

团 体 标 准

T/XXX XXXX—XXXX

灵芝多糖和三萜类化合物抗肿瘤协同功效
评价方法

Evaluation method for the synergistic anti - tumor efficacy of ganoderma lucidum
polysaccharides and triterpenoids

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

发 布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 基本原则	1
5 评价方法	2
6 数据处理与分析	7
7 结果判定	7
8 评价报告	9
参考文献	10

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由××××提出。

本文件由××××归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

灵芝多糖和三萜类化合物抗肿瘤协同功效评价方法

1 范围

本文件规定了灵芝多糖和三萜类化合物抗肿瘤协同功效评价的基本原则、评价方法、数据处理与分析、结果判定、评价报告等。

本文件适用于指导含灵芝多糖和灵芝三萜类化合物的食品、保健食品及相关研发样品的抗肿瘤协同功效的评价。不适用于药品范畴的评价。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 14925 实验动物 环境及设施

GB/T 29344 灵芝孢子粉采收及加工技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

灵芝多糖 ganoderma polysaccharides

从灵芝子实体、菌丝体或孢子粉中提取分离得到的多糖类化合物，主要由葡萄糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖等单糖通过糖苷键连接而成，具有多种生物活性。

3.2

三萜类化合物 triterpenoids

一类具有30个碳原子的萜类化合物，在灵芝中广泛存在，具有多种结构类型，如四环三萜、五环三萜等，具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化等生物活性。

3.3

协同指数 combination index, CI

用于评价两种或多种物质联合作用效果的定量指标，通过特定公式计算得出，可判断其相互作用为协同、相加或拮抗。

4 基本原则

4.1 科学性原则

基于细胞生物学、肿瘤学等理论，采用经验证的实验技术（如 MTT 法、流式细胞术），确保评价结果可重复、可追溯。

4.2 实用性原则

实验方法、操作流程及判定规则具有可操作性，适用于实验室及检测机构，且实验周期、成本可控。

4.3 安全性原则

在评价协同功效时，应同步对灵芝多糖与灵芝三萜类化合物复合体系进行毒性评估。其中，体外细胞毒性检测可参照《保健食品检验与评价技术规范》中的体外细胞毒性试验方法执行；涉及动物实验，实验动物的饲养环境应符合GB 14925的要求，肝肾功能等关键毒性指标检测应遵循现行有效的保健食品或食品安全性评价相关技术规范，确保评价过程及样品无急性毒性或潜在长期安全风险。

