冬虫夏草通过IL-6反式信号通路改善小鼠肾间质纤维化

孙滢雪[1▲] 陈 军[2▲] 唐培宸[3] 张 健[1] 陈威泽[1] 颜芷昕[1] 宋娜娜[1,4△]

([1]复旦大学附属中山医院肾内科 上海 200032; [2]海军军医大学第二附属医院病理科 上海 200433;
[3]国宝企业发展中心 上海 200001; [4]上海浦东复旦大学张江科技研究院 上海 200120)

【摘要】 目的 探究冬虫夏草(cordyceps sinensis,CS)通过抑制IL-6反式信号通路介导的成纤维细胞活化,进而治疗肾纤维化的分子机制。**方法** 建立小鼠单侧缺血再灌注(unilateral ischemia/reperfusion,UIR)肾纤维化模型,同时给药虫草菌粉、可溶性糖蛋白130Fc(soluble glycoprotein 130 Fc,sgp130Fc)或Hyper-IL-6。Masson染色评估肾小管间质纤维化程度;PAS染色评估肾损伤情况;Western blot检测纤维化标志物[α-平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin,α-SMA),纤连蛋白(fibronectin,FN)]和IL-6反式信号通路相关蛋白[磷酸化信号转导及转录激活因子3(phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3,p-STAT3),可溶性IL-6受体(soluble interleukin-6 receptor,sIL-6R)]的表达水平;通过免疫组化、免疫荧光和qPCR等手段检测纤维化蛋白表达量以及定位情况。体外细胞实验进一步探究虫草提取物虫草素对成纤维细胞中IL-6反式信号的影响。**结果** 体内实验结果显示,在慢性期给药虫草菌粉可显著减轻小鼠患肾的炎症和纤维化,降低血清肌酐水平和胶原沉积。Western blot结果显示,CS治疗组α-SMA、FN的表达水平降低,IL-6信号通路蛋白p-STAT3、sIL-6R蛋白表达水平降低,单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1,MCP-1)、CXC趋化因子配体12(C-X-C motif chemokine ligand 12,CXCL12)的mRNA表达水平均下降。此外,Hyper-IL-6可部分抵消虫草菌粉的治疗效果。体外实验结果显示,虫草素可抑制NRK-52E分泌IL-6,而IL-6-sIL-6R复合物处理可诱导成纤维细胞NRK-49F活化,表现为α-SMA、FN和p-STAT3表达量显著升高。虫草素和sgp130Fc处理显著抑制IL-6反式信号通路引起的成纤维细胞的活化。**结论** CS可显著抑制小鼠肾小管上皮细胞分泌IL-6,并抑制成纤维细胞中IL-6反式信号通路的激活,从而改善肾间质纤维化。

【关键词】 冬虫夏草(CS); 慢性肾脏病(CKD); 成纤维细胞; IL-6反式信号通路; 肾纤维化; 小鼠
【中图分类号】 R692.5 **【文献标志码】** A **doi**:10.3969/j.issn.1672-8467.2025.01.001

Cordyceps sinensis ameliorates renal interstitial fibrosis in mice by IL-6 trans-signaling pathway

SUN Ying-xue[1▲], CHEN Jun[2▲], TANG Pei-chen[3], ZHANG Jian[1],
CHEN Wei-ze[1], YAN Zhi-xin[1], SONG Na-na[1,4△]

([1]*Department of Nephrology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai* 200032, *China*; [2]*Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai* 200433, *China*; [3]*Guobao Enterprise Development Center, Shanghai* 200001, *China*; [4]*Zhangjiang Institute of Science and Technology, Fudan University, Shanghai* 200120, *China*)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of cordyceps sinensis (CS) on the activation of

国家自然科学基金面上项目(82070710);上海市科技创新行动计划(21S21902900)

▲SUN Ying-xue and CHEN Jun contributed equally to this work
△Corresponding author E-mail: song.nana@zs-hospital.sh.cn

网络首发时间:2024-12-24 14:53:11 网络首发地址:https://link.cnki.net/urlid/31.1885.R.20241223.1350.002

