

doi: 10.3969/j.issn.1000-484X.2016.03.013

冬虫夏草菌丝体提取物调控免疫改善肾纤维化的实验研究

岳会敏 刘 飞 李范林 马菲雅 沈苏南 侯亚义

(南京大学医学院和生物医药技术国家重点实验室,南京 210093)

中图分类号 R392 文献标志码 A 文章编号 1000-484X(2016)03-0354-04

摘要 目的:观察冬虫夏草菌丝体(*Hirsutella sinensis* mycelium, HSM)提取物对盲肠穿孔结扎(CLP)小鼠的免疫反应和肾纤维化程度的影响。方法:建立 CLP 诱导脓毒症小鼠模型,分为假术组(sham, $n=5$)、模型组(CLP, $n=11$)、治疗组(HSM, $n=11$)。冬虫夏草菌丝体组在术前2小时和术后10天给予HSM提取物200 mg/(kg·d),假术组和模型组给予等量的生理盐水。利用流式细胞术分析了小鼠外周血中巨噬细胞、中性粒细胞和Treg细胞数量以及腹水中巨噬细胞数量;利用Q-PCR检测了肾脏组织中炎症因子TNF- α 和IL-1 β 及纤维化因子TGF- β 1、TIMP1和MMP9的表达;另外,还对肾脏组织切片进行了HE染色以及 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和纤连蛋白(fibronectin)免疫组化染色。结果:模型组外周血中巨噬细胞、中性粒细胞和腹水中巨噬细胞数量较假术组显著升高,而HSM提取物治疗能下降上述细胞的数量;与正常组相比,模型组和治疗组外周血中Treg细胞数量均无明显差异;模型组肾脏组织中炎症因子TNF- α 和IL-1 β 及纤维化因子TGF- β 1、TIMP1和MMP9表达均上调,而治疗组肾脏上述细胞因子表达都有显著降低;HE染色显示模型组肾脏组织炎症样变明显,而治疗组有较好改善;与假术组比,模型组肾小管及间质 α -SMA和fibronectin表达明显增多,而治疗组肾小管及间质表达低于模型组。结论:HSM提取物具有调控免疫及改善肾纤维化的功能。

关键词 冬虫夏草菌丝体;盲肠穿孔结扎;免疫反应;纤维化

An experimental study on effects of *Hirsutella sinensis* mycelium (HSM) extract on immunoregulation and kidney fibrosis

YUE Hui-Min, LIU Fei, LI Fan-Lin, MA Fei-Ya, SHEN Su-Nan, HOU Ya-Yi. Medical School & State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of HSM on the immunoreaction and renal fibrosis in mice with cecal ligation and puncture (CLP). **Methods:** Renal fibrosis was induced by CLP; mice were divided into three groups, including sham group (sham, $n=5$), model group (CLP, $n=11$), therapy group (HSM, $n=11$). HSM extract [200 mg/(kg·d)] was orally administered to HSM group 2 hour before surgery and repeated everyday throughout 10 days, while sham group and model group were given the same dose of normal saline. FACS assay was used to analyze the amount of macrophages, neutrophils and Treg in PBMC, as well as macrophages in peritoneal fluid; we used Q-PCR assay to analyze the expression of inflammatory molecules (IL-1 β and TNF- α) and fibrogenic cytokines (TGF- β , MMP9 and TIMP1) from renal sections. Besides, renal sections were subjected to HE stain and immunohistochemical staining with α -SMA and fibronectin. **Results:** The amount of model group's macrophages and neutrophils in PBMC, as well as macrophages in the peritoneal fluid were significantly higher than sham group's, whereas HSM succeeded in lowering them; contrast to sham group, Tregs' amount of CLP group and HSM group in PBMC had no significant changes. The expression of inflammatory molecules (IL-1 β and TNF- α) and fibrogenic cytokines (TGF- β , MMP9 and TIMP1) from CLP group's renal sections were remarkably improved, whereas HSM inhibited that. The CLP group's HE results showed obvious renal inflammatory damage, whereas HSM reduced the histopathologic alterations; contrast to sham group, model group's expression of α -SMA and fibronectin was remarkably improved, while HSM group showed lower expression. **Conclusion:** HSM extract could regulate immunity response and had effect in improving renal fibrosis.

