

編號：CCMP96-RD-208

冬蟲夏草菌絲體對A群鏈球菌感染的保護 效果之研究

莊偉哲
成功大學

摘 要

研究目的：

A群鏈球菌的感染會造成多種病症，包括輕微的咽喉炎、膿皰病、猩紅熱，到致命的壞死性筋膜炎及毒性休克症候群，也可能造成非化膿性後遺症，如急性腎絲球腎炎和風濕性心臟病。儘管現今有一些有效的抗生素，但近年來，由A群鏈球菌感染造成嚴重疾病在全世界都有增加的趨勢。在台灣各個年齡層的病人都可能引起壞死性筋膜炎、毒性休克症候群、及非化膿性後遺症，而且目前仍無疫苗可用。先前在小鼠的研究顯示，冬蟲夏草菌絲體對A群鏈球菌的感染提供保護效果。我們並且發現冬蟲夏草菌絲體會誘發細胞激素的產生，而使得A群鏈球菌產生的毒素streptococcal pyrogenic exotoxin B (SPE B)所造成的吞噬作用的抑制有回升的現象。

研究方法：

為了分析冬蟲夏草菌絲體在細菌感染的功效，利用先前建立的A群鏈球菌從氣囊感染小鼠的模式，並且以餵食方式給予冬蟲夏草菌絲體萃取物。計畫採用large-scale screening，以cDNA microarray以及protein array大量篩選與發炎反應、免疫反應及訊息傳遞相關基因表現的變化。同時，將冬蟲夏草菌絲體萃取物分成不同fractions，以A群鏈球菌感染小鼠模式，探討不同fractions可能提供的保護效果，比較小鼠存活率，並偵測局部組織和器官傷害程度、細菌生長與散佈、以及chemokines和cytokines的產生。

結果與討論：

Microarray、protein array以及RT-PCR的結果顯示，與發炎反應相關的cytokine及chemokine明顯受到調節。如IL1 β 、IL3、IL3R β 、IL-10、IL12、TNF- α 、sTNF-RII、CTACK、CXCL16、Eotaxin1、MIG、MIP-1、TCA-3，在餵食冬蟲夏草菌絲體萃取物的小鼠在受到A群鏈球菌感染的組別中，其表

現量皆高於正常老鼠、單獨餵食冬蟲夏草菌絲體萃取物，或單獨感染A群鏈球菌的小鼠。進一步以不同的fraction餵食小鼠，結果顯示餵食冬蟲夏草菌絲體萃取物的小鼠，皆有延長的存活率，其中又以餵食Fraction 2的效果最好。不論是蟲草菌絲體粗萃取物、Fraction 1或是Fraction 2，皆能有效地抑制感染A群鏈球菌小鼠背部組織的滲血情形，A群鏈球菌感染小鼠造成菌血症的情形，有餵食蟲草菌絲體粗萃取物、Fraction 1與Fraction 2的小鼠，其菌血症的發生率也比單獨感染A群鏈球菌的小鼠組別低，其中以餵食蟲草菌絲體粗萃取物與Fraction 2的小鼠效果最為明顯。另外，在in vitro的研究結果發現蟲草菌絲體粗萃取物、Fraction 1與Fraction 2都可以活化單核細胞U937，增加細胞的吞噬作用與毒殺細菌的能力。因此，蟲草菌絲體粗萃取物、Fraction 1與Fraction 2可以增加對A群鏈球菌的感染提供保護效果。

關鍵詞：冬蟲夏草菌絲體、A群鏈球菌、感染小鼠模式

Number:CCMP96-RD-208

Protective Effect of *Cordyceps Sinensis* Mycelium in Group A Streptococcal Infection

Woei-Jer Chuang

National Cheng Kung University

ABSTRACT

Aim:

Group A streptococcus (GAS) causes a wide spectrum of diseases, ranging from mild pharyngitis, impetigo, and scarlet fever to life-threatening diseases including necrotizing fasciitis and streptococcal toxic shock syndrome. Nonsuppurative sequelae, such as acute glomerulonephritis and rheumatic heart disease, may also occur. Despite the availability of effective antimicrobial agents, there has been a worldwide increase in the incidence of serious invasive GAS infection in recent years. In Taiwan, patients of all ages with necrotizing fasciitis, toxic shock syndrome, and post-infection sequelae have been reported. No vaccine is available. Our previous studies have shown that *Cordyceps sinensis* mycelium (CS) protected mice from GAS infection. We also demonstrated that CS abrogated the streptococcal pyrogenic exotoxin B (SPE B)-mediated suppression of phagocytosis in monocytic cells by inducing the production of cytokines.

Method:

To further characterize the effects of CS in microbial infections, mice were inoculated with GAS via an air pouch with or without force-feeding with CS. We used large-scale screening by cDNA microarray and protein array to examine the inflammation-, immune response-, and signal transduction-related gene expression in mouse spleen cells after GAS infection with or without CS treatment. We further fractionated and investigated the protective efficacy of different fractions using the mouse model of GAS infection. Mouse survival rates, local tissue and organ damage, bacterial growth and dissemination, and chemokine and cytokine production were compared between mice given different fractions of CS extract.

Results and Discussion:

Microarray, protein array and RT-PCR analysis showed the increased expression of cytokines and chemokines, including IL IL3, IL3Rb, IL-10, IL12, TNF- α , sTNF-RII, CTACK, CXCL16, Eotaxin1, MIG, MIP-1, and TCA-3 in mice after GAS infection with CS treatment. Animal model was used to test whether the CS extract or fractions would provide the protection against GAS infection. Mouse survival rates were increased in CS extract and fractions pretreated groups. Among them, Fraction 2 conferred the best protective effect. CS extract and Fractions 1 and 2 all dramatically reduced local skin tissue damage. Bacterial dissemination rates were lower in CS-pretreated and Fractions 1 and 2-pretreated mice as compared with in untreated mice at 48 h after bacterial inoculation. Among them, CS- and Fraction 2-pretreated mice showed the most effective protection. The in vitro studies indicated that CS extract and fractions could activate monocytic cell line U937 to enhance phagocytic activity and bactericidal ability. Therefore, CS extract and fractions provide protection in the host against GAS infection.

