

蛹虫草免疫调节蛋白分离纯化、结构表征与免疫调节活性研究

徐大众, 马高兴, 马宁, 杨文建, 裴斐, 苏安祥, 胡秋辉*

(南京财经大学食品科学与工程学院, 江苏省现代粮食流通与安全协同创新中心,
江苏省食用菌保鲜与深加工工程研究中心, 南京 210023)

摘要: **目的** 探究蛹虫草蛋白质的免疫调节活性和一级结构。**方法** 通过碱溶酸沉法提取蛹虫草蛋白质, 采用阴离子交换层析法和葡聚糖凝胶层析法对其进行分离纯化, 通过建立小鼠巨噬细胞免疫调节模型对各组分进行活性评价, 得到免疫活性最佳的组分, 通过基质辅助激光解吸飞行时间质谱法测得其分子量大小, 通过蛋白质谱解析出其蛋白质一级结构。以脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)作为阳性对照, 通过小鼠巨噬细胞研究其对巨噬细胞 RAW264.7 增殖活性、吞噬率、一氧化氮(nitrogen monoxide, NO)分泌量及免疫因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)释放量等的影响。**结果** 分离纯化出的蛹虫草免疫调节蛋白 CMP 2b 由 196 个氨基酸组成, 分子量为 22.460 kDa; CMP 2b 可显著提高巨噬细胞的增殖能力和吞噬能力, 细胞增殖率最高达到了空白对照组的(152.91 \pm 5.55)%, 吞噬能力提高了 23.34%; CMP 2b 可促进巨噬细胞分泌 NO、活性氧(reactive oxygen species, ROS)、IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 及 TNF- α , 其中 NO 分泌水平达到了空白对照组的 2.31 倍, ROS 分泌水平达到阳性对照组 LPS 的 82.33%, TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 和 IL-6 分泌量分别为空白对照组的 5.51、17.42、4.18 和 26.75 倍, 显著增强了巨噬细胞免疫调节能力。**结论** 作为近年来兴起的一种优质珍稀食用菌, 蛹虫草蛋白质在体外研究中显示出较强的免疫增强作用, 可为蛹虫草作为免疫调节剂的开发提供新思路。

关键词: 蛹虫草; 蛋白质; 纯化; 结构表征; 巨噬细胞; 免疫调节活性

Isolation, purification, structural characterization and immunomodulatory activity of immune regulatory proteins from *Cordyceps militaris*

XU Da-Zhong, MA Gao-Xing, MA Ning, YANG Wen-Jian, PEI Fei, SU An-Xiang, HU Qiu-Hui*

(Collaborative Innovation Center for Modern Grain Circulation and Safety, Jiangsu Province Engineering Research Center of Edible Fungus Preservation and Intensive Processing, College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT: Objective To explore the immunomodulatory activity and primary structure of *Cordyceps militaris* protein. **Methods** *Cordyceps militaris* protein was extracted by alkali-soluble acid precipitation method, and separated and purified by anion exchange chromatography and glucan gel chromatography. The activity of each component was evaluated and the best immunoactive component was obtained by establishing mouse macrophage

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目(CX(21)2005)、江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

Fund: Supported by the Independent Innovation Fund for Agricultural Science and Technology of Jiangsu Province (CX(21)2005), and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD)

*通信作者: 胡秋辉, 博士, 教授, 主要研究方向为食品营养与功能。E-mail: qiuhuihu@nufe.edu.cn

*Corresponding author: HU Qiu-Hui, Ph.D, Professor, College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics, No.3, Wenyuan Road, Qixia District, Nanjing 210023, China. E-mail: qiuhuihu@nufe.edu.cn

immune regulation model. Its molecular weight was measured by matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry and its primary protein structure was determined by protein spectroscopy. With the lipopolysaccharide (LPS) as a positive control, the proliferative activity, phagocytosis rate, nitrogen monoxide (NO) secretion and the release of immune factor interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interferon- γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) of RAW264.7 cells in mouse macrophages were studied. **Results** The isolated and purified immunomodulatory protein CMP 2b was composed of 196 amino acids and its molecular weight was 22.460 kDa. The CMP 2b could significantly improve the proliferation ability and phagocytosis ability of macrophages, the cell proliferation rate reached the highest (152.91 \pm 5.55)% of blank control group, phagocytosis ability increased by 23.34%. In addition, CMP 2b could promote the secretion of NO, reactive oxygen species (ROS), IL-1 β , IL-6, IFN- γ and TNF- α by macrophages, in which the secretion of NO was 2.31 times of that of blank control group, and the secretion of ROS was 82.33% of LPS of positive control group. The secretion levels of TNF- α , IL-1 β , IFN- γ and IL-6 were 5.51, 17.42, 4.18 and 26.75 times of the blank control group, respectively, which significantly enhanced the immune regulation ability of macrophages. **Conclusion** As a high-quality rare edible fungus emerging in recent years, the protein of *Cordyceps militaris* has strong immune enhancing effect *in vitro*, and the results of the study may provide new ideas for the development of *Cordyceps militaris* as an immunomodulator.

KEY WORDS: *Cordyceps militaris*; protein; purification; structural characterization; macrophages; immunomodulatory activity

0 引言

蛹虫草(*Cordyceps militaris*)又称北冬虫夏草,与冬虫夏草同属异种,是虫草属的模式种。其保健作用与冬虫夏草的药用及保健价值较相近^[1]。蛹虫草含有多糖、蛋白质、虫草素等多种生物活性物质^[2],其中,蛹虫草多糖含有(1-4)或(1-2)连接的吡喃葡萄糖基或半乳吡喃糖基残基,平均分子量 127 kDa^[3-5],具有免疫调节等多种生物活性,还通过一定程度上抑制肿瘤的增殖和转移,提高患者的免疫功能来对抗癌症^[5-7]。

近年,蛹虫草多糖是蛹虫草研究主要集中方向,而对蛹虫草蛋白质结构和活性的研究很少。多种食用菌中均存在一类具有免疫调节活性的蛋白质^[8-9]。例如,有研究从虎乳菇中制得一种含有 112 个氨基酸(12.59 kDa)的免疫调节蛋白,并论证了其具有类凝集素的性质和对 MCF-7、HeLa 和 A549 癌细胞系的具有抑制作用^[10-12]。LIN 等^[13]利用基因克隆手段,在巴斯德毕赤酵母中表达了一种源自血红铆钉菇的免疫调节蛋白,具备凝血和抗肿瘤活性。有研究通过小鼠哮喘炎症模型,论证了金针菇 FIP-fve 的抗过敏活性^[14-16]。这些小分子蛋白质参与和介导了免疫功能的调节,能够提高机体的免疫功能,同时对正常细胞没有毒副作用,是一种良好的免疫调节剂^[17]。