[Key words] *Hirsutella sinensis*; CLP; Immunoreaction; Fibrosis

作者简介:岳会敏(1991年-),女,硕士,主要从事细胞与分子免疫研究, E-mail: yuehuimin914@126.com。

通讯作者及指导教师:沈苏南(1974年-),男,博士,副教授,硕士生导师,主要从事细胞与分子免疫和肿瘤与生物治疗方面的研究, E-mail: shensn@nju.edu.cn。

肾纤维化是各种慢性肾脏病发展为终末期肾脏病的共同途径^[1],其实质是细胞外基质(ECM)的大量沉积。大多肾纤维化都会诱导肾脏炎症反应,而未被及时调控的炎症反应又会促进肾纤维化的进程^[2];肾脏炎症反应涉及免疫细胞和肾脏固有细胞产生和分泌促纤维化细胞因子和生长因子,这些细

胞因子可以促进纤维化病程^[3]。减缓和阻止肾纤维化是肾脏病治疗的重要环节,但由于其病理机制复杂,目前为止现代医学仍缺乏良好的临床治疗手段。

冬虫夏草菌丝体是我国传统名贵中药,它是真菌寄生在蝙蝠蛾幼虫上的干燥子座和虫体;许多临床经验显示冬虫夏草菌丝体可延缓各种慢性肾脏病的进展,但对其具体作用机制的研究有限。近年来的研究表明冬虫夏草菌丝体具有免疫调控、抗肿瘤、抗病毒和保护肺及肾脏等功能^[4-7]。本研究的主要目的是进一步明确冬虫夏草菌丝体调控免疫反应、改善肾纤维化的作用,并研究其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物的购置饲养 4~6周C57BL/6小鼠,雄性,体重18~20g,购于南京大学模式动物所,饲养于SPF级动物房内,保证饮食和饮水,昼夜循环,使用前饲养1周。

1.1.2 药物与试剂 冬虫夏草菌丝体提取物由南京中科药业有限公司提供,批号:20140778;免疫组化所用fibronectin抗体购自SANTA CRUZ公司,1:50稀释; α -SMA抗体是abcam公司产品,1:200稀释;DAB显示试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,产品编号:AR1022;SABC-AP免疫组化染色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,产品编号:SA1050;实验用流式抗体均为eBioscience产品。

1.1.3 实验动物处理 27只小鼠在SPF级动物房饲养1周后,随机分组,实验分组如下:(1)sham组:小鼠腹腔注射100 μ l/10g生理盐水,2h后用4%水合氯醛(200 μ l/每只)麻醉小鼠打开腹腔暴露盲肠,不结扎不穿刺,然后将盲肠放入腹腔,逐层关闭腹腔,缝好伤口;每组5只小鼠。(2)实验组:①CLP组:小鼠腹腔注射100 μ l/10g生理盐水,2h后用4%水合氯醛(200 μ l/每只)麻醉小鼠打开腹腔抽出盲肠结扎穿刺,之后将盲肠放入腹腔逐层关闭腹腔,缝好伤口;每组11只小鼠;②治疗组:冬虫夏草菌丝体液(200 mg/kg)预处理2h,随后进行CLP手术,术后每天菌丝体液(200 mg/kg)灌胃,每组11只小鼠,术后10d处死小鼠。

1.2 方法

1.2.1 流式细胞术 将收集的细胞用PBS洗3遍,然后用PBS重悬并转移至标准BD流式管中,按抗体说明书加入相应用量的流式抗体,4℃避光孵育30 min,PBS洗两次,重悬细胞后使用流式细胞仪检

测。标记胞内因子的,PBS洗两遍后,加500 μ l 4%的PFA室温固定20 min,离心去上清;加500 μ l含0.1% saponin的PBS,破膜15 min,离心去上清;按抗体说明书加入相应用量的流式抗体,4℃避光孵育30 min,然后用含0.1% saponin的PBS洗2遍,重悬细胞后上流式细胞仪检测。

1.2.2 Q-PCR 将肾脏组织匀浆后,加入Trizol,提总RNA,核酸蛋白检测仪检测RNA的纯度和浓度后,取1 g RNA进行反转录。反转录体系(20 μ l):4 μ l 5 $\times$ RT buffer,2 μ l dNTP,0.5 μ l RNase inhibitor,0.5 μ l Oligo dT,0.5 μ l ReverTra Ace,1 μ g RNA,加DEPC水至20 μ l;采用三步法进行Q-PCR反应,反应在Applied BioSystems 7300 Sequence Detection System中进行,得到各个基因的Ct值,然后以GAPDH为内参,按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行计算确定目的基因的表达。其中IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 1、MMP9和TIMP1引物均按primer bank查询设计合成,GAPDH引物根据文献合成。