Keywords: *Cordyceps sinensis* mycelium, Group A streptococcus, Infection mouse model

壹、前言

A群鏈球菌是一種革蘭氏陽性細菌，其致病因子的種類很多，A群鏈球菌感染會造成多種病症，包括輕微的咽喉炎、膿皰病、猩紅熱，到致命的壞死性筋膜炎及毒性休克症候群，也可能造成非化膿性後遺症，如急性腎絲球腎炎和風濕性心臟病(Stevens, 1999, 2000; Cunningham, 2000; Bisno et al., 2003; Musser and DeLeo, 2005; Cleary, 2006; O'Connell, 2006)。雖然現階段已有一些genome-wide系統生物學的分析探討A群鏈球菌和宿主之間彼此相互的作用，但是在治療的進展上仍相當受限，而且目前仍無疫苗可用(Musser and DeLeo, 2005; Currie, 2006)。儘管現今有一些有效的抗生素，但近年來，由A群鏈球菌感染造成嚴重疾病在全世界都有增加的趨勢。在台灣各個年齡層的病人都可能引起壞死性筋膜炎、毒性休克症候群、及非化膿性後遺症。我們先前的研究以小鼠建立A群鏈球菌的感染模式探討其致病因子的病理機制(Kuo et al., 1998, 2004)，結果顯示A群鏈球菌產生的一種cysteine protease即streptococcal pyrogenic exotoxin B (SPE B) (Chen et al., 2003)有助於細菌在生物體內的存活、生長，並且進入血液及不同器官，並會導致肝臟和腎臟病變。我們藉由此感染模式來測試免疫調節物質的功能，結果顯示給予冬蟲夏草菌絲體(*Cordyceps sinensis* mycelium)萃取物能使小鼠存活率增加，局部組織傷害降低，細菌生長與散佈減少，血清中AST、ALT、和BUN的量較控制組低，以及IL-12和IFN- γ 產生而增強巨噬細胞的吞噬能力(Kuo et al., 2005)。在in vitro的實驗中，冬蟲夏草萃取物增加U937細胞IFN- γ 、IL-12和TNF- α 的產生及吞噬能力，A群鏈球菌產生的SPE B抑制U937細胞的吞噬能力(Kuo et al., 1999)會被冬蟲夏草萃取物促進細胞激素的產生所消除(Kuo et al., 2007)。

冬蟲夏草*Cordyceps sinensis*為真菌類Ascomycetes之一員，寄生於Lepidoptera moth之幼蟲體，長久以來作為珍貴中藥材，其功效很多，亦能調節免疫反應(Shimitsu, 1978)。冬蟲夏草被報導具有抗腫瘤能力(Yoshida et al., 1989; Kuo et al., 1994)，這可能是經由活化宿主免疫力來抑制腫瘤的生長(Yamaguchi et al., 1990; Chen et al., 1997)。在lipopolysaccharide(LPS)活化肺部沖洗液細胞的研究模式中，冬蟲夏草萃取物fraction CS-19-22會降低IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10和TNF α ，但會增加IL-12和IFN- γ 的產生，顯示冬蟲夏草會調節肺中Th1和Th2細胞(Kuo et al., 2001)。冬蟲夏草的polysaccharide fraction會增加人類周邊血液單核細胞IFN- γ 、TNF- α 和IL-1 β 的產生。此外，冬蟲夏草刺激周邊血液單核細

胞後所收集的上清液(conditioned medium)會抑制U937細胞生長與分化，主要是由於IFN- γ 和TNF- α 的產生(Chen et al., 1997)。近來的研究顯示冬蟲夏草萃取物其中一個fraction具有很強的free-radical scavenging的能力，而抑制colorectal 和hepatocellular癌細胞的生長(Wang et al., 2005)。

本計畫以先前建立的小鼠感染A群鏈球菌以及餵食冬蟲夏草的模式，以large-scale screening方式，測試冬蟲夏草菌絲體萃取物及其fractions所造成與發炎反應、免疫反應及訊息傳遞相關基因和蛋白質表現的變化，並確認冬蟲夏草菌絲體萃取物誘發產生的factors在A群鏈球菌感染提供保護之作用機制。

貳、材料與方法

一、實驗動物

BALB/c小鼠取自國立成功大學醫學院動物中心或國家實驗動物中心，皆為無特定病原菌的小鼠，本計畫中使用8~10週齡的小鼠。

二、冬蟲夏草菌絲體萃取物

冬蟲夏草(*Cordyceps sinensis*)菌絲體由善笙生物科技公司(Simpson Biotech Company Ltd, Taipei, Taiwan)提供。100公克的冬蟲夏草菌絲體加入800毫升的蒸餾水後於37°C均勻搖動72小時，再經由12,000×g高速離心30分鐘後收集上清液，並且將上清液進行冷凍乾燥形成粉末。在進行實驗前將冬蟲夏草萃取物粉末溶解於PBS並以0.2 μm filter過濾。另外將冬蟲夏草萃取物經由純化與分離的過程，區分出兩種fractions。

三、細菌株

本研究計畫選用的菌株為臨床檢體分離的菌株NZ131 (M49, T14)，得自紐西蘭Martin博士，將新鮮少量的A群鏈球菌株種於TSBY (含有0.5% yeast extract的tryptic soy broth containing)培養液，37°C隔夜培養後以1:50的比例加入新的培養液中，再繼續培養8小時後將細菌離心，去除上清液後以無菌的PBS將沉澱的菌體回溶，利用分光光度儀器將細菌的濃度調整為OD600=0.2，此時的細菌濃度約為10⁹ CFU/ml。

四、A群鏈球菌的小鼠感染模式

利用本實驗室先前建立的A群鏈球菌氣囊感染模式(Kuo et al., 1998)，選用8-10週齡的BALB/c品系小鼠，以27號針頭的針筒先將1 ml的空氣打入小鼠背部皮下，使小鼠的背部皮下形成氣腔，再將調好濃度的菌液打入皮下氣囊中。在小鼠存活率的實驗中，小鼠在感染A群鏈球菌後每天觀察記錄其存活率。局部氣囊受損的嚴重程度以計算氣囊受損滲血的面積並拍照紀錄。在進行感染A群鏈球菌實驗前，先利用胃管將每隻小鼠每天灌食0.2ml的濃度為50μg/ml的冬蟲夏草發酵菌絲體萃取物溶液、fraction 1 (F1)與fraction 2 (F2)，連續灌食三天後再進行感染A群鏈球菌的實驗。

五、感染部位氣囊回抽液與血液中細菌的計數

分別在感染後48、72小時的時間點，將小鼠麻醉後以無菌的方式心

臟採血，另外將1 ml的無菌PBS注入小鼠的背部氣囊反覆沖提出局部氣囊菌液，經過10倍連續稀釋後取100 μ l塗於TSBY培養基上，經過37 $^{\circ}$ C培養24小時後計數菌落並觀察菌落以確定沒有其他雜菌的污染。

六、cDNA微矩陣分析

以affymetrix chip microarray系統分析未餵食或餵食冬蟲夏草菌絲體萃取物在受A群鏈球菌感染小鼠模式下，大量篩選小鼠脾臟細胞基因表現的變化，以Trizol Reagent (Gibco BRL)萃取分離出小鼠脾臟細胞的RNA，經由phenol/chloroform萃取並以isopropanol沉澱RNA，再利用75% ethanol清洗後，將RNA回溶後以測量OD260 (U-2000; Hitachi, Tokyo, Japan)的方式定量RNA的濃度與含量。微矩陣實驗則根據製造商的步驟(Affymetrix, Santa Clara, CA)進行，並且以GeneArray scanner (Affymetrix)將結果以3mm掃描並進行分析比較。

