

doi: 10.3969/j.issn.1000-484X.2016.10.014

冬虫夏草菌丝体提取物通过抑制炎症因子及 Treg 细胞功能 缓解肺纤维化

岳会敏 刘 飞 李范林 马菲雅 沈苏南 侯亚义

(南京大学医学院和生物医药技术国家重点实验室, 南京 210093)

中图分类号 R392 文献标志码 A 文章编号 1000-484X(2016)10-1472-05

摘 要 目的: 观察冬虫夏草菌丝体(*Hirsutella sinensis mycelium*, HSM) 提取物对盲肠穿孔结扎(CLP) 小鼠的炎症反应和肺纤维化程度的影响。方法: 建立 CLP 诱导脓毒症 5 d 和 10 d 小鼠模型, 分别分为假术组(sham, $n=5$)、模型组(CLP, $n=11$)、治疗组(HSM, $n=11$)。冬虫夏草菌丝体组在术前 2 h 和术后给予 HSM 提取物 200 mg/(kg · d) (低于人体用量 0.27 g/kg), 假术组和模型组给予等量的生理盐水。利用 Q-PCR 检测了肺组织中炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 及纤维化因子 TGF- β 1、TIMP1 和 MMP9 的表达; 利用流式细胞术分析了小鼠外周血和脾脏中 Th1 细胞以及脾脏组织中 Treg 细胞的数量; 另外, 还对肺组织切片进行了 HE 染色以及 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA) 和纤连蛋白(fibronectin) 免疫组化染色。结果: 模型组外周血和脾脏中 Th1 细胞以及脾脏组织中 Treg 细胞的数量较假术组显著降低, 而 HSM 提取物治疗能上调上述细胞的数量。5 d 时, 模型组肺组织中 IL-1 β 及纤维化因子 TGF- β 1、MMP9 和 TIMP1 表达显著上调, 到第 10 天时有所降低但仍高于 sham 组, 而治疗组上述因子表达明显降低; 各组肺组织 TNF- α 表达无显著差异; HE 染色显示模型组肺部炎症样变明显, 到第 10 天时炎症样变比 5 d 时减轻, 而治疗组均有改善; 免疫组化显示与假术组比, 模型组肺内间质 α -SMA 和 fibronectin 表达明显增多, 而治疗组肺内间质表达低于模型组。结论: HSM 提取物具有抑制炎症、平衡免疫及缓解肺纤维化的功能。

关键词 冬虫夏草菌丝体; 炎症反应; 肺纤维化

Hirsutella sinensis mycelium (HSM) extract relieves pulmonary fibrosis though suppress inflammation and function of Treg cells

YUE Hui-Min, LIU Fei, LI Fan-Lin, MA Fei-Ya, SHEN Su-Nan, HOU Ya-Yi. Medical School & State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of HSM on the inflammation and pulmonary fibrosis in mice with cecal ligation and puncture (CLP). **Methods:** Both 5 day and 10 day timepoint pulmonary fibrosis were induced by CLP; mice were randomly divided into three groups, including sham group (sham, $n=5$), model group (CLP, $n=11$), therapy group (HSM, $n=11$). HSM extract (200 mg/kg, less than human dose of 0.27 g/kg) was orally administered to HSM group 2 hour before surgery and repeated everyday, while sham group and model group were given the same dose of normal saline. We used Q-PCR assay to analyze the expression of inflammatory molecules (IL-1 β and TNF- α) and fibrogenic cytokines (TGF- β , MMP9 and TIMP1) from lung tissues, we used FACS assay to analyze the amount of Th1 cells in PBMC and spleen sections, as well as Treg in spleen sections. Besides, lung sections were subjected to HE stain and immunohistochemical staining with α -SMA and fibronectin. **Results:** The amount of model group's Th1 cells in PBMC and spleen sections, as well as Treg in spleen sections were significantly lower than sham group's, whereas HSM succeeded in raising them. By day 5, the expression of inflammatory molecules IL-1 β and fibrogenic cytokines (TGF- β , MMP9 and TIMP1) from CLP group's lung sections were remarkably improved, by day 10, the expression had decreased but was higher than sham group's; HSM inhibited these cytokines' expression. The expression of TNF- α of CLP group and HSM group had no significant changes. The CLP group's HE results showed obvious pulmonary inflammatory damage, by day 10, the situation had improved, whereas HSM reduced the histopathologic alterations; contrast to sham group, model group's expression of α -SMA and fibronectin was remarkably improved, while HSM group showed lower expression. **Conclusion:** HSM extract can suppress inflammation, balances immune system and relieves pulmonary fibrosis.