1.2.3 组织学观察 肺组织取出后用4%多聚甲醛固定,常规HE染色,切片在光学显微镜10 $\times$ 20视野下观察肾小球和肾小管形态变化。

1.2.4 免疫组化染色 石蜡切片脱蜡、水化后,热修复;冷却后,3% H₂O₂阻断过氧化氢酶;PBS洗三遍,然后按抗体说明书滴加适当浓度的一抗,4℃孵育过夜;按说明书滴加适量二抗,37℃孵育45 min后,用PBST洗三遍,加底物SABC 37℃孵育20 min;随后用PBST洗四遍,DAB(武汉博士德生物公司)显色;复染透明后封片;在光学显微镜10 $\times$ 20视野下观察。

1.3 统计学方法 所有实验数据均重复三次以上,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用Prism5软件统计分析并作图,组间比较采用one-way ANOVA分析, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 冬虫夏草菌丝体提取物对小鼠免疫细胞数量的影响 本实验主要研究了HSM提取物对小鼠外周血中巨噬细胞、中性粒细胞、Treg细胞以及腹水中巨噬细胞数量的影响。流式细胞术结果显示:与sham组相比,CLP组小鼠外周血巨噬细胞和腹水中巨噬细胞数量均显著增多($P < 0.05$),分别见图1A和图1B;与CLP组相比,给予HSM提取物治疗后,小鼠外周血和腹水中巨噬细胞数量明显降低($P < 0.05$);与sham组相比,CLP组小鼠外周血中性粒细胞数量显著增多($P < 0.05$);与CLP组相比,给予

HSM 提取物治疗后,小鼠外周血中性粒细胞数量有所降低($P<0.05$),见图 1; Sham 组、CLP 组和治疗组小鼠外周血中 Treg 细胞均无显著差异,见图 2。

2.2 冬虫夏草菌丝体对肾脏炎性反应的影响 Q-PCR 结果显示,与 sham 组相比,CLP 组小鼠肾脏重要的炎性因子 IL-1 β 的 mRNA 的表达升高($P<0.01$),而 HSM 治疗组 IL-1 β 的 mRNA 表达相比 CLP 组明显降低($P<0.05$); CLP 组小鼠肾脏 TNF- α 的 mRNA 表达也较 sham 组升高,给予 HSM 提取物治疗后降低,见图 3A。

肾组织 HE 染色显示,模型组小鼠的肾小管及间质出现炎性细胞浸润、系膜基质增生,血管充血等变化;给予 HSM 提取物治疗后,上述症状减轻。以上结果说明冬虫夏草菌丝体改善了小鼠肾脏炎性病

2.3 冬虫夏草菌丝体对肾脏纤维化分子表达的影响 Q-PCR 结果显示,CLP 组小鼠肾脏 TGF- β 1、金属基质蛋白酶 9(MMP9) 和金属蛋白酶组织抑制物 1(TIMP1) 的 mRNA 表达均显著上调,提示 CLP 组小鼠肾脏可能出现纤维化病变;而 HSM 治疗组小鼠肾脏 TGF- β 1、MMP9 和 TIMP1 的表达与 CLP 组相比均有下降,提示小鼠肾脏 ECM 的合成和降解失衡得到控制、肾纤维化病变可能得到改善。见图 4A。

2.4 冬虫夏草菌丝体对肾脏 α -SMA 和 fibronectin 蛋白表达影响 sham 组小鼠肾小管、肾小球及间质罕见 α -SMA 和 fibronectin 表达,然而 CLP 模型组小

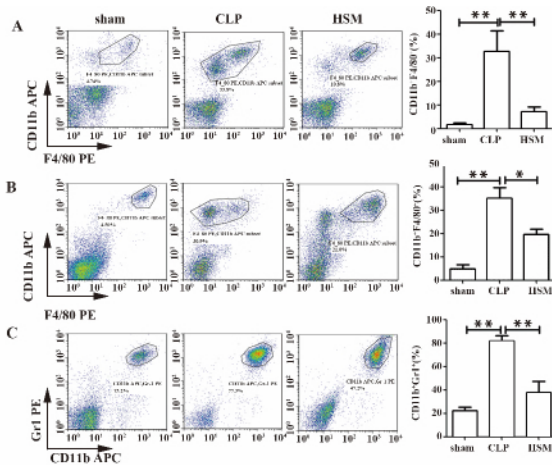


图 1 HSM 影响小鼠免疫细胞数量($n=3$)

Fig. 1 HSM influences amounts of mice's immunocytes ($n=3$)

Note: * . $P<0.05$, ** . $P<0.01$.