七、RT-PCR

我們利用RT-PCR的方式偵測小鼠的RNA表現情形。將total RNA萃取後，以25 U的Moloney murine leukemia virus的反轉錄酶(Promega)與6 μ g/ml的oligo primers於37 $^{\circ}$ C作用2小時，將5 μ g的RNA將其反轉錄為單股的cDNA，之後再以DNA thermocycler (GeneAmp PCR system 2400; PE Applied Biosystems)進行PCR，將cDNA的體積調為1.25 μ l，加入1mM的deoxyribonucleotides (Amersham)、1 μ g的sense and antisense primers、0.75mM的MgCl₂以及1.25U的Taq DNA polymerase (Promega)，在作用體積為25 μ l下將cDNA放大，PCR作用時溫度的條件為，94 $^{\circ}$ C進行5分鐘的denaturation，72 $^{\circ}$ C作用2分鐘進行extension，而最終PCR的產物以電泳膠片進行分析，將電泳膠片利用ethidium bromide染色最後以UV光激發拍照，並以densitometer (Bio-capt MW; Vilber Lourmat, Marne La Vallée, France)與Bio-1D分析軟體(Version 99; Vilber Lourmat)定量PCR的產物。使用PCR引子如下：

IL-12p40: '-CAACATCAAGAGCAGTAGCAG-3' (forward)和
5'- TACTCCCAGCTGACCTCCAC-3' (reverse), MCP-1:
5'-ACTGAAGCCAGCTCTCTCTTCCTC-3' (forward)和
5'-TTCCTTCTTGGGGTCAGCACAGAC-3' (reverse), IFN- γ :
5'-TGAACGCTACACACTGCATCTTGG-3' (forward)和
5'-CGACTCCTTTTCCGCTTCCTGAG-3' (reverse), GAPDH:
5'-CAAGGCTGTGGGCAAGGTCA-3' (forward)和

5'-AGGTGGAAGAGTGGGAGTTGCTG-3' (reverse).

八、Chemokine and cytokine array

利用RayBio Mouse Cytokine Antibody Array (RayBiotech Inc)偵測小鼠脾臟細胞的chemokine與cytokine的表現情形。根據套組使用說明書建議，以先餵食冬蟲夏草菌絲體萃取物三天的BALB/c小鼠在受到A群鏈球菌感染後24小時後，將小鼠（分為餵食PBS組，餵食冬蟲夏草菌絲體組，感染A群鏈球菌組，以及先餵食冬蟲夏草菌絲體再感染A群鏈球菌組等四組）的脾臟取出以PBS沖洗並且混合磨碎，離心取得之上清液與RayBio Mouse Cytokine Antibody Array在4°C作用24小時。經過適當沖洗除去非專一性的結合後，利用HRP結合的二級抗體呈色反應。

九、U937細胞吞噬能力

將50µg/ml的冬蟲夏草發酵菌絲體萃取物溶液、Fraction 1 (F1)與Fraction 2 (F2)加入monocytic U937細胞中(5×10^5 /well)共同培養24小時後，加入1 µl的FITC-conjugated beads於37°C反應1~2小時，再將細胞置於2% BSA/PBS的上層以形成比重梯度，經過1000rpm離心10分鐘將未被細胞吞噬的beads除去，重複離心清洗兩次後，利用流式細胞儀分析細胞的綠色螢光強度的變化，並計算細胞進行吞噬作用的情形。每組實驗為三重複的實驗平均所得，並進行統計分析。

十、U937細胞殺菌能力

將50µg/ml的冬蟲夏草發酵菌絲體萃取物溶液、Fraction 1 (F1)與Fraction 2 (F2)加入monocytic U937細胞中(5×10^5 /well)共同培養24小時後，加入調好濃度的菌液(MOI=10)與細胞反應1小時，以無菌PBS經過1000rpm離心10分鐘清洗除去未進入細胞內的細菌，在培養液中加入抗生素以殺死細胞外的細菌，再同樣以無菌PBS離心清洗細胞後，將細胞lysis後塗於TSBY培養基上，經過37°C培養24~48小時後計數菌落。每組實驗為三重複的實驗平均所得，並進行統計分析。

十一、統計方法

利用paired *t*-test進行統計分析，*p*值小於0.05則符合統計上具有顯著差異的情形。

參、結果

冬蟲夏草會參與調節免疫反應。先前在A群鏈球菌感染小鼠的研究模式中，我們發現餵食小鼠冬蟲夏草菌絲體萃取物能使小鼠存活率增加，局部組織傷害降低，細菌生長與散佈減少，血清中AST、ALT、和BUN的量較控制組低，以及IL-12和IFN- γ 產生而增強巨噬細胞的吞噬能力(Kuo et al., 2005)。在in vitro的實驗中也發現，冬蟲夏草菌絲體萃取物會增加巨噬細胞U937其IL-12、IFN- γ 和TNF- α 的產生及吞噬能力(Kuo et al., 2007)。因此，我們進一步利用核酸微陣列分析法以及蛋白質微陣列分析法，針對未餵食或餵食冬蟲夏草菌絲體萃取物在受A群鏈球菌感染小鼠模式下，大量篩選與發炎反應、免疫反應及訊息傳遞相關基因及蛋白質表現的變化。核酸微陣列分析法的初步結果顯示，BALB/c小鼠(n=6/group)在氣囊中注射A群鏈球菌NZ131 (2.5×10^8 CFU) 18小時後，將六隻小鼠的脾臟取出並且混合磨碎後進行核酸微陣列分析法的分析，發現MIP-2、IL1R、IGFBP-7、CD14基因表現明顯上升（感染NZ131組別相較於PBS組別，其基因表現比值大於2者）；IL2R、IL6 signal transducer、IL6R、IL10R、MIP-3 α R、MCP-1R、CXCR6、TLR7、CD40基因表現明顯下降（感染NZ131組別相較於PBS組別，其基因表現比值小於0.5者）（表一）。蛋白質微陣列分析法的結果顯示（圖一），先餵食冬蟲夏草菌絲體萃取物三天的小鼠在受到A群鏈球菌感染後24小時，小鼠脾臟的上清液能測得增強的cytokine及chemokine反應。在餵食冬蟲夏草菌絲體萃取物的小鼠在受到A群鏈球菌感染後，利用蛋白質微陣列分析法發現促發炎細胞激素(IL1 β 、IL12、TNF- α 、sTNF-RII)、抗發炎細胞激素(IL-10)、細胞生長激素(IL3、IL3Rb)以及細胞趨化激素(CTACK、CXCL16、Eotaxin1、MIG、MIP-1 α 、TCA-3)等基因的表現，高於正常老鼠、單獨餵食冬蟲夏草菌絲體萃取物，或單獨感染A群鏈球菌的小鼠（表二、表三）。IL-12及TNF- α 的表現亦如過去發現餵食冬蟲夏草菌絲體萃取物可增加其表現(Kuo et al., 2007)，而RT-PCR的分析亦顯示相同的結果（圖二）。雖然結果顯示餵食冬蟲夏草菌絲體萃取物無法有效降低A群鏈球菌感染所引起的發炎激素表現，然而餵食冬蟲夏草菌絲體萃取物可以有效增加抗發炎細胞激素IL-10的表現。我們推論餵食冬蟲夏草菌絲體萃取物可能藉由IL-10的作用進一步抑制發炎激素引起的細胞發炎反應。然而，這仍需未來的研究證實。為了進一步釐清冬蟲夏草菌絲體萃取物中可能的有效成份，我們利用離心及濃度梯度的方式，將冬蟲夏草菌絲體萃取物依據組成成分的不