然而,由于蛋白质的化学结构复杂,研究手段也存在一定的局限性,因此蛹虫草蛋白的研究还存在许多亟待解决的问题。目前,蛹虫草蛋白质中发挥免疫调节功能的主要组分并不清楚,国内外对于蛹虫草活性成分的研究大多数还是集中在食用菌本身或粗食用菌提取物或不同代谢物,

因此通过分离和纯化活性蛋白,解析特定化合物的免疫调节机制与功能关系的研究就显得尤为重要^[5-7]。本研究通过分离纯化的方法从蛹虫草中纯化获得一种活性蛋白组分,并对其一级结构进行表征,同时考查其免疫调节活性,旨在为蛹虫草的高值化开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜蛹虫草子实体购自云南那曲农贸市场; Raw 264.7 购自上海 IBS 细胞库。

CCK-8 试剂盒、酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒、NO 测定试剂盒、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(纯度 \geq 99%)(上海碧云天生物技术有限公司);高糖培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、青霉素-链霉素溶液(美国 Gibco 生物科技公司);纤维素 DE-52、葡聚糖凝胶 G-200(北京索莱宝科技有限公司);2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA)、无水乙醇、冰醋酸、浓硫酸、苯酚、硼酸、氢氧化钠、其他试剂(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

MV-1200 紫外检测器(上海沪西分析仪器厂有限公司);BSZ-100 自动部分收集器(上海嘉鹏科技有限公司);FD-1A-50 真空冷冻干燥机(西班牙 Telstar 公司);5800 MALDI-TOF/TOF 质谱仪(美国 AB Sciex 公司);W200IR 型二氧化碳细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);SpectraMax M5 多功能酶

标仪(美国 Molecular Devices 公司); TE214S 型万分之一电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 蛹虫草蛋白质的制备

根据 XU 等^[18]方法,按照 1:25 (g/mL)料液比加入超纯水, -20℃下冻融 3 次,用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 12.0, 40℃水浴 180 min,在功率 400 W、温度 40℃条件下超声 180 min 处理, 10000 r/min 离心 20 min 取上清液,用 1 mol/L HCl 滴定至等电点 4.5, 10000 r/min 离心 20 min 弃上清液,得到蛹虫草粗蛋白(crude *C. militaris* protein, CCMP)。

1.3.2 阴离子交换层析

室温(21~25℃)条件下,将纤维素 DE-52 填料浸泡于去离子水中溶胀 1 h,期间不断搅拌。选用规格为 2.6 cm×40 cm 色谱柱,垂直安装,注入少量去离子水,将填料溶液搅匀后经玻璃棒沿柱内壁缓慢连续地装入柱中,自然沉降,应无气泡或明显断层。打开恒流泵,用 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.2)压柱平衡 6 h 后,得到纤维素 DE-52 阴离子交换色谱柱。

将 CCMP 溶解于 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中(100 mg/mL),并适当超声至完全溶解。按柱体积的 5% 上样,弃去色谱柱顶端液体,将样品溶液沿柱内壁圆周式缓慢加入。用 0~0.5 mol/L NaCl 溶液进行梯度洗脱,流速为 0.5 mL/min,收集 0、0.1、0.3、0.5 mol/L NaCl 溶液洗脱部分,并绘制 DE-52 色谱柱洗脱曲线。收集各洗脱组分,透析脱盐后冷冻干燥,得到蛹虫草免疫活性蛋白(*C. militaris* protein, CMP)组分,记为 CMP_x,并通过小鼠巨噬细胞模型筛选免疫调节活性最佳的组分。

1.3.3 葡聚糖凝胶色谱分析

室温(21~25℃)条件下,将葡聚糖凝胶 G-200 干粉置于去离子水中煮沸 1 h,间歇搅拌混匀至充分溶胀,选用规格为 2.6 cm×60 cm 色谱柱,采用 DE-52 色谱柱的装柱及压柱平衡方式,得到葡聚糖凝胶 G-200 排阻色谱柱。

将 1.3.2 中筛选得到的免疫调节活性最佳的组分溶解于 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中(100 mg/mL),按柱体积的 5% 上样,弃去色谱柱顶端液体,将样品溶液沿柱内壁圆周式缓慢加入。用 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液洗脱该 CMP 组分,流速为 1.0 mL/min,部分收集器每管收集 10 mL,收集各洗脱组分,透析后冷冻干燥,得到各组分,记为 CMP_{xy},并通过小鼠巨噬细胞模型筛选免疫调节活性最佳的组分。

1.3.4 蛹虫草免疫调节蛋白的筛选

巨噬细胞是否分泌 NO 及 NO 分泌水平已被广泛用作其免疫活化的定性和定量指标,且分泌 NO 被证明是巨噬细胞在自身免疫应答期间实现防御病原体感染和组织损伤的关键因素^[18]。通过建立巨噬细胞免疫调节活性筛选模型,实现对蛹虫草免疫调节蛋白的筛选。将 Raw264.7 在培养箱中预培养 24 h,吸弃培养基,向 96 孔板中加入 100 μL 培养基作为空白对照及含有不同浓度 CMP 样品的完全培养基处理细胞,培养 24 h 后吸取上清液。依照 NO 检测试

剂盒说明书操作。

1.3.5 蛹虫草免疫调节蛋白相对分子质量

根据 SUCKAU 等^[19]方法,蛋白样品点至样品靶,待样品自然干燥,取芥子酸基质溶液点至样品靶上,自然干燥,用相同方法在样品靶位相邻位置点标准品,打开高压和激光,待仪器预热 30 min 后进行基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF/TOF-MS)检测。在正离子模式下选择线性方法测试样品相对分子量。

1.3.6 蛹虫草免疫调节蛋白一级结构测定

蛋白制取后冻干,加胰蛋白酶缓冲液,37℃温育 16~18 h 进行肽段酶解。液相色谱柱平衡在 0.1% 的甲酸水溶液中,自动将样品放入样器上,经毛细管高效液相色谱分离后进行酶解产物的质谱分析。采用正离子检测,采集每次完整扫描后的碎片图谱,将质谱测试原始文件通过软件 MAXQUANT1.5.5.1 对相应数据库进行检索,得到蛋白质鉴定和定量分析结果。

1.3.7 巨噬细胞活性测定

将巨噬细胞复苏后接种于 96 孔板,置于 37℃,含有 5% CO₂ 的细胞培养箱中,培养至对数生长期备用。将处于对数生长期的巨噬细胞加入不同质量浓度的食用菌蛋白溶液(25、50、100、200 μg/mL),只加培养基组设置为空白对照,正常培养 24 h。参考 CCK-8 试剂盒说明书测定细胞活性^[18]。