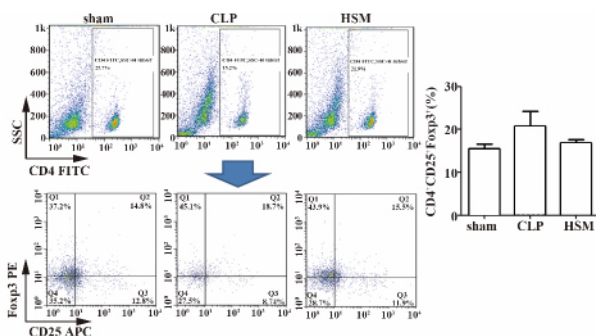


图 2 HSM 不影响小鼠外周血 Treg 细胞数量($n=3$)

Fig. 2 HSM dose not affect the amount of Treg in mice's PBMC ($n=3$)

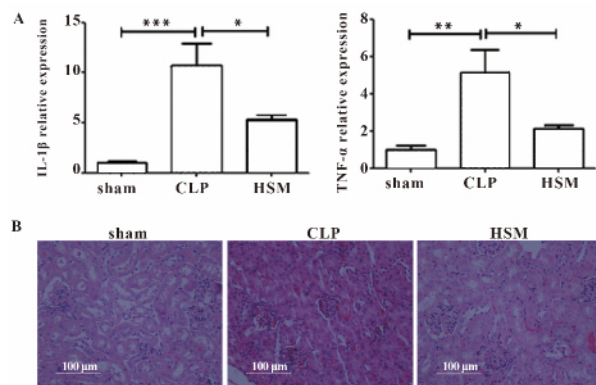


图 3 HSM 改善小鼠肾脏炎性反应($n=3$)

Fig. 3 HSM can improve inflammation in mice's renal sections($n=3$)

Note: HE staining was performed on renal sections. Original magnification, $\times 20$. * . $P<0.05$, ** . $P<0.01$, *** . $P<0.001$.

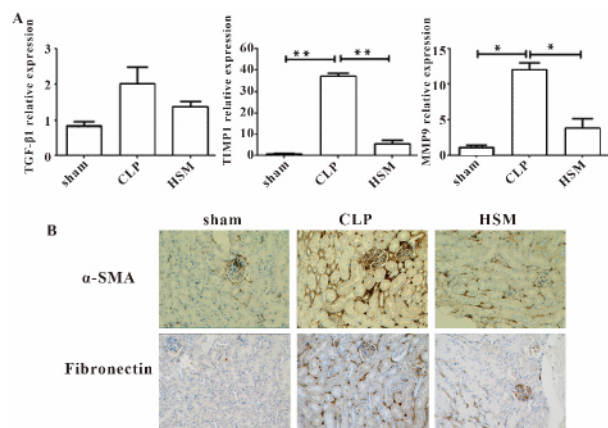


图 4 HSM 改善小鼠肾纤维化情况($n=3$)

Fig. 4 HSM can improve mice's renal fibrosis($n=3$)

Note: Immunohistochemical staining was performed on renal sections. Original magnification, $\times 20$. * . $P<0.01$, ** . $P<0.001$.

鼠的肾小球、肾小管及间质均有大量 α -SMA 和 fi-bronectin 表达,而经过 HSM 提取物治疗后,肾小球、肾小管及间质中两种蛋白的表达明显减少。见图 4B。

3 讨论

肾纤维化是多种慢性肾病的病理过程,以肾脏组织破坏、肾脏功能丧失以及过量 ECM 在肾间质积聚为特征。肾纤维化涉及炎症反应、免疫细胞和肾脏固有细胞合成分泌促纤维化细胞因子等环节。

