

中国被毛孢醇提物通过 MAPK/NF- κ B 通路双向调控巨噬细胞的免疫功能研究

李琪琪¹, 王雪娇^{2#}, 初英杰², 刘霞², 禹艳丽¹, 王遥^{2*}, 贾鑫^{1*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100027

2. 北京中医药大学生命科学院, 北京 100027

摘要:目的 利用巨噬细胞和小鼠模型, 探究中国被毛孢醇提物 (*Hirsutella sinensis* alcohol extract, HSAE) 的免疫调控功能和机制。方法 CCK-8 法检测 HSAE 对 RAW264.7 巨噬细胞活力的影响; 通过血清溶血素实验明确 HSAE 对小鼠免疫功能的影响; 利用 qRT-PCR 技术检测炎症相关因子表达, 探究 HSAE 对 RAW264.7 细胞静息状态下的免疫促进功能和脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激的炎症激活状态下的炎症抑制作用; 通过 Western blotting 检测 HSAE 对丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 和核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路的调控作用。结果 HSAE 能够显著增加巨噬细胞的吞噬功能和小鼠血清溶血素水平 ($P < 0.01$ 、 0.001); HSAE 能够激活静息状态下的巨噬细胞肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, *Tnf*)、干扰素 β 1 (interferon beta 1, *Ifnb1*)、CXC 趋化因子配体 10 (CXC chemokine ligand 10, *Cxcl10*) 的 mRNA 表达 ($P < 0.01$ 、 0.001), 而在 LPS 诱导的炎症激活的巨噬细胞中, HSAE 可显著抑制上述炎症因子的 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 此外, HSAE 显著增强静息状态下巨噬细胞中 MAPK 信号通路关键蛋白细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinase, ERK)、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK)、p38 和 NF- κ B 信号通路 p65 的磷酸化水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 并在炎症激活后抑制相关蛋白的磷酸化 ($P < 0.01$ 、 0.001)。结论 HSAE 对小鼠巨噬细胞具有双向免疫调节作用, 即静息状态下的免疫促进作用和炎症激活状态下的免疫抑制作用, 该双重调控作用可能与其调控 MAPK 和 NF- κ B 免疫信号通路相关。

关键词: 中国被毛孢醇提物; 免疫功能; 双向调控; 巨噬细胞; 丝裂原活化蛋白激酶; 核因子- κ B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)11-3559-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.11.017

Hirsutella sinensis alcohol extract regulates immune function of macrophages through MAPK/NF- κ B pathway

LI Qi-qi¹, WANG Xue-jiao², CHU Ying-jie², LIU Xia², YU Yan-li¹, WANG Yao², JIA Xin¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100027, China

2. School of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100027, China

Abstract: Objective To explore the immunomodulatory function and molecular mechanism of *Hirsutella sinensis* alcohol extract (HSAE) using macrophages and mice model. **Methods** The cytotoxicity of HSAE against RAW264.7 cells was measured by CCK-8 assay, and immune-regulating functions of HSAE was determined by serum hemolysin test *in vivo*. To explore the immune-promoting function of HSAE on RAW264.7 cells in resting state and inflammatory inhibitory effect of HSAE on RAW264.7 cells in the presence of LPS stimulation, the expressions of inflammatory related cytokines were detect by qRT-PCR. Furthermore, regulatory effects of HSAE on mitogen-activated protein kinase (MAPK) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway were detected by Western blotting. **Results** HSAE significantly increased the phagocytosis of macrophages and level of serum hemolysin in mice ($P < 0.01$, 0.001). HSAE activated *Tnf*, *Ifnb1* and *Cxcl10* mRNA expressions in resting macrophages ($P < 0.01$, 0.001), while in macrophages activated

收稿日期: 2022-11-11

基金项目: 中国科协青年人才托举工程项目(2020-QNRC1-03); 国家自然科学基金资助项目(31900661); 国家自然科学基金资助项目(82001663)

作者简介: 李琪琪, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药抗病毒免疫药理。E-mail: lqq3692021@163.com

*通信作者: 贾鑫, 副教授, 研究方向为中药抗病毒免疫药理。E-mail: jiaxin@bucm.edu.cn

王遥, 教授, 研究方向为中医药免疫。E-mail: yaowang@bucm.edu.cn

#共同第一作者: 王雪娇, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药抗病毒免疫药理。E-mail: wxj1600@163.com

by LPS-induced inflammation, HSAE significantly inhibited the mRNA expression levels of above inflammatory factors ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). In addition, HSAE significantly enhanced the phosphorylation levels of extracellular regulated protein kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 and p65 in resting macrophages ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), which play essential roles in MAPK or NF- κ B signaling pathway. However, phosphorylation levels of these proteins were inhibited by HSAE in macrophages after LPS stimulation ($P < 0.01, 0.001$). **Conclusion** HSAE has a two-way immunomodulatory effect on mouse macrophages, that is, immune promotion at rest and immune suppression at inflammatory activation, which may be related to its regulation of MAPK and NF- κ B immune signaling pathways.

Key words: *Hirsutella sinensis* alcohol extract; immunity; bidirectional immunomodulatory effect; macrophages; mitogen-activated protein kinase; nuclear factor- κ B

冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 属于麦角菌科真菌, 是我国特有的中草药, 并被用于肾虚精亏、阳痿遗精、腰膝酸痛、久咳虚喘等症^[1-3]。研究表明, 冬虫夏草具有调血脂、抗衰老、抗疲劳、抗肿瘤等多种药理学活性。中国被毛孢是冬虫夏草的无性型菌株, 也是其药理活性成分的主要来源和唯一代表性真菌。