5 评价方法

5.1 细胞试验

5.1.1 试验材料及设备

5.1.1.1 样品

选用符合GB/T 29344要求的灵芝子实体，样品来源清晰可追溯。采用水提醇沉法，制备灵芝多糖；采用醇提萃取法，制备灵芝三萜类化合物。

5.1.1.2 试剂

5.1.1.2.1 蒸馏水：符合 GB/T 6682 中一级水的要求。

5.1.1.2.2 胎牛血清：应无支原体、病毒污染。

5.1.1.2.3 RPMI1640 培养基、DMEM 培养基：符合细胞培养要求。

5.1.1.2.4 CCK-8 试剂：正规厂家生产，在有效期内。

5.1.1.2.5 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒：质量合格，按说明书储存。

5.1.1.2.6 阳性对照药物：选取临床常用抗肿瘤药物，纯度 $\geq 98\%$ ，正规厂家生产，在有效期内。

5.1.1.2.7 其他试剂：如相关缓冲液，均为分析纯及以上级别，且在有效期内使用。

5.1.1.3 仪器设备

5.1.1.3.1 超净工作台。

5.1.1.3.2 CO₂培养箱（温度控制精度 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ，CO₂浓度控制精度 $\pm 0.1\%$ ）。

5.1.1.3.3 酶标仪（波长范围 340 nm~750 nm，精度 $\pm 1\%$ ）。

5.1.1.3.4 流式细胞仪。

5.1.1.3.5 Transwell 小室。

5.1.1.3.6 96 孔板。

5.1.1.3.7 培养瓶。

5.1.1.3.8 离心机（转速 $\geq 10000\text{r}/\text{min}$ ）。

5.1.1.3.9 移液器（量程涵盖 1 μL ~1000 μL ）。

5.1.1.3.10 冰箱（4 $^{\circ}\text{C}$ 、-20 $^{\circ}\text{C}$ ）。

5.1.1.3.11 倒置显微镜。

5.1.1.3.12 血细胞计数板。

5.1.2 预试验

5.1.2.1 单成分浓度范围筛选

选取人源性肿瘤细胞系（如 MCF-7、HCT116），接种于 96 孔板（ 5×10^3 个/孔），培养 24 h 后，分别加入不同浓度梯度的灵芝多糖，预实验浓度范围：10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；灵芝三萜类化合物，预实验浓度范围：5 μM ~400 μM ，每组设置 3 个复孔，同时设置空白对照组，仅加细胞培养液。继续培养 48h 后，采用 CCK-8 法检测各孔 OD 值，计算细胞生长抑制率，绘制量效曲线，筛选出单药抑制率在 20%~80% 之间的浓度范围，作为正式实验的单药浓度梯度依据。

5.1.2.2 联合配比比例筛选

基于单成分筛选出的有效浓度范围，设置灵芝多糖与三萜类化合物的候选联合配比比例，如 10:1、5:1、2:1、1:1、1:2、1:5、1:10。按照各配比比例，将两种单成分的有效浓度范围进行组合，制备储备液。将肿瘤细胞接种于 96 孔板并培养 24 h 后，加入不同配比的联合用药溶液，每组 3 个复孔，设置空白对照组及单成分对照组。培养 48h 后通过 CCK-8 法检测细胞抑制率，采用金正均 Q 值法评价联合用药效果， $Q > 1.15$ 为协同作用， $0.85 \leq Q \leq 1.15$ 为相加作用， $Q < 0.85$ 为拮抗作用，筛选出具有协同作用的3~4个最优配比比例，用于正式试验。

5.1.3 试验步骤

5.1.3.1 溶液配制

分别称取灵芝多糖和三萜类化合物样品，用含10%胎牛血清的细胞培养液溶解，配制成预实验筛选确定的不同浓度的储备液；联合用药组按照预实验筛选出的最优配比比例混合两种储备液。阳性对照药物用相应溶剂溶解并稀释至临床等效浓度或预实验确定的有效浓度，制备阳性对照储备液。所有溶液经0.22 μm 滤膜过滤除菌，4℃避光保存，有效期不超过7天。

5.1.3.2 细胞系选择与培养

选取人源性肿瘤细胞系，如乳腺癌细胞系 MCF-7、结肠癌细胞系 HCT116，细胞应处于对数生长期，活力≥95%，且无支原体污染。将细胞培养于含10%胎牛血清、1% 双抗的相应培养基中，置于 37℃、5% CO₂培养箱中培养。

