冬虫夏草繁育品保健功能的多组学研究

辛梦茹[1]，谢 地[1]，毛维东[2]，周 立[3*]，郭 珊[4*]，胡汉昆[1*]

（1. 武汉大学中南医院药学部，湖北武汉 430071；2. 佐治亚格威内特学院信息技术系，美国劳伦斯维尔 30043；
3. 武汉大学基础医学院，动物生物安全三级实验室，湖北武汉 430071；4. 武汉大学中南医院，生物样本库，湖北武汉 430071）

摘要：冬虫夏草繁育品（Cultured of *Cordyceps sinensis*，CCs）与野生冬虫夏草相比，具有相近的化学成分和药理活性。然而，针对冬虫夏草中多种化学组分在疾病预防中的协同作用，目前的研究尚显不足。该研究采用 LC-MS/MS 法检测了 CCs 中的代谢物，并基于质谱代谢组学、蛋白质组学和转录组学等多组学技术，研究了健康大鼠在连续 14 d 灌胃给予 CCs 后的系统生物学响应。LC-MS/MS 检测结果显示，在 CCs 中识别出 993 种水溶性代谢物和 804 种脂溶性代谢物；并且，经 CCs 处理和经生理盐水处理（对照）的大鼠血浆中代谢物存在显著差异。2 组大鼠血浆中共检测出 2 711 个代谢物，其中 293 个为差异代谢物，大多数差异代谢物是脂质，主要是甘油酯，如甘油一酯、甘油二酯和甘油三酯；同时，2 组大鼠血浆中共检出 782 个蛋白质，包括 38 个差异蛋白质；从 2 组大鼠血液样本的转录组数据中筛选出 147 个差异表达基因。利用京都基因与基因组百科全书（KEGG）数据库，对这些差异代谢物、蛋白质及基因进行注释和通路富集分析。结果显示，差异代谢物主要富集于机体代谢相关通路（如代谢通路、甘油酯代谢和胆固醇代谢）以及免疫相关疾病通路（如新型冠状病毒感染通路、NK 细胞介导的细胞毒性通路、NF-κB 信号通路和肝细胞癌通路）。该研究首次从分子水平上揭示了 CCs 有益于身体代谢和免疫防御。

关键词：冬虫夏草繁育品；保健功能；多组学技术；代谢组学；蛋白质组学；转录组学

中图分类号：R285.5 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2025)02-0205-12

引用：辛梦茹，谢 地，毛维东，等．冬虫夏草繁育品保健功能的多组学研究［J］．中国医药工业杂志，2025, 56(2)：205-216．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.02.009

Multi-omics Investigation into the Healthy Functions of Cultured *Cordyceps sinensis*

XIN Mengru[1], XIE Di[1], MAO Weidong[2], ZHOU Li[3*], GUO Shan[4*], HU Hankun[1*]

(*1. Dept. of Pharmacy, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071; 2. Dept. of Information Technology, Georgia Gwinnett College, Lawrenceville, USA 30043; 3. Animal Biosafety Level III Lab., School of Basic Medical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071; 4. Dept. of Biological Repositories, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071*)

ABSTRACT: Cultured *Cordyceps sinensis* (CCs) possesses similar chemical components and pharmacological activities to wild Chinese cordyceps. However, the synergistic effects of multiple chemical components on disease-preventative potentials remain unexplored. This study utilized multi-omics technologies, including LC-MS/MS-based metabolomics, proteomics, and transcriptomics, to comprehensively explore the systemic biological responses of healthy rats after irrgation of CCs for 14 days. After LC-MS measurement, 993 of water-soluble metabolites and 804 of fat-soluble metabolites were identified in homogenized CCs. Furthermore, significant differences were observed between the Rats + CCs group and the Rats + normal saline group (the control). There were 293 differential metabolites out of 2 711 metabolites measured in blood plasma, and 38 differential proteins among 782 proteins detected in blood plasma. The majority of differential metabolites were lipids, mainly glyceryl esters (e.g., monoglyceride, diglyceride, and triglyceride). Additionally, 147 differentially expressed genes (DEGs) were identified from the transcriptomic data of blood cells. Subsequently, through annotation in the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database, differential metabolites, proteins, and DEGs were enriched in body metabolism-associated pathways (e.g., metabolic pathways, glycerolipid metabolism, and cholesterol metabolism) and immune-related disease pathways (e.g., coronavirus disease pathway, NK cell-mediated cytotoxicity pathway, NF-κB signaling pathway, and hepatocellular carcinoma pathway). This is the first molecular-level evidence confirming that consuming CCs has the potential to regulate body metabolism and immune defense.

Key Words: cultured *Cordyceps sinensis*; healthy function; multi-omics technology; metabolomics; proteomics; transcriptomics

冬虫夏草（*Cordyceps sinensis*）是麦角菌科冬虫夏草菌寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座和幼虫尸体的干燥复合体[1—2]。冬虫夏草味甘，性平，归肾、肺经，具有补肾益肺、止血化痰的功效。现代研究表明其具有抗炎[3]、免疫调节[3—4]、抗氧化[5]和抗肿瘤[6]活性，可用于多种疾病的预防和治疗。同时，冬虫夏草也可作为膳食补充剂[7—8]，增强人体免疫力。

然而，由于生长环境恶劣和过度开发，野生冬虫夏草资源十分有限[8]。且野生冬虫夏草砷含量超出国家安全标准中保健食品的砷限量（1.0 mg/kg），存在较高风险[9]。因此，野生冬虫夏草的替代品受到了广泛关注。目前市场上蛹虫草的子实体、菌丝体、冬虫夏草繁育品（Cultivation of *Cordyceps sinensis*，CCs）等均已实现大规模生产[2,10—11]。这些替代品中也检测出多种生物活性物质[12—13]，但它们在体内的协同作用还缺乏深入研究。冬虫夏草保健功能的多组分分子作用机制也尚不明确。

因此，本研究采用多组学技术系统分析了灌胃给予 CCs 后大鼠的血液代谢物、蛋白质和基因表达，以从分子水平上揭示 CCs 的保健功能，如免疫调节作用、降血脂作用等。

1　仪器与试药

ExionLC AD 型高效液相色谱仪、QTRAP® 6500+ 型质谱仪、Orbitrap Exploris 480 型质谱仪、Nova 6000 型基因组分析仪（美国爱博才思公司）；nanoEASY-nLC 1200 型高效液相色谱仪、Qubit 2.0 型荧光仪、ProFlex 型 PCR 仪（美国赛默飞世尔科技公司）；Milli-Q Advantage A10 型超纯水仪（德国默克密理博公司）；CentriVap 型离心浓缩仪（美国 LABCONCO 公司）；AS 60/220.R2 型电子天平（波兰 RADWAG 公司）；DYY-6C 型电泳仪（北京六一生物科技有限公司）；Agilent 2100 型生物分析仪（美国安捷伦公司）；CFX96 TOUCH 型荧光定量 PCR 仪（美国伯乐公司）；NovaSeq 6000 型高通量测序仪（美国因美纳公司）。

甲醇、乙腈、异丙醇和甲基叔丁基醚（methyl *tert*-butyl ether，MTBE）购自德国默克公司；甲酸铵、Qubit RNA 定量试剂盒购自美国赛默飞世尔科技公司；戊巴比妥钠、甲酸、尿素、Trizma® 碱、二硫苏糖醇、碘乙酰胺、TFA 购自西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司；盐酸购自国药集团化学试剂有限公司；胰蛋白酶购自加拿大 SignalChem 公司；Empore C18 47 mm 固相萃取膜片购自美国 CDS 公司；Bradford 法蛋白质定量检测试剂盒购自生工生物工程（上海）股份有限公司；新型总 RNA 抽提试剂（Trizol 试剂）购自美国 Ambion 公司；NEBNext® Ultra™ RNA 非链特异性文库制备试剂盒购自美国纽英伦生物技术有限公司；RNA Nano 6000 试剂盒购自美国安捷伦公司；TruSeq PE 簇生成试剂盒 V3-cBot-HS 购自美国因美纳公司；AMPure XP 核酸纯化试剂盒购自美国贝克曼库尔特公司。