1.3.8 吞噬中性红能力测定

将接种在 96 孔板中的巨噬细胞加入样品并培养 24 h,每个孔中加入 20 μL 中性红溶剂并培养 20 min,继续加入 100 μL 细胞裂解液,其中脂多糖组为阳性对照。用酶标仪测量 λ=570 nm 处的吸光度。

1.3.9 活性氧分泌量测定

取对数生长期的细胞,调整密度为 1×10⁶ 个/mL,加入到 96 孔细胞培养(黑板)中,每孔 100 μL,于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后,小心弃去上清液后,分别加入 100 μL DMEM 基础培养基、不同质量浓度食用菌蛋白溶液(25、50、100、200 μg/mL)、LPS (1 μg/mL,用 DMEM 基础培养基配制),每个组设 3 个复孔。培养 24 h 后,小心弃去上清液后,每孔均加入 100 μL,10 μmol/L 的 DCFH-DA 溶液,在 37℃继续孵育 20 min,吸去上清液后,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗涤细胞 3 次,最后再加入 100 μL PBS 重悬细胞。酶标仪检测每孔荧光强度。

1.3.10 NO 释放量的测定

将细胞悬浮液接种于 96 孔板,培养至单层贴壁状态后弃去完全培养液,然后加入 200 μL 样品培养液培养 24 h。依照 NO 检测试剂盒说明书操作。

1.3.11 细胞免疫因子释放量的测定

将处于对数生长期的巨噬细胞接种于 6 孔板,每孔添加 2 mL 的细胞培养液,加入不同浓度样品,放于含有 5% CO₂ 的细胞培养箱正常培养 24 h,取上清液。参考 ELISA 试剂盒

说明书测定上清液中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 释放量。

1.4 数据处理

所有实验至少重复 5 次, 实验结果以平均值 \pm 标准偏差表示。采用 IBM SPSS 25 统计分析软件分析数据。

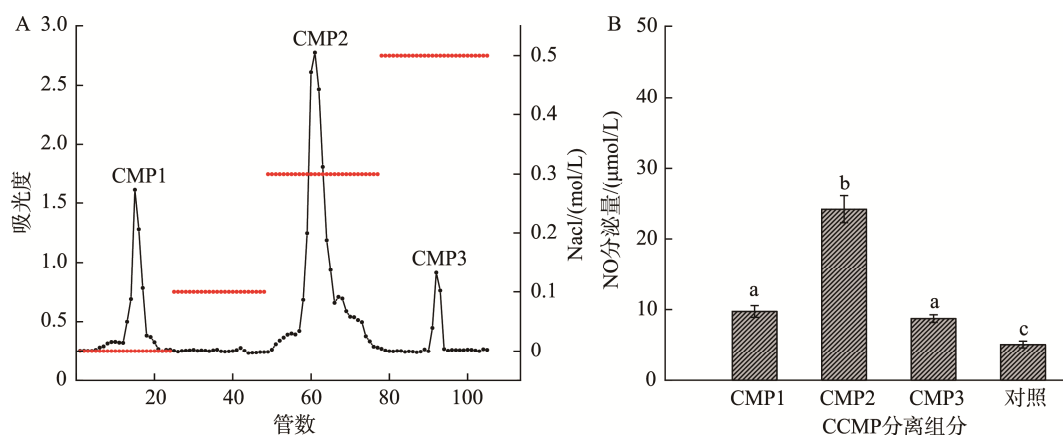
2 结果与分析

2.1 蛹虫草免疫调节蛋白分离纯化与免疫活性筛选

本研究通过碱溶酸沉法获取蛋白质, 每 100 g 蛹虫草子实体粉末可制备粗蛋白质约 5.23 g。通过阴离子交换色谱柱, 经溶液梯度洗脱, 紫外检测器共检测出 3 个蛋白吸收峰, 即获得 3 个蛋白组分(图 1A), 分别命名为 CMP 1、CMP 2 和 CMP 3, 并通过活性筛选模型测定各个组分(200 μ g/mL)

诱导巨噬细胞分泌 NO 的能力。结果显示(图 1B), 3 个 CMP 组分分别诱导巨噬细胞产生(9.73 \pm 0.83)、(24.16 \pm 0.19)和(8.73 \pm 0.54) μ mol/L 的 NO, 均显著高于对照组巨噬细胞的 NO 产生量[(5.09 \pm 0.47) μ mol/L]。由此可见, 3 个 CMP 组分均能激活巨噬细胞, 其中 CMP 2 较其他两个组分显著地诱导了巨噬细胞的 NO 分泌, 可认定 CMP 2 是含有高免疫调节活性的蛹虫草蛋白组分^[19]。

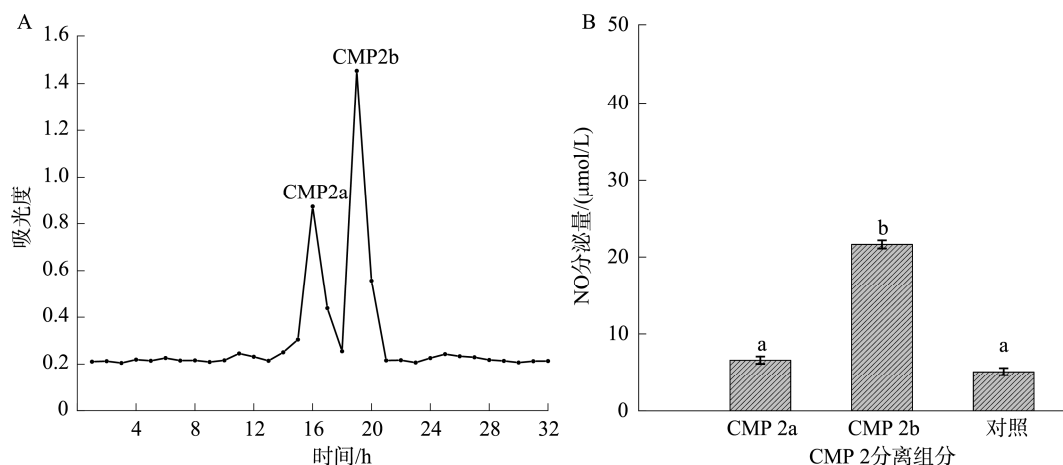
将 CMP 2 组分通过葡聚糖凝胶 G-200 排阻层析柱进一步分离纯化, 经 Tris-HCl 缓冲液洗脱得到 CMP 2a 和 CMP 2b 两个紫外蛋白吸收峰, 即分离出 2 个蛋白组分(图 2A)。活性筛选模型鉴定结果显示, CMP 2a 和 CMP 2b (200 μ g/mL) 分别诱导巨噬细胞产生(6.61 \pm 0.48) μ mol/L 和(21.63 \pm 0.52) μ mol/L 的 NO, 含量均显著高于对照组, 其中 CMP 2b 组分较 CMP 2a 更为显著地提升巨噬细胞的 NO 分泌量(图 2B)。由此确定, CMP 2b 组分含有高免疫调节活性的蛹虫草蛋白。