5.1.3.3 试验分组

5.1.3.3.1 空白对照组：每孔加入 200 μL 细胞培养液。

5.1.3.3.2 阳性对照组：加入预实验确定的有效浓度的阳性对照药物溶液，使每孔终体积为 200 μL。

5.1.3.3.3 灵芝多糖单独处理组：设置预实验筛选的浓度梯度，分别向各孔中加入相应浓度的灵芝多糖溶液，使每孔终体积为 200 μL。

5.1.3.3.4 三萜类化合物单独处理组：设置预实验筛选的浓度梯度，分别向各孔中加入相应浓度的三萜类化合物溶液，使每孔终体积为 200 μL。

5.1.3.3.5 灵芝多糖和三萜类化合物联合处理组：按照预实验筛选出的具有协同作用的配比比例进行组合。

5.1.3.4 细胞接种与给药

将细胞以 5×10^3 个/孔接种于96孔板，培养24 h后加入不同组别的药物溶液，继续培养 48 h。

5.1.4 指标检测

5.1.4.1 细胞增殖抑制实验（MTT 法）

将对数生长期的肿瘤细胞用DMEM培养基调整细胞浓度为 5×10^4 个/mL，每孔加入100 μL细胞悬液接种于96孔板，使每孔细胞数为 5×10^3 个。将96孔板置于37℃、5% CO₂培养箱中培养24 h，使细胞贴壁生长。按照上述药物处理分组，向各孔中加入相应的药物溶液，每孔 100 μL，每个浓度设置3个复孔。继续将96孔板置于培养箱中培养 48 h。每孔加入 20 μL MTT 溶液（5 mg/mL），轻轻振荡混匀，置于培养箱中继续培养 4 h。小心弃去各孔中的上清液，避免吸走孔底部的紫色结晶。每孔加入 150 μL DMSO，置于摇床上振荡10min，使紫色结晶充分溶解。用酶标仪在490 nm波长处测定各孔的吸光度值（OD 值）。试验重复3次，取平均值，计算细胞生长抑制率。计算公式如下：

$$X = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X—细胞生长抑制率，%；

A₀—空白对照组 OD 值平均值；

A₁—实验组OD值平均值。

5.1.4.2 细胞凋亡检测

取对数生长期的肿瘤细胞，接种于6孔板中，每孔细胞数为 2×10^5 个，培养 24 h使细胞贴壁。按照药物处理分组加入相应的药物，继续培养48 h。用胰蛋白酶消化细胞，收集各孔中的细胞悬液于离心管中，以1000 rpm的速度离心5 min，弃去上清液。用 PBS 洗涤细胞2次，每次离心后弃去上清液。向离心管中加入195 μL Annexin V-FITC 结合液，轻轻重悬细胞。加入5 μL Annexin V-FITC，轻轻混匀，避光室温孵育10 min。加入10 μL PI 染色液，轻轻混匀，避光室温孵育5 min。用流式细胞仪检测细胞凋亡比例，激发波长为 488 nm，发射波长为 530 nm（FITC）和 610 nm（PI）。

5.1.4.3 细胞侵袭转移检测

将基质胶从-20℃取出，置于4℃冰箱过夜融化，用无血清培养基按 1:8比例稀释，轻轻混匀，避免产生气泡。在 Transwell 小室上室底部均匀加入 50 μL 稀释后的基质胶，置于 37℃、5% CO₂培养箱中孵育 4 h ~6 h，使基质胶凝固成胶状。收集各实验组对数生长期的细胞，用无血清培养基洗涤2次，调整细胞浓度为 2×10⁵个/mL。向 Transwell 小室上室加入200 μL细胞悬液，下室加入 600 μL含10% 胎牛血清的培养基（作为趋化因子），每组设置3个复孔。将24孔板置于37℃、5% CO₂培养箱中培养24 h ~48 h。取出 Transwell 小室，弃去上下室液体，用 PBS 洗涤2次，加入4%多聚甲醛溶液固定30min。弃去固定液，PBS 洗涤 2 次，加入0.1% 结晶紫染液染色 20min，自来水缓慢冲洗至多余染液洗净，用棉签轻轻擦去上室未侵袭的细胞。待小室干燥后，倒置显微镜下观察，选取5个不同视野（上、下、左、右、中）计数穿过小室的细胞数，取平均值。

5.1.4.4 细胞周期检测

将肿瘤细胞接种于6孔板中，培养24h后加入相应药物，继续培养48h。收集细胞，离心后用 PBS 洗涤 2 次。向细胞沉淀中加入 70% 预冷乙醇，轻轻吹打混匀，4℃固定过夜。离心弃去乙醇，用 PBS 洗涤细胞 2 次。加入500 μL PI 染色液（含 RNase A），37℃避光孵育 30 min。用流式细胞仪检测细胞周期分布，激发波长为 488 nm，发射波长为 610 nm。