冬虫夏草对机体的免疫调节及其药理功能发挥具有重要意义。冬虫夏草可发挥类似于免疫佐剂的功能, 被用于改善移植病变和器官移植患者免疫力低下的辅助治疗^[4]。研究发现, 虫草水提取物具有治疗和改善辐射诱导的免疫抑制的功效^[5]。此外, 冬虫夏草表现出显著的抗炎作用, 虫草水提取物通过抑制趋化因子表达, 在免疫球蛋白 A (immunoglobulin A, IgA) 肾病中发挥抗炎功能; 虫草水提取物通过抑制细胞凋亡和促炎因子表达, 从而减轻肝损伤和肝脏的局部炎症^[6-8]。虫草多糖和虫草素是冬虫夏草 (中国被毛孢菌丝体) 水提物中的主要药效成分^[9-10]。其中, 虫草多糖可通过抗氧化和调血脂作用, 发挥对非酒精性脂肪肝 ApoE^{-/-}小鼠的保护作用, 并有效缓解博来霉素引起的小鼠肺纤维化^[11-16]。虫草素通过激活腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 信号通路和抑制信号转导和转录激活因子 1 (signal transducers and activators of transcription 1, STAT1) 磷酸化抑制过度炎症浸润, 从而有效改善非酒精性脂肪肝^[17-18]。然而, 目前关于冬虫夏草醇提取物的免疫药理功能仍鲜有报道, 探究其醇提物中的主要成分和免疫药理作用具有现实意义。本研究利用巨噬细胞和小鼠模型, 探究中国被毛孢醇提物 (*Hirsutella sinensis* alcohol extract, HSAE) 的免疫调控功能和机制。

1 材料

1.1 细胞

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 购自美国 ATCC。

1.2 动物

SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠, 体质量 18~20 g, 6~8 周龄, 购自斯贝福 (北京) 实验动物科技有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2019-0010。小鼠饲养于温度 18~22 °C、湿度 50%~60%、12 h 光暗交替的环境中, 自由进食饮水。所有动物实验和研究经北京中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号 BUCM-2022-041303-2016), 并严格按照动物实验相关章程执行。

1.3 药品与试剂

HSAE 冻干粉由云南大学与云南白药集团股份有限公司提供; 去离子水为实验室 Milli-Q (18.2 M Ω) 自制超纯水、DMEM 高糖培养基 (批号 C11995500CP)、胎牛血清 (批号 2358184P)、BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 23227)、质谱级乙腈及甲酸购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 D4540)、20 $\times$ TBST 溶液 (批号 T1082)、5 $\times$ Tris-甘氨酸电泳缓冲液 (批号 T1070-500 mL) 购自北京索莱宝科技有限公司; CCK-8 细胞增殖-毒性检测试剂盒 (批号 CK04) 购自东仁化学科技 (上海) 有限公司; Trizol 试剂 (批号 15596018) 购自 Invitrogen 公司; Evo M-MLV RT Kit (批号 AG11711)、0.25% 胰蛋白酶/EDTA 细胞消化液 (批号 T1300)、SYBR[®] Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit (批号 AG11701) 购自湖南艾科瑞生物工程有限公司; 都氏试剂 (批号 R22785-100 mL)、绵羊红细胞 (4%, 批号 R21900-100 mL)、补体 (正常豚鼠血清, 批号 S27068-1 mL $\times$ 10)、匹多莫德 (批号 S80183-5 g) 购自上海源叶生物科技有限公司; PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (批号 PG212) 购自上海雅酶生物医药科技有限公司; 超敏 ECL 发光液 (批号 WBKLS0500) 购自美国 Millipore 公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 60004-1-Ig)

购自英国 Abcam 公司; c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 抗体 (批号 9252S)、p-JNK 抗体 (批号 9251S)、细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinase, ERK) 抗体 (批号 9102L)、p-ERK 抗体 (批号 9106S)、p38 抗体 (批号 9212S)、p-p38 抗体 (批号 9211S) 购自美国 CST 公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 M21002S)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (批号 M21001S) 购自艾比玛特生物医药 (上海) 有限公司; 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS, 批号 L4391) 购自美国 Sigma 公司。

1.4 仪器

CFX96 型荧光定量 PCR 仪、T100 型 PCR 仪、SCI-VS 型可调式混匀仪 (美国 Scilogex 公司); PowerPac 型基础电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); UPLC-QE-Orbitrap-MS 质谱仪 (Xcalibur 质谱工作站)、NANODROP ONEc 型分光光度计、Sorvall™ Legend™ Micro 21R 型微量离心机、1300 Series A2 型生物安全柜、Heracell 150i 型 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); SpectraMax i3x 型多功能酶标仪 [美谷分子仪器 (上海) 有限公司]; Mill-Q 超纯水仪 (美国 Millipore 公司); ZHCH-C1115B 型超净工作台 (上海智城分析仪器制造有限公司); DK-8D 型电热恒温水槽 (上海一恒科技有限公司); SK-L180-Pro 型数控线性摇床 [大龙兴创实验仪器 (北京) 股份公司]; EPS-300 型数显式稳压稳流电泳仪 (上海天能公司); CKX53 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 药物配制

取 HSAE 冻干粉 100 mg, 加入 1 mL DMSO 充分振荡混匀, 即为 100 μg/μL 母液, 分装后储存于 -80 °C 待用。

2.2 细胞培养

RAW264.7 细胞用含 1% 青霉素-链霉素混合液和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 在 5% CO₂、37 °C 的培养箱中培养, 待细胞密度为 90% 左右时, 按 1:5 的比例进行传代。

2.3 液质联用色谱-质谱分析

2.3.1 样品溶液的制备 精密称取 HSAE 冻干粉 20 mg 于 1.5 mL EP 管, 加入 1 mL 甲醇涡旋溶解, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得样品溶液。

2.3.2 液相条件 Waters HSS T3 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~30 min, 5%~95% B。柱温 40 °C; 体积流量 0.2 mL/min; 进样量 2 μL。

2.3.3 质谱条件 离子源为电喷雾电离源 (ESI); 正负离子同时扫描; 扫描模式为 Full scan/dd MS², 扫描范围 *m/z* 100~1500; 毛细管温度 350 °C; 正离子模式喷雾电压 3500 V, 负离子模式喷雾电压 3000 V; 鞘气 35 arb, 辅助气 15 arb; 标准化碰撞能为 35%; 一级质谱分辨率为 70 000, 二级质谱分辨率为 17 500。

