doi:10.11659/jjssx.04E018217

·基础研究·

虫草素对 CLP 诱导的脓毒症大鼠免疫调节作用及肝肺组织病理变化的影响

郭 蕾,骆艳妮,马 琪,侯彦丽,赵玉杰,张小玲 (西安交通大学第二附属医院重症医学科,陕西 西安 710004)

[摘 要] **目的** 探索虫草素对盲肠结扎穿孔(CLP)诱导的脓毒症大鼠免疫反应的调节作用及肝肺组织病理变化的影响。**方法** 利用盲肠结扎穿刺法构建大鼠脓毒症模型。SD 大鼠随机分为对照组、模型组、加药组(CDP 10、20、50 mg/kg BW)5 组,每组 5 例。苏木素伊红染色检测肝、肺组织病理损伤情况。TUNEL 染色检测肝、肺组织细胞凋亡情况。蛋白免疫印迹检测肺组织 Ki67、caspase-3 和 p65 蛋白表达情况。ELISA 检测血清炎症因子 IL-6、TNF-α、IL-1β 和 IL-10 水平。**结果** 与模型组相比较,随着虫草素浓度的增加,加药组肝、肺病理损伤程度减轻;加药组细胞凋亡数目随虫草素浓度的增加而减少($P<0.01$);加药组 caspase-3 和 p65 表达水平随虫草素浓度的增加而降低,Ki67 蛋白表达水平随虫草素浓度的增加而升高($P<0.01$);与模型组相比较,加药组炎症因子 IL-6、TNF-α、IL-1β 水平随虫草素浓度的增加而减少($P<0.01$),IL-10 随虫草素浓度的增加而增加。**结论** 虫草素通过抑制 NF-κB 改善大鼠肝肺组织病理损伤,并降低脓毒症进程中炎症反应。

[关键词] 脓毒症;虫草素;免疫调节;炎症;肝;肺;大鼠;病理

[中图分类号] R563 [文献标识码] A [收稿日期] 2018-04-18

Effect of cordycepin on immune regulatory and pathological changes of lung and liver tissue of CLP-induced sepsis rats

GUO Lei, LUO Yan-ni, MA Qi, HOU Yan-li, ZHAO Yu-jie, ZHANG Xiao-ling (Department of Intensive Medicine, Second Affiliated Hospital of Xi'an JiaoTong University, Xi'an Shaanxi 710004, China)

Abstract: Objective To explore the effects of cordycepin on the immune regulatory of CLP-induced sepsis rats and the pathologic changes of liver and lung tissues. **Methods** The sepsis model in rats was constructed by cecum ligation puncture(CLP) method. SD rats were randomly divided into 5 groups($n=5$): the control group, model group, and treatment group(CDP 10, 20, 50 mg/kg BW). The pathological damage of liver and lung was detected by hematoxylin- eosin(HE) staining. The apoptosis cells of liver and lung tissue were detected by Tunel staining. Western-blot was used to detect the relative expression of Ki67, caspase-3 and p65 protein in lung tissue. ELISA was used to detect levels of inflammatory cytokines IL-6, TNF-α, IL-1β and IL-10 in serum. **Results** Compared with the model group, the pathological

[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2015SF044)

[通信作者] 郭 蕾, E-mail: lcq_6502@163.com

[19] Per S, Kose M, Ozdemir A, et al. Hepatoprotective effects of capping protein gelsolin against hyperoxia-induced hepatotoxicity, oxidative stress and DNA damage in neonatal rats [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2018, 58: 189-195. doi: 10.1016/j.etap.2018.01.007.

[20] Horvath-Szalai Z, Kustan P, Szirmay B, et al. Predictive value of serum gelsolin and Gc globulin in sepsis- a pilot study [J]. Clin Chem Lab Med, 2018, 56(8): 1373-1382. doi: 10.1515/cclm-2017-0782.

[21] Garg R, Peddada N, Dolma K, et al. Pregnancy-related hormones, progesterone and human chorionic gonadotrophin, upregulate expression of maternal plasma gelsolin [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2018, 314(4): R509-R522. doi: 10.1152/ajpregu.00131.2017.

[22] Shi SS, Yue XJ, Zhao DY, et al. Plasma gelsolin level predicts acute kidney injury after cardiopulmonary bypass in infants and young children [J]. World J Pediatr, 2018, 14(2): 143-150. doi: 10.1007/s12519-017-0116-4.

[23] Horvath-Szalai Z, Kustan P, Szirmay B, et al. Validation of an automated immune turbidimetric assay for serum gelsolin and its possible clinical utility in sepsis [J]. J Clin Lab Anal, 2018, 32(3). doi: 10.1002/jcla.22321.