5.2 动物实验

5.2.1 实验材料及设备

5.2.1.1 样品

同 5.1.1 中的灵芝多糖和三萜类化合物。

5.2.1.2 试剂

5.2.1.2.1 生理盐水：0.9% 氯化钠注射液，符合药典标准。

5.2.1.2.2 75% 酒精。

5.2.1.2.3 IL-2、TNF-α 检测试剂盒：灵敏度高、特异性好。

5.2.1.2.4 其他试剂：4%甲醛溶液、10%中性福尔马林溶液、洗涤液、环磷酰胺、苏木素染液、伊红染液，均为分析纯及以上级别。

5.2.1.2.5 中性树胶。

5.2.1.3 仪器设备

5.2.1.3.1 屏障环境动物饲养箱（温度 22℃~25℃，湿度 40%~60%）。

5.2.1.3.2 游标卡尺（精度 0.01 mm）。

5.2.1.3.3 电子天平（精度 0.001 g）。

5.2.1.3.4 病理切片机。

5.2.1.3.5 显微镜。

5.2.1.3.6 离心机。

5.2.1.3.7 移液器。

5.2.1.3.8 冰箱（4℃、-20℃、-80℃）。

5.2.1.3.9 无菌毛细管（直径 0.5 mm ~1.0 mm）。

5.2.1.3.10 采血管。

5.2.1.3.11 酶标板。

5.2.1.3.12 酶标仪。

5.2.1.3.13 光学显微镜：配备 10×、20×、40×物镜。

5.2.1.3.14 石蜡包埋设备。

5.2.1.3.15 切片机。

5.2.1.3.16 防脱载玻片。

5.2.1.3.17 烤片机。

5.2.1.3.18 无菌解剖台。

5.2.1.3.19 一次性无菌垫布。

- 5.2.1.3.20 无菌手术剪。
- 5.2.1.3.21 无菌镊子。
- 5.2.1.3.22 无菌培养皿。
- 5.2.1.3.23 无菌滤纸（经 121℃ 高压灭菌 30 min）。
- 5.2.1.3.24 称量皿。
- 5.2.1.3.25 75% 酒精棉片。

5.2.2 实验步骤

5.2.2.1 溶液配制

分别称取灵芝多糖和三萜类化合物样品，用无菌生理盐水溶解，配制成不同浓度的储备液，联合用药组按照预设比例混合两种储备液，4℃ 保存备用。

5.2.2.2 实验动物选择与饲养

选用 SPF 级 BALB/c 裸鼠或 C57BL/6 小鼠，雌雄各半，体重 18g~22g，饲养于符合 GB 14925 要求的屏障环境中，自由摄食饮水，适应环境3~5天后开始实验。

5.2.2.3 肿瘤模型建立

将对数生长期的肿瘤细胞（如 HepG2 细胞）调整浓度为 1×10^7 个/mL，每只小鼠右侧腋窝皮下接种 0.2 mL 细胞悬液，每只小鼠注射 1×10^7 个细胞。注射后每天观察裸鼠的精神状态、饮食情况以及肿瘤生长情况。当肿瘤体积长至约 $100 \text{ mm}^3 \sim 200 \text{ mm}^3$ 时，将裸鼠随机分组进行实验。

5.2.2.4 实验分组及给药

5.2.2.4.1 阳性对照组：每只小鼠每天灌胃给予环磷酰胺，剂量为 20 mg/kg 体重，连续给药 21 天。

5.2.2.4.2 模型对照组：每只小鼠每天灌胃给予 0.2 mL 生理盐水，连续给药 21 天。

5.2.2.4.3 灵芝多糖单独处理组：设置低、中、高三个剂量组，分别为 100 mg/kg 体重、200 mg/kg 体重、400 mg/kg 体重。每只小鼠每天按相应剂量灌胃给予灵芝多糖溶液，连续给药 21 天。

5.2.2.4.4 三萜类化合物单独处理组：设置低、中、高三个剂量组，分别为 50 mg/kg 体重、100 mg/kg 体重、200 mg/kg 体重。每只小鼠每天按相应剂量灌胃给予三萜类化合物溶液，连续给药 21 天。

