

· 基础研究 ·

冬虫夏草菌粉对 5/6 肾大部切除大鼠肾脏纤维化的抑制作用及机制

潘明明 张明辉 倪海峰 陈俊峰 徐敏 刘必成

【摘要】 目的 探讨冬虫夏草菌粉对 5/6 肾大部切除术大鼠肾脏纤维化的抑制作用及其可能机制。方法 30 只雄性 SD 大鼠随机分为 3 组:假手术组(Sham 组, $n = 10$)、5/6 肾大部切除模型组(SNx 组, $n = 10$)以及 5/6 肾大部切除 + 冬虫夏草菌粉干预组(CS 组, $n = 10$)。术前及术后 4、8、12 周分别检测大鼠体质量、尿蛋白量变化,并于术后第 12 周末处死大鼠,检测血尿素氮、肌酐变化,取肾组织切片行 HE、Masson 染色观察肾脏病理变化,免疫组化观察转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 及其 I 型受体(T β R I)、II 型受体(T β R II)的表达,免疫荧光观察 E-cadherin、 α -SMA 的表达,Western 印迹法检测肾脏组织 TGF- $\beta 1$ 、T β R I、T β R II、磷酸化(p) Smad2/3、Smad7、E 钙黏蛋白(E-cadherin)、 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达。结果 术后 CS 组大鼠的体质量高于 SNx 组,尿蛋白量及血尿素氮、血肌酐低于 SNx 组。肾脏组织病理分析显示,CS 组肾小球硬化、肾小管间质损伤程度均显著低于 SNx 组(均 $P < 0.01$)。CS 组 TGF- $\beta 1$ 、T β R I、T β R II、p-Smad2/3 蛋白表达量均显著低于 SNx 组(均 $P < 0.05$),E-cadherin 蛋白表达量显著高于 SNx 组($P < 0.05$), α -SMA 蛋白表达量显著低于 SNx 组($P < 0.05$),Smad7 蛋白表达量显著高于 SNx 组($P < 0.05$)。结论 冬虫夏草菌粉对 5/6 肾大部切除大鼠肾脏纤维化具有明显的抑制作用,其机制可能是与其抑制 TGF- $\beta 1$ 及其下游信号通路以及抑制 EMT 的发生有关。

【关键词】 冬虫夏草; 纤维化; 转化生长因子 $\beta 1$; 信号通路

Effect of Cordyceps sinensis on renal fibrosis in 5/6 subtotal nephrectomy rats and its possible mechanism PAN Ming-ming, ZHANG Ming-hui, NI Hai-feng, CHEN Jun-feng, XU Min, LIU Bi-cheng. Institute of Nephrology, Zhongda Hospital, School of Medicine, Southeast University, Nanjing 210009, China

Corresponding author: LIU Bi-cheng, Email: liubc64@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Cordyceps sinensis on renal fibrosis and its possible mechanism. **Methods** Thirty Sprague - Dawley rats were randomly divided into three groups: Sham operation group (Sham, $n = 10$), 5/6 subtotal nephrectomy group (SNx, $n = 10$), and 5/6 subtotal nephrectomy treated with Cordyceps sinensis group (CS, $n = 10$). Body weights were assessed and 24 - hour urine excretion was collected before and every four weeks after surgery. Rats were sacrificed at 12 weeks after surgery. Blood samples were taken for biochemical study, and kidney tissues were used for HE and Masson stains to assess histological changes. Immunohistochemical staining was used to detect the expression of transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) and its receptors of type I (T β R I), type II (T β R II). Immunofluorescence was used to detect E-cadherin and α -SMA. The relative protein level of TGF- $\beta 1$, T β R I, T β R II, p-Smad2/3, Smad7, E-cadherin, α -SMA were examined by Western blotting. **Results** CS group had higher body weights and lower urinary

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2013.05.005

基金项目:国家自然科学基金重点项目(NO81130010)

作者单位:210009 南京,东南大学附属中大医院肾内科 东南大学医学院

通信作者:刘必成,Email:liubc64@163.com

protein, BUN and Scr level compared with SNx group. Glomerulosclerosis index and tubulointerstitial injury score were significantly reduced in CS group compared with those in SNx group (all $P < 0.05$). The protein expressions of TGF- β 1, T β R I, T β R II, p-Smad2/3 were decreased in CS group compared with those in SNx group (all $P < 0.05$). CS treatment up-regulated the expression of E-cadherin, Smad7 and down-regulated the expression of α -SMA compared with that in SNx group (all $P < 0.05$).