[24] Dai BB, Li HP, Fan JH, et al. MiR-21 protected against diabetic cardiomyopathy induced diastolic dysfunction by targeting gelsolin [J]. Cardiovasc Diabetol, 2018, 17(1): 123. doi: 10.1186/s12933-018-0767-z.

[25] Chen ZY, Wang PW, Shieh DB, et al. Involvement of gelsolin in TGF-beta 1 induced epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells [J]. J Biomed Sci, 2015, 22: 90. doi: 10.1186/s12929-015-0197-0.

[26] Guo Y, Zhang H, Xing X, et al. Gelsolin regulates proliferation, apoptosis and invasion in natural killer/T-cell lymphoma cells [J]. Biol Open, 2018, 7(1). doi: 10.1242/bio.027557.

(编辑:刘 艺)

damage of liver and lung induced by CLP were ameliorated with the concentration of cordycetin increased in treatment group rats. The apoptosis cells were decreased with the concentration of cordycetin increased in treatment group rats($P<0.01$). The expression levels of caspase-3 and p65 were decreased with the concentration of cordycetin increased in treatment group rats, and the expression level of Ki67 protein increased with the concentration of cordycetin increased in treatment group rats($P<0.01$). Compared with the model group, the concentrations of inflammatory cytokines IL-6, TNF-α, IL-1β were decreased with the concentration of cordycetin increased in treatment group rats, while IL-10 concentrations in serum increased with the concentration of cordycetin increased in treatment group rats ($P<0.01$). **Conclusion** Cordycepin ameliorated the pathological damage of liver and lung tissue in sepsis rats by inhibiting NF-κB, and reduced the inflammatory response in the process of sepsis.

Keywords: sepsis; cordycepin; immune regulation; inflammation; cecal ligation puncture; liver; lung; rat; pathology

脓毒症是重症监护中病死率很高的一种严重疾病,其特点是全身不受控制的过度炎症反应、弥散性血管内凝血和多器官功能障碍[1-2]。脓毒症的发病机制很复杂。脓毒症发生的原因主要是宿主对病原体的免疫应答而产生免疫系统失调[1,3]。迄今为止,脓毒症的生理病理机制已得到很好的研究。许多介质如促炎细胞因子、趋化因子和自由基等被发现参与脓毒症的过程[4]。尽管提出了各种治疗策略,但有效改善脓毒症治疗的药物仍有待开发。抗生素是临床治疗的主要策略,但败血症的病死率仍然高达 30% ~40%[5]。冬虫夏草作为一种传统中药已经使用了 400 多年,被认为是肺和肾的补药。临床上其还被用于治疗一些过敏性、炎症性和自身免疫性疾病,如过敏性哮喘、系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)、慢性肾炎和同种异体排斥反应[6]。冬虫夏草中最主要的活性成分是虫草素,也称 3'-脱氧腺苷,属于核苷衍生物。虫草素具有多种生物学效应如抑制 DNA、RNA 合成,增强细胞增殖,抗肿瘤,抗炎,抗真菌和抗疟,免疫调节等[7-8]。尽管关于虫草素在循环系统、免疫系统、呼吸系统和腺体系统方面的研究很多[9-10],但虫草素对脓毒症的影响尚未报道。探讨虫草素对脓毒症的影响有助于临床上脓毒症的防治,本研究通过盲肠结扎穿孔(cecal ligation puncture, CLP)构建脓毒症模型,研究虫草素对 CLP 诱导的脓毒症大鼠免疫调节和肝肺组织病理变化的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

实验动物普通级健康 SD 大鼠,成年雄性,体质量 250 ~280 g,购自河南省实验动物中心。动物被安置在以下环境中:温度 22 ℃左右,相对湿度 55% ~60%,12 h 昼夜交替,大鼠食物和饮用水无限制。虫草素购自美国 selleck 公司,分子式为:$C_{10}H_{13}N_5O_3$,分子量为 251.24,纯度为 99.97%。Tunel 试剂盒(In Situ Cell Death Detection Kit)购自罗氏(Roche);ELISA 试剂盒购自 R&D 公司;抗 Ki67(ab16667)和 caspase-3(ab13585)抗体购自 Abcam 公司;苏木素伊红(HE)染色试剂盒购自 Solarbio 公司; BCA 蛋白定量试剂盒(Santa Cruz 生物技术公司)。