注: A 为葡聚糖凝胶 G-200 排阻色谱分离得到的 CCMP 组分; B 为 3 种 CCMP 组分对巨噬细胞 NO 分泌的影响, 不同小写字母表示组间存在显著性差异($P < 0.05$), 图 2B 相同。

图 1 CCMP 的分离纯化及各组分免疫调节活性筛选

Fig.1 Separation and purification of CCMP and screening of immunomodulatory activities of its components



注: A 为葡聚糖凝胶 G-200 排阻色谱分离得到的 CMP 2 组分; B 为两种 CMP 2 组分对巨噬细胞 NO 分泌的影响。

图 2 CMP 2 的分离纯化及各组分免疫调节活性筛选

Fig.2 Separation and purification of CMP 2 and screening of immunomodulatory activities of its components

2.2 蛹虫草免疫调节蛋白高分辨率分子量测定

MALDI-TOF/TOF-MS 能够以高分辨率实现对蛋白质、多肽、氨基酸、糖蛋白等化合物的相对分子量测定。测定前, 首先通过测试标准品对样品靶进行校准, 标准品校准测试通过后, 检测 CMP 2b 相对分子量, 得到测试图谱。由图 3 可知, CMP 2b 的高分辨率相对分子量为 22.460 kDa。图中主峰附近存在与主峰分子量相近的低响应值附峰, 这是由于天然产物蛋白在真菌组织中发生了如氧化、脱酰胺、磷酸化等多种类型的修饰^[20-21], 即各种天然化学修饰的综合作用结果。

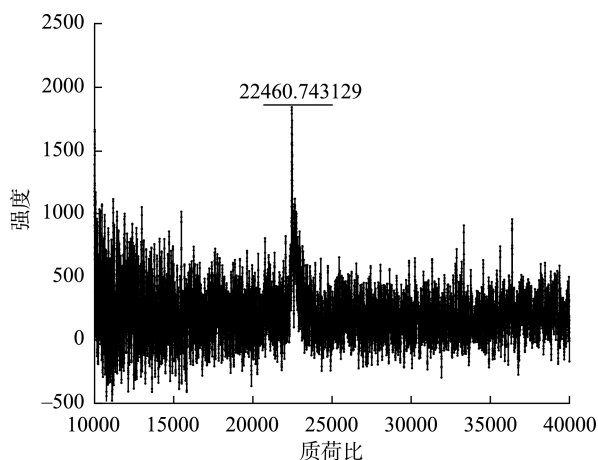


图 3 CMP 2b 的 MALDI-TOF/TOF-MS 图谱

Fig.3 MALDI-TOF/TOF-MS chromatogram of CMP 2b

2.3 蛹虫草免疫调节蛋白结构表征

本研究基于毛细管高效液相色谱和 QE 质谱联用技术对蛹虫草免疫调节蛋白一级结构进行确定。将出峰物质的质谱图与蛹虫草蛋白谱图库(美国 JGI-MycCosm 真菌基因组数据库, <https://jgi.doe.gov/>)进行对比, 通过判定原则(评分高于 70), 匹配得出的蛋白名称如表 1 所示。根据匹

配所得蛋白质的分子量与 CMP 2b 高分辨率相对分子质量分析结果对比可知, CMP 2b 肽指纹图谱与蛋白质 G3JQN1|G3JQN1_CORMM 匹配度为 187.89, 而 G3JQN1|G3JQN1_CORMM 的相对分子质量是 21.724 kDa, 与 CMP 2b 相吻合, 由此可根据 G3JQN1|G3JQN1_CORMM 的结构信息判定 CMP 2b 的蛋白质一级序列(图 4), 并且可知 CMP 2b 由 196 个氨基酸组成。

2.4 蛹虫草免疫调节蛋白对 RAW264.7 增殖能力的影响

细胞增殖率测定通常用于反映细胞分裂情况和细胞群体变化程度, 常用于表征生物大分子对细胞活性的影响, 以确定适于进行细胞实验的生物大分子用量。CCK-8 利用不同质量浓度的 CMP 2b 作用于小鼠巨噬细胞后, 通过 CCK-8 细胞活力测定法鉴定 CMP 2b 对小鼠巨噬细胞增殖率的影响(图 5)。定义空白组测得的细胞增殖率为 100%, 25、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CMP 2b 样品处理后的细胞增殖率分别为(106.47 \pm 3.69)%、(109.64 \pm 2.93)%、(125.52 \pm 3.81)%、(152.91 \pm 5.55)%, 均极显著高于空白组, XU 等^[18]的研究显示, 当食用菌蛋白质 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之内是无毒性的, 大于 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 会抑制细胞增殖, 不是安全浓度, 表明当 CMP 2b 作用质量浓度低于 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, CMP 2b 对小鼠巨噬细胞的具有增殖作用, 可用于进行细胞实验。

2.5 蛹虫草免疫调节蛋白对 RAW264.7 吞噬能力的影响

活中性红是一种活体细胞的酸碱指示剂, 当其进入细胞后便可以与其中的溶酶体发生反应, 从而生成红色的物质。依据细胞活性状态不同, 摄入中性红染料的量也不同, 从而反映细胞的吞噬活性大小^[20]。从图 6 可以看出, 经过不同质量浓度 CMP 2b (25~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 培养 24 h 后的细胞, 其吞噬中性红的能力均极显著提高。特别地, 当样品质量浓度提高至 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 细胞吞噬率比空白对照组的高出 61.00%, 同时也达到了 LPS 阳性对照组的 82.14%, 表明

表 1 蛹虫草蛋白谱图库中与 CMP 2b 肽质量指纹图谱相匹配的蛋白质

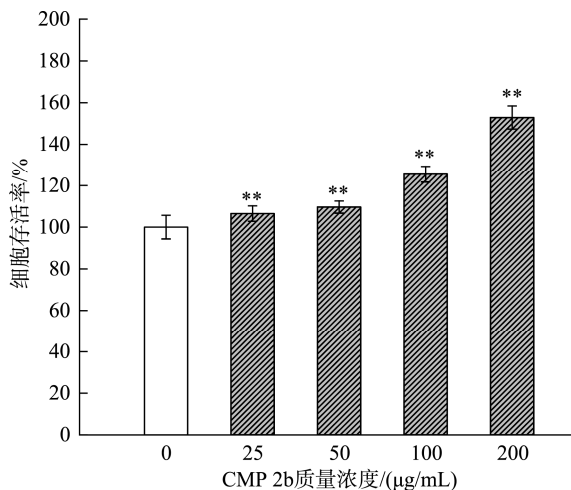
Table 1 Proteins matched with peptide mass fingerprint of CMP 2b in *C. militaris* protein library