同，分成Fraction 1 (60% carbohydrate: 40% protein)以及Fraction 2 (40% carbohydrate: 60% protein) (圖三)。以不同的fractions餵食小鼠，觀察兩種不同組成比例的fractions對於小鼠在受到A群鏈球菌感染模式下所提供的保護能力。實驗結果初步顯示，單獨感染A群鏈球菌的小鼠5天後全部死亡，而有餵食冬蟲夏草菌絲體萃取物的小鼠，皆有延長的存活率，其中又以餵食Fraction 2的效果最好(圖四)。另外，局部損傷的分析結果顯示，不論是蟲草菌絲體粗萃取物(CS)、Fraction 1 (F1)或是Fraction 2 (F2)，皆能有效地抑制感染A群鏈球菌小鼠背部組織的滲血情形(圖五)。在感染後48小時，餵食Fraction 2的小鼠組別中有一隻小鼠的氣囊細菌數只有 1.5×10^5 CFU，甚至還有一隻小鼠的菌數小於 10^5 CFU，與其他組別的小鼠背部氣囊回抽液菌量比較並沒有顯著的差異。然而A群鏈球菌感染所造成菌血症的情形，有餵食蟲草菌絲體粗萃取物(CS)、Fraction 1 (F1)與Fraction 2 (F2)的小鼠，其菌血症的發生率都比單獨感染A群鏈球菌的小鼠組別(6/8, 75%)低，其中以蟲草菌絲體粗萃取物(CS)與Fraction 2 (F2)的小鼠效果最為明顯，分別為1/8 (12.5%)與2/8 (25%)，而餵食Fraction 1 (F1)的小鼠菌血症的比例為4/8 (50%) (表四)。

另一方面，我們也比較冬蟲夏草菌絲體萃取物的不同fractions是否能增強對於人類巨噬細胞株U937的吞噬能力為活性指標。結果顯示，Fraction 1與Fraction 2都可以促進U937細胞的吞噬能力，而在同樣的濃度下Fraction 1與Fraction 2增加細胞吞噬能力的效果都比冬蟲夏草菌絲體萃取物(CS)還要高些(圖六)。重要的是，Fraction 1與Fraction 2也可以增強U937細胞的殺菌能力(圖七)。然而我們測試過此濃度的蟲草菌絲體粗萃取物、Fraction 1與Fraction 2對U937細胞是否具有毒性，結果發現此濃度對細胞並無傷害。因此冬蟲夏草菌絲體萃取物與fractions可以藉由活化宿主免疫細胞的吞噬能力和殺菌能力，進而幫助小鼠抵抗A群鏈球菌的感染。

肆、討論

在本研究中，我們以large-scale screening方式檢測冬蟲夏草菌絲體萃取物所造成與發炎反應、免疫反應及訊息傳遞相關基因和蛋白質表現的變化，根據所得之結果，找到一些受到調控的cytokines和chemokines。其中，促發炎細胞激素IL-12及TNF- α 的表現亦如過去的發現，餵食冬蟲夏草菌絲體萃取物可增加其表現，而餵食冬蟲夏草菌絲體萃取物在受A群鏈球菌感染的小鼠組別中，抗發炎細胞激素IL-10的表現卻也明顯增加。此一結果說明，餵食冬蟲夏草菌絲體萃取物可以為小鼠提供保護以對抗抑制A群鏈球菌感染可能的機制之一，首先即是透過引發促發炎細胞激素IL-12及TNF- α 的表現，以增加細胞發炎反應吸引並活化吞噬細胞，針對侵入的A群鏈球菌進行清除。然而，利用冬蟲夏草菌絲體萃取物處理過的U937細胞，的確表現出增強的吞噬能力的實驗結果證實了如此的推論。當宿主清除了大部分的細菌後，為了減少大量的發炎激素過度反應反而對宿主造成傷害，冬蟲夏草菌絲體萃取物即可進一步的調節抗發炎細胞激素IL-10的表現增加，進而適當地拮抗發炎反應以避免過度的發炎反應對宿主造成傷害。因此，冬蟲夏草菌絲體萃取物可藉由加強調節並且平衡宿主的免疫反應，進而對受A群鏈球菌感染的小鼠提供有效的保護效果。然而除了IL-12，TNF- α 及IL-10的表現外，我們亦有興趣針對IL-1，IL-6，IFN- γ ，MCP-1，MIP-2，MIG，CXCL16等，進一步確認其重要性及調節的作用。冬蟲夏草菌絲體萃取物如何有效地對受A群鏈球菌感染的小鼠提供保護，其中的詳細機制：包括cytokines和chemokines活化的時間點、作用部位以及哪些免疫細胞受到調節，這些問題仍需未來的研究證實。

本研究並確認冬蟲夏草菌絲體萃取物以及其不同fractions的組成份，能有效地在A群鏈球菌感染下提供保護機制。冬蟲夏草菌絲體萃取物以及其不同fractions可能含有多種調節免疫細胞的物質，對於冬蟲夏草菌絲體萃取物的Fraction 1與Fraction 2增強吞噬作用與毒殺細菌的能力，是本研究中的重要發現，其機制值得繼續深入探討。曾有研究指出巨噬細胞的活化可以產生多種的抗菌物質，例如nitric oxide (NO)與superoxide anion，以及促發炎細胞激素，包括IL-6、IL-1 β 、IL-12與TNF- α (Mosser, 2003)。冬蟲夏草菌絲體萃取物的Fraction 1與Fraction 2是否會藉由促進單核細胞產生NO或superoxide anion與細胞激素，是未來繼續探討的方向。由於Fraction 1是經由冬蟲夏草菌絲體加入蒸餾水後於37°C均勻搖動72小時，再經由高速離心後收集的上清液，再經

由 *column* 純化得來的，因此 Fraction 1 的性質是屬於水溶性的部份，而 Fraction 2 是冬蟲夏草菌絲體加入蒸餾水後經由高速離心後收集的沉澱物中，再經由甲醇萃取，取其上清液的部份再以 *column* 純化得來，由於研究報導指出冬蟲夏草的多醣體具有可以降低小鼠血醣、膽固醇與三酸甘油脂含量、治療 B 型肝炎、抗腫瘤與免疫調節的作用 (Pasterson, 2008)，我們初步的區分出 Fraction 1 與 Fraction 2 其蛋白質與醣類的含量比例，然而 Fraction 1 與 Fraction 2 都還含有多種物質在內，因此針對 Fraction 1 與 Fraction 2 仍需要更深入的研究才能釐清其有效成分為何。

伍、結論與建議

本計畫以小鼠感染A群鏈球菌模式，證實冬蟲夏草的確具有調節免疫反應的作用，可能藉由促進小鼠產生IL-12與INF- γ ，進而提高小鼠存活率與降低菌血症的發生，以及in vitro細胞培養方式，針對冬蟲夏草菌絲體及其fractions的保護功效進行研究，發現冬蟲夏草菌絲體萃取物的Fraction 1與Fraction 2可以增強吞噬作用與毒殺細菌的能力，期望能建立一個中醫藥及健康食品的篩選平台，進一步在不同病菌感染之評估與運用。然而針對冬蟲夏草菌絲體萃取物的Fraction 1與Fraction 2其中的有效成分為何仍需要更深入的研究加以證實，總結而言，冬蟲夏草對於A群鏈球菌的感染具有免疫調節的功效進而達到保護的效果。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號CCMP96-RD-208提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