2.4 CCK-8 法检测细胞增殖活性

RAW264.7 细胞以 9 × 10⁴/孔接种于 96 孔板, 培养箱中过夜使细胞完全贴壁且细胞密度为 80%~90%。用 DMEM 完全培养基稀释 HSAE 母液至相应质量浓度 (1 × 10⁻⁴、1 × 10⁻³、0.01、0.1、1、10、100、1000、1 × 10⁴ μg/mL), 将稀释好的 HSAE 溶液加入细胞中, 每孔 100 μL, 同时设置仅加入 DMEM 完全培养基 (无细胞) 的空白组和加入 1% DMSO 的溶剂对照组 (有细胞), 每组设置 3 个复孔, 于 5% CO₂、37 °C 的细胞培养箱中培养 24 h; 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 于培养箱中孵育 30 min, 待培养基变为橙黄色后, 酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 (*A*) 值, 计算细胞存活率, 绘制细胞增殖曲线。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.5 细胞吞噬活性检测

RAW264.7 细胞以 9 × 10⁴/孔接种于 96 孔板, 培养箱中过夜使细胞完全贴壁且细胞密度为 80%~90%。用 DMEM 完全培养基稀释 HSAE 母液至相应质量浓度 (1 × 10⁻⁴、1 × 10⁻³、0.01、0.1、1、10、100、1000、1 × 10⁴ μg/mL), 分别用稀释好的 HSAE 溶液和 LPS (500 ng/mL, 阳性对照) 处理细胞, 每组设置 3 个复孔, 于 5% CO₂、37 °C 的细胞培养箱中培养 24 h 后, 弃去上清, 每孔加入 100 μL 1% 中性红溶液, 培养箱中孵育 1 h, 用 PBS 洗涤 3 次, 每孔加入 100 μL 细胞裂解缓冲液 (无水乙醇-冰醋酸 1:1), 4 °C 静置过夜, 酶标仪测定 570 nm 处的 *A* 值, 计算细胞吞噬活性。

$$\text{细胞吞噬率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.6 小鼠体内血清溶血素测定实验

将小鼠分为空白组 (PBS)、匹多莫德 (100 mg/kg) 组和 HSAE 低、中、高剂量 (50、100、200 mg/kg) 组, 每组 5 只。各组小鼠 ig 200 μL 相应药

物, 1 次/d, 连续 21 d; 实验结束前 5 d 开始, 各组小鼠 ip 0.2 mL 绵羊红细胞致敏, 直至实验结束, 小鼠摘眼球取血后脱颈椎处死。血液放置 30 min 后经离心分离得到血清, 将血清与生理盐水按 1:500 的比例混匀, 吸取 0.5 mL 稀释后的血清, 与 0.25 mL 绵羊红细胞混合, 在低温下加入 0.5 mL 豚鼠血清混合。设置不加血清的对照组, 37 °C 恒温箱中孵育 30 min, 随后立即移至 0 °C 冰箱结束反应, 3000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 酶标仪检测 540 nm 处的 *A* 值。将 0.25 mL 绵羊红细胞与 3.75 mL 都氏试剂混合后测定 *A* 值, 代表绵羊红细胞的半数溶血值 (half value of hemolysis, HC₅₀)。

$$HC_{50} = A_{\text{样品}} \times \text{稀释倍数} / A_{\text{绵羊红细胞半数溶血}}$$

2.7 qRT-PCR 检测 HSAE 对细胞因子表达的影响

RAW264.7 细胞以 4×10^5 /孔接种于 24 孔板, 过夜培养使其完全贴壁。设置浓度梯度加药和时间梯度加药实验。用 DMEM 完全培养基稀释 HSAE 母液 (100 μg/mL) 至相应质量浓度 (25、50、100、200 μg/mL), 加或不加 LPS (500 ng/mL) 共同孵育 2 h, 收集细胞。

用 DMEM 完全培养基稀释 HSAE 母液 (100 μg/mL) 至 200 μg/mL, 加或不加 LPS (500 ng/mL) 共同孵育 30、60、90 min, 收集细胞。按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, *Tnf*)、CXC 趋化因子配体 10 (CXC chemokine ligand 10, *Cxcl10*) 和干扰素 β1 (interferon beta 1, *Ifnb1*) 的引物序列见表 1。

2.8 Western blotting 检测 HSAE 对 p-p38、p38、p-p65、p65、p-JNK、JNK、p-ERK 和 ERK 蛋白表达的影响

RAW264.7 细胞以 8×10^5 /孔接种于 12 孔板,

过夜培养使其完全贴壁。按“2.7”项下方法给药, 过夜培养使其完全贴壁。按“2.7”项下方法给药, 收集细胞, 使用 IP 裂解液使细胞充分裂解, 离心后取上清, 加入 5×Loading Buffer, 100 °C 使蛋白变性, BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 封闭后加入一抗, 4 °C 孵育过夜, 室温孵育二抗, 显影。

2.9 统计学分析

所有数据使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析, 使用单因素方差分析进行组间比较, 结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 HSAE 的成分测定

利用 HPLC-MS 技术鉴定分析 HSAE 中所含成分, HPLC-MS 基峰图见图 1。《中国药典》2020 年版规定腺苷为鉴定冬虫夏草的主要有效成分^[21], HSAE 所含成分主要包含核苷、氨基酸类以及虫草酸等。其中腺苷为核苷类的主要成分, 但未鉴定出虫草多糖和虫草素成分 (表 2)。虫草多糖为极性分子, 多包含于水提物成分^[9-10]; 此外, 多个团队也报道冬虫夏草中不含虫草素成分^[22-27]。

3.2 HSAE 对巨噬细胞活性的影响

使用 CCK-8 法检测不同质量浓度的 HSAE 处理 24 h 对 RAW264.7 细胞存活率的影响, 并绘制量-效关系曲线, 计算得到 HSAE 对细胞的半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC₅₀) 为 933.3 μg/mL (图 2)。选取 5、50、100、200 μg/mL 4 个质量浓度进行后续细胞实验。