Conclusion Cordyceps sinensis has inhibitory effect on renal fibrosis in 5/6 subtotal nephrectomy rat model, which might be related with the suppression of TGF- β 1 signal pathway.

【Key words】 Cordyceps sinensis; Fibrosis; Transforming growth factor beta1; Signal pathway

肾脏纤维化是各种原因引起的慢性肾脏病 (CKD) 发展至终末期肾脏病 (ESRD) 的共同途径和病理特征^[1]。虽然目前 CKD 的治疗已取得了不少进展, 但每年仍有成千上万的 CKD 患者进展至 ESRD, CKD 防治仍是肾脏病领域重大挑战性课题。冬虫夏草 (CS) 是麦角菌科真菌冬虫夏草寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座及幼虫尸体的复合体, 是一种传统的名贵中药, 具有免疫调节、抗氧化、抗衰老等功效^[2-3]。天然虫草价格十分昂贵, 人工虫草菌粉多年来已在肾脏病临床广泛应用, 然而其确切作用机制仍不十分清楚。本研究通过构建 5/6 肾大部切除大鼠模型, 探讨冬虫夏草菌粉对肾脏纤维化的抑制作用及其可能的作用机制。

材料和方法

1. 材料: 冬虫夏草菌粉由杭州华东制药提供, 用双蒸水配制成 0.2 g/ml 悬液。6 周龄清洁级健康雄性 SD 大鼠 30 只, 体质量 200 ~ 220 g, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限责任公司 [SCXK (沪) 2008-0016]。TGF- β 1、T β R I、T β R II、磷酸化 (p) Smad2/3、Smad7、 α -SMA、E-cadherin 抗体 (美国 Santa Cruz), β -actin 抗体 (美国 Immunoway), 免疫组化试剂盒 (福州迈新)。

2. 模型建立及分组: 实验大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为 3 组: 假手术组 (Sham 组, $n = 10$)、5/6 肾大部切除模型组 (SNx 组, $n = 10$) 和 5/6 肾大部切除 + 冬虫夏草菌粉干预组 (CS 组, $n = 10$)。SNx 组和 CS 组大鼠在水合氯醛麻醉下行右肾全切, 选择性切除左肾上、下极各 1/3 肾组织; Sham 组仅打开腹腔, 剥离肾包膜后关腹^[4]。CS 组大鼠术后 1 周开始给予虫草菌粉 $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃, 其余两组大鼠同时给予等体积双蒸水灌胃。术前

及术后 4、8、12 周检测大鼠体质量、尿蛋白量变化, 并于术后 12 周末处死大鼠, 留取血、尿样本和肾组织标本。

3. 血尿生化指标检查: 血尿素氮 (BUN) 和肌酐 (Scr) 采用全自动生化分析仪测定, 24 h 尿蛋白量采用双缩脲法测定。

4. 肾脏病理学检查: 肾脏组织经 10% 甲醛固定、石蜡包埋, 切成 $3 \mu\text{m}$ 薄片后, 行 HE 及 Masson 染色, 光学显微镜下观察肾脏组织病理学改变, 每张切片随机选取 20 个连续不重复视野 ($\times 200$), 进行肾脏损伤评分。肾小球硬化指数: 1 分: 系膜扩张/硬化 $< 25\%$ 肾小球毛细血管襻; 2 分: $25\% \sim 50\%$; 3 分: $50\% \sim 75\%$; 4 分: $> 75\%$ 。小管间质损伤评分: 0 分: 正常; 1 分: 损伤 $< 25\%$ 皮质范围; 2 分: $25\% \sim 50\%$; 3 分: $> 50\%$ ^[5]。

5. 免疫组化: 石蜡切片脱蜡水化, 微波修复, 采用 SP 法免疫组化试剂盒, 检测指标包括 TGF- β 1、TGF- β I 型受体 (T β R I)、TGF- β II 型受体 (T β R II) (1:100 稀释), DAB 处理 2 ~ 5 min, 显微镜下观察, 控制着色时间, 苏木素复染, 所有操作按照说明书进行。每张切片随机选取 20 个连续不重复视野 ($200\times$), 行半定量分析: 无染色 (-), 轻度染色 (淡黄色, +), 中度染色 (棕黄色, 2+), 重度染色 (棕褐色, 3+)。参照免疫组化反应结果的判断标准 (1996) 进行评分。