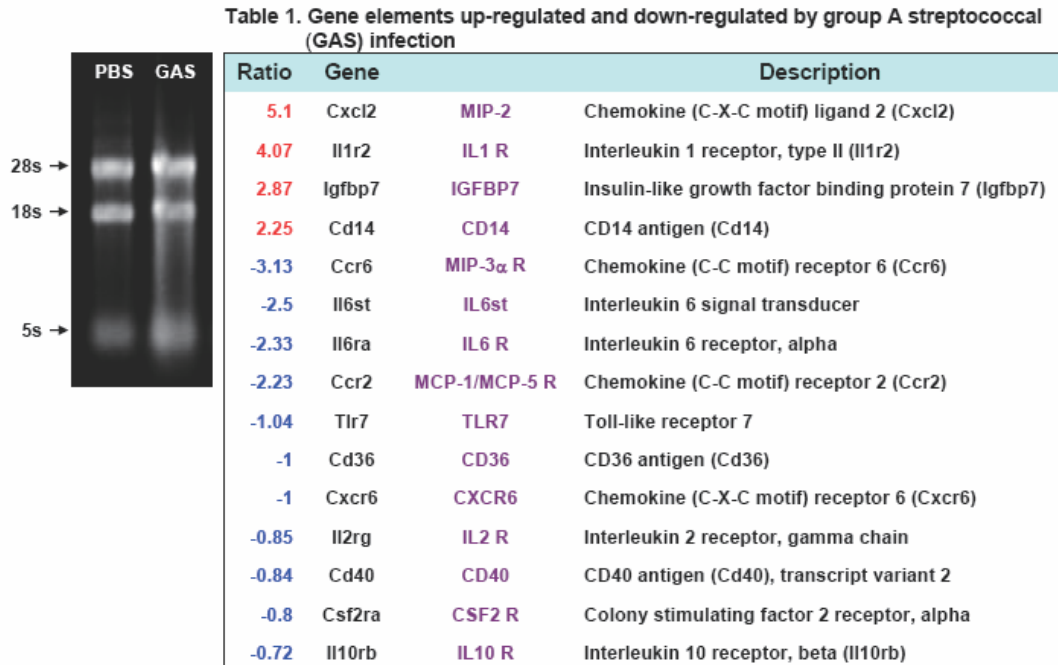
陸、參考文獻

1. Bisno AL, Brito MO, and Collins CM: Molecular basis of group A streptococcal virulence. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 191-200.
2. Chen CY, Luo SC, Kuo CF, Lin YS, Wu JJ, Lin MT, Liu CC, Jeng WY, and Chung WJ: Maturation processing and characterization of streptopain. *J Biol Chem* 2003; 278: 17336-17343.
3. Chen YJ, Shiao MS, Lee SS, and Wang SY: Effect of *Cordyceps sinensis* on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells. *Life Sci* 1997; 60: 2349-2359.
4. Cleary PP: *Streptococcus* moves inward. *Nat Med* 2006; 12: 384-386.
5. Cunningham MW: Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 470-511.
6. Currie BJ: Group A streptococcal infections of the skin: molecular advances but limited therapeutic progress. *Curr Opin Infect Dis* 2006; 19: 132-138.
7. Kuo CF, Wu JJ, Lin KY, Tsai PJ, Lee SC, Jin YT, Lei HY, and Lin YS: Role of streptococcal pyrogenic exotoxin B in the mouse model of group A streptococcal infection. *Infect Immun* 1998; 66: 3931-3935.
8. Kuo CF, Wu JJ, Tsai PJ, Kao FJ, Lei HY, Lin MT, and Lin YS: Streptococcal pyrogenic exotoxin B induces apoptosis and reduces phagocytic activity in U937 cells. *Infect Immun* 1999; 67: 126-130.
9. Kuo CF, Luo YH, Lin HY, Huang KJ, Wu JJ, Lei HY, Lin MT, Chuang WJ, Liu CC, Jin YT, and Lin YS: Histopathologic changes in kidney and liver correlate with streptococcal pyrogenic exotoxin B production in the mouse model of group A streptococcal infection. *Microb Pathog* 2004; 36: 273-285.
10. Kuo CF, Chen CC, Luo YH, Huang RY, Chuang WJ, Sheu CC, and Lin YS: *Cordyceps sinensis* mycelium protects mice from group A streptococcal infection. *J Med Microbiol* 2005; 54: 795-802.
11. Kuo CF, Chen CC, Lin CF, Jan MS, Huang RY, Luo YH, Chuang WJ, Sheu CC, and Lin YS: Abrogation of streptococcal pyrogenic exotoxin B-mediated suppression of phagocytosis in U937 cells by *Cordyceps sinensis* mycelium via production of cytokines. *Food Chem Toxicol* 2007; 45: 278-285.
12. Kuo YC, Lin CY, Tsai WJ, Wu CL, Chen CF, and Shiao MS: Growth inhibitors against tumor cells in *Cordyceps sinensis* other than cordycepin and polysaccharides. *Cancer Invest* 1994; 12: 611-615.
13. Kuo YC, Tsai WJ, Wang JY, Chang SC, Lin CY, and Shiao MS: Regulation of

- bronchoalveolar lavage fluids cell function by the immunomodulatory agents from *Cordyceps sinensis*. *Life Sci* 2001; 68: 1067-1082.
14. Mosser DM: The many faces of macrophage activation. *J Leuk Biol* 2003; 73: 209-212.
 15. Musser JM and DeLeo FR: Toward a genome-wide systems biology analysis of host-pathogen interaction in group A streptococcus. *Am J Pathol* 2005; 167: 1461-1472.
 16. O'Connell D: Bacterial pathogenesis: triggering GAS invasive disease. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4: 644-645.
 17. Paterson RRM: *Cordyceps* - a traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory? *Phytochemistry* 2008; 69: 1469-1495.
 18. Shimitsu D: Green Book 51, *Cordyceps*. New Science Company, Japan. 1978.
 19. Stevens DL: The flesh-eating bacterium: What's next? *J Infect Dis* 1999; 179: S366-S374.
 20. Stevens DL: Streptococcal toxic shock syndrome associated with necrotizing fasciitis. *Annu Rev Med* 2000; 51: 271-288.
 21. Wang BJ, Won SJ, Yu ZR, and Su CL: Free radical scavenging and apoptotic effects of *Cordyceps sinensis* fractionated by supercritical carbon dioxide. *Food Chem Toxicol* 2005; 43: 543-552.
 22. Yamaguchi N, Yoshida J, Ren LJ, Chen H, Miyazawa Y, Fujii Y, Huang YX, Takamura S, Suzuki S, Koshimura S, and Zeng FD: Augmentation of various immune reactivities of tumor-bearing hosts with an extract of *Cordyceps sinensis*. *Biotherapy* 1990; 2: 199-205.
 23. Yoshida J, Takamura S, Yamaguchi N, Ren LJ, Chen H, Koshimura S, and Suzuki S: Antitumor activity of an extract of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. against murine tumor cell lines. *Jpn J Exp Med* 1989; 59: 157-161.

