad 公司 Prism 6 软件进行统计分析; 定量资料应用 $\bar{x} \pm s$ 进行描述, 多组间比较采用 one-way ANOVA 检验, 2 组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 香菇多糖联合 AdIRF3 对荷瘤小鼠肿瘤生长的影响

Balb/c 荷瘤小鼠接受不同处理后, 记录肿瘤生长曲线, 可见单独香菇多糖或 AdIRF3 处理可延缓 TUBO 肿瘤生长, 同时香菇多糖与 AdIRF3 联用后对 TUBO 肿瘤生长的抑制作用更强 (图 1)。

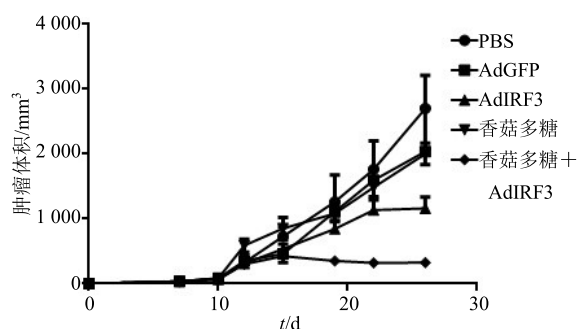


图 1 荷瘤 Balb/c 小鼠接受不同处理后的肿瘤生长曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of different treatment on tumor volume of TUBO xenograft in Balb/c mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2 香菇多糖与 AdIRF3 联合对肿瘤细胞分泌 IFN- β 的影响

获取小鼠的肿瘤组织制备单细胞悬液后, 利用 qRT-PCR 的方法检测细胞内 IFN- β 的表达水平。与其他处理组相比, 香菇多糖联合 AdIRF3 组小鼠肿瘤细胞分泌更高水平的 IFN- β , 提示香菇多糖与 AdIRF3 具有协同刺激 IFN- β 的作用 (图 2)。

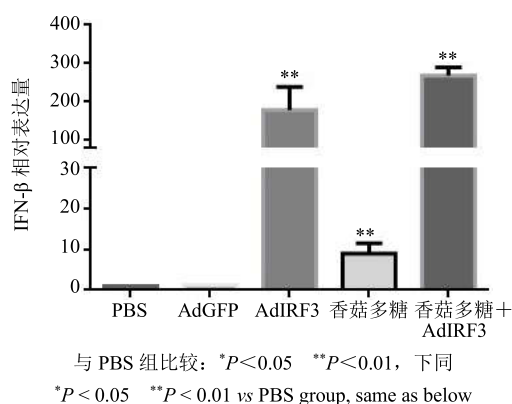


图 2 RT-PCR 方法检测肿瘤组织中 IFN β 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 IFN- β expression in tumor cells detected by RT-PCR ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

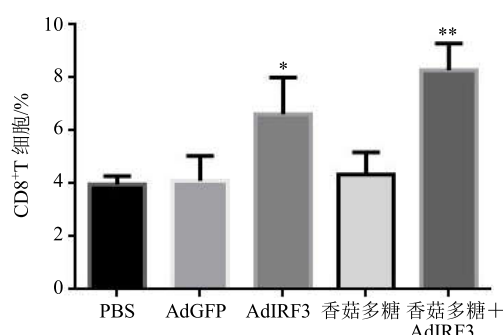
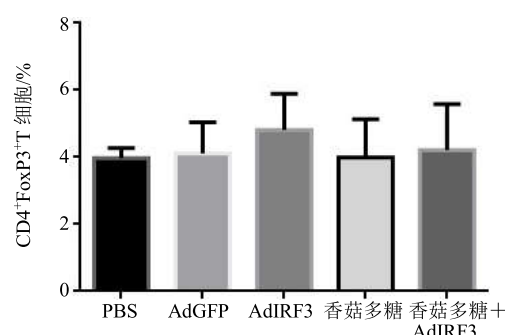


图 3 FACS 法检测肿瘤组织中 CD8⁺T 细胞及 CD4⁺FoxP3⁺Treg 细胞比例 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Tumor infiltrating CD8⁺T cell and CD4⁺FoxP3⁺Treg cell analyzed by FACS ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