CCs（批号 DC-200914）由宜昌山城水都冬虫夏草有限公司提供，经东阳光研究院副主任药师李文庆鉴定，符合 ChP 2020 年版规定。室温下，CCs 原料经清洗、干燥后用万能粉碎机研磨成粗粉，然后投入气流粉碎机粉碎，得到过 200 目筛（筛孔尺寸 0.074 mm）的 CCs 微粉。精密称量 CCs 粉末 13.5 g，加入超纯水 500 mL，混匀，配制成 27 mg/mL 的 CCs 混悬液，于 －20 ℃冰箱保存备用。

6 周龄无特定病原体（specific pathogen free，SPF）雄性 SD 大鼠 18 只，体质量（150±15）g，购自斯贝福（北京）生物技术有限公司。实验动物质量合格证号为 SCXK（京）2019-0010。在试验开始前，将大鼠置 20 ～ 25 ℃、相对湿度 40%～ 70%、12 h 暗 / 光循环、自由饮水及饮食条件下，适应性饲养 3 d。动物试验已通过武汉大学中南医院实验动物福利伦理委员会批准（批准号 ZN2021244），所涉及的所有动物试验均严格按照《实验动物管理条例》执行。

2　方法与结果

2.1　动物分组与给药

根据 ChP 2020 年版的标准，体质量 70 kg 的成人口服冬虫夏草的日剂量为 3 ～ 9 g。按人与动物间体表面积转化率，将人体剂量乘以 6.2 即转换为大

收稿日期：2024-10-19

基金项目：2022 年中国药学会医院药学科研专项资助项目（CPA-Z05-ZC-2022-002）、2022 年湖北省“揭榜制”科技项目（2022-35）、2024 年武汉大学学位与研究生教育教学改革研究项目（2024YBXM-019）

作者简介：辛梦茹（1999—），女，硕士研究生，专业方向：中药质量评价新方法及中药功效的科学表征。

通信作者：胡汉昆（1970—），男，主任药师，副教授，博士生导师，从事中药质量评价新方法及中药功效的科学表征研究。

E-mail：huhankun@whu.edu.cn

郭　珊（1989—），女，副研究员，从事生物样本质谱多组学研究。

E-mail：sguo@whu.edu.cn

周　立（1983—），男，副教授，从事模式动物及病毒学研究。

E-mail：zhouli_jerry@whu.edu.cn

鼠剂量[14]。根据药材入汤剂煎煮与粉末入药剂量的区别换算方法，大部分中药破壁饮片剂量为传统饮片用量的 1/4 至 1/2（本研究选用 1/3）时，即可产生与传统饮片相近或更强的药效作用[15]。照下式计算，大鼠的生物等效剂量为 90 ～ 270 mg/kg，选定大鼠的用药剂量为 270 mg/kg。

$$D(\text{Rat})=\frac{D(\text{Human})}{70}\times 6.2\times\frac{1}{3}$$

式中：D(Rat) 是大鼠的生物等效剂量 /(mg·kg^{-1})；D(Human) 是成人剂量 /(mg·kg^{-1})。

将 18 只 SD 大鼠随机分为 2 组，每组 9 只。试验组（Rats+CCs 组）大鼠连续 14 d 灌胃给予 CCs 混悬液，剂量为 270 mg/kg；对照组（Rats+ 生理盐水组）灌胃给予等体积无菌 0.9% 氯化钠溶液。D15，所有大鼠禁食 12 h 后腹腔注射 1% 戊巴比妥钠溶液，剂量为 40 mg/kg，然后采集大鼠颈动脉血液，置含肝素钠的真空抗凝管中，4 ℃离心 (845×*g*) 10 min，取上清液即得血浆样本；经液氮速冻后，置 －80 ℃冰箱中保存，用于代谢组学和蛋白组学检测。另保留全血样本，于 －80 ℃冰箱中保存，用于转录组学分析。

2.2 代谢组学分析

2.2.1 样品处理和 LC-MS/MS 分析

CCs 中水溶性代谢物的提取：参考文献[16]方法，精密称取 CCs 200 mg(*n*=4)，加入 70% 甲醇水溶液 400 μL 并涡旋 3 min，冰水浴超声处理 10 min，继续涡旋 1 min，在 －20 ℃冰箱中静置 30 min，以尽可能沉淀样品中的蛋白质。4 ℃离心 (113 523×*g*) 10 min，取上清液 300 μL，再于 4 ℃离心 (113 523×*g*) 3 min，取上清液 200 μL，用于后续 LC-MS/MS 分析。

大鼠血浆中水溶性代谢物的提取：精密移取试验组 (*n*=9) 和对照组 (*n*=9) 血浆样品各 50 μL，分别加入乙腈和甲醇（体积比 1 ∶ 4)300 μL，涡旋 3 min，4 ℃离心 (113 523×*g*) 10 min，取上清液 200 μL，于 －20 ℃冰箱中静置 30 min，取上清液于 4 ℃离心 (113 523×*g*) 3 min，取上清液用于后续 LC-MS/MS 分析。

CCs、血浆中脂溶性代谢物的提取：参考文献[17]方法，取 CCs 20 mg 或血浆 50 μL，加入 MTBE 和甲醇（体积比 3 ∶ 1)1 mL，涡旋 15 min，加入水 200 μL 并涡旋 1 min，4 ℃离心 (113 523×*g*) 10 min，移取上层有机相，浓缩后向剩余物中加入乙腈和异丙醇（体积比为 1 ∶ 9)200 μL 复溶，4 ℃离心 (113 523×*g*) 3 min，移取上清液用于后续分析，并从已处理的待测样本中取部分混合成质量控制样本。

检测水溶性代谢物的色谱条件：色谱柱 Waters ACQUITY HSS T3 C_{18} 柱 (2.1 mm×100 mm，1.8 μm)；流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液，B 为 0.1% 甲酸的乙腈溶液，梯度洗脱 (0—10 min，B 5%—90%；10—12 min，B 90%；12—12.1 min，B 90%—5%；12.1—14 min，B 5%)；柱温 40 ℃；流速 0.4 mL/min；进样量 2 μL。

检测脂溶性代谢物的色谱条件：色谱柱 Thermo Accucore™ C_{30} 柱 (2.1 mm×100 mm，2.6 μm)；流动相 A 为 60% 乙腈水溶液（含 0.1% 甲酸和 10 mmol/L 甲酸铵），B 为 10% 乙腈的异丙醇溶液（含 0.1% 甲酸和 10 mmol/L 甲酸铵），梯度洗脱 (0—2 min，B 20%—30%；2—4 min，B 30%—60%；4—9 min，B 60%—85%；9—14 min，B 85%—90%；14—15.5 min，B 90%—95%；15.5—17.3 min，B 95%；17.3—17.5 min，B 95%—20%；17.5—20 min，B 20%)；柱温 45 ℃；流速 0.35 mL·min^{-1}；进样量 2 μL。