6. 免疫荧光: $5 \mu\text{m}$ 冰冻切片, 0.25% Triton X-100 穿透 10 min, 分别加入第一抗体 E-cadherin、 α -SMA (1:200 稀释), 4°C 过夜, 加入相应的荧光标记二抗, 1 h 后显微镜下观察。

7. Western 印迹: 取 -80°C 保存的肾皮质, 加适量裂解液后匀浆, 后离心, 取上清液检测蛋白浓度。取等量组织蛋白样本变性后 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转入 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 然后分别与特异性 TGF- β 1、T β R I、T β R II、p-Smad2/3、

表 1 各组大鼠体质量、尿蛋白量变化($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	体质量(g)				尿蛋白量(mg/24 h)			
	术前	术后 4 周	术后 8 周	术后 12 周	术前	术后 4 周	术后 8 周	术后 12 周
Sham 组	229.12±5.36	317.38±12.18	386.25±6.25	417.75±9.91	5.08±0.79	5.96±1.97	7.31±1.31	6.51±1.84
SNx 组	228.88±5.00	286.38±13.81 ^a	354.12±8.37 ^a	430.38±6.69 ^a	5.74±2.40	18.97±6.17 ^a	67.85±13.65 ^a	100.49±12.11 ^a
CS 组	230.00±3.46	297.38±7.42 ^a	360.62±6.82 ^a	441.75±5.51 ^{ab}	6.81±1.68	15.69±4.88 ^a	39.68±6.31 ^{ac}	56.29±11.60 ^{ac}

注:与 Sham 组同时时间点比较,^a $P < 0.01$;与 SNx 组同时时间点比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$

Smad7、E-cadherin、 α -SMA 抗体(1:500 稀释)4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜, 再与辣根过氧化物酶标记的二抗室温下孵育 1 h, 洗膜, ECL 化学发光法曝光。以 β -actin 作为内参照, 测定蛋白相对表达水平。

8. 统计学分析: 计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析。使用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. 大鼠体质量及血、尿生化指标变化: 术后 4 周、8 周, 与 Sham 组大鼠同时时间点相比, SNx 组和 CS 组大鼠体质量均有所下降, 尿蛋白量增多, 而给予冬虫夏草菌粉治疗后, 大鼠的体质量较 SNx 组开始增加, 尿蛋白量减少, 见表 1。术后 12 周 CS 组血 BUN、Scr 均显著低于 SNx 组(均 $P < 0.01$), 见表 2。

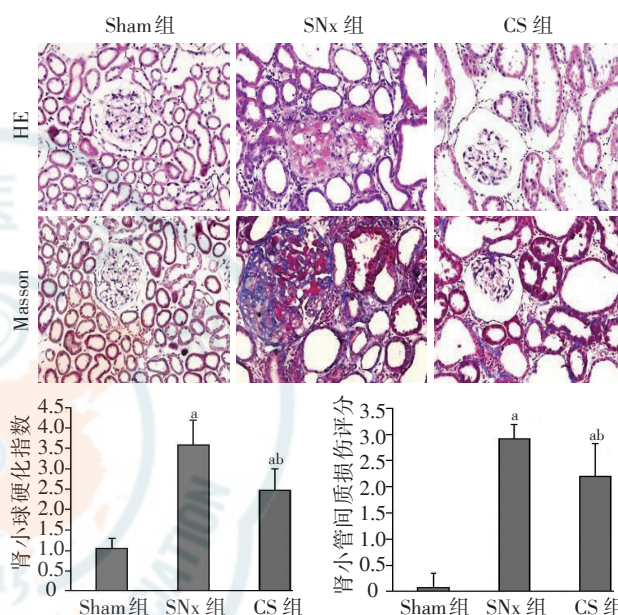
表 2 12 周末大鼠 BUN 和 Scr 变化($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	BUN(mmol/L)	Scr(μ mol/L)
Sham 组	5.89±0.39	40.38±3.85
SNx 组	13.34±0.49 ^a	120.88±12.91 ^a
CS 组	9.23±1.49 ^{ab}	59.50±9.79 ^{ab}

注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.01$;与 SNx 组比较,^b $P < 0.01$