fibroblasts through IL-6 trans-signaling pathway and its specific mechanism in the treatment of renal fibrosis. **Methods** Renal fibrosis mouse model was established by unilateral ischemia/reperfusion (UIR), and the mice were administered intragastrically CS, soluble glycoprotein 130 Fc (sgp130Fc) or Hyper-IL-6. Masson's trichrome staining was utilized to identify tubulointerstitial fibrosis. PAS staining was utilized to assess the extent of renal injury. Western blot was employed to analyze the expression levels of fibrosis markers [alpha-smooth muscle actin (α-SMA), fibronectin (FN)] and proteins associated with IL-6 trans-signaling pathway [phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 (p-STAT3), soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R)]. The expression and localization of proteins were additionally detected by immunohistochemistry, immunofluorescence and qPCR. The effect of cordyceps sinensis extract cordycepin on IL-6 trans-signaling in fibroblasts was further investigated *in vitro*. **Results** The results from *in vivo* experiments showed that administration of CS during the chronic phase demonstrated a beneficial protective impact on inflammation and fibrosis in the affected kidney, and serum creatinine levels and collagen deposition were decreased. Western blot analysis revealed a decrease in the expression levels of α-SMA, FN, as well as IL-6 trans-signaling pathway protein p-STAT3, sIL-6R in the treatment group. Additionally, the mRNA expression levels of chemokines monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and C-X-C motif chemokine ligand 12 (CXCL12) were also decreased in the CS treatment group. Additionally, Hyper-IL-6 can partially counteract the therapeutic effects of CS. *In vitro* experiments further demonstrated that cordycepin inhibited the secretion of IL-6 from NRK-52E. Combined treatment of recombinant IL-6 and sIL-6R protein activated NRK-49F, leading to a significant increase in α-SMA, FN, and p-STAT3 expression levels. Cordycepin or sgp130Fc treatment significantly inhibited the proliferation of fibroblasts induced by IL-6 trans-signaling pathway. **Conclusion** CS can significantly reduce IL-6 secretion by renal tubular epithelial cells and inhibit the activation of IL-6 trans-signaling pathway in fibroblasts, thereby ameliorating renal interstitial fibrosis.

【Key words】 cordyceps sinensis (CS); chronic kidney disease (CKD); fibroblast; IL-6 trans-signaling pathway; renal fibrosis; mouse

*** This work was supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82070710) and the Science and Technology Innovation Action Plan of Shanghai (21S21902900).**

根据WHO的统计,与肾脏有关的疾病导致全球每年多达1 000万人死亡[1-2]。预计至2040年,慢性肾脏疾病(chronic renal disease,CKD)将成为全球第五大死亡原因[3]。目前,治疗CKD的主要方法是替代疗法或肾移植[4],这为家庭和社会带来沉重的负担。肾间质纤维化是各病因所致CKD的共同病理生理过程[5-6]。因此,我们迫切需要寻找有效的治疗方法来改善肾间质纤维化。

冬虫夏草(cordyceps sinensis,CS)被誉为中国传统医学三宝之一,具有十分重要的药用价值。1951年,德国科学家坎宁安首次发现了冬虫夏草的主要成分虫草素,它具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、抗衰老、免疫调节等多种生物活性[7-10]。虫草素可以靶向抑制激酶发挥抗癌作用[11-12];可通过减轻中性粒细胞浸润抑制创伤导致的神经炎性病变[13];可通过靶向尿酸盐转运体1(urate transporter 1,URAT1)改善小鼠高尿酸血症[14]。虫草素对糖尿病肾病也有治疗作用[15-18],并在多种器官中被发现具有抗纤维化作用[19-20]。几个世纪以来,虫草作为一种天然的滋补灵药,在传统中医经典中被记载为治疗肾脏疾病的珍品。常驻肾间质成纤维细胞被激活后,转化为肌成纤维细胞(fibroblast-myofibroblast transformation,FMT),是肾纤维化的重要机制[21-23],而虫草素可抑制成纤维细胞活性,但具体机制尚不清楚[24]。

IL-6是一种多效性细胞因子,最初被描述为与抗菌免疫反应相关的细胞因子。IL-6介导3种不同的信号通路模式,包括经典信号通路、反式信号通路和簇信号通路[26]。经典信号通路通常在抗炎和

体内稳态过程中起作用；而反式信号通路主要参与促炎反应，具有促纤维化的作用[25]。CKD患者IL-6的水平升高主要是由氧化应激、慢性炎症和循环灌注增加等原因所致[27]。同时，IL-6水平升高也是CKD及其相关并发症进展的关键因素[27-28]。不同信号通路模式下，IL-6均与IL6受体（IL6 receptor，IL-6R）形成复合体，并激活膜结合糖蛋白130（glycoprotein130，gp130）。成纤维细胞中的gp130下游靶分子p-STAT3是纤维化的主要驱动因子[29]。近年来，研究发现IL-6反式信号通路是IL-6参与多种疾病的重要途径，靶向抑制IL-6反式信号通路具有良好的临床治疗前景[30-31]。

本研究拟通过构建小鼠单侧肾缺血再灌注（unilateral ischemia/reperfusion，UIR）模型，研究CS作为传统中药是否对IL-6反式信号通路有抑制作用并发挥抗肾纤维化的作用，并使用CS的有效单体成分虫草素在体外细胞实验中进一步验证其具体机制，以期为CS的治疗潜力提供新的见解，同时也为其潜在的临床应用提供新靶点和新策略。