柒、圖、表

表一、以A群鏈球感染的小鼠脾臟細胞進行cDNA microarray的分析結果，針對與發炎反應相關的cytokines、chemokines基因變化與正常小鼠表現進行相互比對。



Mouse Cytokine Antibody Array III

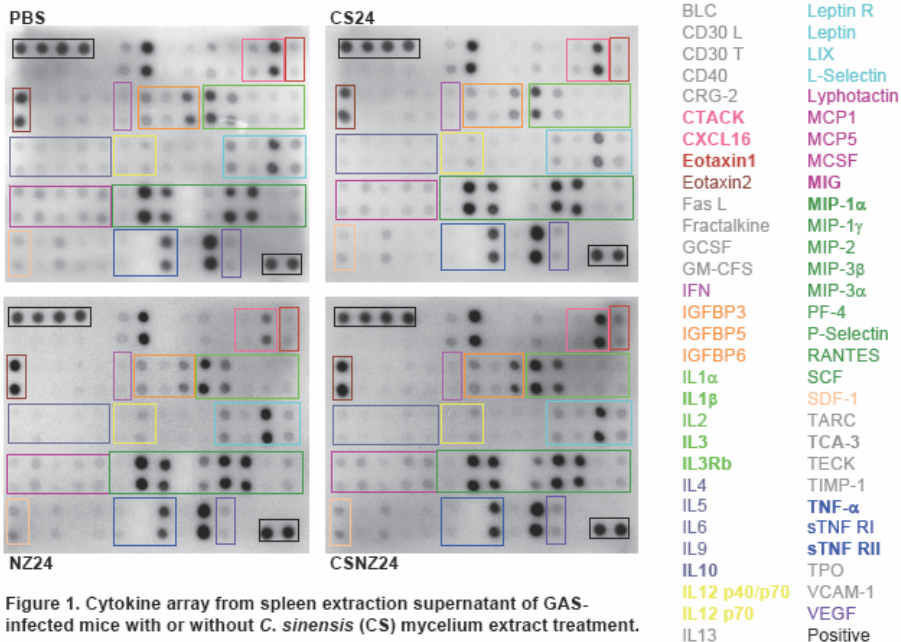


Figure 1. Cytokine array from spleen extraction supernatant of GAS-infected mice with or without *C. sinensis* (CS) mycelium extract treatment.

圖一 餵食或未餵食冬蟲夏草菌絲體萃取物，在給予或不給予A群鏈球菌的小鼠取得之脾臟上清液，以Mouse Cytokine Antibody Array III分析結果。

表二、餵食或未餵食冬蟲夏草菌絲體萃取物，在給予或不給予A群鏈球菌的小鼠取得之脾臟上清液，分析其cytokines的變化。

Table 2. Cytokine expression in mouse spleen extraction supernatant.

Cytokine	Ratio	Function
Positive		-
IFN		Activating natural killer cells and macrophages, increasing antigen presentation to lymphocytes
IL1 α		Pro-inflammatory cytokine
IL1 β		Pro-inflammatory cytokine
IL3		Supporting growth and differentiation of T cells from the bone marrow in an immune response.
IL3Rb		IL3 receptor
IL6		Acting as both a pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine
IL10		Anti-inflammatory cytokine
IL12 p40/p70		Involving in the differentiation of naive T cells into Th1 cells
IL12 p70		Involving in the differentiation of naive T cells into Th1 cells
TNF- α		Pro-inflammatory cytokine
sTNF RII		Soluble TNF- α receptor II

表三、餵食或未餵食冬蟲夏草菌絲體萃取物，在給予或不給予A群鏈球菌的小鼠取得之脾臟上清液，分析其chemokines的變化。

Table 3. Chemokine expression in mouse spleen extraction supernatant.

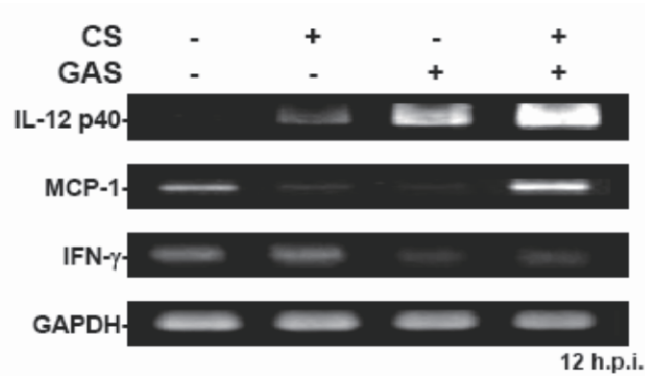
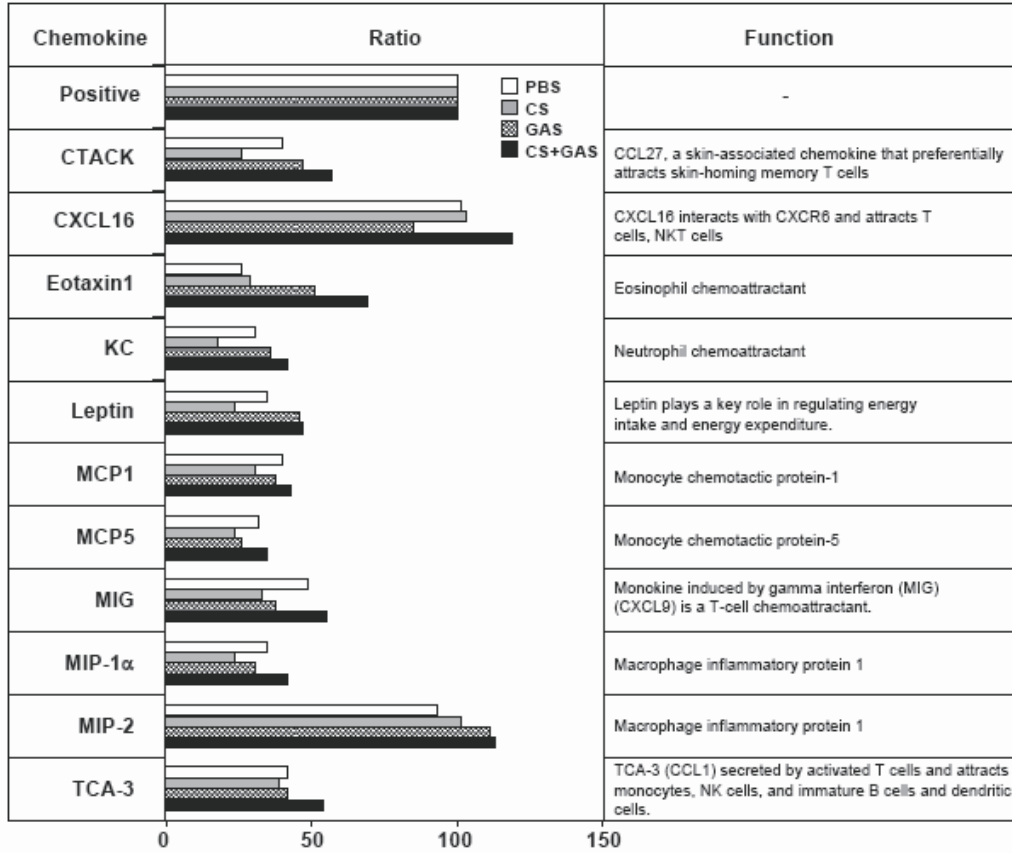


Figure 2. Levels of cytokine mRNA in GAS-infected mouse splenocytes with or without *C. sinensis* (CS) mycelium extract treatment. BALB/c mice were force-fed CS or PBS for 3 consecutive days followed by GAS infection for 12 hours. The mRNA expression of IL-12 p40, MCP-1, and IFN- γ were detected using RT-PCR. GAPDH is the internal control.