5.2.2.4.5 灵芝多糖和三萜类化合物联合处理组：按照灵芝多糖与三萜类化合物剂量比为 2:1、1:1、1:2 进行组合，具体剂量如下：

——2:1 比例：灵芝多糖 200 mg/kg 体重 + 三萜类化合物 100 mg/kg 体重、灵芝多糖 400 mg/kg 体重 + 三萜类化合物 200 mg/kg 体重；

——1:1 比例：灵芝多糖 100 mg/kg 体重 + 三萜类化合物 100 mg/kg 体重、灵芝多糖 200 mg/kg 体重 + 三萜类化合物 200 mg/kg 体重；

——1:2 比例：灵芝多糖 100 mg/kg 体重 + 三萜类化合物 200 mg/kg 体重、灵芝多糖 200 mg/kg 体重 + 三萜类化合物 400 mg/kg 体重。

5.2.2.4.6 每只小鼠每天按相应剂量灌胃给予联合药物溶液，连续给药 21 天。

5.2.3 指标检测

5.2.3.1 肿瘤生长情况

5.2.3.1.1 肿瘤体积测量

从给药第1天开始，每隔3天用游标卡尺测量肿瘤体积，每次测量由同一操作人员完成，以肿瘤最明显凸起处为基准，分别测量最长径（a）和垂直于长径的最短径（b），若肿瘤形态规则，连续测量 3 次，取平均值记录，按照公式 2 计算肿瘤体积。若肿瘤形态不规则，需额外测量第三径（c，垂直于a-b平面的直径），连续测量 3 次，取平均值记录，按照公式3计算肿瘤体积。

$$V = \frac{(a \times b^2)}{2} \dots \dots \dots (1)$$

式中：

V——肿瘤体积， mm^3 ；

a——肿瘤最长径，mm；
b——垂直于长径的最短径，mm。

$$V = \frac{a \times b \times c}{6} \dots \dots \dots (2)$$

式中：

V——肿瘤体积，mm³；
a——肿瘤最长径，mm；
b——垂直于长径的最短径，mm；
c——垂直于a-b平面的直径，mm。

5.2.3.1.2 抑瘤率计算

5.2.3.1.2.1 给药 21 天后，同一批次小鼠需在同一天内完成处死，处死时间间隔不超过 4 h。脱颈椎处死后，立即用 75% 酒精浸泡小鼠体表 30 s 消毒，置于无菌解剖台的一次性无菌垫布上。用无菌手术剪沿肿瘤边缘剪开皮肤，完整剥离肿瘤，确保无残留。若肿瘤与周围组织粘连，用无菌生理盐水冲洗后小心分离，禁止拉扯肿瘤导致组织破损。剥离后立即放入预冷 4℃ 的无菌生理盐水中漂洗 10 s，去除表面血迹和组织碎屑，用无菌滤纸（经 121℃ 高压灭菌 30 min）轻轻吸干表面水分，避免挤压肿瘤组织。

5.2.3.1.2.2 处理好的肿瘤，用电子天平称重。每称量 1 个样本后，立即用 75% 酒精棉片擦拭称量皿，更换新的无菌滤纸，避免交叉污染。称重完成后，将肿瘤组织按编号对应放入 4% 多聚甲醛溶液中固定（用于后续病理检查），并记录肿瘤外观特征（如颜色、质地、有无坏死）。采用双人双录入法，将实验组和模型对照组的瘤重数据分别记录，计算每组平均瘤重，按照以下公式计算抑瘤率。

$$T = \left(1 - \frac{m_1}{m_0}\right) \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