序号	蛋白质名称	评分
1	tr G3JQN1 G3JQN1_CORMM Mannose-binding lectin OS= <i>C. militaris</i> (strain CM01) OX=983644 GN=CCM_07787 PE=4 SV=1	187.89
2	tr G3JPG9 G3JPG9_CORMM Fatty acid oxygenase, putative OS= <i>C. militaris</i> (strain CM01) OX=983644 GN=CCM_08032 PE=4 SV=1	167.75
3	tr G3JTH4 G3JTH4_CORMM tyrosinase OS= <i>C. militaris</i> (strain CM01) OX=983644 GN=CCM_09114 PE=3 SV=1	162.83
4	tr G3JNX7 G3JNX7_CORMM Heat shock protein 90 OS= <i>C. militaris</i> (strain CM01) OX=983644 GN=CCM_07839 PE=3 SV=1	159.96
5	tr G3JEN3 G3JEN3_CORMM Heat shock 70 kDa protein OS= <i>C. militaris</i> (strain CM01) OX=983644 GN=CCM_04804 PE=3 SV=1	116.99
6	tr G3JPP8 G3JPP8_CORMM Cytoplasmic ribosomal protein subunit S3 OS= <i>C. militaris</i> (strain CM01) OX=983644 GN=CCM_07401 PE=3 SV=1	102.38



图 4 蛹虫草免疫调节蛋白一级结构

Fig.4 Primary structure of *C. militaris* immunomodulating protein



注: **代表与空白组之间有极显著差异, $P < 0.01$, 下同。

图 5 不同质量浓度 CMP 2b 对小鼠巨噬细胞增殖率的影响

Fig.5 Effects of different mass concentrations of CMP 2b fraction on the proliferation rates of murine macrophage

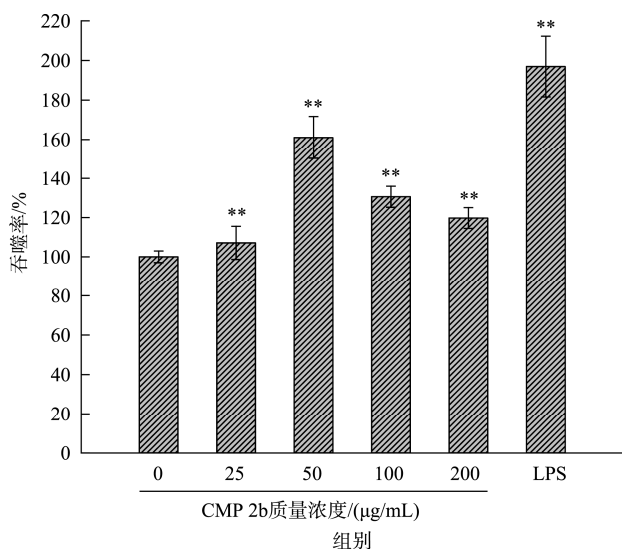


图 6 不同质量浓度 CMP 2b 对 RAW 264.7 吞噬率的影响

Fig.6 Effects of different mass concentrations of CMP 2b on phagocytosis rates of RAW 264.7

CMP 2b 可显著增强巨噬细胞吞噬中性红能力, 从而发挥机体的免疫防御。结果表明, CMP 2b 能显著促进巨噬细胞吞噬中性红, 可显著增强 RAW264.7 的吞噬能力, 增强巨噬细胞免疫调节能力。

2.6 蛹虫草免疫调节蛋白对 RAW264.7 分泌 NO 的影响

巨噬细胞是人类非特异性免疫系统的一个重要组成部

分。当人体免疫系统受到外界刺激时, 巨噬细胞可以通过吞噬和产生、分泌细胞因子参与免疫反应和免疫调节过程, 而呼吸爆发是重要的反应模式之一^[21]。巨噬细胞被激活后, 还原型辅酶II氧化酶引发呼吸爆发, 同时促进诱导型一氧化氮合酶的基因表达并生成 NO, 协助机体对抗外来抗原的侵入, 实现免疫作用。由图 7 可知, DMEM 完全培养基处理组(空白对照)的巨噬细胞 NO 分泌水平为(9.33±1.25) μmol/L, 而在 200 μg/mL CMP 2b 样品组中, NO 分泌水平分别为(21.63±0.52) μmol/L, 显著高于空白对照组水平($P < 0.01$), 且 CMP 2b 浓度与所诱导的 NO 水平呈现剂量依赖型关系, CMP 2b 浓度的增加, NO 产量随之提升。表明 CMP 2b 能够显著增强巨噬细胞抵抗抗原入侵, 增强巨噬细胞的免疫调节能力。

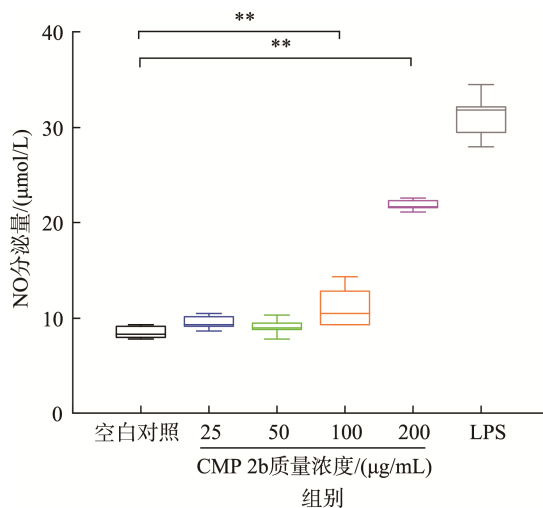


图 7 不同质量浓度 CMP 2b 对 RAW 264.7 分泌 NO 的影响

Fig.7 Effects of different mass concentrations of CMP 2b on the NO production of RAW 264.7

2.7 蛹虫草免疫调节蛋白对 RAW264.7 分泌活性氧的影响

活性氧(reactive oxygen species, ROS)作为许多信号途径中的第二信使, 影响机体的分化、代谢、细胞增殖、细胞死亡等重要的细胞活性^[22]。当机体处于急性或慢性炎症时, 机体内的噬菌细胞, 如巨噬细胞、嗜中性粒细胞等随即被激活, 导致机体呼吸作用的加强, 提高氧气消耗, 产生 ROS, 而 ROS 能参与合成一系列的炎症因子或者提高细胞吞噬能力从而杀死细菌等外源物质

如图 8 所示, 空白对照组的细胞平均荧光强度(ROS 产生量)为 342.09±3.62, 而 LPS 和各质量浓度水平的 CMP 2b 的细胞平均荧光强度均极显著高于空白对照组。