1.2 动物分组及模型建立

SD 大鼠随机分为 5 组($n=5$):对照组、模型组、加药组。加药组大鼠腹腔注射虫草素(CDP 10,20,50 mg/kg BW),连续 1 周 。对照组进行假手术,并在给加药组注射虫草素时,模型组和对照组组注射等量生理盐水。加药组和模型组采用盲肠结扎穿孔(CLP)构建大鼠脓毒症模型[11],手术步骤如下:大鼠在异氟醚麻醉下进行剖腹手术,2% 碘酊皮肤消毒,下腹部纵切口,暴露盲肠,结扎盲肠中部,用 22 号针穿刺盲肠 2 次,缝合切口。手术后立即皮下注射 1 mL 生理盐水进行流体复苏,防止休克。对照组进行切口,拿出盲肠、放回,缝合切口。手术完成后将大鼠放在电热毯上恢复 1 h,每隔 12 h 皮下注射止痛药丁丙诺啡(0.1 mg/kg)。手术后 6 h 开始药物处理。

1.3 取材

各组大鼠连续 1 周腹腔注射虫草素或生理盐水后处死,取肝肺组织制成石蜡切片(4% 多聚甲醛固定 - 脱水 - 包埋 - 切片)用于后续切片染色;收集各组肝肺组织液氮冷冻,冷藏于 - 80 ℃冰箱待 Western blot 检测;同时收集各组大鼠的血清储存在 4 ℃尽快进行 ELISA 检测。

1.4 HE 染色

将各组大鼠肝肺组织石蜡切片,用二甲苯浸洗 2 次,每次 5 min ;用梯度乙醇(100%、95%、90%、80%、70%)各浸洗 1 次,每次 3 min ;染色,在光学显微镜下观察组织病变情况并拍照。

1.5 Tunel 染色

二甲苯脱蜡,每次 5 min ;梯度乙醇(100%、95%、90%、80%、70%)复水,每次 3 min; Proteinase K 工作液消化组织 15 min 在 25 ℃;PBS 漂洗;按照说明书进行 Tunel 染色,漂洗;玻片干后加 50 μL converter-POD

于标本上,加盖玻片在暗湿盒中 37 ℃反应 30 min,漂洗;在组织处加 50 μL DAB 底物,在 25 ℃下反应 10 min,漂洗;拍照,然后用苏木素复染 3 ~ 5 s,立即用自来水冲洗。梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。加一滴 PBS 在视野下,用光学显微镜观察凋亡细胞并拍照。

1.6 WB 检测蛋白相对表达水平

液氮研磨各组大鼠肺组织,冰上裂解,提取组织中总蛋白;用 BCA 试剂盒进行蛋白定量;取等量蛋白与 Loading buffer 混合,100 ℃金属浴 10 min;离心,取上清上样到 SDS-PAGE 凝胶电泳中分离蛋白,并转移至 0.22 μm 孔径的 PVDF 膜;5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 ~ 2 h;加入抗 Ki67 和抗 caspase-3 一抗,4 ℃过夜孵育,次日,TBST 清洗后再加标记 HRP 的二抗,室温孵育 1 h,清洗。最后加入 ECL 发光液,于凝胶成像系统进行曝光拍照,并用 ImageJ 软件统计灰度值计算相对表达量。GAPDH 作为上样量一致的参照,至少进行 3 次独立的重复实验。

1.7 ELISA 检测血清炎症因子水平

取各组大鼠血清,进行酶联免疫吸附实验(ELISA)检测炎症因子(IL-6、TNF-α、IL-1β、IL-10)水平。根据说明书,首先加入稀释后的标准品、待测样品 50 μL 于反应孔内,设计好复孔和阴性对照;立即加入 50 μL 的生物素标记的抗体。盖上膜板,轻轻振荡混匀,37 ℃温育 1 h;甩去孔内液体,每孔加满 PBST,振荡 30 s,甩去洗涤液,用吸水纸拍干,重复此操作 4 次;每孔加入 80 μL 的亲和链酶素-HRP,轻轻振荡混匀,37 ℃孵育 30 min,洗涤方法同上;每孔加入底物 A、B 各 50 μL,轻轻振荡混匀,37 ℃避免孵育 10 min;取出酶标板,迅速加入 50 μL 终止液,加入终止液后应立即测定结果:在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值。

1.8 统计学方法

实验数据用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,两两比较用独立的 t 检验,分析比较模型组与对照组/加药组与模型组之间凋亡细胞数目、炎症因子水平以及蛋白表达的差异。以 $P<0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 虫草素改善脓毒症导致的肝肺损伤