式中：

T——抑瘤率，%；
m₁——实验组平均瘤重，g；
m₀——模型对照组平均瘤重，g。

5.2.3.2 免疫功能

5.2.3.2.1 细胞因子检测

实验结束后，优先采用眼眶静脉丛采血法，用无菌毛细管（直径 0.5 mm ~1.0 mm）沿内眦部轻轻刺入，待血液自然流入采血管，每只小鼠采血量控制在 0.5 mL ~1.0 mL（根据小鼠体重调整，不超过体重的 1%）。采血管倾斜 30° 放置于室温（22℃ ~25℃）环境中，静置 30 min ~60 min，待血液自然凝固，可见血清与血块分层。使用台式离心机，转速 3000 rpm 离心 10 min 分离血清，离心完成后，放入 -80℃ 冰箱冷冻保存。按照试剂盒说明制备标准品梯度，每个浓度设置 3 个复孔，用标准品稀释液定容，避免手工稀释误差。将血清样本从 -80℃ 冰箱取出，4℃ 解冻后轻轻混匀，避免剧烈震荡，按试剂盒要求稀释，通常 1:1 或 1:5 稀释，每孔加入 100 μL 稀释后的样本，空白孔加入等量样本稀释液，加盖后 37℃ 孵育 60 min。孵育结束后，弃去孔内液体，用洗涤液注满每孔，静置 30 s 后弃去，重复洗涤 5 次，最后一次洗涤后将酶标板倒置在吸水纸上拍干。按顺序加入检测抗体（每孔 100 μL），每个样本检测 2 次，CV ≤ 10%，标准曲线 R² ≥ 0.98。

5.2.3.2.2 免疫器官指数测定

5.2.3.2.2.1 采用脱颈椎法处死小鼠，用精度为 0.1 g 的电子秤称量小鼠体重，记录精确至 0.1 g，确保体重数据与免疫器官重量对应。体重记录完成后，立即将小鼠置于无菌解剖台上，用 75% 酒精喷洒体表消毒 30 s，待酒精挥发后开始解剖。从处死小鼠到取出脾脏和胸腺的时间需控制在 5 min 内，避免器官因缺血发生形态和重量变化。用无菌手术剪沿小鼠腹中线剪开腹腔，切口长度约 2 cm ~3 cm，暴露腹腔脏器；脾脏位于胃左侧，呈暗紫色椭圆形，用无菌镊子轻轻提起脾脏，小心分离周围结缔组织和血管，完整取出脾脏。剪开小鼠胸腔，暴露纵隔区域；胸腺位于胸骨柄后方，呈浅粉色扁条状，分为左右两叶，用无菌镊子轻轻分离胸腺与周围组织，注意避免损伤胸腺包膜，完整摘取胸腺，确保无残留。

5.2.3.2.2 将摘取的脾脏和胸腺分别放入盛有 5 mL 预冷无菌生理盐水的无菌培养皿中,用无菌镊子轻轻晃动器官,冲洗表面血迹和组织碎屑,清洗时间不超过 30 s。清洗后,用无菌镊子轻轻夹取器官,转移至另一盛有 5 mL 预冷无菌生理盐水的培养皿中,重复清洗 1 次,确保表面无可见血迹。将清洗后的脾脏和胸腺分别放在无菌滤纸上,用另一张无菌滤纸轻轻覆盖在器官表面,以按压-轻提的方式吸干表面水分,每个器官更换 2 张滤纸,避免用力挤压导致器官组织液流失。

5.2.3.2.3 用无菌镊子将处理后的脾脏和胸腺分别放入对应称量皿中,待天平读数稳定后记录器官重量(精确至 0.1 mg),同一器官称重 3 次,取平均值作为最终重量,若 3 次称重结果的相对标准偏差(RSD) > 5%,需重新检测。每称量完一个器官后,用 75% 酒精棉片擦拭称量皿,更换新的无菌称量皿,避免交叉污染。脾脏指数和胸腺指数计算公式如下:

$$SI = \frac{SW}{W} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

SI——脾脏指数;

SW——脾脏重量, g;

W——小鼠体重, g。

$$TI = \frac{TW}{W} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

SI——胸腺指数;

TW——胸腺重量, g;