其中, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CMP 2b 处理后, 细胞 ROS 分泌水平为 1049.18 ± 43.10 , 比空白对照组提高了 306.72%, 达到阳性对照组 LPS (1274.31 ± 69.53) 的 82.33%, 表明 CMP 2b 可显著增强巨噬细胞分泌 ROS 能力。表明 CMP 2b 能够激活巨噬细胞, 增强其呼吸作用, 增加耗氧量并产生 ROS, 并且参与一系列炎症因子的合成或增加细胞的吞噬能力^[23]。

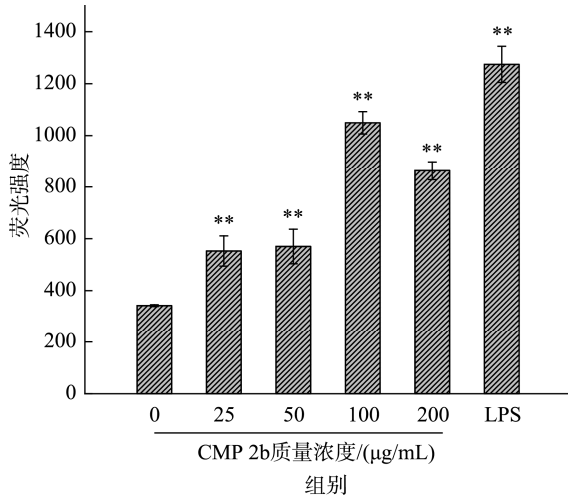


图 8 不同质量浓度 CMP 2b 对 RAW 264.7 分泌 ROS 的影响
Fig.8 Effects of different mass concentrations of CMP 2b on the ROS production of RAW 264.7

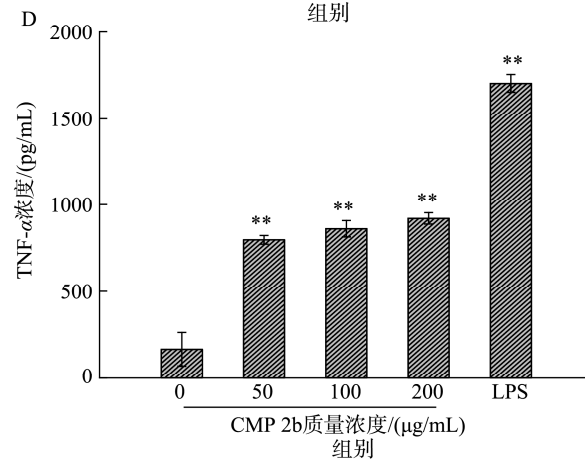
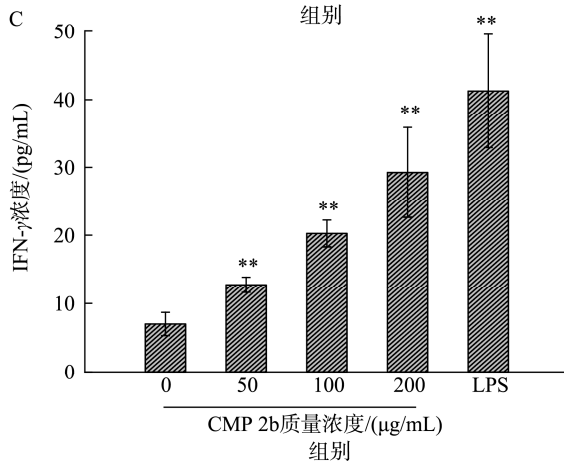
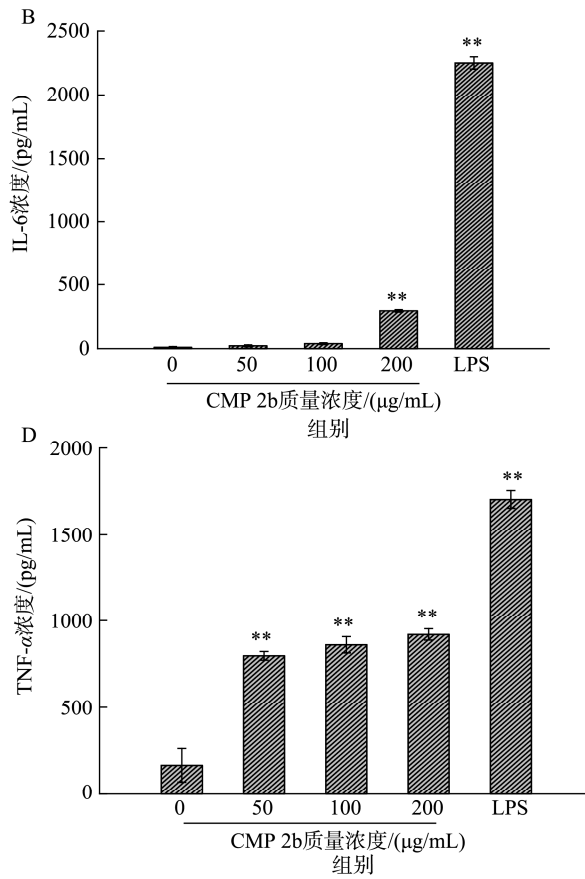
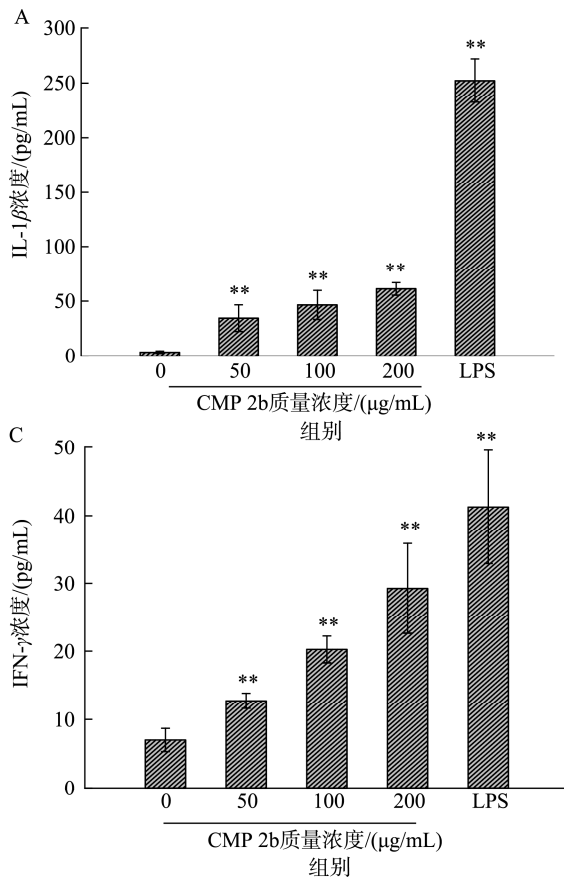