为了探索虫草素对 CLP 诱导脓毒症的影响,对大鼠肝肺组织进行 HE 染色,并在光学显微镜下观察肝肺组织病理损伤情况。与对照组相比,模型组肝组织表现出明显病理损伤,细胞不完整、出现明显的裂痕、出血、炎性细胞浸润(图 1),说明 CLP 造成严重肺损伤;与模型组相比,加药组肝细胞趋于完整,出血明显减少,炎性细胞减少,病理损伤明显减轻且呈剂量依赖的特点,说明虫草素改善脓毒症造成的急性肝损伤。与对照组相比,模型组表现出明显的病理损伤,如肺泡壁增厚、毛细血管扩张、肺泡充血、间质炎性细胞浸润(图 1),说明 CLP 造成严重肺损伤;与模型组相比,加药组出血减少,炎性细胞减少,肺泡结构趋于完整,病理损伤明显减轻且呈剂量依赖的特点,说明虫草素改善脓毒症造成的急性肺损伤。

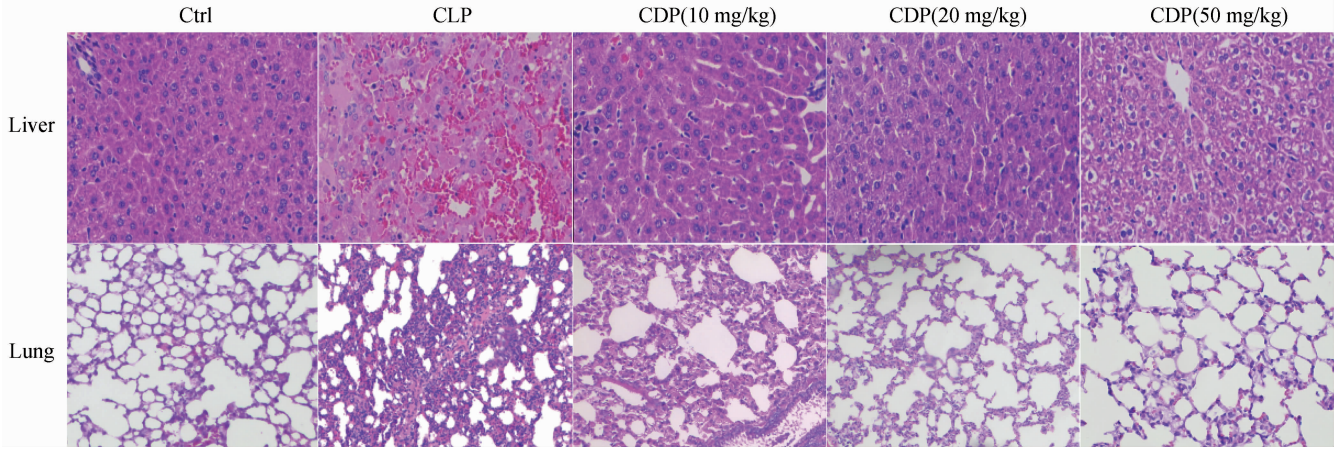


图 1 大鼠肝肺病理损伤(HE ×400)

2.2 虫草素降低脓毒症肝肺组织细胞凋亡细胞数目

Tunel 结果显示,棕黄色颗粒为阳性凋亡细胞,紫色颗粒为阴性细胞。肝组织染色结果显示(图 2),与对照组相比,模型组棕黄色颗粒明显增多;观察模型组肝细胞形态,呈现出以下特征:棕黄色颗粒染色质浓缩、边缘化、核膜裂解、染色质分割成块状;与模型组相比,加药组棕黄色细胞明显减少,且细胞形态随虫草素浓度增加逐渐趋近于对照组;肺组织染色结果显示(图 2),与对照组相比,模型组棕黄色颗粒明显增多;观察模型组肺细胞形态,呈现出以下特征:出现大颗粒棕

黄色小体、棕黄色颗粒染色质浓缩、边缘化、核膜裂解、染色质分割成块状;与模型组相比,加药组棕黄色细胞明显减少,且细胞形态随虫草素浓度增加逐渐趋近于对照组;统计细胞凋亡细胞数目见图 3,与对照组相比,模型组肝肺细胞凋亡细胞数目大大增加($P<0.01$);同时,与模型组相比,加药组肝肺细胞凋亡细胞数目随虫草素浓度增加而明显减少($P<0.01$),说明虫草素能减轻 CLP 诱导的脓毒症引发的肝肺细胞凋亡。