质谱条件：离子源 电喷雾离子源；检测模式 正离子模式和负离子模式；离子源温度 500 ℃；正离子喷雾电压 5 500 V；负离子喷雾电压 －4 500 V。质量扫描范围：*m/z* 50 ～ *m/z* 1 200；数据采集模式 多反应监测 (multiple reaction monitoring，MRM) 模式；喷雾气 高纯空气，379.21 Pa(55 psi)（亲水性代谢物）、310.26 Pa(45 psi)（亲脂性代谢物）；辅助加热气 高纯空气，413.69 Pa(60 psi)（亲水性代谢物）、379.21 Pa(55 psi)（亲脂性代谢物）；脱溶剂气 氮气，172.37 Pa(25 psi)（亲水性代谢物）、241.32 Pa(35 psi)（亲脂性代谢物）；碰撞气 氮气，高（亲水性代谢物）、中（亲脂性代谢物）。每个离子对根据优化的去簇电压和碰撞能进行扫描检测。

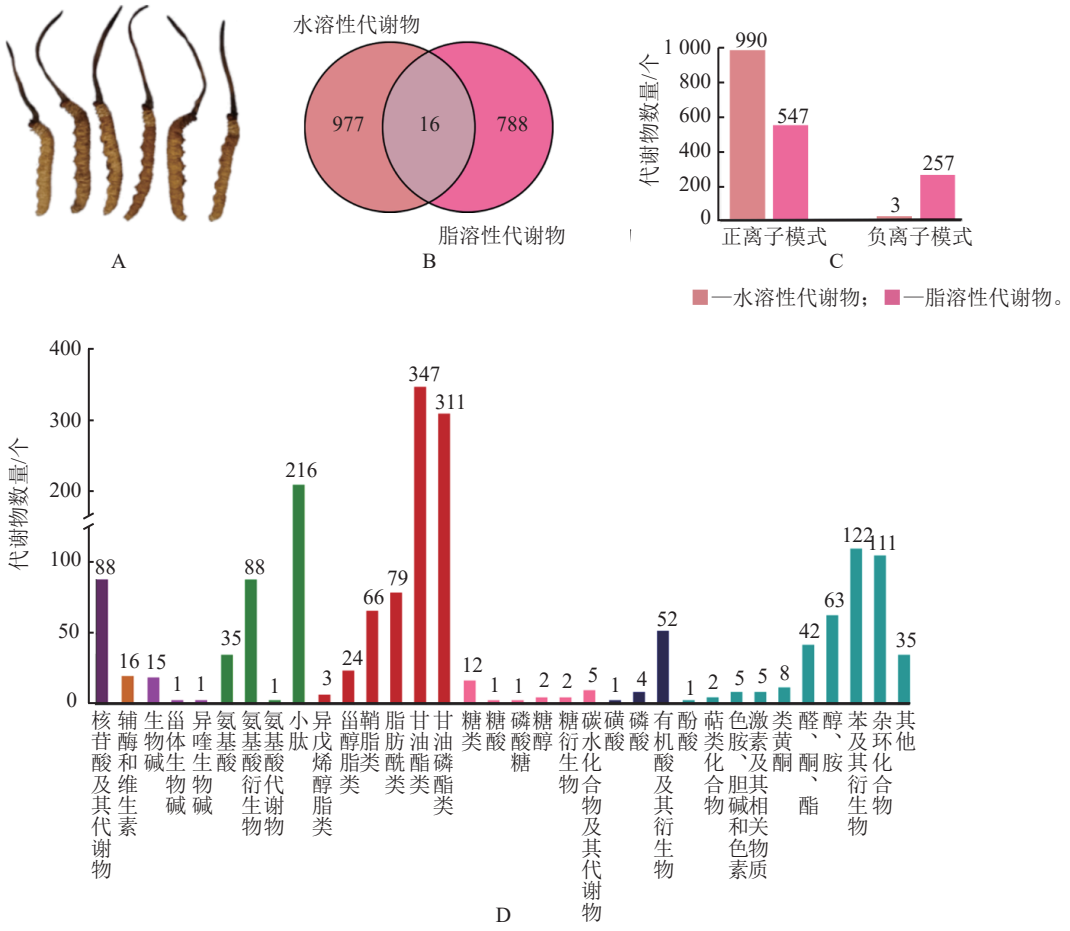
2.2.2 数据处理

采用 Analyst 1.6.3 软件，将保留时间、母离子 / 子离子信息和 MS/MS 谱图与自建的 MetWare 数据

库和公共数据库［包括 Metlin（http://metlin.scripps.edu）数据库、人代谢数据库（Human Metabolome Database，HMDB，https://hmdb.ca）、京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG，https://www.kegg.jp）］中的信息匹配，进行代谢产物鉴定。使用 MultiQuant 3.0.3 软件对色谱峰进行积分和校正。使用 R 3.5.0 软件进行差异代谢物的 KEGG 通路富集分析。

2.2.3　CCs 中水溶性代谢物和脂溶性代谢物分析

冬虫夏草（图 1A）的生物活性与多种天然化学成分密切相关[18]。为此，本研究基于 LC-MS/MS 的广泛靶向代谢组学和脂质组学技术分析了 CCs 中的水溶性代谢物和脂溶性代谢物。结果（图 1）显示，在正离子模式下，在水相和有机相中分别检测到 990 个水溶性代谢物和 547 个脂溶性代谢物；在负离子模式下，在水相和有机相中分别检测到 3 个水溶性代谢物和 257 个脂溶性代谢物。即经过 LC-MS/MS 测试，在 CCs 中共检测到 993 个水溶性代谢物和 804 个脂溶性代谢物；其中 16 个物质（包括 12 个溶血磷脂酰胆碱类物质、3 个溶血磷脂酰乙醇胺类物质和 1 个单硬脂酸甘油酯类物质）在水相和有机相中均检测到。从 CCs 中检测到的物质成分包括氨基酸、碳水化合物、脂质、核苷酸、有机酸、维生素、生物碱及其代谢物等。此外，从 CCs 中也检测到一些



A—CCs 实物图；B—CCs 中检测到水溶性代谢物和脂溶性代谢物维恩图；C—正离子模式和负离子模式下水溶性代谢物和脂溶性代谢物数量；D—CCs 中检测到的代谢物分类。