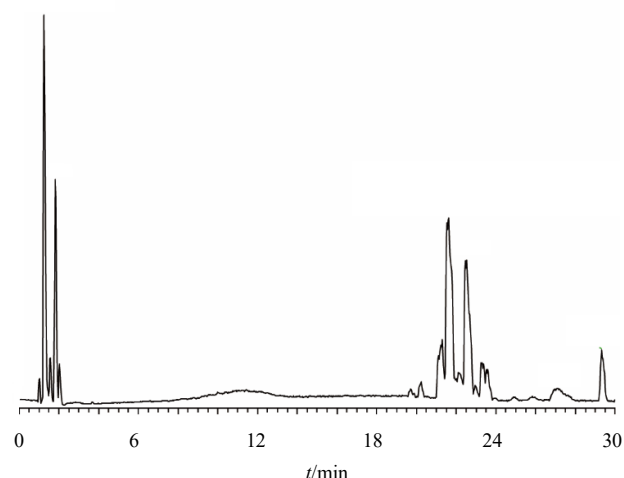


图 1 HSAE 的 HPLC-MS 基峰图

Fig. 1 HPLC-MS base peak map of HSAE

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'-3')
<i>Actb</i>	F: GTGACGTTGACATCCGTAAAGA
	R: GCCGGACTCATCGTACTCC
<i>Tnf</i>	F: CCTGTAGCCACGTCGTAG
	R: GGGAGTAGACAAGGTACAACCC
<i>Ifnb1</i>	F: AGCTCCAAGAAAGGACGAACA
	R: GCCCTGTAGGTGAGGTTGAT
<i>Cxcl10</i>	F: GGATGGCTGTCCTAGCTCTG
	R: TGAGCTAGGGAGGACAAGGA

表 2 HSAE 主要成分及分类

Table 2 Main components and classification of HSAE

分类	分子式	名称	分类	分子式	名称
核苷类	C ₅ H ₅ N ₅ O	鸟嘌呤	环肽	C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₂	—
	C ₅ H ₅ N ₅	腺嘌呤		C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂	—
	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	腺苷		C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂	—
	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	尿苷	其他	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	亚麻酸
	C ₅ H ₄ N ₄ O	次黄嘌呤		C ₆ H ₁₄ O ₆	虫草酸
氨基酸类	C ₅ H ₇ NO ₃	焦谷氨酸		C ₆ H ₈ O ₇	柠檬酸
	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	精氨酸		C ₈ H ₉ NO ₄	4-吡哆酸
	C ₉ H ₁₁ NO ₃	酪氨酸		C ₉ H ₁₆ O ₄	壬二酸

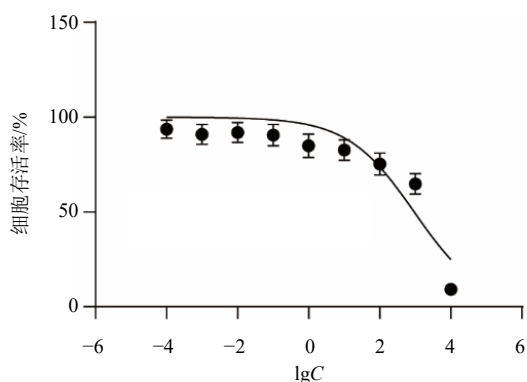


图 2 HSAE 对巨噬细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

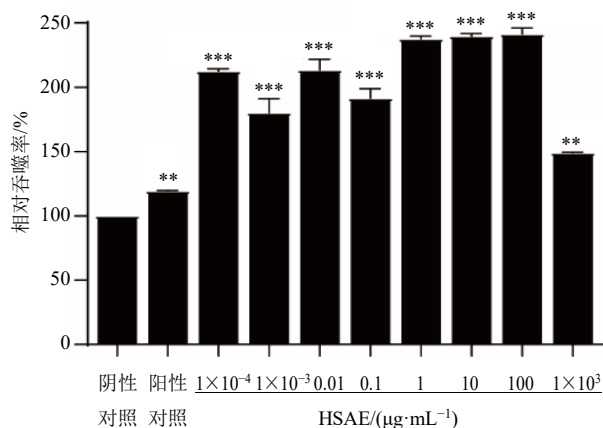
Fig. 2 Effect of HSAE on survival rate of macrophages ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 HSAE 可以增加巨噬细胞的吞噬能力

巨噬细胞吞噬入侵的病原体并递呈抗原，分泌肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和 IL-1 β 等促炎细胞因子，从而激活招募多种免疫细胞共同抵抗病原体的入侵。巨噬细胞可吞噬中性红染料，其吞噬能力可通过定量巨噬细胞吞噬中性红后的吸光度变化所反映。在 HSAE 或 LPS (阳性对照，LPS 具有激活巨噬细胞吞噬的功能) 处理后的细胞中加入中性红溶液，1 h 后除去，再将细胞裂解，静置过夜后检测 A 值的变化。如图 3 所示，HSAE 处理能够显著增加巨噬细胞的吞噬能力，并呈剂量相关性 ($P < 0.01, 0.001$)，其促进吞噬的作用强于阳性对照 LPS 处理组。

3.4 HSAE 对小鼠脏器指数和免疫功能的影响

如图 4 所示，各给药组小鼠肾、脾和胸腺脏器指数均显著升高 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)，匹多莫德组和 HSAE 低剂量组肝脏器指数显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)，各给药组均可增强小鼠的血清溶血素水平。



与阴性对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下同

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs negative control group, same as below figures