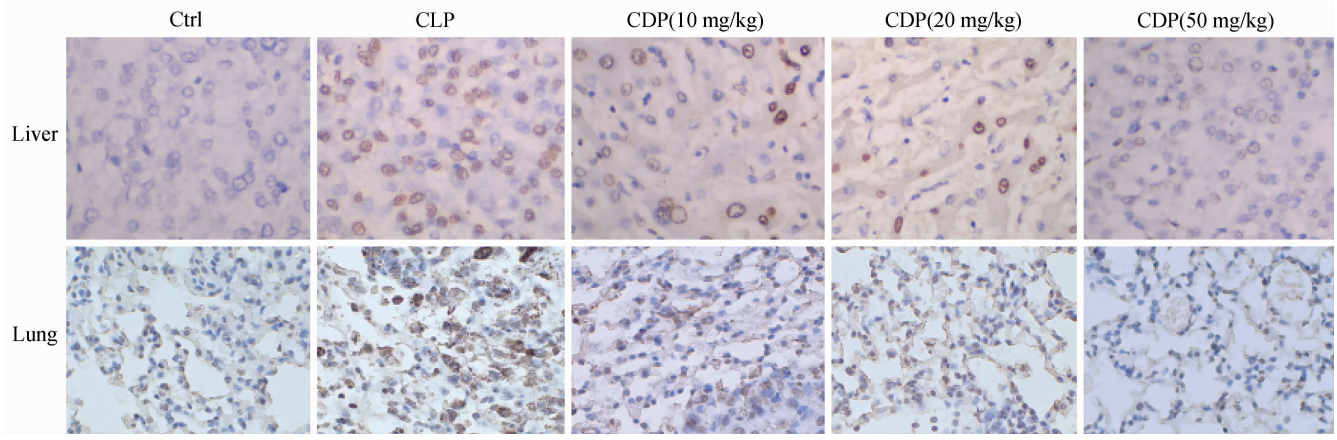
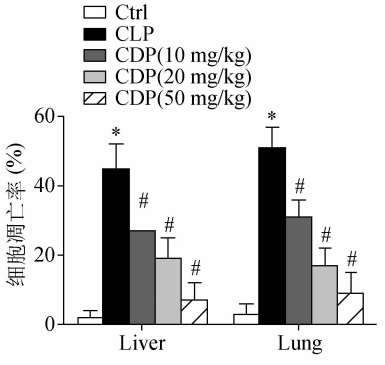


图 2 肝组织及肺组织 Tunnel 染色结果(×400)



*:与 Ctrl 组比较,$P<0.01$;#:与 CLP 组比较,$P<0.01$

图 3 细胞凋亡统计

2.3 蛋白免疫印迹检测增殖、凋亡标记蛋白

为了验证虫草素对肺损伤的治疗机制,本文检测了虫草素对细胞增殖标记蛋白 Ki67 和促凋亡蛋白 caspase-3 表达水平的影响。与对照组相比,模型组 Ki67 表达量显著减少,而 caspase-3 表达量明显增加($P<0.01$),说明模型组细胞增殖被抑制,同时存在大量细胞凋亡(图 4);与模型组相比,加药组 Ki67 表达水平随虫草素剂量增加而显著增加,caspase-3 表达水平随虫草素剂量增加而显著减少($P<0.01$);统计条带灰度值,虫草素可以通过上调 Ki67 表达水平、下调 caspase-3 表达水平,促进细胞增殖,减少细胞凋亡减轻抑制肺损伤(图 5)。

2.4 虫草素能降低脓毒症引起的炎症反应

为了验证炎性因子的产生,采用酶联免疫吸附实验检测大鼠血清标志炎症细胞因子水平。与对照组相比,模型组炎症因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平显著增加($P<0.01$),抗炎细胞因子 IL-10 水平显著下降(图 6),

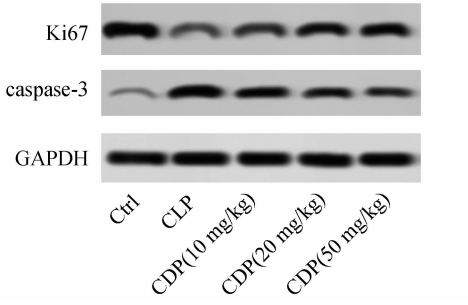
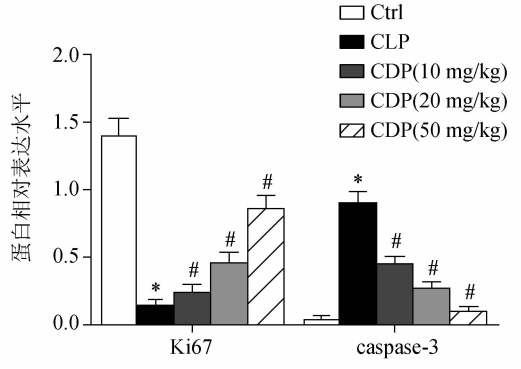