炎症反应是各种慢性肾脏病的基本病理现象,当肾脏受到损伤刺激时,肾脏固有细胞活化并释放趋化因子,招募免疫细胞浸润到损伤组织。近些年的研究对于巨噬细胞的研究最多,很多临床数据和实验报道都说明各种肾脏病均开始于巨噬细胞浸润到肾间质。Tsung-Teng Huang 等发现冬虫夏草菌丝体不仅能够在体外抑制 LPS 处理的巨噬细胞分泌 IL-1 β 、IL-18 等,而且能减少 caspase-4 的活化,证明其具有抗炎活性^[8]。本研究中外周血巨噬细胞数量、腹水巨噬细胞数量、肾脏炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的 mRNA 水平表达量以及肾脏 HE 染色结果均提示,冬虫夏草菌丝体能够降低巨噬细胞数量、显著改善小鼠炎症细胞浸润情况和降低肾脏炎症因子的表达,证实蝙蝠蛾被毛孢菌丝体具有阻断炎症反应和调节肾脏微环境的功能。

ECM 合成和降解失衡导致 ECM 在肾间质过量积聚,形成纤维化。MMPs 和 TIMPs 与维持肾脏 ECM 的合成和降解密切相关,本研究中 HSM 治疗组小鼠肾脏 MMP9 和 TIMP1 的 mRNA 表达水平均降,证实了冬虫夏草菌丝体改善肾功能及抗肾纤维化的作用。低随着对肾纤维化的研究进展,上皮细胞向间质转化(EMT) 渐渐受到人们关注,EMT 时,肾上皮细胞失去其上皮细胞本身的特性,进入间质,变成肌成纤维细胞,而肌成纤维细胞也是细胞外基质的重要来源^[9]。包括 TGF- β 在内的多种细胞因子都能促进 EMT。YANG J 等发现单侧输尿管梗阻的大鼠肾脏细胞同时表达上皮细胞标志物 E-cadherin 和肌成纤维细胞标志物 α -SMA,说明肾纤维化中存在上皮细胞向间质细胞转化^[10,11]。本研究中治疗组小鼠肾脏 TGF- β 1 的 mRNA 水平表达量下降,免疫组化结果也表明给予 HSM 提取物治疗后小鼠肾脏 α -SMA 和 fibronectin 表达均下降,说明小鼠

肾脏 EMT 得到改善,冬虫夏草菌丝体具有抗纤维化功能。

本研究结果证实冬虫夏草菌丝体能够调控免疫改善肾纤维化,对此进行深一步研究将有利于阐明其抗纤维化的作用机制,为寻找抗肾纤维化药物提供新视角。

参考文献:

- [1] Boor P, Ostendorf T, Floege J. Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets [J]. Nat Rev Nephrol, 2010, 6(11): 643-656.
- [2] Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. Inflammatory processes in renal fibrosis [J]. Nat Rev Nephrol, 2014, 10(9): 493-503.
- [3] Ji NF, Yao LS, Li Y, et al. Polysaccharide of cordyceps sinensis enhances cisplatin cytotoxicity in non-small cell lung cancer H157 cell line [J]. Integr Cancer Ther, 2011, 10(4): 359-367.
- [4] Hua KF, Hsu HY, Chao LK, et al. Ganoderma lucidum polysaccharides enhance CD14 endocytosis of LPS and promote TLR4 signal transduction of cytokine expression [J]. J Cell Physiol, 2007, 212(2): 537-550.
- [5] 吴冀宁, 刘必成, 夏慧玲, 等. 虫草多糖对单侧输尿管梗阻小鼠肾小管上皮-间充质转化的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2008, 9(5): 400-402, 476.
- [6] Lin J, Chang YJ, Yang WB, et al. The multifaceted effects of polysaccharides isolated from Dendrobium huoshanense on immune functions with the induction of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) in monocytes [J]. PLoS One, 2014, 9(4): e94040.
- [7] Chun-hung Chiu, Chang-cherng Chyau, Chin-eh Chen, et al. Polysaccharide extract of Cordyceps sobolifera attenuates renal injury in endotoxemic rats [J]. Food Chem Toxicol, 2014, 69: 281-288.
- [8] Huang TT, Chong KY, Ojcius DM, et al. Hirsutella sinensis mycelium suppresses interleukin-1 β interleukin-18 secretion by inhibiting both canonical and non-canonical inflammasomes [J]. Sci Rep, 2013, 3: 1374.
- [9] Iwano M, Plieth D, Danoff TM, et al. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis [J]. J Clin Invest, 2002, 110(3): 341-350.
- [10] 辛冰牧, 杨红振, 胡卓伟. 肾纤维化发病机制及治疗学研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2008, 35(5): 349-354.
- [11] Yang J, Liu Y. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis [J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(1): 96-107.

收稿 2015-09-17 修回 2015-10-20

(编辑 许四平)