2. 肾组织病理学改变: HE 和 MASSON 染色结果显示, SNx 组肾小球硬化明显, 系膜细胞增生, 基质增宽, 毛细血管襻闭锁, 球囊粘连; 肾小管管腔扩张, 小管上皮细胞肿胀或发生空泡变性、细胞脱落、基膜裸露, 胶原染色范围明显增大, 见图 1。CS 组肾小球硬化及肾小管间质损伤程度均较 SNx 组轻, 见图 1。

3. 冬虫夏草菌粉对肾脏 TGF- β 1-Smad 信号通



注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.01$;与 SNx 组比较,^b $P < 0.01$; $n = 5$

图 1 各组大鼠肾组织病理学改变($\times 200$)

路的影响: 免疫组化染色显示, Sham 组肾脏几乎不表达或者低表达 TGF- β 1 及其跨膜受体 T β R I、T β R II, 而 SNx 组肾小管上皮细胞其表达明显增加。免疫组化半定量分析或 Western 印迹结果显示, CS 组 TGF- β 1 及 T β R I、T β R II 蛋白表达量均显著低于 SNx 组(均 $P < 0.05$); CS 组 p-Smad2/3 表达量显著低于 SNx 组($P < 0.05$), 见图 2, 图 3。

4. 肾组织中 E-cadherin 和 α -SMA 蛋白的表达: Sham 组大鼠肾脏大量表达肾小管上皮细胞标志物 E-cadherin, 而 SNx 组 E-cadherin 表达较少, CS 组 E-cadherin 蛋白表达量显著高于 SNx 组($P < 0.05$); Sham 组大鼠肾脏几乎不表达肌成纤维细胞标志物 α -SMA, 而 SNx 组 α -SMA 表达显著增加, CS 组 α -SMA 表达量显著低于 SNx 组($P < 0.05$)。见图 3, 图 4。

5. 肾组织中 Smad7 蛋白的表达: 造模成功后给予冬虫夏草菌粉治疗至 12 周末, Smad7 的蛋白

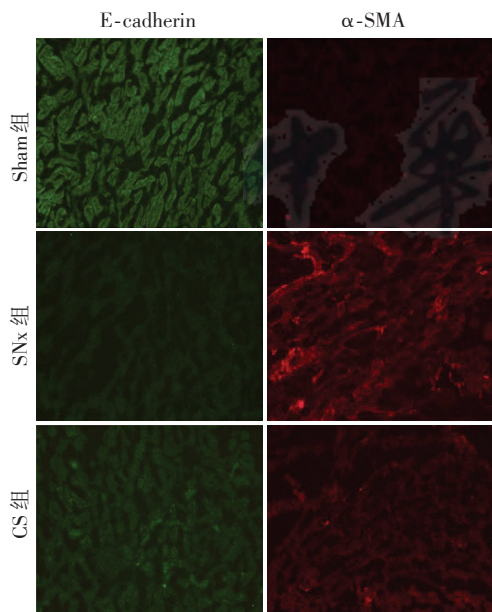
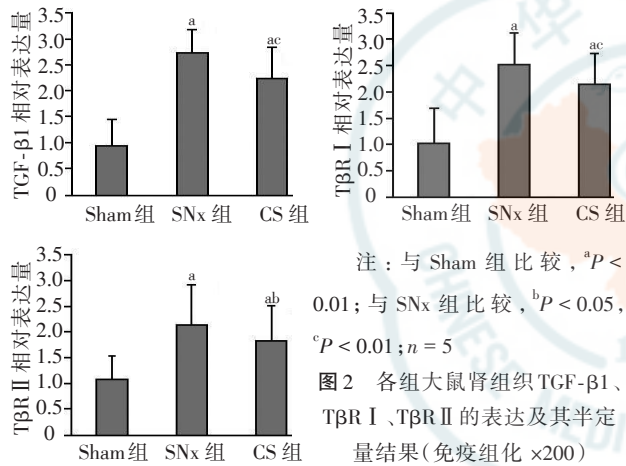
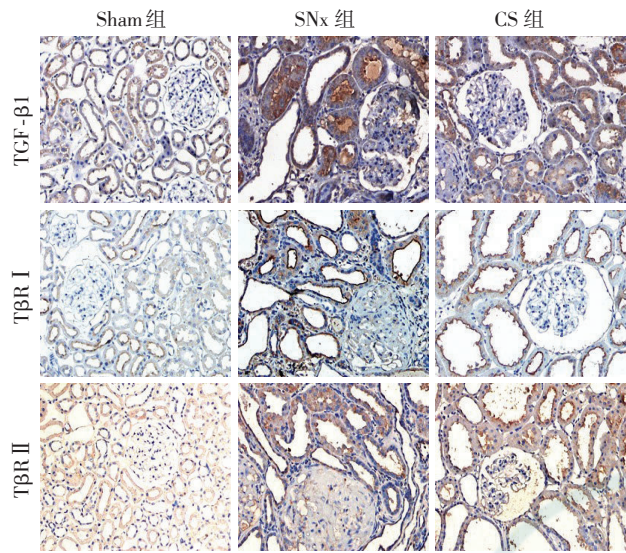