图 4 WB 检测肺组织中 Ki67 和 caspase-3 的表达水平



*:与 Ctrl 组比较,$P<0.01$;#:与 CLP 组比较,$P<0.01$

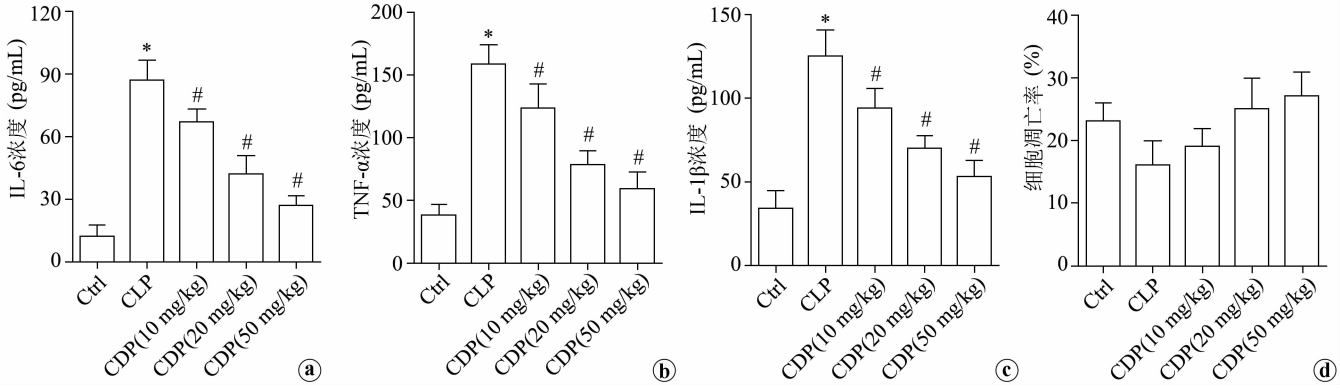
图 5 蛋白相对表达水平分析

说明脓毒症引发大鼠机体产生严重的炎症反应。与模型组相比,加药组 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平随加药浓度增加而降低($P<0.01$),IL-10 水平随加药浓度增加而升高,说明虫草素能调节炎症细胞因子从而降低大鼠脓毒症引起的炎症反应。

2.5 虫草素能抑制脓毒症引起的肺组织中 NF-κB 激活

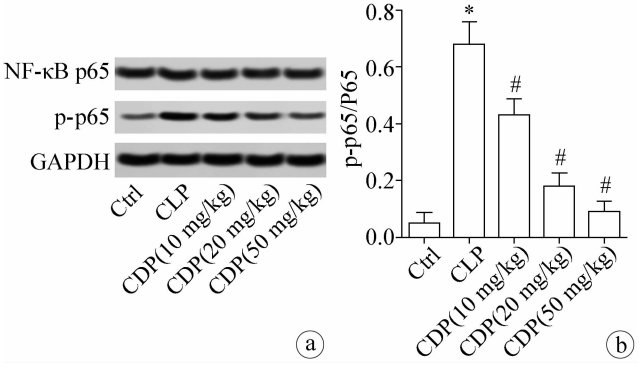
为了检测虫草素对 NF-κB 信号通路的调节情况,本文采用蛋白免疫印迹检测各组肺组织样本 NF-κB p65 蛋白和磷酸化 p65 蛋白相对表达量,各组 NF-κB

p65 蛋白表达水平差异无统计学意义(图 7);与对照组相比,模型组 p-p65 蛋白表达水平提高,p-p65/p65 比值显著增加($P<0.01$),说明模型组 NF-κB 信号通路激活;与模型组相比,加药组 p-p65 蛋白表达水平随虫草素浓度增加而降低,p-p65/p65 比值明显减少($P<0.01$),说明虫草素能抑制 NF-κB p65 磷酸化,抑制 NF-κB 信号通路。