[Key words] *Hirsutella sinensis*; Inflammation; Pulmonary fibrosis

作者简介: 岳会敏(1991 年-), 女, 硕士, 主要从事细胞与分子免疫研究, E-mail: yuehuimin914@126.com。

通讯作者及指导教师: 侯亚义(1960 年-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事细胞与分子免疫方面的研究, E-mail: yayihou@nju.edu.cn。

肺纤维化是一种慢性的、不可逆的肺部间质性疾病,可造成肺泡结构的破坏,进而导致病人呼吸困难,最终因呼吸衰竭而死亡^[1]。此类疾病病因尚不明确,但被普遍认为与暴露于职业危害、环境因素及基因易感性相关^[2]。肺纤维化预后较差,通常在患病早期启动炎症反应,以上皮细胞转分化、成纤维细胞大量增殖、纤维化病灶的形成以及肺结构破坏为特征^[3]。上皮细胞向间质细胞转化(EMT)和间质标志 vimentin 表达伴随着 E-cadherin 的表达消失都是肺纤维化的标志^[4]。肺纤维化的发生和发展与 TGF- β 1 活化密切,TGF- β 1 诱导过多的胶原和 ECM 产生积聚以及基底膜 MMP/TIMP 失衡。由于其病理机制复杂,目前为止现代医学仍缺乏良好的临床治疗手段^[5]。

冬虫夏草菌丝体是我国传统的名贵中药材,它是由冬虫夏草菌寄生于蝙蝠蛾幼虫而形成的幼虫尸体和干燥子座的复合体。冬虫夏草现在常被用来治疗呼吸系统疾病,也有报道称其可作为抗氧化剂和血管生成抑制剂。近年来有研究表明冬虫夏草菌丝体可通过抑制 TGF- β 1 表达及促进胶原降解缓解肝肾肺纤维化等功能^[6-9]。Keshar 等^[10]证实,脓毒症诱导的急性呼吸窘迫综合征(ARDS)可能诱发持续的纤维化病变,本实验构建了 CLP 诱导脓毒症模型,主要目的是明确冬虫夏草菌丝体缓解肺纤维化的作用,探讨其作用的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 4~6 周龄的 C57BL/6 小鼠,雄性,体重 18~20 g,购自南京大学模式动物所,饲养于 SPF 级动物房内,保证饮食和饮水,昼夜循环,使用前饲养不少于 1 周。

1.1.2 药物与试剂 冬虫夏草菌丝体提取物由南京中科药业有限公司提供(批号:20140778);免疫组化所用 fibronectin 抗体购自 SANTA CRUZ 公司,1:50 稀释; α -SMA 抗体是 abcam 公司产品,1:200 稀释;DAB 显示试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司(产品编号:AR1022);SABC-AP 免疫组化染色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司(产品编号:SA1050);实验用流式抗体均为 eBioscience 产品。

1.1.3 实验动物处理 两种模型各 27 只小鼠在 SPF 级动物房饲养 1 周后,随机分组,实验分组如下:(1) sham 组:小鼠腹腔注射 100 μ l/10 g 生理盐水,2 h 后用 4% 水合氯醛(200 μ l/每只)麻醉小鼠打

开腹腔暴露盲肠,不结扎不穿刺,然后将盲肠放入腹腔,逐层关闭腹腔,缝好伤口;每组 5 只小鼠;(2) 实验组:① CLP 组:小鼠腹腔注射 100 μ l/10 g 生理盐水,2 h 后用 4% 水合氯醛(200 μ l/每只)麻醉小鼠打开腹腔抽出盲肠结扎穿刺,之后将盲肠放入腹腔逐层关闭腹腔,缝好伤口;每组 11 只小鼠;② 治疗组:冬虫夏草菌丝体液(200 mg/kg)预处理 2 h,随后进行 CLP 手术,术后每天菌丝体液(200 mg/kg)灌胃,每组 11 只小鼠,术后 5 d 或 10 d 处死小鼠。