W——小鼠体重, g。

5.2.3.3 组织病理学观察

5.2.3.3.1 按照 5.2.3.1.2.1 剥离肿瘤组织,将剥离的肿瘤组织放入 10% 中性福尔马林溶液中固定 24h 以上。经石蜡包埋后连续切片,厚度 4 μm,贴于防脱载玻片,60℃ 烤片 2 h,按 HE 染色标准流程操作(脱蜡→水化→苏木素染色 5 min→分化→伊红染色 3 min),中性树胶封片。

5.2.3.3.2 先用 10× 物镜扫描整个切片,确定肿瘤组织位置及大致形态;再用 20× 物镜观察细胞排列方式;最后用 40× 物镜观察细胞细节(核形态、核分裂象、坏死区域)。重点观察肿瘤实质与间质交界处、坏死灶边缘、细胞密集区,每个样本至少观察 5 个不同视野,确保结果代表性。在 40× 物镜下,选择 3 个核分裂象最密集的视野,计数每个视野的核分裂象数量,取平均值。

6 数据处理与分析

6.1 数据记录

实验过程中应详细记录各项数据,包括实验条件、实验结果,确保数据的真实性和完整性。

6.2 统计学分析

采用统计学软件(如 SPSS、GraphPad Prism) 进行数据分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用 LSD 法或 Dunnett's 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

6.3 协同效应评价方法

采用中效原理(Chou-Talalay 法) 计算联合成分组的协同指数(CI)。根据 CI 值判断协同效应,CI < 1 表示协同作用,CI = 1 表示相加作用,CI > 1 表示拮抗作用。

7 结果判定

7.1 体外细胞试验结果判定

7.1.1 细胞增殖抑制试验

以细胞生长抑制率为指标，比较不同实验组与空白对照组的差异；若某浓度组的抑制率显著高于空白对照组（ $P < 0.05$ ），且随浓度升高抑制率呈上升趋势，表明灵芝多糖、三萜类化合物以及两者联合对肿瘤细胞增殖有抑制作用。联合成分组与单成分组分别比较，若抑制率显著提高（ $P < 0.05$ ），结合协同指数（CI）判定：

- CI < 1：灵芝多糖和三萜类化合物联合对细胞增殖的抑制具有协同效应；
- CI = 1：灵芝多糖和三萜类化合物联合为相加效应；
- CI > 1：灵芝多糖和三萜类化合物联合为拮抗效应。

7.1.2 细胞凋亡作用判定

以流式细胞仪检测的凋亡细胞比例（早期凋亡 + 晚期凋亡）为指标，若实验组凋亡比例显著高于空白对照组（ $P < 0.05$ ），表明灵芝多糖、三萜类化合物以及两者联合可诱导肿瘤细胞凋亡。联合成分组与单成分组比较，若凋亡比例显著升高（ $P < 0.05$ ），且 CI < 1，表明灵芝多糖与三萜类化合物对细胞凋亡的诱导具有协同效应。

7.1.3 细胞侵袭转移抑制作用判定

以Transwell小室穿过的细胞数为指标，若实验组穿过细胞数显著少于空白对照组（ $P < 0.05$ ），表明灵芝多糖、三萜类化合物以及两者联合可抑制肿瘤细胞侵袭转移能力。联合成分组与单成分组比较，若穿过细胞数显著减少（ $P < 0.05$ ），且 CI < 1，表明灵芝多糖与三萜类化合物对侵袭转移的抑制具有协同效应。

7.1.4 细胞周期影响判定

以流式细胞仪检测的各周期（G0/G1 期、S 期、G2/M 期）细胞比例为指标，若实验组与空白对照组相比，某一周期细胞比例显著升高（ $P < 0.05$ ），表明灵芝多糖、三萜类化合物以及两者联合可将细胞周期阻滞于该时期（如 G2/M 期阻滞）。联合成分组与单成分组比较，若周期阻滞效应更显著（ $P < 0.05$ ），且 CI < 1，表明灵芝多糖与三萜类化合物对细胞周期的调控具有协同效应。