图 3 HSAE 对巨噬细胞吞噬能力的增强作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

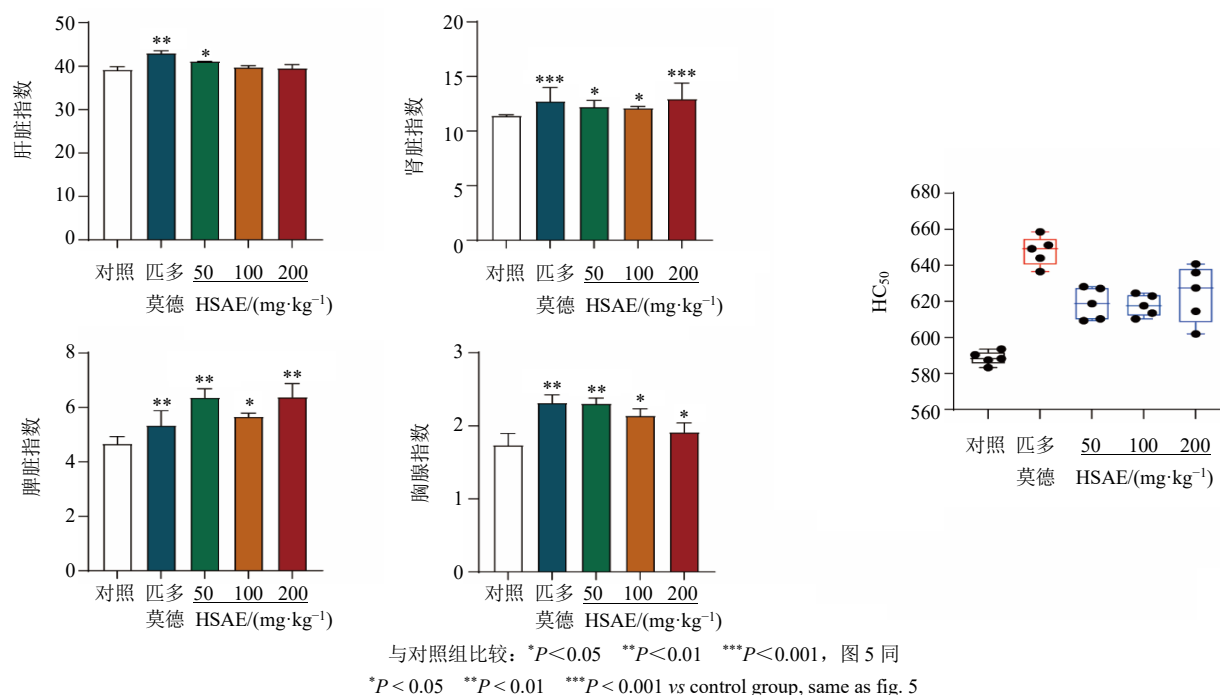
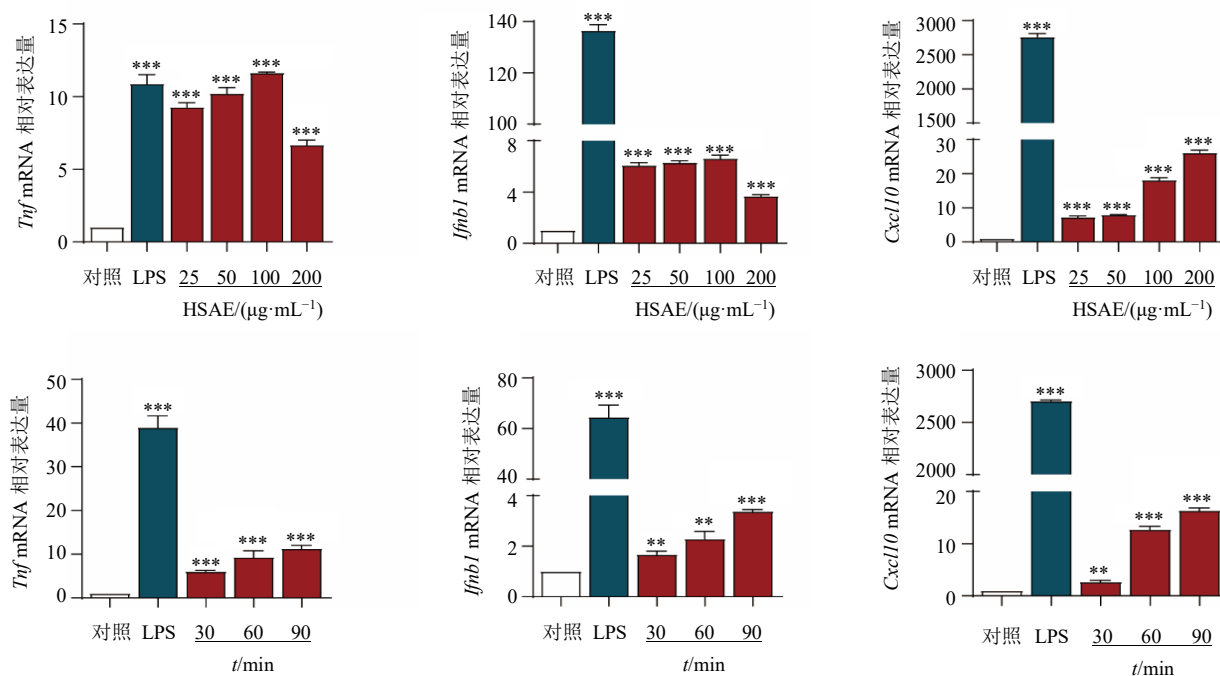
Fig. 3 Enhancement of phagocytosis of macrophages by HSAE ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5 HSAE 能激活静息状态下巨噬细胞中免疫因子的表达

促炎细胞因子的分泌对于维持和调节免疫系统稳态至关重要。因此，考察 HSAE 单独刺激时对细胞因子表达的影响，如图 5 所示，与对照组比较，HSAE 诱导 *Tnf*、*Cxcl10* 和 *Ifnb1* 基因表达增加 ($P < 0.01, 0.001$)，且呈剂量和时间相关性，表明 HSAE 能够促进静息巨噬细胞中促炎细胞因子的表达。