1.2 方法

1.2.1 流式细胞术 将收集的细胞用 PBS 洗 3 遍,然后用 PBS 重悬并转移至标准 BD 流式管中,按抗体说明书加入相应用量的流式抗体,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, PBS 洗 2 遍,重悬细胞后使用流式细胞仪检测。标记胞内因子的, PBS 洗两遍后,加 500 μ l 4% 的 PFA 室温固定 20 min,离心去上清;加 500 μ l 含 0.1% saponin 的 PBS,破膜 15 min,离心去上清;按抗体说明书加入相应用量的流式抗体,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,然后用含 0.1% saponin 的 PBS 洗 2 遍,重悬细胞后上流式细胞仪检测。

1.2.2 Q-PCR 将肺组织匀浆后,加入 Trizol,提总 RNA,核酸蛋白检测仪检测 RNA 的纯度和浓度后,取 1 g RNA 进行反转录。反转录体系(20 μ l):4 μ l 5 $\times$ RT buffer,2 μ l dNTP,0.5 μ l RNase inhibitor,0.5 μ l Oligo dT,0.5 μ l ReverTra Ace,1 μ g RNA,加 DEPC 水至 20 μ l;采用三步法进行 Q-PCR 反应,反应在 Applied BioSystems 7300 Sequence Detection System 中进行,得到各个基因的 Ct 值,然后以 GAPDH 为内参,按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行计算确定目的基因的表达。其中 IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 1、MMP9 和 TIMP1 引物均按 primer bank 查询设计合成,GAPDH 引物根据文献合成。

1.2.3 组织学观察 肺组织取出后用 4% 多聚甲醛固定,常规 HE 染色,切片在光学显微镜 10 $\times$ 20 视野下观察肺组织形态变化。

1.2.4 免疫组化染色 石蜡切片脱蜡、水化后,热修复;冷却后,3% H₂O₂ 阻断过氧化氢酶;PBS 洗 3 遍,然后按抗体说明书滴加适当浓度的一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;按说明书滴加适量二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 45 min 后,用 PBST 洗 3 遍,加底物 SABC 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min;随后用 PBST 洗 4 遍,DAB(武汉博士德生物公司)显色;复染透明后封片;在光学显微镜 10 $\times$ 20 视野下观察。

1.3 统计学方法 所有实验数据均重复 3 次以上,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 Prism5 软件统计分析并作

图,组间比较采用 one-way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 冬虫夏草菌丝体对肺组织炎症反应的影响 Q-PCR 结果显示,与 sham 组相比,5 d CLP 组小鼠肺组织重要的炎症因子 IL-1 β 的 mRNA 的表达升高($P < 0.05$),而 HSM 治疗组 IL-1 β 的 mRNA 表达相比 CLP 组明显降低($P < 0.05$);此外, TNF- α 也有与 IL-1 β 相似的变化趋势,但改变不明显,见图 1A。10 d CLP 组小鼠肺组织重要的炎症因子 IL-1 β 的 mRNA 的相比 5 d 模型组有所降低但仍高于 sham 组,而给予 HSM 治疗后降低($P < 0.05$);此外, TNF- α 也有与 IL-1 β 相似的变化趋势,但改变不明显,见图 1B。

肺组织 HE 染色显示,模型组小鼠的肺组织出现炎性细胞浸润、系膜基质增生,血管充血等变化;给予 HSM 提取物治疗后,上述症状减轻。见图 1C。以上结果说明肺组织炎症样变随病程进展而减轻,而冬虫夏草菌丝体改善了小鼠肺组织炎症病变。