图 9 不同浓度 CMP 2b 对 RAW 264.7 分泌 IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 及 TNF- α 的影响

Fig.9 Effects of different mass concentrations of CMP 2b on the IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 及 TNF- α production of RAW 264.7

2.8 蛹虫草免疫调节蛋白对 RAW264.7 分泌 IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 及 TNF- α 的影响

细胞因子具有调节免疫系统、造血功能、细胞生长和修复受损组织等功能^[24-28]。IL-6 不仅可以促进原代骨髓细胞的生长和分化, 还可以参与人体的免疫防御等。IFN- γ 通过抗病毒、抗增殖和免疫调节功能在宿主防御中发挥关键作用。在几种细胞类型中, γ 干扰素诱导细胞因子的产生, 并上调不同膜蛋白的表达, 可以有效地激活巨噬细胞, 指导 B 细胞免疫球蛋白的合成、类型转换和分泌。其中, 巨噬细胞激活后可通过分泌细胞因子传导并调控免疫通路, 如白细胞介素和 TNF- α , 从而辅助清除外源性抗原及异常细胞, 发挥免疫调节作用。活化过后的巨噬细胞, 可以极化为 M1 型巨噬细胞, 从而分泌促炎细胞因子参与正向免疫应答^[29-30], 提高巨噬细胞的免疫调节能力。在巨噬细胞免疫调节模型中, 促炎细胞因子的分泌水平可作为评估天然活性成分的免疫激活和免疫调节能力的一个指标^[31-33]。

以 LPS 处理作为阳性对照, 通过 ELISA 测定不同质量浓度 CMP 2b (0、50、100 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的完全培养基处理小鼠巨噬细胞培养液中各细胞因子的蛋白水平^[34-35]。结果如图 9 所示, 随着 CMP 2b 质量浓度的升高, 巨噬细胞培

养液中 IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 和 TNF- α 的含量呈现浓度依赖性增长。其中, 各质量浓度 CMP 2b 处理后的 IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 含量和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CMP 2b 处理后的 IL-6 含量与空白对照存在极显著差异($P < 0.01$)。由于不同细胞因子在 LPS 的刺激下分泌量细胞生长状态、温度等因素影响, 所以实验在同一批细胞和环境下操作, 这样巨噬细胞分泌不同细胞因子的量是客观的范围。

由此证明, CMP 2b 可通过介导巨噬细胞中 IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 和 TNF- α 等细胞因子的产生及分泌发挥免疫调节作用, 如前文所述, IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 和 TNF- α 等促炎性细胞因子通常由 M1 型巨噬细胞产生和分泌, 由此可推断, CMP 2b 作用后, 巨噬细胞主要发生 M1 型极化, 从而显著诱导促炎性细胞因子的分泌。

3 讨论与结论

本研究通过阴离子交换色谱和葡聚糖凝胶色谱分离纯化出一种蛹虫草免疫调节蛋白 CMP 2b, 由蛋白质谱测得它由 196 个氨基酸组成, 分子量为 22.460 kDa; 通过建立巨噬细胞免疫调节模型, 发现 CMP 2b 可显著提高巨噬细胞的增殖能力、吞噬能力, 细胞增殖率最高可达空白对照组的(152.91 \pm 5.55)%, 吞噬能力提高了 23.34%, 也即 CMP 2b 可显著提高巨噬细胞吞噬外来病原体的能力, 从而增强了巨噬细胞的免疫调节能力。另外, CMP 2b 可促进巨噬细胞分泌 NO、ROS、IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 及 TNF- α , 其中 NO 分泌水平分别达到了空白对照组的 2.31 倍, ROS 分泌水平达到阳性对照组 LPS 的 82.33%, TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 和 IL-6 分泌量分别为空白对照组的 5.51、17.42、4.18 和 26.75 倍, 由此证明 CMP 2b 可使巨噬细胞活化, 并且极化为 M1 型巨噬细胞, 参与正向免疫应答, 增强巨噬细胞免疫调节能力。综上, 蛹虫草免疫调节蛋白具有较强的免疫调节潜力, 本研究结论可为蛹虫草作为免疫调节剂的开发提供理论依据。

本研究依托小鼠巨噬细胞免疫调节模型对 CMP 2b 的活性作用进行了体外论证, 后续可对蛋白进行稳定化处理, 选取小鼠免疫缺陷模型, 通过饲喂不同剂量的 CMP 2b, 探究其在活体内的活性作用, 并通过代谢组学、蛋白组学、肠道菌群宏基因组测序等技术, 分析 CMP 2b 对小鼠体内的代谢功能、蛋白水平以及肠道菌群的影响。

参考文献

- [1] 顾丹丹, 侯静宇, 张金秀, 等. 两种方法制备的蛹虫草多糖特性及体外生物活性对比分析[J/OL]. 食品工业科技: 1–12. [2023-05-10]. DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110183
- GU DD, HOU JY, ZHANG JX, *et al.* Comparative analysis of polysaccharide properties and *in vitro* bioactivity of *Chrysalis nobilis*