7.2 动物实验结果判定

7.2.1 肿瘤生长抑制作用判定

7.2.1.1 若实验组肿瘤体积增长速率显著慢于模型对照组（ $P < 0.05$ ），且随给药时间延长差异更明显，表明灵芝多糖、三萜类化合物以及两者联合可抑制肿瘤生长。

7.2.1.2 抑瘤率（T），阳性对照组抑瘤率应 $\geq 30\%$ （验证模型有效性）；实验组抑瘤率显著高于模型对照组（ $P < 0.05$ ），表明灵芝多糖、三萜类化合物以及两者联合具有体内抑瘤作用；联合成分组与单成分组比较，若抑瘤率显著提高（ $P < 0.05$ ），且 CI < 1，表明灵芝多糖与三萜类化合物在体内抑瘤具有协同效应。

7.2.2 免疫功能调节作用判定

7.2.2.1 若实验组血清中 IL-2、TNF- α 水平显著高于模型对照组（ $P < 0.05$ ），表明灵芝多糖、三萜类化合物以及两者联合可增强机体免疫活性。

7.2.2.2 若实验组免疫器官指数显著高于模型对照组（ $P < 0.05$ ），表明灵芝多糖、三萜类化合物以及两者联合可改善免疫器官功能（减轻肿瘤导致的免疫抑制）。

7.2.3 组织病理学判定

与模型对照组相比，实验组肿瘤细胞出现核固缩、核碎裂、坏死区域扩大、核分裂象减少等特征，表明灵芝多糖、三萜类化合物以及两者联合可诱导肿瘤细胞凋亡或坏死；联合成分组在上述病理改变更显著，结合抑瘤率和 CI 值，可佐证协同效应。

7.3 综合判定标准

7.3.1 细胞试验中，在增殖抑制、凋亡诱导、侵袭转移抑制或细胞周期调控中至少 1 项指标显著有效（ $P < 0.05$ ）；动物实验中，肿瘤生长抑制（抑瘤率 $\geq 30\%$ ）、免疫功能调节或病理改善中至少 1 项指标显著有效（ $P < 0.05$ ）；联合成分组满足上述有效条件，且 CI < 1 时，判定为具有协同增效作用。

7.3.2 细胞试验中，所有检测指标与空白对照组无显著差异 ($P \geq 0.05$)；动物试验中，肿瘤生长、免疫功能及病理特征与模型对照组无显著差异 ($P \geq 0.05$)；联合成分组 $CI > 1$ 且各项指标未优于单独成分组，判定为拮抗或无协同功效。

8 评价报告

评价报告内容包括：

- a) 封面：标题、编号、日期及参与单位；
- b) 摘要：简述评价目的、方法、主要结果及判定；
- c) 正文：
 - 1) 引言：背景、意义及评价目标；
 - 2) 试验起止时间；
 - 3) 方法：详细描述评价流程、指标及方法；
 - 4) 结果：数据表格、图表及统计分析结果；
 - 5) 判定：明确判定结果；
 - 6) 试验者、校核人和技术负责人分别的签字以及试验单位公章。

参 考 文 献

- [1] 《保健食品检验与评价技术规范》
- [2] 《保健食品功能检验与评价技术指导原则》
- [3] 《保健食品功能评价程序与检验方法规范》
- [4] 《中华人民共和国药典》
- [5] 《抗肿瘤药物药效学研究技术指导原则》
- [6] 《灵芝三萜与灵芝多糖抗肿瘤作用及其机制研究进展》（中国实验方剂学杂志）
- [7] Albin A, Iwamoto Y, Kleinman H K, et al. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells[J]. Cancer Research, 1987, 47(12): 3239-3245.
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline—Third Edition EP05-A3[S]. Wayne, PA: CLSI; 2014.
- [9] U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers [S/OL]. 2005.
- [10] Tomayko M M, Reynolds C P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice[J]. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 1989, 24(3): 148-154.
-