图 1　CCs 的代谢组学和脂质组学检测结果

Fig.1　Metabolomics and Lipidomics Characterization of CCs

常见的生物活性物质，例如，虫草素、甘露醇、麦角甾醇、鞘磷脂、生物碱和类黄酮化合物[3,19—22]。上述结果表明，CCs 中包含丰富的化学组分。

2.2.4 血浆样品的代谢组学和脂质组学差异分析

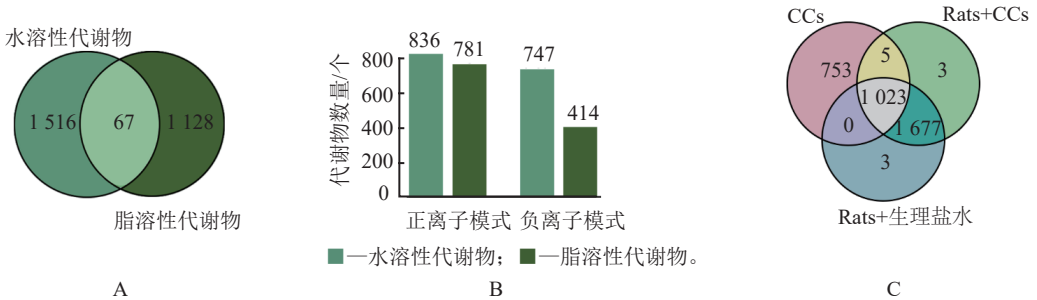
取“**2.1**”项下的大鼠血浆样本，按“**2.2.1**”项下方法进行代谢组学和脂质组学检测。结果如图 2 所示，在正离子模式下检测到 836 个水溶性代谢物和 781 个脂溶性代谢物；在负离子模式下检测到 747 个水溶性代谢物和 414 个脂溶性代谢物。即从大鼠血浆中共检测到 1 583 个水溶性代谢物和 1 195 个脂溶性代谢物，包括脂质、氨基酸、核苷酸、碳水化合物、有机酸、维生素、生物碱及其代谢物；其中 67 个化合物在水相和有机相中均能检测到，包括 24 个脂肪酰类物质、39 个甘油磷脂类物质、3 个胆汁酸类物质和 1 个激素相关化合物。2 组大鼠血浆中共检测出 2 711 个代谢物。与对照组的检测结果相比，有 8 个代谢物［甘油二酯（15 ： 0_18 ： 0）、溶血磷脂酰乙醇胺（17 ： 1/0 ： 0）、*N*-ω- 乙酰基组胺、2- 苯乙酰胺、5a- 雄甾烷 -3a,17b- 二醇、Ile-Val 二肽、Thr-Leu 二肽和 Thr-Ile 二肽］只在试验组大鼠的血浆中检测到。值得注意的是，8 个代谢物中有 3 个，即溶血磷脂酰胆碱（O-20 ： 3）、（4*Z*,7*Z*,10*Z*,13*Z*,17*Z*,19*Z*）-16- 羟基二碳氧烷 -4,7,10,13,17,19- 己烯酸和 Leu-Ile 二肽，仅在对照组大鼠的血浆中检测到，另 5 个代谢物在 CCs 中也能够检测到。将 CCs 与大鼠血浆中的代谢物进行对比，753 个化合物只在 CCs 中检测到，包括 12 个生物碱、155 个氨基酸及其代谢物、14 个碳水化合物及其代谢物、6 个辅酶和维生素。

采用正交偏最小二乘判别分析（orthogonal partial least squares discriminant analysis，OPLS-DA）评估 CCs 诱导的大鼠血浆代谢组学改变，结果如图 3A 所示。如图 3B 所示，选取差异倍数（fold change，FC）≥ 1.5 或≤ 0.67，P<0.05 为标准，共筛选出 293 个差异代谢物（67 个上调，226 个下调）。如图 3C 所示，在试验组中显著下调的 226 个代谢物中，有 180 个属于脂质，其中的 157 个为甘油酯，包括 3 个甘油一酯（monoglyceride，MG）类物质、21 个甘油二酯（diglyceride，DG）类物质、133 个甘油三酯（triglyceride，TG）类物质。这表明 CCs 具有一定的降血脂作用[23—24]。基于 KEGG 数据库的通路富集分析结果如图 4 所示，差异代谢物更多富集于脂质代谢相关通路，例如维生素消化吸收通路、生热作用通路、脂肪细胞中脂肪分解的调节通路、代谢通路、脂质和动脉粥样硬化通路、胰岛素抵抗通路、甘油脂质代谢通路、脂肪消化吸收通路以及胆固醇代谢通路。上述研究表明，服用 CCs 可引起健康大鼠血浆代谢组学变化，降低血浆中的甘油酯水平。

2.3 蛋白质组学分析

2.3.1 样品处理和 LC-MS/MS 检测

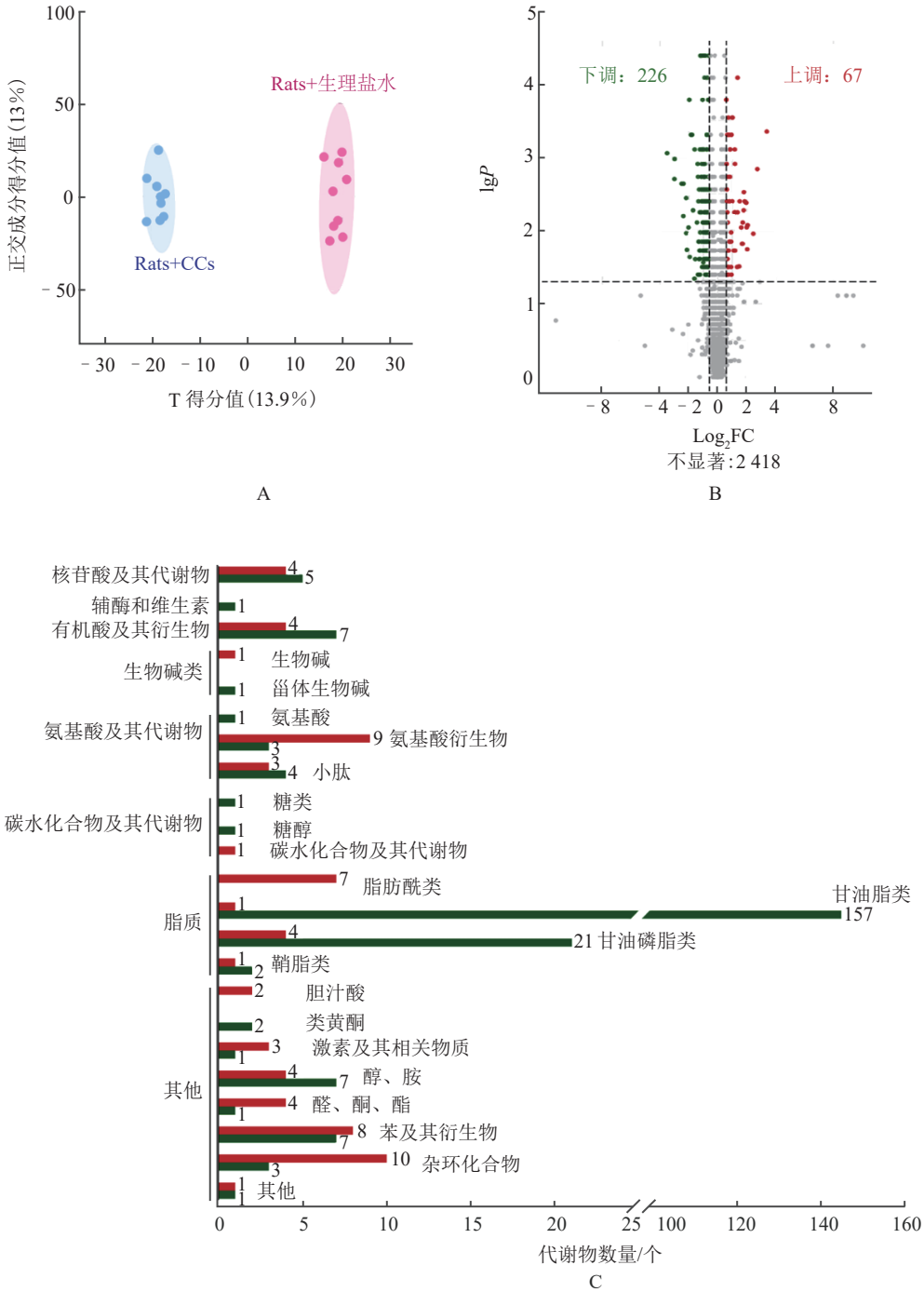
样品处理：参考文献[25]方法，精密移取试验组（n=4）和对照组（n=4）血浆样品 100 μL，加入