图 4 各组大鼠肾组织 E-cadherin 和 α-SMA 的表达 (免疫荧光 ×100)

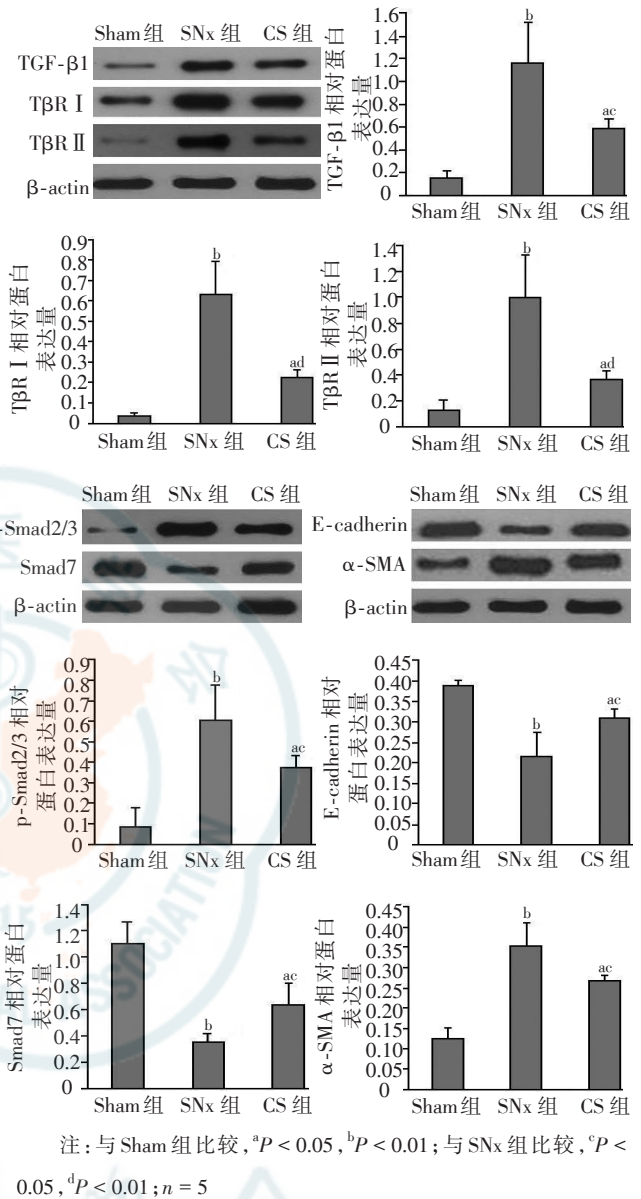


图 3 各组大鼠肾脏组织 TGF-β1、TβR I、TβR II、p-Smad2/3、Smad7、E-cadherin 和 α-SMA 的表达 (Western 印迹)

表达量显著高于 SNx 组 ($P < 0.05$)，但仍低于 Sham 组 ($P < 0.05$)，见图 3。

讨 论

TGF-β1-Smad 信号通路是目前公认的最主要的致肾脏纤维化信号通路。TGF-β1 与其膜受体 TβR II 结合后，磷酸化 TβR I，继而激活胞内受体 Smad，而 Smad2 与 Smad3 结合并磷酸化，转移到细胞核内才能发挥相应的生物学活性^[6]。研究已经证实，在体外给予 TGF-β1 中和抗体，可以抑制肾小管上皮细胞纤维化的发生^[7]，提示其可作为

抗肾脏纤维化治疗的新靶点。本研究发现,冬虫夏草菌粉对 TGF- β 1 以及跨膜受体 I 和 II 均有一定的抑制作用,对 p-Smad2/3 也有显著抑制作用,提示冬虫夏草菌粉可能部分通过抑制 TGF- β 1 以及它的下游信号通路的激活发挥抗纤维化作用。