圖二 利用RT-PCR分析餵食或未餵食冬蟲夏草菌絲體萃取物，在給予或不給予A群鏈球菌的小鼠取得之脾臟細胞其IL-12、MCP-1和IFN- γ 的變化。

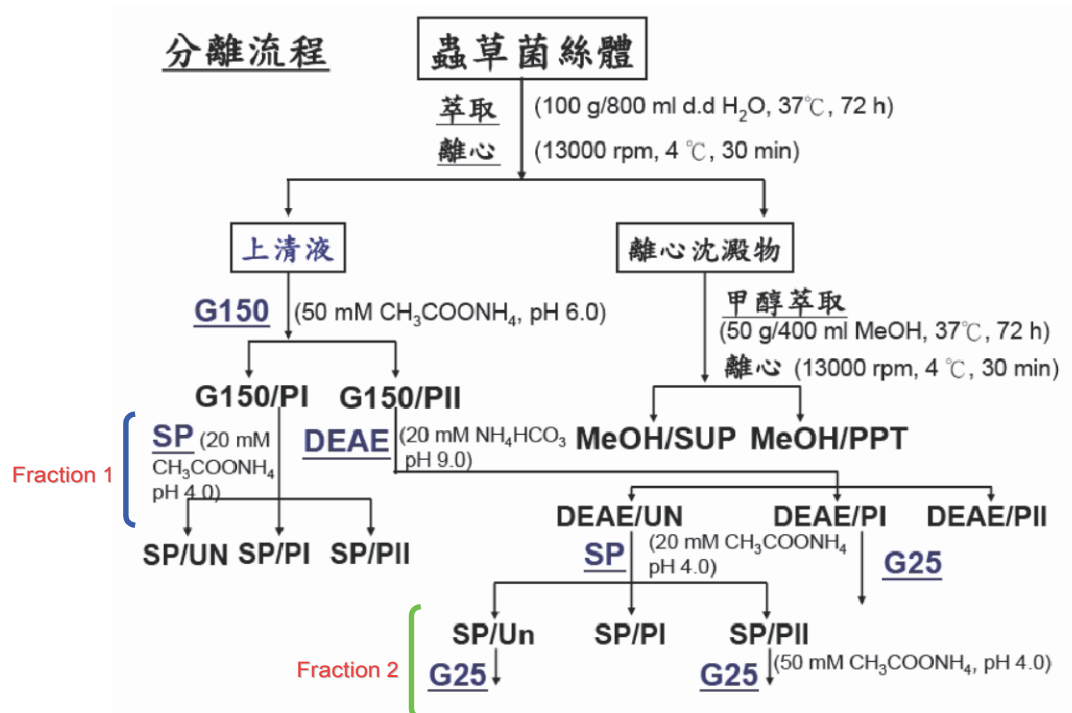


Figure 3. Extraction and fractionation protocol of *C. sinensis* mycelium.

圖三 冬蟲夏草菌絲體的萃取分離流程。

Figure 3. Extraction and fractionation protocol of *C. sinensis* mycelium.

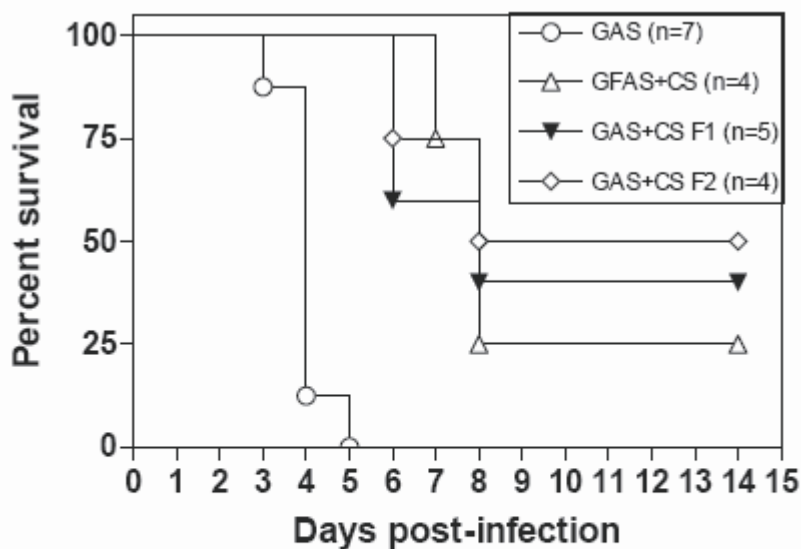


Figure 4. Both *C. sinensis* mycelium extract (CS) and fractions (F1, F2) increase the survival rate in GAS-infected mice. BALB/c mice were force-fed CS mycelium extract for 3 consecutive days and inoculated with 3×10^8 c.f.u. of GAS in the air pouch 1 day later. Mortality was monitored for 14 days.