2.2 冬虫夏草菌丝体对小鼠免疫细胞的影响 本实验利用流式细胞术研究了 HSM 提取物对小鼠脾脏中 Treg 细胞以及 PBMC 和脾脏中 Th1 细胞数量的影响。结果显示:与 sham 组相比,5 d CLP 组小鼠脾脏中 Treg 细胞数量均显著增多($P < 0.05$),而与 CLP 组相比,给予 HSM 提取物治疗后,小鼠脾脏中 Treg 细胞数量明显降低($P < 0.05$),见图 2A;10 d 组各组分变化趋势与 5 d 组相似,见图 2B;与 sham 组相比,5 d CLP 组小鼠脾脏中 Th1 细胞数量显著减少($P < 0.05$),而与 CLP 组相比,给予 HSM 提取物治疗后,小鼠脾脏中 Th1 细胞数量有显著增加($P < 0.05$),见图 3A;10 d 组各组分小鼠脾脏中 Th1 细胞数量变化趋势与 5 d 组相似,见图 3B;与 sham 组相比,5 d 和 10 d CLP 组中小鼠 PBMC 中 Th1 细胞数量均有下降趋势,而给予 HSM 提取物治疗后 Th1 细胞数量有增多的趋势,见图 3A 和图 3B。

2.3 冬虫夏草菌丝体对肺组织纤维化分子表达的影响 Q-PCR 结果显示,5 d CLP 组小鼠肺组织 TGF- β 1、金属基质蛋白酶 9(MMP9) 和金属蛋白酶组织抑制物 1(TIMP1) 的 mRNA 表达均显著上调;而 HSM 治疗组小鼠肺组织 TGF- β 1 和 MMP9 的表达与 CLP 组相比均有显著下降($P < 0.05$),TIMP1 有下降趋势;见图 4A;10 d CLP 组小鼠肺组织 TGF- β 1 的 mRNA 表达有上调趋势, MMP9 和 TIMP1 的 mRNA 表达相比第 5 天时有所降低但仍显著高于 sham 组,而与 CLP 组相比,给予 HSM 提取物治疗后, TGF- β 1 和 MMP9 的表达均明显下调,见图 4B;提示 CLP 组小鼠肺部可能出现纤维化病变且纤维化病变在发病后期有减轻的趋势,经 HSM 提取物治

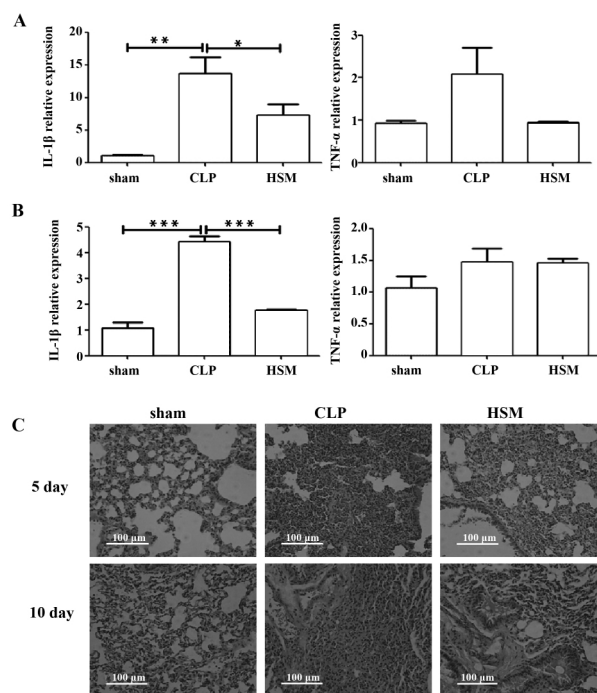


图1 HSM改善小鼠肺部炎症反应($n=3$)

Fig.1 HSM can improve inflammation in mice's renal sections($n=3$)

Note: HE staining was performed on renal sections. Original magnification, * . $P < 0.05$, ** . $P < 0.01$, *** . $P < 0.001$.