A—大鼠血浆中水溶性代谢物和脂溶性代谢物维恩图；B—正离子模式和负离子模式下水溶性代谢物和脂溶性代谢物数量；C—大鼠血浆和 CCs 中检测出的代谢物维恩图。

图 2 大鼠血浆样品的代谢组学和脂质组学检测结果

Fig.2 Metabolomics and Lipidomics Profiling of Rat Plasma Samples



A—两组大鼠血浆代谢物OPLS-DA分析结果；B—两组大鼠血浆代谢物火山图；C—两组大鼠血浆差异代谢物分类（■—上调；■—下调。）。

图 3　试验组和对照组大鼠血浆的代谢组学差异

Fig.3　Metabolomic Differences between the Plasma of the Test and the Control Group Rats

8 mol/L 尿素、100 mmol/L Tris-HCl 溶液（pH 8.0），水浴超声后加入二硫苏糖醇，37 ℃下孵育 1 h，于室温、暗处加入碘乙酰胺。采用考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度。向还原、烷基化后的样品中加入 100 mmol/L Tris-HCl 溶液，将尿素浓度稀释至 2 mol/L 以下，加入胰蛋白酶，于 37 ℃孵育过夜，加入 TFA 终止反应。取上清液，加至使用 Empore C18 47 mm 固相萃取膜片自填的 Sep-Pak C18 小柱进行脱盐，

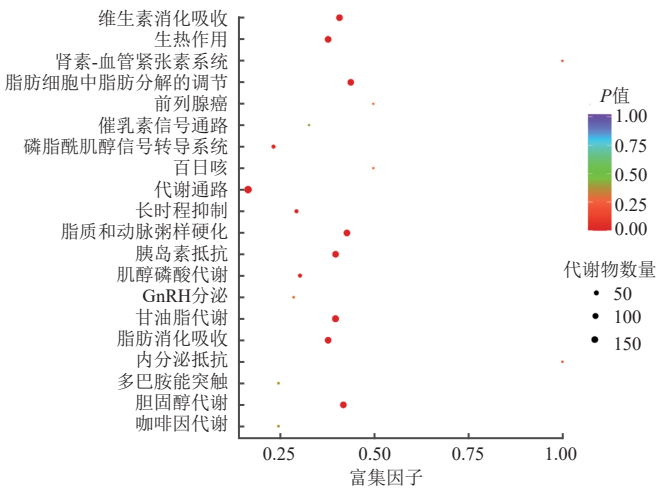


图 4 试验组和对照组大鼠血浆中差异代谢物的 KEGG 富集分析结果

Fig.4 KEGG Enrichment Analysis Result of the Differential Metabolites Found in the Plasma Samples of the Test and the Control Group Rats

抽干后于 －20 ℃冻存。检测时将肽段样品溶解于 0.1%甲酸水溶液中，采用 nanoEASY-nLC 1200 型高效液相色谱仪、Orbitrap Exploris 480 型质谱仪进行 LC-MS 分析。

色谱条件：色谱柱 Dr. Maisch ReproSil-Pur 120 C_{18}-AQ 柱（75 μm×25 cm，1.9 μm）；流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液，B 为含 0.1%甲酸的 80%乙腈溶液，梯度洗脱（0—40 min，B 8%—24%；40—52.5 min，B 24%—45%；52.5—53.5 min，B 45%—90%；53.5—60 min，B 90%）；柱温 50 ℃；流速 300 nL/min；进样量 2 μL。

质谱条件：离子源 Nanospray Flex 纳升离子源；扫描模式 正离子扫描模式；离子传输管温度 320 ℃；喷雾电压 2 400 V；数据扫描模式 数据非依赖采集（data independent acquisition，DIA）；高场非对称波形离子迁移谱补偿电压 －45 V；碰撞能量 30%。每个扫描周期包括一个全扫描质谱（分辨率 60 K；自动增益控制 3×10^6；最大离子注入时间 30 ms；扫描范围 *m/z* 350 ～ *m/z* 1 250）和 40 张可变窗口的二级质谱扫描（分辨率 30 K；自动增益控制 1 000%；最大离子注入时间 50 ms）。

2.3.2 数据处理

使用 DIA-NN V1.7.16 软件处理原始 MS 数据。利用 DIA-NN 的深度学习算法，基于 Swiss-Prot 大鼠数据库（https://www.uniprot.org）生成预测光谱库。用预测的谱图库以及 MBR 函数得到的谱图库对 DIA 原始数据进行提取，得到蛋白定量信息，最终结果以 1%的错误发现率对母离子和蛋白水平进行筛选，获得蛋白质组学的定量信息。通过局部序列比对检索基本工具（basic local alignment search tool，BLAST，https://blast.ncbi.nlm.nih.gov）比对（$e \leqslant 10^{-5}$）进行基因本体论（gene ontology，GO）、KEGG、蛋白相邻类聚簇（cluster of orthologous groups of proteins，COG）数据库注释，通过 R 3.5.0 软件进行 KEGG 通路富集分析。

2.3.3 结果

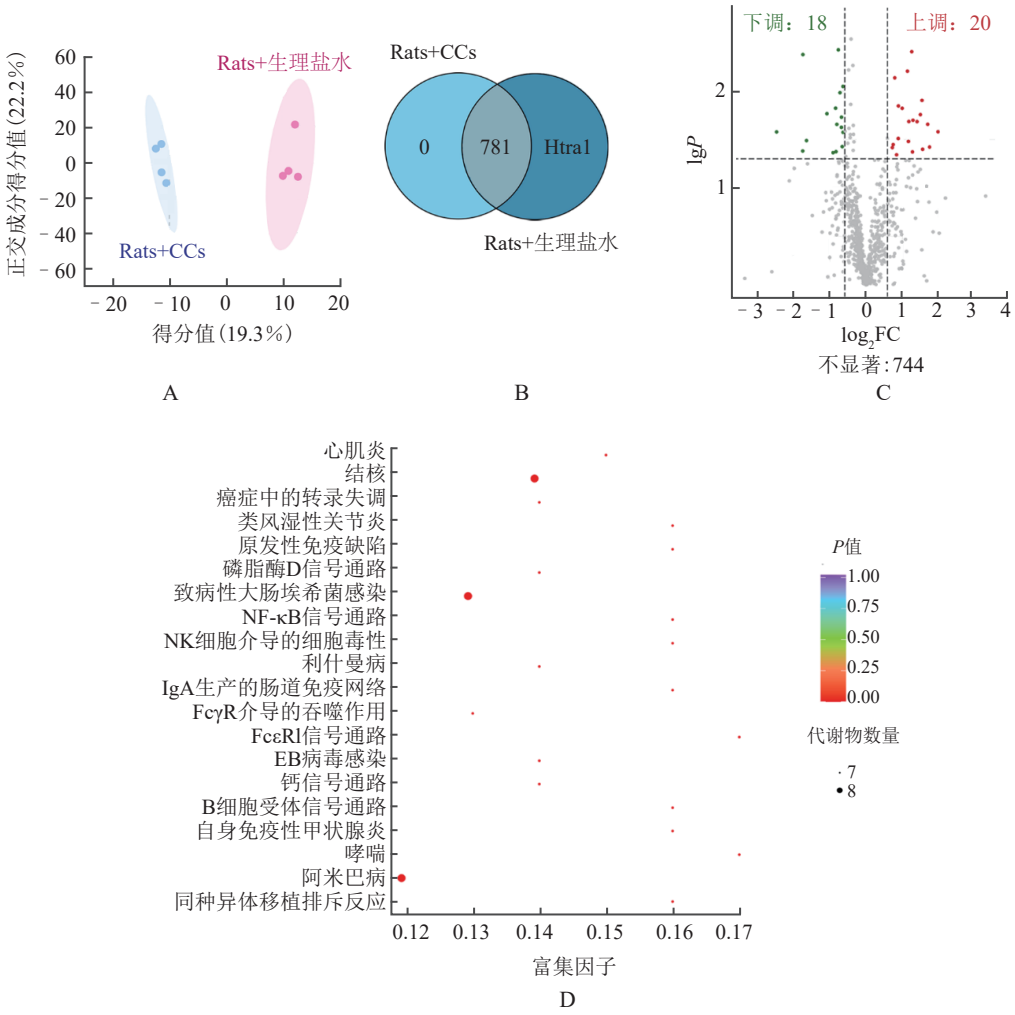
取“**2.1**”项下大鼠血样进行蛋白质组学检测。OPLS-DA 分析结果如图 5A 所示，试验组与对照组大鼠的血浆蛋白质组明显分离，存在差异。图 5B 显示，在试验组与对照组大鼠血浆中均检测到的蛋白质共 781 个，而 Htra 1 蛋白只在对照组大鼠血浆中检测到。基于 FC ≥ 1.5 或≤ 0.67 和 P<0.05 的标准，共筛选出 38 个差异表达蛋白质。KEGG 数据库富集分析结果（图 5D）显示，差异表达蛋白质主要定位于与免疫相关的结核病通路、致病性大肠埃希菌感染通路和阿米巴病通路。与先前报道[3—4]一致，CCs 可能与其他品类冬虫夏草一样具有免疫调节作用。