圖四 餵食不同fractions的冬蟲夏草菌絲體萃取物，對於A群鏈球菌感染的小鼠存活率之影響。

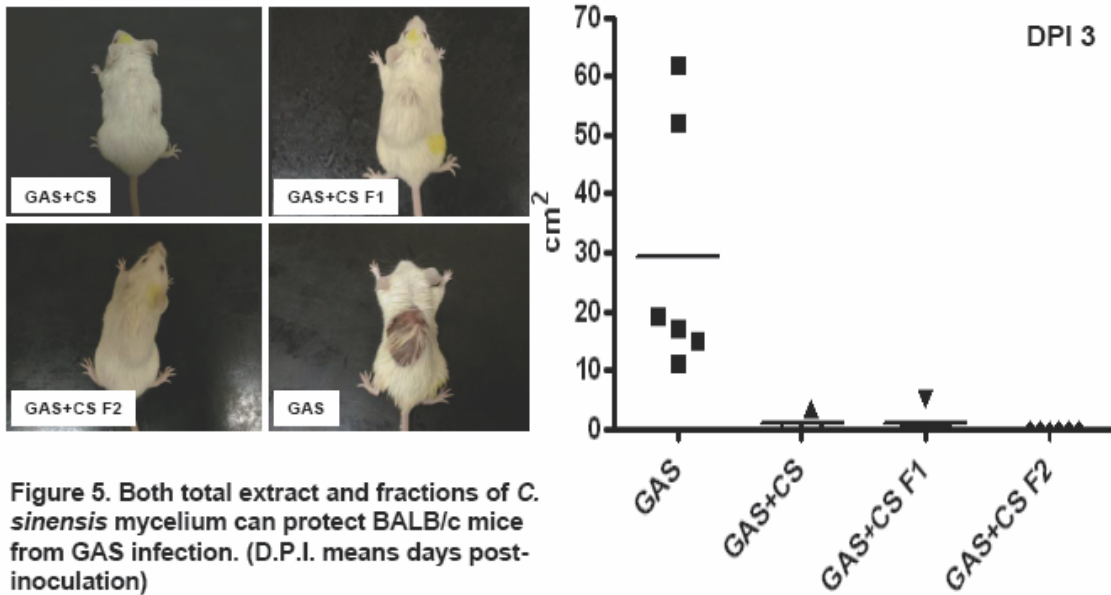


Figure 5. Both total extract and fractions of *C. sinensis* mycelium can protect BALB/c mice from GAS infection. (D.P.I. means days post-inoculation)

圖五 餵食不同fractions的冬蟲夏草菌絲體萃取物，對於A群鏈球菌感染的小鼠局部組織損傷的保護效果。

表四、餵食不同fractions的冬蟲夏草菌絲體萃取物，對於A群鏈球菌感染的小鼠局部組織與血液的細菌數。

Table 4. Bacterial counts in the air pouch and blood after GAS infection with or without force-feeding *C. sinensis*

Treatment and time post-infection	Sample site	Bacterial number for each mouse (CFU/ml)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
PBS-treated, 48 h	Air pouch	5.3×10^7	5.8×10^7	3.9×10^7	1.6×10^9	8.3×10^6	1.1×10^7	2.9×10^7	NA
	Blood	--	1.1×10^2	--	7.3×10^2	1.1×10^2	4.1×10^2	3.0×10^1	9.0×10^1
CS-treated, 48 h	Air pouch	4.4×10^8	2.3×10^7	5.7×10^6	4.0×10^7	1.9×10^6	3.6×10^7	8.1×10^7	1.7×10^7
	Blood	--	--	--	--	--	1.0×10^1	--	--
F1-treated, 48 h	Air pouch	NA	3.2×10^8	7.2×10^7	4.4×10^7	2.3×10^6	1.2×10^8	8.9×10^8	NA
	Blood	--	1.0×10^1	--	--	9.0×10^2	2.6×10^3	3.0×10^1	--
F2-treated, 48 h	Air pouch	4.8×10^7	3.4×10^7	1.5×10^5	--	5.6×10^6	NA	NA	4.5×10^8
	Blood	--	--	--	--	--	--	7.0×10^1	3.0×10^1

NA, not applicable; --, undetectable.

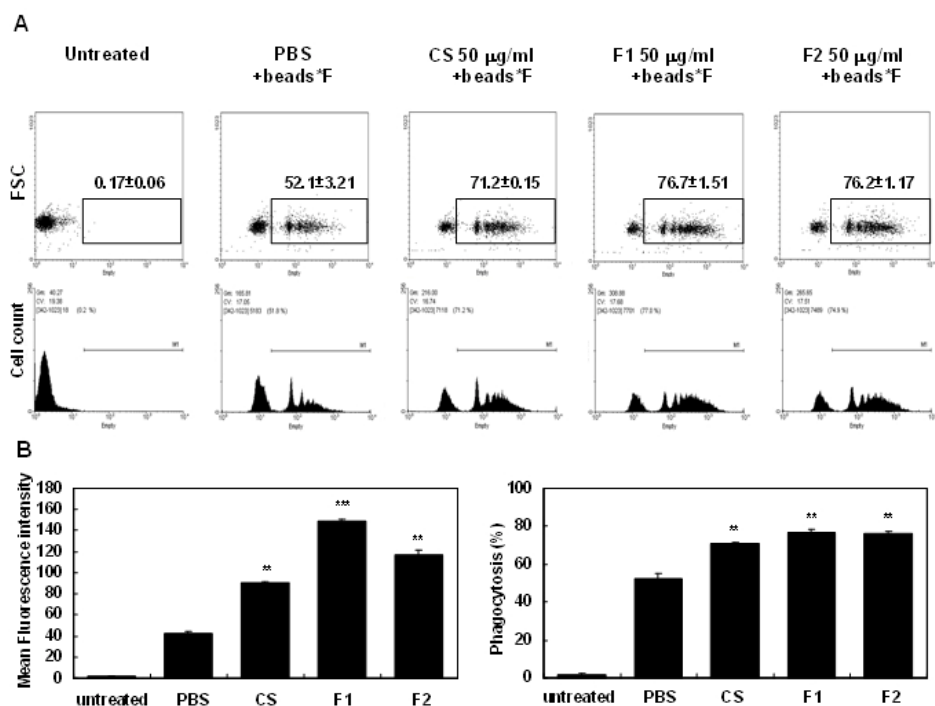


Figure 6. CS mycelium extract and fractions enhance U937 phagocytic activity. U937 cells (5×10^5 in 1 ml) were incubated with or without 50 $\mu\text{g/ml}$ of CS mycelium extract for 24 h. The cultures were mixed with or without FITC-labeled beads (Bead*F) for 1 h and then analyzed using flow cytometry. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ as compared with untreated + Bead*F.

圖六 不同fractions的冬蟲夏草菌絲體萃取物對於U937細胞吞噬能力的影響。

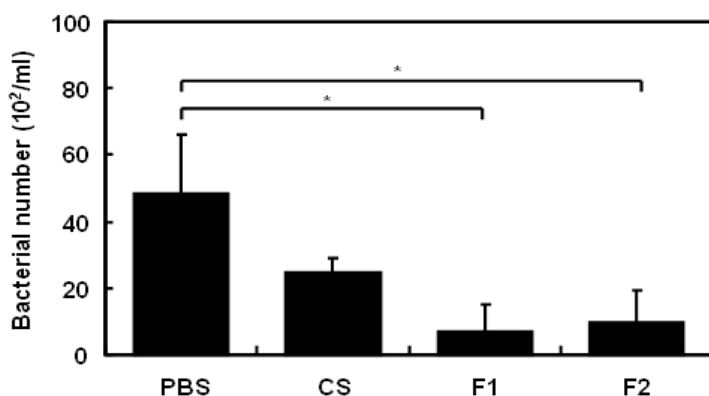


Figure 7. CS mycelium extract and fractions enhance U937 bactericidal activity. U937 cells (5×10^5 in 1 ml) were incubated with or without 50 $\mu\text{g/ml}$ of CS mycelium extract for 24 h. The cultures were infected with GAS ($moi=10$) for 1 h and then the extracellular bacteria were killed by adding antibiotics. The cells were lysed and the bacterial numbers were counted. * $p < 0.05$ as compared with untreated group.

圖七 不同fractions的冬蟲夏草菌絲體萃取物對於U937細胞毒殺細菌能力的影響。