3.6 HSAE 能抑制 LPS 诱导炎症激活的巨噬细胞中免疫因子的表达

LPS 是一种常用的细菌内毒素，巨噬细胞识别 LPS 后，激活细胞信号转导，转录并释放多种促炎细胞因子，激活炎症反应。HSAE 与 LPS 共处理后，检测细胞中促炎细胞因子与干扰素的表达，如图 6 所示，与单独 LPS 刺激组相比，在 RAW264.7 细胞

图 4 HSAE 对小鼠的抗炎及免疫调节作用 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Fig. 4 Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of HSAE on mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)图 5 HSAE 诱导巨噬细胞中相关细胞因子基因的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 5 HSAE induced cytokine gene expressions in macrophages ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

中 HSAE 与 LPS 共处理后, *Tnf*、*Cxcl10*、*Ifnb1* mRNA 表达随着药物质量浓度升高而下降 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 抑制效果呈时间相关性。以上结果表明, HSAE 可以抑制炎症激活后巨噬细胞中促炎细胞因子和干扰素的 mRNA 表达, 从而发挥其抗炎效应。

3.7 HSAE 通过调控丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 和核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路介导免疫双向调控功能

为了探究 HSAE 的免疫调控功能的分子机制,

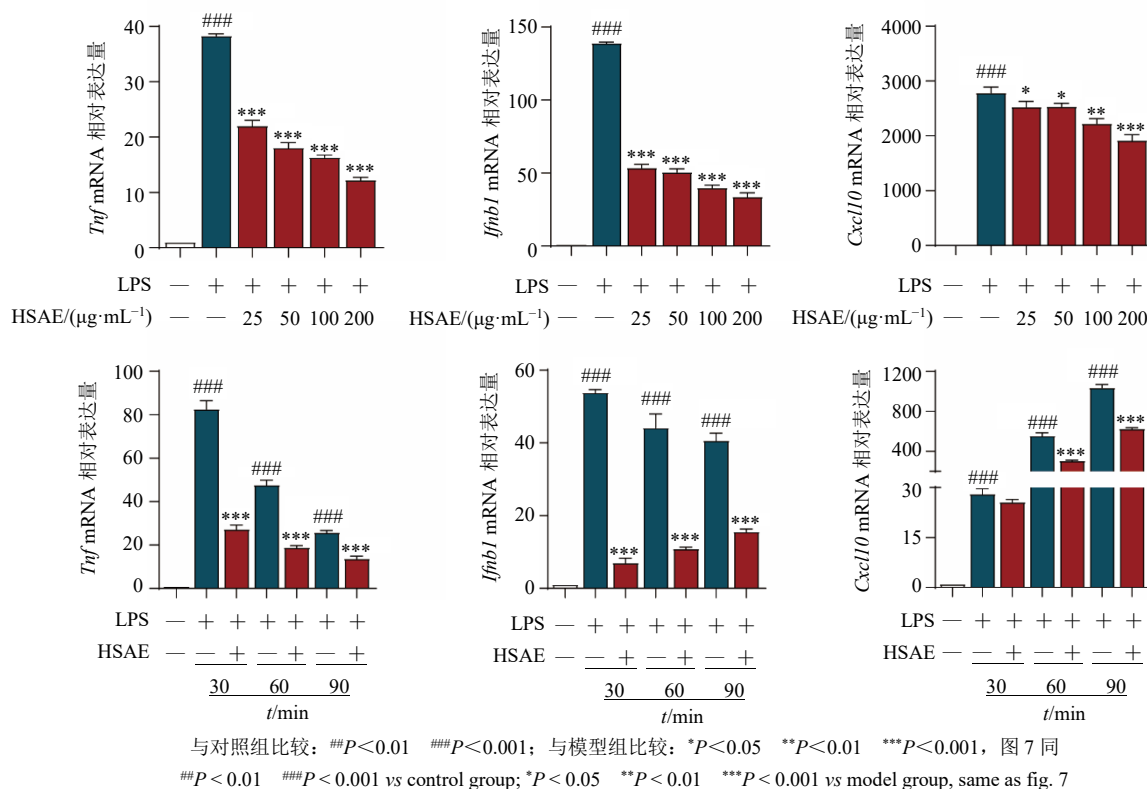


图 6 HSAE 抑制 LPS 诱导的炎症因子表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 HSAE inhibited expressions of inflammatory factors induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

采用 Western blotting 检测 MAPK 通路关键因子 JNK、ERK、p38 和 NF- κ B 通路的重要亚基 p65 的磷酸化变化。如图 7-A 所示, 静息状态下的 RAW264.7 细胞中, 随着 HSAE 质量浓度的升高, 细胞中 p-JNK、p-ERK 和 p-p65 的蛋白磷酸化水平相对逐步增强, 与对照组相比具有显著差异 ($P < 0.05$ 、 0.01); 而 HSAE 不同时间点处理后, p-JNK、p-ERK 和 p-p65 的蛋白磷酸化水平随时间增加而减弱 (图 7-B)。

如图 7-C 所示, 在 LPS 诱导的炎症激活模型中, 加入 HSAE 处理不同时间, LPS 激活的 p-JNK、p-ERK、p-p38 和 p-p65 蛋白磷酸化水平逐步抑制, 与 LPS 刺激组比较差异显著 ($P < 0.01$ 、 0.001)。以上结果表明, HSAE 的免疫双向调控与其对 MAPK 通路和 NF- κ B 通路的调控密切相关。