2.4 转录组学分析

2.4.1 RNA-Seq 测序和转录组分析

按说明书，用 Trizol 试剂分别提取试验组（n=5）和对照组（n=5）大鼠血浆（100 μL）中的总 RNA。使用 1%琼脂糖凝胶检查 RNA 的降解和污染情况。使用 Qubit 2.0 型荧光仪，按 Qubit RNA 定量试剂盒说明书检测 RNA 浓度。使用 RNA Nano 6000 试剂盒在 Agilent 2100 型生物分析仪上检查 RNA 完整性。

按 NEBNext® Ultra™ RNA 非链特异性文库制备试剂盒说明书生成测序文库，按 AMPure XP 核酸纯化试剂盒说明书筛选 200 bp 左右的 cDNA，进行 PCR 扩增并纯化 PCR 产物，获得文库。使用荧光仪对文



A—两组大鼠血浆蛋白质的 OPLS-DA 分析结果；B—两组大鼠血浆蛋白质的维恩图；C—两组大鼠血浆蛋白质的火山图；D—两组大鼠血浆差异蛋白质的 KEGG 富集分析。

图 5　试验组和对照组大鼠血浆中由 CCs 导致的差异的蛋白质组学分析

Fig.5　Proteomics Analysis of CCs-induced Changes between the Plasma Samples of the Test and the Control Group Rats

库进行初步定量，稀释文库至 1.5 ng/μL，使用生物分析仪评估文库质量，并进行实时定量反转录 PCR，以准确定量文库有效浓度（高于 2 nmol/L）。使用高通量测序仪对文库测序并产生 150 bp 的末端读数。

2.4.2　数据处理

初始数据经 fastp 0.19.3 软件过滤，标准如下：①删除带接头的读序；②删除未识别核苷酸（N）占比大于 10%的读序；③删除低质量（$Q \leqslant 20$）碱基数占比超过 50%的读序。使用 HISAT 2.1.0 软件比对高质量序列与大鼠参考基因组 *Rattus norvegicus*。

基因的表达水平通过每 1 000 个碱基转录物的片段数 / 百万序列（fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments，FPKM）进行量化。使用 featureCounts 1.6.2 软件计算基因的对比情况和 FPKM 值，使用 DESeq 2 1.22.1 软件进行差异基因表达分析，以 Benjamini-Hochberg 方法校正 *P* 值，并以 $|\log_2 FC| \geqslant 1$ 且 $P<0.05$ 为条件筛选差异基因表达。使用 R 3.5.0 软件进行 OPLS-DA 和 KEGG 通路富集分析。

2.4.3　结果

通过转录组学分析评估 CCs 能否导致大鼠血液样本中基因表达的变化。结果（图 6）显示，试验组

和对照组大鼠血液样本的基因表达水平存在差异。与对照组相比，在试验组中检测到 44 个下调基因和 103 个上调基因（$|\log_2 FC| \geq 1$ 且 $P<0.05$，图 6B）。较多的差异表达基因与Ⅰ型人类嗜 T 淋巴细胞病毒（human T-cell lymphotropic virus-1，HTLV-1）感染通路、1 型单纯疱疹病毒（herpes simplex virus 1，HSV-1）感染通路和人类疱疹病毒 4 型（EB 病毒）感染通路相关（图 6C）。此外，蛋白质组学和转录组学的富集分析结果显示，差异蛋白质及差异表达基因均涉及免疫相关通路，如病毒性心肌炎通路、产生 IgA 的肠道免疫网络、自身免疫性甲状腺疾病通路、哮喘通路和同种异体移植排斥反应通路等。这些结果表明，CCs 可引起免疫相关蛋白质及基因表达变化。

2.5 多组学数据整合分析

最后，为进一步解释 CCs 的保健功能，对代谢组学、蛋白质组学和转录组学的数据进行整合分析，并使用 KEGG 通路数据库筛选差异物质的共同通路。在本研究中，用于代谢组学、脂质组学分析的大鼠是每组各 9 只（n=9），对其中 4 只大鼠的血浆样本进行蛋白质组学分析（n=4），另外 5 只大鼠的血液样本进行转录组学分析（n=5）。先分别寻找代谢组学 - 脂质组学与蛋白质组学的共同通路，以及代谢组学 - 脂质组学与转录组学的共同通路，再寻找 3 个组学的共同通路。

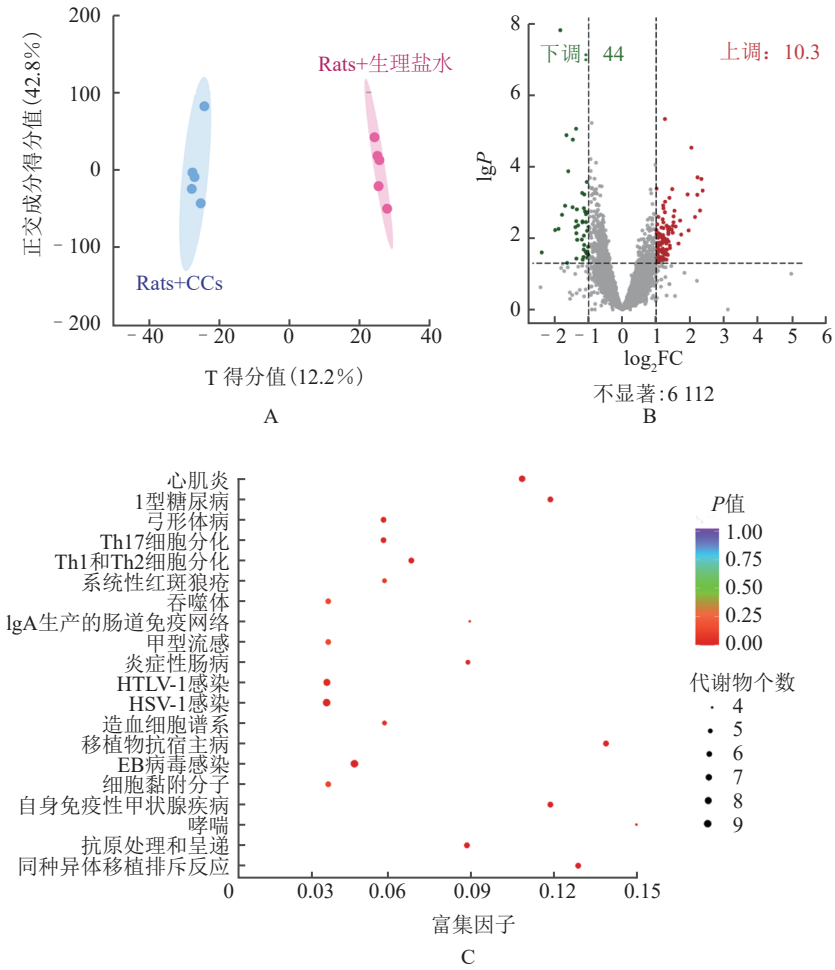
将上述筛选出的差异代谢物、差异蛋白质及差异表达基因映射到 KEGG 通路数据库中，通过寻找共同通路信息，揭示 CCs 中多种组分的潜在协同效应。从代谢组学和蛋白质组学数据中富集的前 20 个共同通路如图 7A 所示；从代谢组学和转录组学数据中富集的前 20 个共同通路如图 7B 所示。在 3 个组学中均显著富集到的 KEGG 通路包括代谢通路、新型冠状病毒感染通路、自然杀伤细胞（natural killer cell，NK 细胞）介导的细胞毒性通路、NF-κB 信号通路和肝细胞癌通路。共同通路中的差异代谢物、差异蛋白质和差异表达基因详见表 1。差异代谢物甘油二酯（18 ∶ 1_20 ∶ 1）涉及新型冠状病毒感染、NK 细胞介导的细胞毒性、NF-κB 信号和肝细胞 4 个通路；有 7 个差异表达蛋白质均涉及新型冠状病毒感染通路、NK 细胞介导的细胞毒性通路和 NF-κB 信号通路。这些结果表明，服用 CCs 具有调节机体代谢和免疫相关疾病状态的潜力。