力, 可见香菇多糖联合 AdIRF3 刺激淋巴细胞分泌 IFN- γ 的能力最强, 约为 PBS 对照组的 7 倍 (图 4)。

3.5 香菇多糖与 AdIRF3 联合对荷瘤裸鼠肿瘤生长的影响

与 PBS+AdGFP 组肿瘤生长曲线相比, 荷瘤裸鼠接受香菇多糖及 AdIRF3 处理后, 联合处理组未

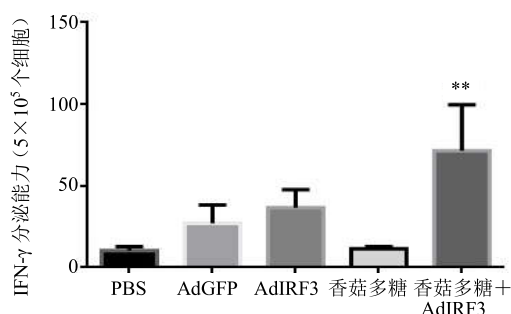


图 4 ELISPOT 法检测荷瘤小鼠脾脏 T 细胞的 IFN- γ 分泌反应能力 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 IFN- γ secretion of tumor infiltrating T cells detected by ELISPOT ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.3 香菇多糖联合 AdIRF3 对肿瘤局部浸润 CD8⁺T 细胞比例的影响

在获取肿瘤组织后, 取部分肿瘤组织制备单细胞悬液后, 分析肿瘤局部浸润淋巴细胞的数量, 可以看到经不同处理后, 各组间肿瘤浸润 CD4⁺FoxP3⁺调节性 T 细胞 (Treg) 细胞比例并未发生显著变化, 而 AdIRF3 组、香菇多糖联合 AdIRF3 组的肿瘤浸润 CD8⁺T 细胞比例显著高于其他组, 尤其是香菇多糖联合 AdIRF3 组增加更为显著 (图 3)。

3.4 香菇多糖联合 AdIRF3 对 T 细胞分泌 IFN- γ 的影响

获取小鼠脾脏, 制备单细胞悬液, ELISPOT 检测不同处理组的 CD8⁺T 细胞的 IFN- γ 分泌释放能

能抑制荷瘤裸鼠的肿瘤生长 (图 5)。

3.6 阻断 IFNAR1 对香菇多糖联合 AdIRF3 的肿瘤抑制作用的影响

利用 Balb/c 小鼠接种 TUBO 肿瘤细胞后, 利用 IFNAR1 封闭抗体阻断 IFN 的作用, 可见注射不同量 IFNAR1 均可抑制香菇多糖联合 AdIRF3 的肿瘤抑制作用, 每次 1 mg 的量足以抑制香菇多糖联合 AdIRF3 联合处理组的肿瘤抑制作用 (图 6)。

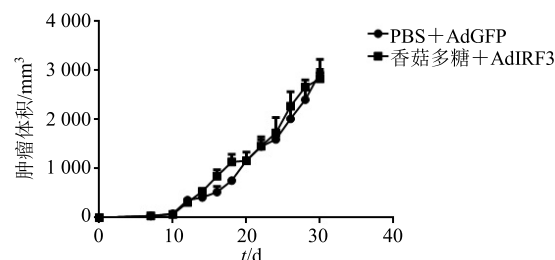


图 5 荷瘤 Balb/c-nu 小鼠肿瘤生长曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effect of different treatment on tumor volume of TUBO xenograft in Balb/c-nu mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

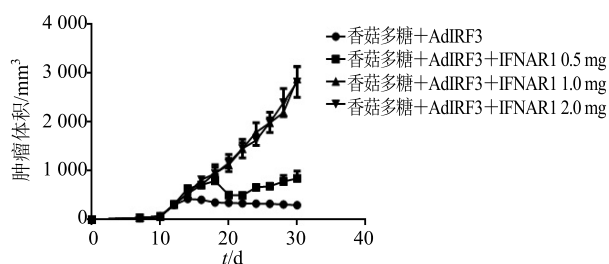


图 6 不同浓度 IFNAR1 封闭抗体阻断后荷瘤 Balb/c 小鼠肿瘤生长曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 6 Tumor volume of TUBO xenograft in Balb/c mice receiving IFNAR1 blocking antibody ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