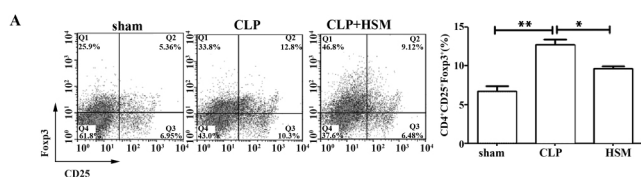
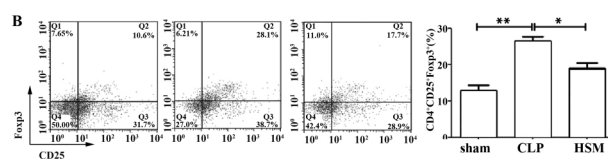


图2 HSM对小鼠脾脏Treg细胞数量的影响($n=3$)

Fig.2 HSM influences amounts of mice's Treg in spleen($n=3$)

Note: * . $P < 0.05$, ** . $P < 0.001$.



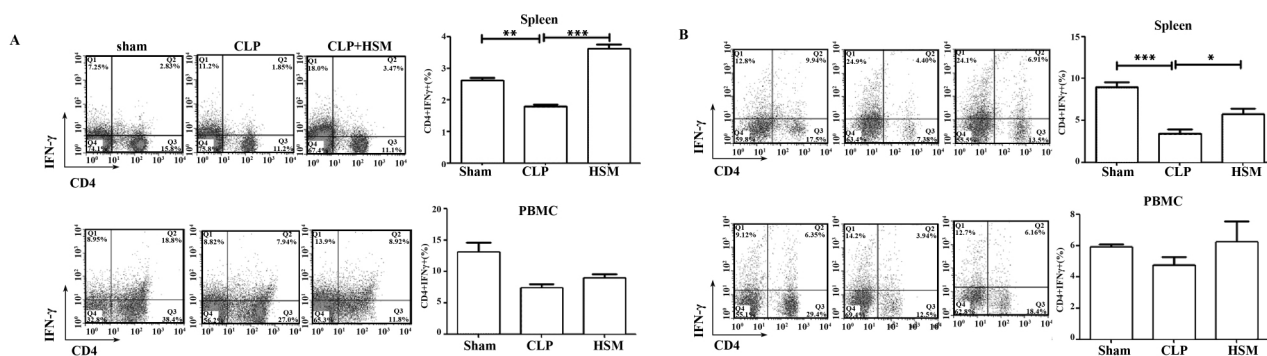


图3 HSM 对小鼠外周血和脾脏中 Th1 细胞数量的影响 ($n=3$)

Fig.3 HSM influences amounts of mice's Th1 cells in PBMC and spleen ($n=3$)

Note: * . $P<0.05$, ** . $P<0.01$, *** . $P<0.001$.

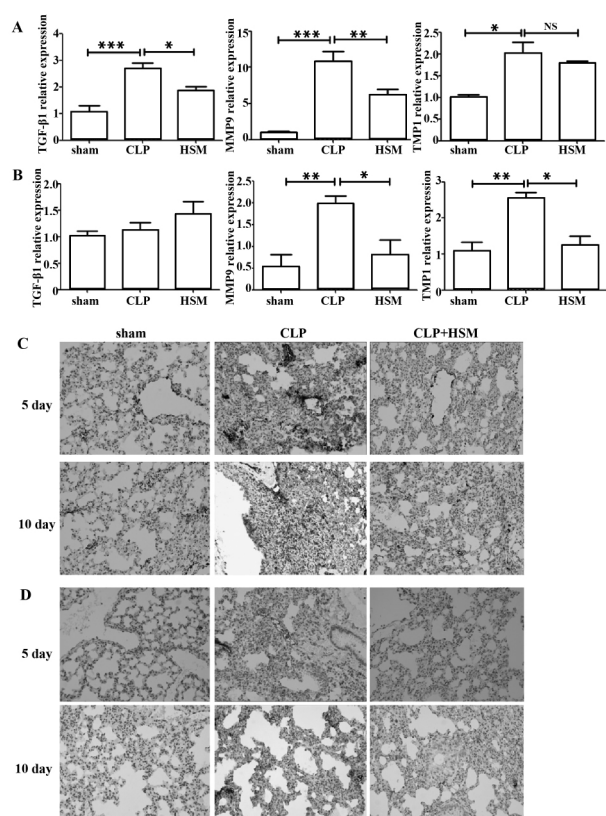


图4 HSM 改善小鼠肺纤维化情况 ($n=3$)

Fig.4 HSM can improve mice's pulmonary fibrosis ($n=3$)

Note: Immunohistochemical staining was performed on lung sections. Original magnification $\times 20$. * . $P<0.05$, ** . $P<0.01$, *** . $P<0.001$.