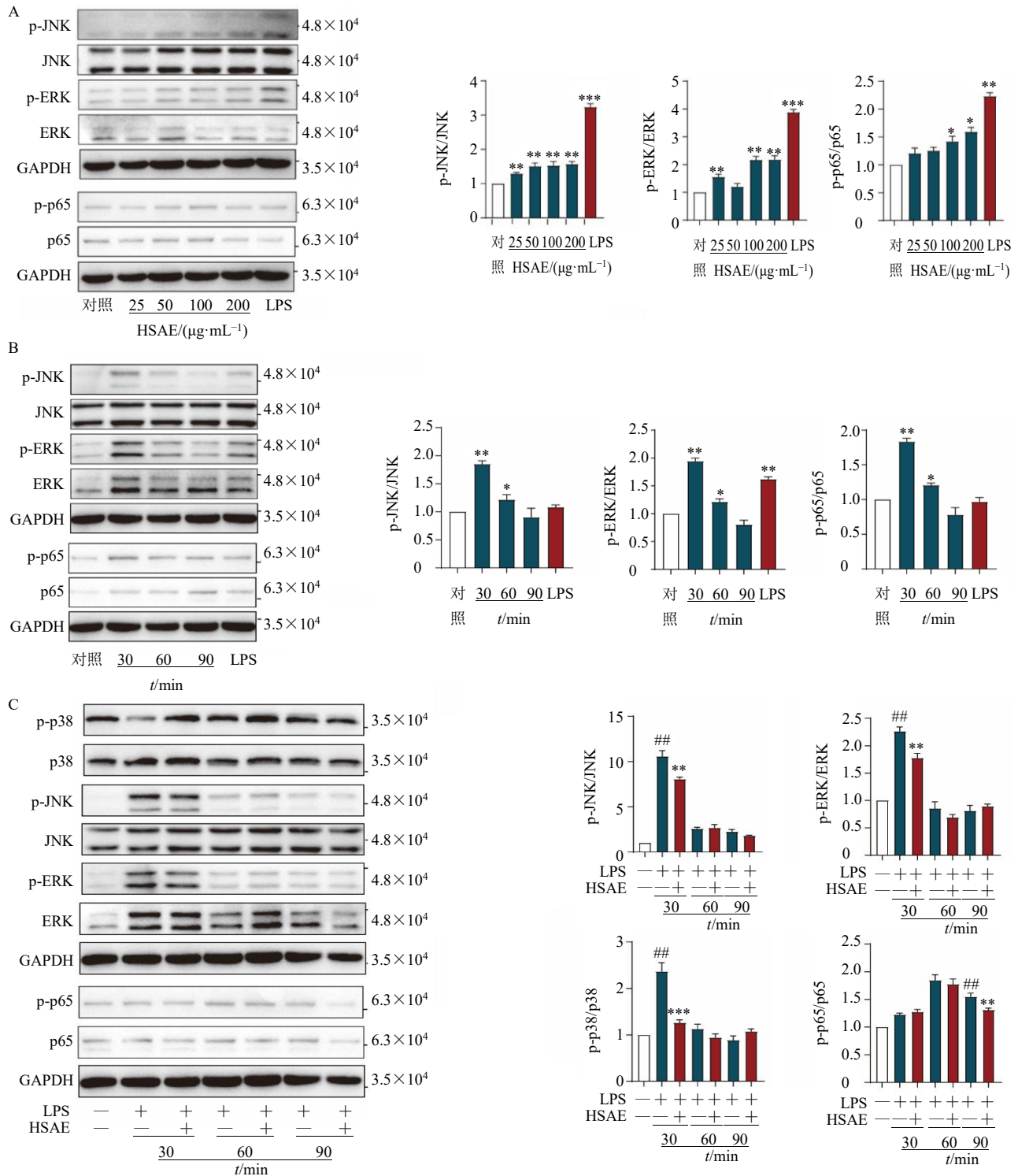
4 讨论

免疫系统的严密调控是维持人体健康的充分必要条件。机体免疫力低下, 其免疫应答不足或不及, 可造成病原微生物入侵并在宿主体内增殖、复制, 诱发病原感染性疾病。此外, 宿主免疫识别病原入侵信号后, 激活炎症相关信号通路, 诱发炎症反应。

适度的炎症反应是机体清除病原微生物的重要方式, 然而, 当炎症信号过度或持续激活, 则会导致炎症性的组织损伤, 诱发机体的系统性病变和肿瘤发生。因此, 探究冬虫夏草的免疫双向调控功能及其作用的分子机制, 具有重要的科学意义和临床应用价值。

巨噬细胞是固有免疫中一类重要的抗原递呈细胞, 具有吞噬杀伤病原体和递呈病原体抗原的作用, 其通过分泌多种细胞因子, 在调控机体的固有免疫和适应性免疫应答中发挥着不可或缺的作用^[19-20]。病原体感染或组织损伤时, 巨噬细胞通过细胞膜上和细胞质中的模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRRs) 识别病原体的病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMP), 激活 MAPK 亚家族的成员, 包括 ERK、p38 和 JNK 亚家族以及 NF- κ B 的磷酸化诱导 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等促炎细胞因子表达, 从而发挥调控固有免疫和适应性免疫的功能。

研究表明, 虫草多糖单独处理可以诱导巨噬细胞中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等细胞因子的分泌, 增强巨噬细胞的吞噬活性^[9-10]。本研究发现, HSAE 可



A-不同质量浓度的 HSAE 对静息状态下的 RAW264.7 细胞中 p-JNK、p-ERK 和 p-p65 蛋白表达的影响 B-HSAE 不同时间点处理后, 静息状态下的 RAW264.7 细胞中 p-JNK、p-ERK 和 p-p65 蛋白表达 C-LPS 诱导的炎症激活模型中, HSAE 处理不同时间后对 p-JNK、p-ERK、p-p38 和 p-p65 蛋白表达的影响

A-effect of different concentrations of HSAE on expression of p-JNK, p-ERK, and p-p65 proteins in RAW264.7 cells in resting state B-effect of HSAE at different time points on expressions of p-JNK, p-ERK, and p-p65 proteins in RAW264.7 cells in resting state C-in LPS-induced inflammation activation model, the effect of different time treatments of HSAE on expression of p-JNK, p-ERK, p-p38, and p-p65 proteins

图 7 HSAE 激活 MAPK 通路和 NF- κ B 通路 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 HSAE activated MAPK pathway and NF- κ B pathway ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