4 讨论

IFN 是 IRF3 活化的重要下游分子, 其中 IFN- α 是临床可以应用于抗肿瘤治疗的有效药物, 但其临床使用有效率有限且大剂量应用时不良反应严重, 极大地限制了其临床应用^[6]。Dubort 及其同事发现肿瘤内注射 I 型干扰素或系统应用抗-CD137 抗体对小鼠 MC38 肿瘤的治疗效果都非常有限, 但是将两者联合应用后, 便可协同作用在注射部位远处产生抗肿瘤免疫反应^[11]。干扰素基因刺激蛋白 (stimulator of interferon genes, STING) 为新近发现表达于细胞浆内的外源性或内源性 DNA 感受器, 活化后可刺激 IRF3 及 NF- κ B 通路表达 I 型干扰素, 进而发挥抗肿瘤作用, 研究发现通过将 STING 配体与粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 联合, 可有效控制肿瘤生长, 与 PD-1 阻断剂联合应用时其抑制肿瘤生长的作用更强^[12]。以上研究均揭示了通过联合方式打破免疫抑制状态, 进而控制肿瘤生长既有理论可能性又具有现实的意义, 且 IRF3-IFN 通路是发挥核心作用的信号传导通路。

机体免疫功能受到抑制是肿瘤发生、进展的重要机制之一, 如何打破免疫耐受一直是中西医肿瘤研究的重要组成部分。肿瘤内注射模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 激动剂可以产生系统性的抗肿瘤免疫反应, 即通过“异位效应”对远处未注射的肿瘤病灶也能发挥作用。例如溶瘤病毒疫苗为病毒载体经过改造后可以更好的靶向肿瘤细胞, 并且高表达免疫刺激分子, 如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、白细胞介素-12 (IL-12) 或 I 型干扰素。一项包含 14 例原发性肝癌或转移性肝内结节患者的研究中, 肿瘤内注射 JX-594/TG6006 病毒后, 30%~50% 患者注射部位

和远处未注射部位都可以产生部分缓解, 并且随后的 II 期临床试验验证了上述结果^[13-14]。因此, 选择病毒载体为基础, 表达活化状态的 IRF3, 不仅可直接作用于肿瘤细胞, 还可利用其活化免疫系统的方式产生全身作用。

IRF3 无论对固有性免疫应答还是适应性免疫应答都有着重要的作用, 特别是与肿瘤免疫相关的适应性免疫应答。已有文献报道 IRF3 对 T 细胞、B 细胞、NK 细胞及以树突状细胞为代表的抗原提呈细胞的功能均有重要的影响, 直接或间接地影响着抗肿瘤免疫反应^[15]。香菇多糖亦有类似的作用机制, 且已从基因层面揭示香菇多糖多可通过影响免疫细胞功能调节抗肿瘤免疫反应^[10,16]。本研究揭示持续活化的 IRF3 表达与香菇多糖联合可进一步控制乳腺癌细胞的生长, 相关的潜在机制研究揭示与肿瘤局部淋巴细胞的浸润及浸润 T 细胞功能状态相关, 进一步的研究发现 IRF3 及香菇多糖影响免疫细胞功能状态的潜在纽带为 IFN- β 。通过阻断 I 型干扰素的作用通路, 其抑制肿瘤生长的作用近乎消失, 不仅从功能角度证实了重组活化 IRF3 联合香菇多糖可控制乳腺癌细胞的生长, 还揭示了 IFN- β 是其作用的重要介质^[17-18]。

总之, 肿瘤的发生、进展与免疫逃逸及免疫功能受到抑制有着重要的关系, 免疫治疗已成为近年来有望治愈肿瘤的重要手段。中医治疗肿瘤的扶正祛邪与西医免疫治疗的打破免疫耐受有着极大的相通之处。本研究通过 IRF3 的持续活化与香菇多糖联合打破免疫耐受, 进而控制乳腺癌细胞的生长, 具有重要的参考意义, 为进一步中西医结合治疗肿瘤提供可行的研究方向。