疗后小鼠肺部 ECM 的合成和降解失衡得到控制、肺纤维化病变可能得到改善。

2.4 冬虫夏草菌丝体对肺组织 α -SMA 和 fibronectin 蛋白表达影响 α -SMA 和 fibronectin 在 sham 组小鼠肺组织内表达很弱; 经过 CLP 手术后表达增强, 其主要表达于肺上皮细胞和肺内间质中; 而给予 HSM 提取物治疗后, 两种蛋白的表达明显减少见图

4C 和图 4D。它们在不同时间点的表达也有不同。

3 讨论

在肺纤维化的发生和发展过程中, 肺组织受到损伤, 由于炎症区域会出现明显的巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞的浸润, 这些浸润的炎症细胞可以产生 IL-1、TNF- α 和 MCP-1 等细胞因子, 进而形成复杂的细胞因子网络, 调控间质成纤维细胞和肺泡上皮细胞的增殖和凋亡, 导致 ECM 活化增殖, 最终促进肺纤维化的发生。Th1 细胞产生的 IFN- γ 可以抑制 TGF- β 表达, 抑制胶原产生而减轻肺纤维化损伤, 本实验中 CLP 组脾脏中 Th1 细胞数量较 sham 组减少, 给予 HSM 治疗后有明显上调。此外, 肺组织炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的 mRNA 水平表达量以及肺 HE 染色结果显示, 进行 CLP 处理第 5 天时炎症因子表达升高较为显著且肺组织损伤较明显, 而到第 10 天时炎症因子有所改善; 给予冬虫夏草菌丝体治疗能够显著改善小鼠肺间质炎症细胞浸润情况和降低肺组织炎症因子的表达。证实在 CLP 诱导脓毒症早期肺组织以炎症改变为主, 随病程向晚期发展, 炎症改变减弱; 冬虫夏草菌丝体具有抑制炎症和调节免疫的功能。

为了进一步探讨 HSM 发挥作用的机制, 我们分析了脾脏中 Treg 细胞比例以及外周血和脾脏中 Th 细胞比例, 发现 HSM 能够显著降低 CLP 引起的脾脏中 Treg 细胞比例增多, 对 Th 细胞也有部分影响。纤维母细胞异常转化为成纤维细胞, 进而产生大量 ECM 并分泌因子影响相邻细胞的功能^[1]。金属基质蛋白酶 (MMPs) 是分解胞外基质的主要酶类, 而金属蛋白酶组织抑制物 (TIMPs) 可以特异性的抑制其对 ECM 的分解作用, 两者对维持 ECM 合成和降解的平衡至关重要。除了纤维化细胞过表达

MMP/TIMPs, 上皮细胞向间质转化(EMT)也是肺纤维化的显著特征; 在 EMT 过程中, 细胞失去胞间连接蛋白 E-cadherin 并表达 α -SMA 和 vimentin 等间质标志。本实验中肺组织纤维化相关因子 TGF- β 1、MMP9 和 TIMP1 的 mRNA 水平表达量在进行 CLP 处理第 5 天时升高较为显著, 到第 10 天时有所下降但仍高于 sham 组, 而给予 HSM 治疗后均有相应改善。免疫组化结果也表明 α -SMA 和 fibronectin 在进行 CLP 处理第 5 天时升高较为显著, 到第 10 天时有所下降但仍高于 sham 组, 给予 HSM 提取物治疗后小鼠肺部 α -SMA 和 fibronectin 表达均下降, 说明冬虫夏草菌丝体具有抗肺纤维化的功能。