- prepared by two methods [J/OL]. *Sci Technol Food Ind*: 1–12. [2023-05-10]. DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110183
- [2] 徐悉哲, 王言之, 李世芬, 等. 蛹虫草对小鼠免疫功能的调节作用[J]. *江苏医药*, 2021, 47(7): 661–663.
- XU XZ, WANG YZ, LI SF, *et al.* Modulatory effects of *Cordyceps militaris* on immune function in mice [J]. *Jiangsu Med J*, 2021, 47(7): 661–663.
- [3] HOU R, LI L, XIANG K, *et al.* Production of antioxidative exopolysaccharides of *Cordyceps militaris* with *Vernonia amygdalina* leaves in substrate [J]. *Chin J Agric Biotechnol*, 2019, 35(4): 667–676.
- [4] YUE GGL, LAU CBS, FUNG KP, *et al.* Effects of cordyceps sinensis, cordyceps militaris and their isolated compounds on ion transport in calu-3 human airway epithelial cells [J]. *J. Ethnopharmacol*, 2008, 117(1): 92–101.
- [5] KIM CS, LEE SY, CHO SH, *et al.* *Cordyceps militaris* induces the IL-18 expression via its promoter activation for IFN-gamma production [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 120(3): 366–371.
- [6] LEE HH, LEE S, LEE K, *et al.* Anti-cancer effect of *Cordyceps militaris* in human colorectal carcinoma RKO cells via cell cycle arrest and mitochondrial apoptosis [J]. *DARU J Pharm Sci*, 2015, 23(5): 154–159.
- [7] LUO L, RAN R, YAO J, *et al.* Se-enriched *Cordyceps militaris* inhibits cell proliferation, induces cell apoptosis, and causes G2/M phase arrest in human non-small cell lung cancer cells [J]. *Oncotargets Ther*, 2019, 12: 8751–8763.
- [8] BORCHERS AT, STERN JS, HACKMAN RM, *et al.* Mushrooms, tumors, and immunity [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1999, 221(4): 281–293.
- [9] BOSCA L, ZEINI M, TRAVES PG, *et al.* Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: A role for NO in macrophage function and fate [J]. *Toxicol*, 2005, 208(2): 249–258.
- [10] PUSHPARAJAH V, FATIMA A, CHONG CH, *et al.* Characterisation of a new fungal immunomodulatory protein from tiger milk mushroom, *Lignosus rhinocerotis* [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(15): 89–95.
- [11] 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.
- [12] YUE GGL, LAU CBS, FUNG KP, *et al.* Effects of *Cordyceps sinensis*, *Cordyceps militaris* and their isolated compounds on ion transport in Calu-3 human airway epithelial cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 117(1): 92–101.
- [13] LIN JW, GUAN SY, DUAN ZW, *et al.* Gene cloning of a novel fungal immunomodulatory protein from *Chroogomphus rutilus* and its expression in *Pichia pastoris* [J]. *J Appl Chem Biotechnol*, 2016, 91(11): 2761–2768.
- [14] CHU PY, SUN HL, KO JL, *et al.* Oral fungal immunomodulatory protein-*Flammulina velutipes* has influence on pulmonary inflammatory process and potential treatment for allergic airway disease: A mouse model [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2015, 85(14): 254–259.
- [15] CHENG X, JIANG M, LONG L, *et al.* Potential roles of mesenchymal stem cells and their exosomes in the treatment of COVID-19 [J]. *Front Biosci-Landmark*, 2021, 26(10): 948–961.

- [16] CHENG XD, WU QX, ZHAO J, *et al.* Immunomodulatory effect of a polysaccharide fraction on RAW 264.7 macrophages extracted from the wild *Lactarius deliciosus* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 128: 732–739.
- [17] CHEN D, WANG R, LONG M, *et al.* Identification of *in vitro* and *in vivo* oncolytic effect in colorectal cancer cells by Orf virus strain NA1/11 [J]. *Oncol Rep*, 2021, 45(2): 535–546.
- [18] XU J, XU D Z, HU QH, *et al.* Immune regulatory functions of biologically active proteins from edible fungi [J]. *Front Immunol*, 2023, 13(9): 478–485.
- [19] SUCKAU D, HAHNER S, RESEMANN A, *et al.* Fast analysis of complex protein mixtures by LC-MALDI-TOF/TOF-MS [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2003, 2(9): 727–732.
- [20] BERTOLLA M, CENCI L, ANESI A, *et al.* Solvent-responsive molecularly imprinted nanogels for targeted protein analysis in MALDI-TOF mass spectrometry [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(8): 6908–6912.
- [21] CEGLIE CD, CALVANO CD, ZAMBONIN CG. MALDI-TOF MS for quality control of high protein content sport supplements [J]. *Food Chem*, 2015, 176(5): 396–402.
- [22] AMIN ML, MAWAD D, DOKOS S, *et al.* Immunomodulatory properties of photopolymerizable fucoidan and carrageenans [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 230(7): 325–330.
- [23] AL-QADHI G, AL-RAI S, HAFED L. The therapeutic potential of inflamed gingiva-derived mesenchymal stem cells in preclinical studies: A scoping review of a unique biomedical waste [J]. *Stem Cells Int*, 2021, 185(3): 125–130.
- [24] CHANG HH, YEH CH, SHEU F. A novel immunomodulatory protein from *Poria cocos* induces toll-like receptor 4-dependent activation within mouse peritoneal macrophages [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(14): 6129–6139.
- [25] CHANG HH, HSIEH KY, YEH CH, *et al.* Oral administration of an Enoki mushroom protein FVE activates innate and adaptive immunity and induces anti-tumor activity against murine hepatocellular carcinoma [J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10(2): 239–246.
- [26] CHANG JPC, SU KP. Nutrition and immunology in mental health: Precision medicine and integrative approaches to address unmet clinical needs in psychiatric treatments [J]. *Brain Behav Immun*, 2020, 85(18): 1–3.
- [27] CHANG Y, LU W, CHU Y, *et al.* Extraction of polysaccharides from maca: Characterization and immunoregulatory effects on CD4(+) T cells [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 154(15): 477–485.
- [28] CHANG YC, CHOW YH, SUN HL, *et al.* Alleviation of respiratory syncytial virus replication and inflammation by fungal immunomodulatory protein FIP-fve from *Flammulina velutipes* [J]. *Antiviral Res*, 2014, 110(11): 124–131.
- [29] CHEIKH-ALI S, FARMAN M, LACAILLE-DUBOIS MA, *et al.* Structural organization of saponins in caryophyllaceae [J]. *Phytochem Rev*, 2019, 18(2): 405–441.
- [30] MA GX, KIMATU BM, YANG WJ, *et al.* Preparation of newly identified polysaccharide from *Pleurotus eryngii* and its anti-inflammation activities potential [J]. *J Food Sci*, 2020, 85(9): 2822–2831.
- [31] SAINI RK, BEKHIT AA, ROOHINEJAD S, *et al.* Chemical stability of lycopene in processed products: A review of the effects of processing methods and modern preservation strategies [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(3): 712–726.
- [32] MUHOZA B, XIA SQ, CAI JB, *et al.* Time effect on coenzyme Q10 loading and stability of micelles based on glycosylated casein via Maillard reaction [J]. *Food Hydrocolloid*, 2017, 72(4): 271–280.
- [33] CÁNOVAS JA, GEA-BOTELLA S, BORRÁS F, *et al.* Vitamin C loss kinetics and shelf life study in fruit-based baby foods during post packaging storage [J]. *Food Packag Shelf Life*, 2020, 23(10): 102–109.
- [34] WARREN D, SHOWMAN C, ROSE A, *et al.* Storage stability and consumer acceptance of soluble protein powders derived from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J]. *Future Food*, 2022, 5(4): 89–94.
- [35] CHOI JS, PARK JW, PARK JS. Design of coenzyme Q10 solid dispersion for improved solubilization and stability [J]. *Int J Pharm*, 2019, 572(7): 57–62.

(责任编辑: 郑丽 张晓寒)

作者简介



徐大众, 硕士研究生, 主要研究方向为食品营养与功能。

E-mail: 3477864877@qq.com



胡秋辉, 博士, 教授, 主要研究方向为食品营养与功能。

E-mail: qiuhuihu@nufe.edu.cn