以促进静息状态下 RAW264.7 细胞的吞噬能力,并显著增加 *Tnf*、*Cxcl10* 等基因的表达。表明 HSAE 在体外具有明确的免疫激活作用。利用 LPS 刺激的巨噬细胞炎症模型,发现 HSAE 显著下调 *Tnf*、*Cxcl10* 的 mRNA 表达水平,并呈剂量和时间相关性。此外,HSAE 单独处理促进了 RAW264.7 巨噬细胞 MAPK 和 NF- κ B 信号通路激活,并在炎症激活后抑制了 MAPK 和 NF- κ B 信号通路关键因子的磷酸化。上述结果与虫草素的免疫双向调控功能的报道一致。

本研究首次阐明 HSAE 的双向免疫调控功能,初步发现该活性可能与其对 MAPK 和 NF- κ B 通路的调控有关,为中国被毛孢的临床应用和药理学研究提供了实验数据支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 郝珍飞,刘迪,付明月,等.补益类降脂中药治疗血脂异常的研究进展[J].实用中医内科杂志,2022,36(5): 132-136.
- [2] Ma L, Zhang S, Du M. Cordycepin from *Cordyceps militaris* prevents hyperglycemia in alloxan-induced diabetic mice [J]. *Nutr Res*, 2015, 35(5): 431-439.
- [3] 李文佳,董彩虹,刘杏忠,等.冬虫夏草培植技术研究进展[J].菌物学报,2016,35(4): 375-387.
- [4] 赵江齐.移植免疫中 Toll 样受体 3 对微血管内皮细胞坏死性凋亡的作用机制研究[D].长春:吉林大学,2022.
- [5] Wei S S, Peng W B, Zhang C X, et al. *Cordyceps sinensis* aqueous extract regulates the adaptive immunity of mice subjected to $^{60}\text{Co}\gamma$ irradiation [J]. *Phytother Res*, 2021, 35(9): 5163-5177.
- [6] Xiao C G, Xiao P, Li X G, et al. *Cordyceps sinensis* may inhibit Th22 cell chemotaxis to improve kidney function in IgA nephropathy [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(3): 857-865.
- [7] Ong B Y, Aziz Z. Efficacy of *Cordyceps sinensis* as an adjunctive treatment in kidney transplant patients: A systematic-review and meta-analysis [J]. *Complementary Ther Med*, 2017, 30: 84-92.
- [8] Cheng Y J, Cheng S M, Teng Y H, et al. *Cordyceps sinensis* prevents apoptosis in mouse liver with D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure [J]. *Am J Chin Med*, 2014, 42(2): 427-441.
- [9] 韩洪坤.冬虫夏草菌—中国被毛孢 (*Hirsutella sinensis*) 菌丝体水提物抗氧化活性研究[D].上海:上海师范大学,2012.
- [10] 王兰英,姜玲,赵静,等.发酵虫草多糖提取工艺优化及其体外抗氧化、免疫活性研究[J].河南工业大学学报:自然科学版,2021,42(6): 80-88.
- [11] 张柏惠.蛹虫草碱提多糖结构解析及降脂活性研究[D].哈尔滨:哈尔滨商业大学,2022.
- [12] 雷燕妮,张小斌,陈书存.蛹虫草多糖的抗氧化活性研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2022,50(11): 26-34.
- [13] 陈刘欣,于凤秀,朱文君,等.蛹虫草多糖对 ApoE $^{-/-}$ 小鼠非酒精性脂肪性肝病的保护效应及机制[J].中国动脉硬化杂志,2022,30(3): 219-224.
- [14] 江敏.兰坪虫草多糖缓解博来霉素引起的小鼠肺纤维化[D].昆明:昆明理工大学,2021.
- [15] 周树波.兰坪虫草多糖联合顺铂增强 Lewis 荷瘤小鼠的抗肿瘤活性研究[D].昆明:昆明理工大学,2021.
- [16] 周罗川.虫草素与虫草多糖调节肠道菌群缓解 COPD 炎症的实验研究[D].昆明:云南中医药大学,2021.
- [17] Lan T, Yu Y, Zhang J, et al. Cordycepin ameliorates nonalcoholic steatohepatitis by activation of the AMP-activated protein kinase signaling pathway [J]. *Hepatology*, 2021, 74(2): 686-703.
- [18] Yang R R, Wang X L, Xi D S, et al. Cordycepin attenuates IFN- γ -induced macrophage IP-10 and mig expressions by inhibiting STAT1 activity in CFA-induced inflammation mice model [J]. *Inflammation*, 2020, 43(2): 752-764.
- [19] 李易泽,黄敏.代谢调控肿瘤微环境固有免疫应答机制研究进展[J].药科学报,2022,57(9):2622-2641.
- [20] 林颖韬,陈伶俐,胡雪峰.免疫细胞的种类、功能及相关疾病概述[J].生物学教学,2020,45(4): 77-80.
- [21] 中国药典[S].一部.2020: 119.
- [22] Xia Y L, Luo F F, Shang Y F, et al. Fungal cordycepin biosynthesis is coupled with the production of the safeguard molecule pentostatin [J]. *Cell Chem Biol*, 2017, 24(12): 1479-1489.
- [23] 马微,张善林.不同提取方法下冬虫夏草提取液成分的分析[J].现代食品,2020(9): 165-177.
- [24] 钱正明,黄琦,李春红,等.冬虫夏草中水溶性和脂溶性成分的高效液相色谱同时分析[J].时珍国医国药,2020,31(7): 1572-1575.
- [25] 钱正明,孙敏甜,周妙霞,等.鲜冬虫夏草化学成分研究[J].中药材,2018,41(11): 2586-2591.
- [26] 刘高强,王晓玲,杨青,等.冬虫夏草化学成分及其药理活性的研究[J].食品科技,2007,32(1): 202-205.
- [27] 白飞荣,李辉,姚粟,等.玉树冬虫夏草原草中主要化学成分分析[J].食品与发酵工业,2015,41(6): 187-189.

[责任编辑 李亚楠]