本研究结果证实冬虫夏草菌丝体具有抑制炎症及平衡免疫缓解肺纤维化的功能, 且这种作用可能是通过抑制炎症因子及 Treg 细胞功能达到的; 对此进行进一步研究将有利于阐明其抗纤维化的作用机制, 为寻找抗肺纤维化药物提供新视角。

参考文献:

- [1] Chen M, Cheung FW, Chan MH, *et al.* Protective roles of Cordyceps on lung fibrosis in cellular and rat models [J]. *J Ethnopharmacology*, 2012, 143(2): 448-454.
- [2] Antoniou KM, Pataka A, Bouros D, *et al.* Pathogenetic pathways and novel pharmacotherapeutic targets in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2007, 20(5): 453-461.
- [3] Verma S, Slutsky AS. Idiopathic pulmonary fibrosis-new insights [J]. *N Engl J Med*, 2007, 356(13): 1370-1372.

(上接第 1471 页)

- [1] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1-2): 55-63.
- [2] Flatley JE, Sargent A, Kitchener HC, *et al.* Tumour suppressor gene methylation and cervical cell folate concentration are determinants of high-risk human papillomavirus persistence: a nested case control study [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 803.
- [3] Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, *et al.* The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer [J]. *J Clin Pathol*, 2002, 55(4): 244-265.
- [4] Kumar M, Kaur V, Kumar S, *et al.* Phytoconstituents as apoptosis inducing agents: strategy to combat cancer [J]. *Cytotechnology*, 2016, 68(4): 531-563.
- [5] Khan M, Li T, Ahmad Khan MK, *et al.* Alantolactone induces apoptosis in HepG2 cells through GSH depletion, inhibition of STAT3 activation, and mitochondrial dysfunction [J]. *Biomed Res*

- [6] Willis BC, du Bois RM, Borok Z. Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung [J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2006, 3(4): 377-382.
- [7] Coward WR, Saini G, Jenkins G. The pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Ther Adv Respir Dis*, 2010, 4(6): 367-388.
- [8] Das SK, Masuda M, Sakurai A, *et al.* Medicinal uses of the mushroom Cordyceps militaris: current state and prospects [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(8): 961-968.
- [9] Chai JJ, Chen YP, Rui HL. Effects of Hirsutella sinensis on TGF- β 1 and Snail expressions and transdifferentiation of tubular epithelial-myofibroblast in renal tissue of rats with chronic aristolochic acid nephropathy [J]. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Za Zhi*, 2009, 29(4): 325-329.
- [10] Xu H, Li S, Lin Y, *et al.* Effectiveness of cultured Cordyceps sinensis combined with glucocorticosteroid on pulmonary fibrosis induced by bleomycin in rats [J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2011, 36(16): 2265-2270.
- [11] Li SP, Yang FQ, Tsim KW. Quality control of Cordyceps sinensis, a valued traditional Chinese medicine [J]. *J Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 2006, 41(5): 1571-1584.
- [12] Keshari RS, Silasi-Mansat R, Zhu H, *et al.* Acute lung injury and fibrosis in a baboon model of Escherichia coli sepsis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2014, 50(2): 439-450.
- [13] Nakasaki M, Hwang Y, Xie Y, *et al.* The matrix protein Fibulin-5 is at the interface of tissue stiffness and inflammation in fibrosis [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8754.

收稿 2016-03-02 修回 2016-04-25

(编辑 张晓舟)

Int, 2013, 2013: 719858.

- [6] Cerezo-Guisado MI, Zur R, Lorenzo MJ, *et al.* Implication of Akt, ERK1/2 and alternative p38MAPK signalling pathways in human colon cancer cell apoptosis induced by green tea EGCG [J]. *Food Chem Toxicol*, 2015, 84: 125-132.
- [7] Di W, Khan M, Rasul A, *et al.* Isoalantolactone inhibits constitutive NF- κ B activation and induces reactive oxygen species-mediated apoptosis in osteosarcoma U2OS cells through mitochondrial dysfunction [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(4): 1585-1593.
- [8] Farsinejad S, Gheisary Z, Ebrahimi Samani S, *et al.* Mitochondrial targeted peptides for cancer therapy [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(8): 5715-5725.

收稿 2016-05-29

(编辑 张晓舟)