参考文献

- [1] Hu Z I, McArthur H L. Immunotherapy in breast cancer: The new frontier [J]. *Curr Breast Cancer Rep*, 2018, 10(2): 35-40.
- [2] Parvizpour S, Razmara J, Omid Y. Breast cancer vaccination comes to age: Impacts of bioinformatics [J]. *Bioimpacts*, 2018, 8(3): 223-235.
- [3] Heylbroeck C, Balachandran S, Servant M J, et al. The IRF-3 transcription factor mediates Sendai virus-induced apoptosis [J]. *J Virol*, 2000, 74(8): 3781-3792.
- [4] Pencheva N, de Gooijer M C, Vis D J, et al. Identification of a druggable pathway controlling glioblastoma invasiveness [J]. *Cell Rep*, 2017, 20(1): 48-60.
- [5] Ysebrant D L L, Martinet V, Goriely S. Interferon

- regulatory factor 3 in adaptive immune responses [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(20): 3873-3883.
- [6] Hochmann S, Mittermeir M, Santic R, *et al.* Evaluation of modified Interferon alpha mRNA constructs for the treatment of non-melanoma skin cancer [J]. *Sci Rep*, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-31061-w.
- [7] Yi W, Zhang P, Hou J, *et al.* Enhanced response of tamoxifen toward the cancer cells using a combination of chemotherapy and photothermal ablation induced by lentinan-functionalized multi-walled carbon nanotubes [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 120(Pt B): 1525-1532.
- [8] Wang H, Cai Y, Zheng Y, *et al.* Efficacy of biological response modifier lentinan with chemotherapy for advanced cancer: A meta-analysis [J]. *Cancer Med*, 2017, 6(10): 2222-2233.
- [9] 李石军, 王凯平, 汪柳, 等. 香菇多糖 LNT₂ 的提取分离纯化、结构及体外抗肿瘤活性研究 [J]. *中草药*, 2014, 45(9): 1232-1237.
- [10] Deng S, Zhang G, Kuai J, *et al.* Lentinan inhibits tumor angiogenesis via interferon gamma and in a T cell independent manner [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, doi: 10.1186/s13046-018-0932-y.
- [11] Dubrot J, Palazon A, Alfaro C, *et al.* Intratumoral injection of interferon-alpha and systemic delivery of agonist anti-CD137 monoclonal antibodies synergize for immunotherapy [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(1): 105-118.
- [12] Liang Y, Tang H, Guo J, *et al.* Targeting IFNalpha to tumor by anti-PD-L1 creates feedforward antitumor responses to overcome checkpoint blockade resistance [J]. *Nat Commun*, 2018, doi: 10.1038/s41467-018-06890-y.
- [13] Heo J, Reid T, Ruo L, *et al.* Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer [J]. *Nat Med*, 2013, 19(3): 329-336.
- [14] Park B H, Hwang T, Liu T C, *et al.* Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: A phase I trial [J]. *Lancet Oncol*, 2008, 9(6): 533-542.
- [15] Yanai H, Chiba S, Hangai S, *et al.* Revisiting the role of IRF3 in inflammation and immunity by conditional and specifically targeted gene ablation in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(20): 5253-5258.
- [16] Chen Q, Peng H, Dong L, *et al.* Activation of the NRF2-ARE signalling pathway by the Lentinula edodes polysaccharose LNT alleviates ROS-mediated cisplatin nephrotoxicity [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 36: 1-8.
- [17] Katlinskaya Y V, Katlinski K V, Yu Q, *et al.* Suppression of type I interferon signaling overcomes oncogene-induced senescence and mediates melanoma development and progression [J]. *Cell Rep*, 2016, 15(1): 171-180.
- [18] Katlinski K V, Gui J, Katlinskaya Y V, *et al.* Inactivation of interferon receptor promotes the establishment of immune privileged tumor microenvironment [J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(2): 194-207.