a:IL-6;b:TNF-α;c:IL-1β;d:细胞凋亡率 *:与 Ctrl 组比较,$P<0.01$;#:与 CLP 组比较,$P<0.01$

图 6 ELISA 检测血清炎症因子水平



a:WB 图片;b:蛋白相对表达水平 *:与 Ctrl 组比较,$P<0.01$;#:与 CLP 组比较,$P<0.01$

图 7 WB 检测肺组织中 P65 的磷酸化情况

3 讨论

脓毒症是一种具有复杂病理机制的严重临床综合征,多种因素影响脓毒症发展过程中的全身炎症和免疫反应[12]。尽管通过抗生素治疗、积极的外科干预,可以改善脓毒症患者感染性休克和 MODS 水平,但仍是最常见的死因。因为脓毒症整个阶段的炎性和免疫反应涉及到大量的介质天然提取物具有多种生物活性和多种靶器官,在脓毒症治疗中比通常有特定靶点的药物更有效[13]。在本研究中,我们证明了虫草素对脓毒症有明显的减轻作用。当感染超出身体的补偿能力时,不同器官系统的功能就会受损。一般来说,呼吸系统最先发生故障,其次是肝、肾、心脏和其他系统[14]。本研究通过 HE 染色检查肺和肝病理损伤,结果表明 CLP(模型组)导致肝、肺呈现出明显病理损伤,加药组以剂量依赖的方式减轻肝、肺病理损伤,说明在脓毒症进程中虫草素能保护肝、肺器官,减少脓毒症造成的多器官损伤。

有效控制炎症反应是脓毒症治疗的重要组成部分。脓毒症的炎症反应主要表现为促炎性细胞因子(如 IL-1β、IL-6 和 TNF-α)的过度产生,被认为是早期脓毒症的特征[15]。此外,减少这些细胞因子的分泌可以延缓脓毒症的发展,降低脓毒症患者或动物模型的死亡率[16]。本研究结果与上述研究一致,在脓毒症大鼠血清中发现 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平显著升高。多项研究表明,虫草素具有免疫调节和抗炎作用。Zhou 等[10]指出虫草素能够以剂量依赖性的方式在体外强烈地增加 IL-10 水平,同时抑制了噬菌体诱导的 IL-2 的产生,改变 IL-10/IL-2 的比值,能明显抑制 T 淋巴细胞的增殖和活化。de Jong 等[17]报道,虫草素能诱导调节型单核树突状细胞。Choi 等[18]研究表明,虫草素能通过抑制巨噬细胞内 NF-κB 激活,从而抑制炎症因子 IL-1β 和 TNF-α 产生,抑制脂多糖(LPS)诱导的炎症。IL-10 被认为是一种潜在的抗炎细胞因子,对 Th1 淋巴细胞、抗原提呈细胞以及炎症介质的产生有很强的抑制作用[19]。本研究结果显示,虫草素能够以剂量依赖性的方式增加 IL-10 水平,并以剂量依赖性的方式减少 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平,说明虫草素抑制脓毒症进程中炎症发生。由此看来,虫草素可能对自身免疫性疾病和炎性疾病有治疗作用。

以往研究表明,NF-κB 是一个广泛存在的转录因子,负责许多基因的转录,包括促炎细胞因子、趋化因子、黏附分子,在脓毒症中发挥了重要的调控作用[20]。NF-κB 的激活与免疫调节和炎症反应息息相关,抑制

NF-κB 的激活是治疗脓毒症的重要手段[13]。NF-κB 的激活依赖 p65 磷酸化,并转移到细胞核,因此 p65 磷酸化水平一定程度上代表 NF-κB 信号激活。本研究检测了脓毒症大鼠肺组织 p65 磷酸化水平,结果表明 CLP 导致肺组织 NF-κB 的激活;而虫草素处理后抑制肺组织磷酸化 p65 水平,即抑制 NF-κB 信号,且抑制效果呈剂量依赖的特征;因此本文推断,虫草素很可能通过抑制 NF-κB 信号通路减轻脓毒症大鼠肺损伤和炎症反应。

综上所述,虫草素可以减轻 CLP 诱导的脓毒症造成的肝肺损伤,并加强大鼠免疫调节。虫草素减轻脓毒症的分子机制可能是通过减少 p65 磷酸化水平和 NF-κB 的激活,调节炎症介质,从而加强 CLP 诱导的脓毒症大鼠的免疫调节能力和抗炎症能力。虫草素可能为治疗脓毒症的一种有效药物。

[参考文献]

[1] Shankar-Hari M,Phillips GS,Levy ML,et al. Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock:For the third international consensus definitions for sepsis and septic shock(sepsis-3)[J]. Jama,2016,315(8):775 - 787. doi:10.1001/jama.2016.0289.

[2] Gu J,Sun P,Zhao H,et al. Dexmedetomidine provides renoprotection against ischemia-reperfusion injury in mice[J]. Critical care(London,England),2011,15(3):R153. doi:10.1186/cc10283.

[3] Zhou H,Deng M. Platelet hmgb1 is required for efficient bacterial clearance in intra-abdominal bacterial sepsis in mice[J]. Blood Adv,2018,2(6):638 - 648. doi:10.1182/bloodadvances.2017011817.