3 总结与讨论

已有研究[26—27]表明冬虫夏草野生品及其替代品具有多种药理学作用。这些研究[19, 27]多集中在单一生物活性物质上，忽视了冬虫夏草中多种成分的协同作用。中国是世界上最大的冬虫夏草消费市场，并且已成功实现了冬虫夏草的大规模生态繁育，繁育品的形态和显微特征与野生品相同[2]。然而，CCs 的保健功能在分子水平上还缺乏高质量的基础研究。因此，本研究通过多组学方法，全面分析了 CCs 中的多种化学组分及大鼠摄入后潜在的疾病预防作用。从 CCs 中共检测到 1 700 多种代谢物，包括脂质、氨基酸、核苷酸、碳水化合物、有机酸、维生素、生物碱及其代谢物，为进一步从 CCs 中发掘更多的生物活性物质提供了丰富信息。与对冬虫夏草的水提物、乙醇提取物或其他提取物的药理活性研究[28—29]不同，本研究通过灌胃方式直接给予大鼠 CCs，再采用多组学技术研究试验组和对照组大鼠间系统生物学变化，探究其在多组学水平上的协同作用。

代谢组学研究结果表明，试验组大鼠血浆中甘油酯水平（包括 MG、DG 和 TG）显著低于对照组；且 2 组大鼠之间的显著差异代谢物和脂质与机体代谢相关。这些结果为揭示 CCs 在代谢相关疾病中的应用提供了有力证据。蛋白质组学和转录组学的结果显示，2 组大鼠间的差异蛋白质和差异表达基因多富集在免疫相关的感染疾病通路上。3 个组学的共同通路也定位于代谢和免疫相关通路，如 NF-κB 信号通路。综上所述，多组学分析提供了大鼠体内 CCs 协同作用的分子图谱全景信息，未来有必要进一步研究 CCs 和其他冬虫夏草品种在体内吸收的原型和代谢产物，以及适应证模型研究，以科学表征其功能与主治疾病。

本研究基于代谢组学、蛋白质组学和转录组学等多组学技术，模拟中国消费者日常在健康状态下



A—两组大鼠血液样本转录组的 OPLS-DA 分析结果；B—两组大鼠血液样本转录组的火山图；C—两组大鼠血液样本中差异表达基因的 KEGG 富集分析。

图 6　试验组和对照组大鼠血液样本中由 CCs 导致的差异的转录组学分析

Fig.6　Transcriptomics Analysis of CCs-induced Changes between the Blood Samples of the Test and the Control Group Rates

服用 CCs 的保健应用场景，在健康大鼠模型上全面研究了 CCs 的保健功能，进一步揭示了 CCs 在体内的协同作用和系统生物学响应，表征其对机体代谢和免疫功能的潜在影响。

参考文献：

[1] SUNG G H, HYWEL-JONES N L, SUNG J M, *et al*. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi [J]. *Stud Mycol*, 2007, **57**: 5-59.

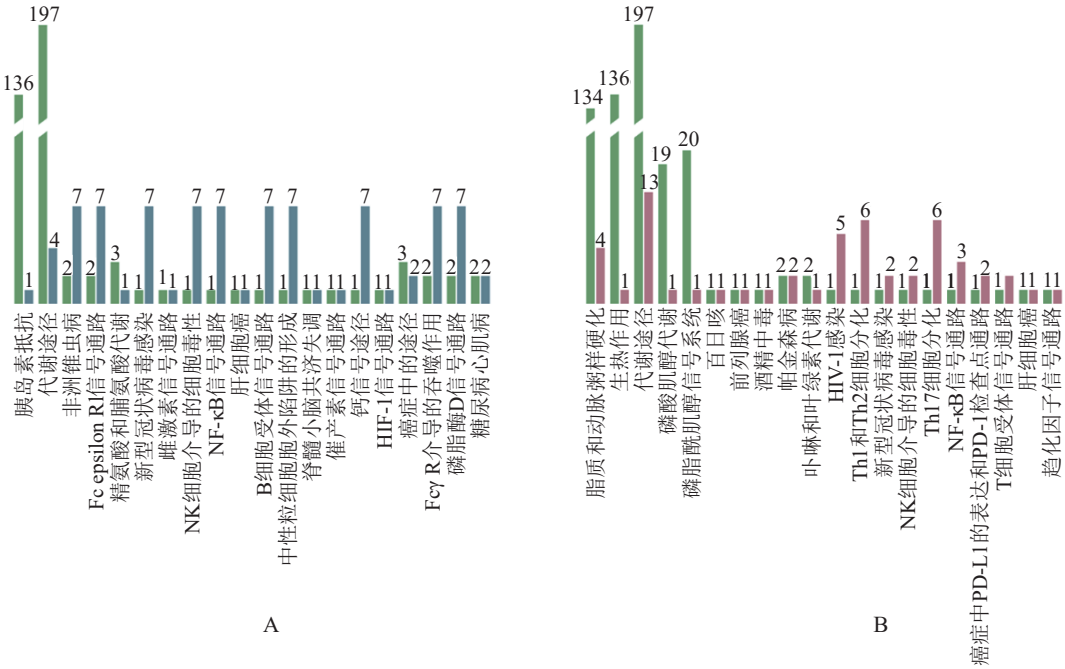
[2] LI X, LIU Q, LI W J, *et al*. A breakthrough in the artificial cultivation of Chinese *Cordyceps* on a large-scale and its impact on science, the economy, and industry [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2019, **39**(2): 181-191.

[3] MI J N, HAN Y W, XU Y Q, *et al*. Deep profiling of immunosuppressive glycosphingolipids and sphingomyelins in wild *Cordyceps* [J]. *J Agr Food Chem*, 2018, **66**(34): 8991-8998.

[4] DAS G, SHIN H S, LEYVA-GÓMEZ G, *et al*. *Cordyceps spp*. : a review on its immune-stimulatory and other biological potentials [J]. *Front Pharmacol*, 2021, **11**: 602364.