目前多数研究者认为肾小管上皮细胞间充质转化(EMT)参与了肾脏纤维化的过程,肾小管上皮细胞失去其原有的细胞表型结构,而表现为具有肌成纤维细胞标志物细胞,继而促进了胞外基质的聚集以及纤维化进程^[8]。E-cadherin 主要表达于上皮细胞,对于维持细胞的极性以及完整性发挥了重要的影响,而 α -SMA 主要表达于激活的肌成纤维细胞。体外实验表明,TGF- β 1 可刺激肾小管上皮细胞 EMT 的发生^[9]。我们前期的实验也发现,虫草提取物虫草多糖可抑制 TGF- β 1 诱导的肾小管上皮细胞表型转化^[1]。本研究通过体内实验进一步发现,冬虫夏草菌粉可显著抑制 EMT 的发生,而这一作用可能有赖于药物对 TGF- β 1 信号通路的抑制作用。

Smad7 可以负反馈调节 TGF- β 1-Smad 信号通路^[10]。在糖尿病以及梗阻性肾病动物模型中予 Smad7 基因敲除,可观察到明显的肾脏纤维化^[11-12];而在 db/db 小鼠中行 Smad7 基因转染,肾脏损伤较对照组明显减轻^[13]。本研究发现虫草可上调 Smad7 蛋白的表达,提示冬虫夏草菌粉也可能通过增加 Smad7 蛋白的表达而发挥其抗肾脏纤维化的作用。

综上所述,本研究在肾大部切除所致肾脏纤维化模型中证实,冬虫夏草菌粉具有显著的抑制肾脏纤维化作用。该作用可能与其抑制肾脏 TGF- β 1-Smad 信号通路,进而抑制 EMT 等有关。

参 考 文 献

- [1] 宫壮, 张晓良, 高君, 等. 虫草多糖对转化生长因子 β 1 诱导人近端肾小管上皮细胞间充质转分化的影响. 中华肾脏病杂志, 2008, 24: 651-656.
- [2] El Zahraa ZEAF, Mahmoud MF, El Maraghy NN, et al. Effect of Cordyceps sinensis and taurine either alone or in combination on streptozotocin induced diabetes. Food Chem Toxicol, 2012, 50: 1159-1165.
- [3] 郭山脉, 仲芳, 周桥, 等. 冬虫夏草制剂拮抗 5/6 肾切除大鼠肾脏纤维化作用研究. 上海交通大学学报·医学版, 2012, 32: 1-8,31.
- [4] Eraranta A, Riutta A, Fan M, et al. Dietary phosphate binding and loading alter kidney Angiotensin - converting enzyme mRNA and protein content in 5/6 nephrectomized rats. Am J Nephrol, 2012, 35: 401-408.
- [5] Gadola L, Noboa O, Marquez MN, et al. Calcium citrate ameliorates the progression of chronic renal injury. Kidney Int, 2004, 65: 1224-1230.
- [6] Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF - beta superfamily. Science, 2002, 296(5573): 1646-1647.
- [7] Wang W, Koka V, Lan HY. Transforming growth factor - beta and Smad signalling in kidney diseases. Nephrology (Carlton), 2005, 10: 48-56.
- [8] Carew RM, Wang B, Kantharidis P. The role of EMT in renal fibrosis. Cell Tissue Res, 2012, 347: 103-116.
- [9] Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. Am J Pathol, 2001, 159: 1465-1475.
- [10] Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, et al. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. Mol Cell, 2000, 6: 1365-1375.
- [11] Chen HY, Huang XR, Wang W, et al. The protective role of Smad7 in diabetic kidney disease: mechanism and therapeutic potential. Diabetes, 2011, 60: 590-601.
- [12] Chung AC, Huang XR, Zhou L, et al. Disruption of the Smad7 gene promotes renal fibrosis and inflammation in unilateral ureteral obstruction (UUO) in mice. Nephrol Dial Transplant, 2009, 24: 1443-1454.
- [13] Ka SM, Yeh YC, Huang XR, et al. Kidney - targeting Smad7 gene transfer inhibits renal TGF - beta/MAD homologue (SMAD) and nuclear factor kappaB (NF - kappaB) signalling pathways, and improves diabetic nephropathy in mice. Diabetologia, 2012, 55: 509-519.

(收稿日期:2012-12-03)

(本文编辑:杨克魁)