[4] Cinel I,Opal SM. Molecular biology of inflammation and sepsis:a primer[J]. Critical care medicine,2009,37(1):291 - 304. doi:10.1097/CCM.0b013e31819267fb.

[5] Zhou J,Qian C,Zhao M,et al. Epidemiology and outcome of severe sepsis and septic shock in intensive care units in mainland china[J]. PloS one,2014,9(9):e107181. doi:10.1371/journal.pone.0107181.

[6] Sun M,Yang YR,Lu YP,et al. Clinical study on application of bailing capsule after renal transplantation[J]. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi,2004,24(9):808 - 810.

[7] Ruma IM,Putranto EW,Kondo E,et al. Extract of cordyceps militaris inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth of human malignant melanoma cells[J]. Int J Oncol,2014,45(1):209 - 218. doi:10.3892/ijo.2014.2397.

[8] Kim HG,Shrestha B,Lim SY,et al. Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of nf-kappab through akt and p38 inhibition in raw 264.7 macrophage cells[J]. Eur J Pharmacol,2006,545(2 - 3):192 - 199. doi:10.1016/j.ejphar.2006.06.047.

[9] Zhou X,Luo L,Dressel W,et al. Cordycepin is an immunoregulatory active ingredient of cordyceps sinensis[J]. Am J Chin Med,2008,36(5):967 - 980. doi:10.1142/S0192415X08006387.

[10] Zhou X,Meyer CU,Schmidtke P,et al. Effect of cordycepin on interleukin-10 production of human peripheral blood mononuclear cells[J]. Eur J Pharmacol,2002,453(2 - 3):309 - 317. doi:10.1016/S0014 - 2999(02)02359 - 2.

[11] Deng M,Scott MJ,Loughran P,et al. Lipopolysaccharide clearance,bacterial clearance,and systemic inflammatory responses are regulated by cell type-specific functions of tlr4 during sepsis[J]. J Immunol(Baltimore,Md:1950),2013,190(10):5152 - 5160. doi:10.4049/jimmunol.1300496.

[12] Bayraktar O,Tekin N,Aydin O,et al. Effects of s-allyl cysteine on lung and liver tissue in a rat model of lipopolysaccharide-induced sepsis[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol,2015,388(3):327 - 335. doi:10.1007/s00210 - 014 - 1076 - z.

[13] Zhao H,Liu Z,Liu W,et al. Betulin attenuates lung and liver injuries in sepsis[J]. Int Immunopharmacol,2016,30:50 - 56. doi:10.1016/j.intimp.

[14] Zhou L,Gao M,Xiao Z,et al. Protective effect of astaxanthin against multiple organ injury in a rat model of sepsis[J]. J Surg Res,2015,195(2):559 - 567. doi:10.1016/j.jss.2015.02.026.

[15] Lomas-Neira J,Perl M,Venet F,et al. The role and source of tumor necrosis factor-alpha in hemorrhage-induced priming for septic lung injury[J]. Shock(Augusta,Ga),2012,37(6):611 - 620. doi:10.1097/SHK.0b013e318254fa6a.

[16] Vanden Berghe T,Demon D,Bogaert P,et al. Simultaneous targeting of il-1 and il-18 is required for protection against inflammatory and septic shock[J]. Am J Respir Crit Care Med,2014,189(3):282 - 291. doi:10.1164/rccm.201308 - 1535OC.

[17] de Jong EC,Smits HH,Kapsenberg ML. Dendritic cell-mediated t cell polarization[J]. Springer Semin Immunopathol,2005,26(3):289 - 307. doi:10.1007/s00281 - 004 - 0167 - 1.

[18] Choi YH,Kim GY,Lee HH. Anti-inflammatory effects of cordycepin in lipopolysaccharide-stimulated raw 264.7 macrophages through toll-like receptor 4-mediated suppression of mitogen-activated protein kinases and nf-kappab signaling pathways[J]. Drug design,development and therapy,2014,8:1941 - 1953. doi:10.2147/DDDT.S71957.

[19] Martinez-Forero I,Garcia-Munoz R,Martinez-Pasamar S,et al. Il-10 suppressor activity and ex vivo tr1 cell function are impaired in multiple sclerosis[J]. Eur J Immunol,2008,38(2):576 - 586. doi:10.1002/eji.200737271.

[20] Liu SF,Malik AB. Nf-kappa b activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation[J]. Am J Physiol Lung Cellul Molecul Physiol,2006,290(4):L622 - l645. doi:10.1152/ajplung.00477.2005.

(编辑:左艳芳)