[5] XIAO M J, WANG T, TANG C Y, *et al*. Effects of drying methods on morphological characteristics, metabolite content, and antioxidant capacity of *Cordyceps sinensis* [J]. *Foods*, 2024, **13**(11): 1639.

[6] BOK J W, LERMER L, CHILTON J, *et al*. Antitumor sterols



A—共同通路中差异表达蛋白质和代谢物的数量统计图（■—代谢物数量；■—蛋白质数量）；B—共同通路中差异表达基因和代谢物的数量统计图（■—代谢物数量；■—基因表达数量）。

图 7 CCs 诱导大鼠产生的变化的多组学综合分析

Fig.7 Integrated Analyses of Multi-omics Data of CCs-induced Changes

表 1 三组学共同通路中 CCs 诱导产生的差异代谢物、差异蛋白质和差异表达基因

Tab.1 Differential Metabolites, Differential Proteins, and Differential Expression Genes Induced by CCs in the Common Pathways Searched among Three Omics Analyses

KEGG 通路	差异代谢物	差异表达蛋白质	差异表达基因
代谢途径	2 个氨基酸衍生物	PYGB_RAT	*Galnt11*
	2 个碳水化合物及其代谢物	G3P_RAT	*Bco1*
	1 个辅酶和维生素	KCRB_RAT	*Gsta6*
	6 个核苷酸及其代谢物	GSTM7_RAT	*Pde5a*
	4 个有机酸及其衍生物	—	*LOC100911417*
	8 个其他类代谢物	—	*Ivd*
	174 个脂质（1 个脂肪酰类，153 个甘油酯类，17 个甘油磷脂类，3 个鞘脂类）	—	—
新型冠状病毒感染通路	甘油二酯（18 ： 1_20 ： 1）	A0A0G2K290_RAT、A0A0G2K9Y0_RAT、D3ZFF8_RAT、D3ZC54_RAT、D3ZJW6_RAT、(RCG21066)、M0R7Q2_RAT、IGG2B_RAT	*Casp1*、*Chuk*
NK 细胞介导的细胞毒性通路	甘油二酯（18 ： 1_20 ： 1）	同上	*Nfatc1*、*Sh3bp2*
NF-κB 信号通路	甘油二酯（18 ： 1_20 ： 1）	同上	*Chuk*、*Blnk*、*Birc2*
肝细胞癌通路	甘油二酯（18 ： 1_20 ： 1）	GSTM7_RAT	*Gsta6*

from the mycelia of *Cordyceps sinensis* [J]. *Phytochemistry*, 1999, **51**(7): 891-898.

[7] ZHANG J S, YU H, LI S S, *et al*. Comparative metabolic profiling of *Ophiocordyceps sinensis* and its cultured mycelia using GC-MS [J]. *Food Res Int*, 2020, **134**: 109241.

[8] WEI Y Q, ZHANG L, WANG J N, *et al*. Chinese caterpillar fungus (*Ophiocordyceps* sinensis) in China: current distribution, trading, and futures under climate change and overexploitation [J]. *Sci Total Environ*, 2021, **755**(Pt 1): 142548.

[9] 国家药品监督管理局. 总局关于冬虫夏草类产品的消费提示[EB/OL]. (2016-02-04)[2024-09-20]. https://www.nmpa.gov.cn/yaopin/ypjgdt/20160204190401258.html.

[10] GUO S, LIN M T, XIE D, *et al*. Comparative metabolic profiling of wild *Cordyceps* species and their substituents by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Front Pharmacol*, 2022, **13**: 1036589.

[11] LIN M T, GUO S, XIE D, *et al*. Lipidomic profiling of wild *Cordyceps* and its substituents by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry [J]. *LWT*, 2022, **163**(7): 113497.

[12] LI J, CAI H W, SUN H H, *et al*. Extracts of *Cordyceps sinensis* inhibit breast cancer growth through promoting M1 macrophage polarization via NF-κB pathway activation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, **260**: 112969.

[13] HE H L, TANG J, RU D, *et al*. Protective effects of *Cordyceps* extract against UVB-induced damage and prediction of application prospects in the topical administration: an experimental validation and network pharmacology study [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, **121**: 109600.

[14] NAIR A, MORSY M A, JACOB S. Dose translation between laboratory animals and human in preclinical and clinical phases of drug development [J]. *Drug Dev Res*, 2018, **79**(8): 373-382.

[15] 成金乐, 赖智填, 陈炜璇, 等. 中药破壁饮片——传统中药饮片的传承和创新 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2016, **18**(9): 1546-1552.

[16] WANT E J, O'MAILLE G, SMITH C A, *et al*. Solvent-dependent metabolite distribution, clustering, and protein extraction for serum profiling with mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2006, **78**(3): 743-752.

[17] MATYASH V, LIEBISCH G, KURZCHALIA T V, *et al*. Lipid extraction by methyl-*tert*-butyl ether for high-throughput lipidomics [J]. *J Lipid Res*, 2008, **49**(5): 1137-1146.

[18] QU S L, LI S S, LI D, *et al*. Metabolites and their bioactivities from the genus *Cordyceps* [J]. *Microorganisms*, 2022, **10**(8): 1489.

[19] 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.

[20] WEI P J, WANG K, LUO C, *et al*. Cordycepin confers long-term neuroprotection via inhibiting neutrophil infiltration and neuroinflammation after traumatic brain injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, **18**(1): 137.

[21] ZHU R, ZHENG R, DENG Y Y, *et al*. Ergosterol peroxide from *Cordyceps cicadae* ameliorates TGF-β1-induced activation of kidney fibroblasts [J]. *Phytomedicine*, 2014, **21**(3): 372-378.

[22] JIANG Y, WONG J H, FU M, *et al*. Isolation of adenosine, iso-sinensetin and dimethylguanosine with antioxidant and HIV-1 protease inhibiting activities from fruiting bodies of *Cordyceps militaris* [J]. *Phytomedicine*, 2011, **18**(2/3): 189-193.

[23] LAUFS U, PARHOFER K G, GINSBERG H N, *et al*. Clinical review on triglycerides [J]. *Eur Heart J*, 2020, **41**(1): 99-109c.

[24] REINER Ž. Hypertriglyceridaemia and risk of coronary artery disease [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2017, **14**(7): 401-411.

[25] WU J, XIE X L, LIU Y S, *et al*. Identification and confirmation of differentially expressed fucosylated glycoproteins in the serum of ovarian cancer patients using a lectin array and LC-MS/MS [J]. *J Proteome Res*, 2012, **11**(9): 4541-4552.

[26] LIU X C, ZHU Z Y, LIU Y L, *et al*. Comparisons of the anti-tumor activity of polysaccharides from fermented mycelia and cultivated fruiting bodies of *Cordyceps militaris in vitro* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, **130**: 307-314.

[27] SONG L Y, YANG J T, KONG W H, *et al*. *Cordyceps militaris* polysaccharide alleviates ovalbumin-induced allergic asthma through the Nrf2/HO-1 and NF-κB signaling pathways and regulates the gut microbiota [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, **238**: 124333.

[28] WEI S S, PENG W B, ZHANG C X, *et al*. *Cordyceps sinensis* aqueous extract regulates the adaptive immunity of mice subjected to ^{60}Co γ irradiation [J]. *Phytother Res*, 2021, **35**(9): 5163-5177.

[29] WU J Y, ZHANG Q X, LEUNG P H. Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Cordyceps sinensis* mycelium on various cancer cells in culture and B16 melanoma in C57BL/6 mice [J]. *Phytomedicine*, 2007, **14**(1): 43-49.