材料和方法

试剂及抗体 虫草菌粉和虫草素（国宝企业发展中心），大鼠成纤维细胞NRK-49F和大鼠肾小管上皮细胞NRK-52E细胞培养基（美国Gibco公司），重组TGF-β蛋白（美国Abcam公司），重组IL-6和IL-6R蛋白（中国Proteintech公司），Hyper-IL-6（Recombinant IL-6/IL-6R alpha Protein Chimera，美国R&D Systems公司，可溶性糖蛋白130Fc（soluble glycoprotein 130 Fc，sgp130Fc，中国义翘神州公司），膜蛋白/胞质蛋白分离试剂盒（美国Thermo Fisher Scientific公司），兔抗GAPDH抗体、兔抗a-SMA抗体、兔抗STAT3抗体和兔抗Fibronectin抗体（美国Abcam公司），羊抗Kim-1抗体（美国R&D公司），兔抗IL-6抗体和兔抗IL-6R抗体（中国Proteintech公司），兔抗p-STAT3抗体（美国Cell Signaling Technology公司）。

动物实验

给药剂量的选择 实验用8周龄雄性BALB/c小鼠（体质量22～25 g）均购置于复旦大学附属中山医院动物部。实验起讫时间为2022年9月至2024年4月。选取雄性BALB/c小鼠25只，随机分为5组：假手术组（Sham组，n=5）、对照组（NS组，n=5）、CS低剂量组（CS-L组，n=5）、CS中剂量组（CS-M组，n=5）、CS高剂量组（CS-H组，n=5）。Sham组给予正常饮食；CS-L组、CS-M组和CS-H组自UIR术后第7天开始，连续14天分别给予100、200、400 mg/（kg·d）CS进行灌胃治疗；NS组给予等量生理盐水。NS组和CS组小鼠均通过腹腔注射1%苯巴比妥（50 mg/kg）麻醉，沿腹中线切开，Sham组随即缝合，其余小鼠进行UIR手术，首先暴露左侧肾脏，钝性分离出连接肾蒂的血管，夹紧肾血管30 min。在这个过程中，温度必须严格控制在37 ℃。随后取下钳，恢复灌注。21天后，对小鼠实施安乐死，取肾。所有动物均在复旦大学附属中山医院饲养。所有动物实验均经复旦大学机构动物保护与使用委员会批准（批准号：2023-109），并严格遵守《国家卫生研究院实验动物护理与使用指南》。

急性期和慢性期不同的给药策略 选取雄性BALB/c小鼠20只，随机分为4组，Sham组（n=5）、NS组（n=5）、CS-A组（n=5）、CS-C组（n=5），其中CS-A组自UIR术后第1天起连续21天给予200 mg/（kg·d）的CS灌胃治疗，CS-C组自UIR术后第7天起连续14天给予相同剂量的CS灌胃处理。

阻断剂与激活剂的干预实验 选取雄性BALB/c小鼠25只，随机分为5组：Sham组、NS组、CS组[400 mg/（kg·d）]、sgp130Fc组与HIL-6+CS组，每组5只。Sham组、NS组和CS组操作与上述相同。sgp130Fc组从UIR术后第7天开始，每隔1天腹腔注射sgp130Fc（1mg/kg）。HIL-6+CS组使用Hyper-IL-6激活IL-6反式信号通路，术后第7、14天，每只小鼠腹腔注射400 μg诱导蛋白，连续灌胃CS 400 mg/（kg·d）14天。直至第21天，对小鼠实施安乐死，取肾。

小鼠肾功能测定 对小鼠实施安乐死后收集小鼠血液，使用血清肌酐定量测定试剂盒（美国BioAssay Systems公司），按照说明书检测小鼠肾功能。

实时荧光定量PCR 用Trizol试剂（美国Invitrogen公司）从细胞或肾组织中分离总RNA。通过测定260 nm和280 nm处的吸光度来评价RNA的纯度，得到D_{260}/D_{280}比值为1.8～2.0。根据逆转录试剂盒（日本TAKARA公司）合成第一链cDNA。采用SYBR Green法检测基因表达。以GAPDH mRNA的相对表达量作为内参。引物序列见表1。

表1 qPCR引物序列

Tab 1 qPCR primer sequence

Gene	F/R	Sequences (5'-3')
Mouse *Tgf-β1*	F	GCATTGAGAGGCAGCAGTAACC
	R	GGAGAAGACACAGCACTTGACAG
Mouse *Ccl2*	F	TGTCGTGGATTGTGATAGCATAGTC
	R	CTTGTAATTGGGTTGGCTCTTTGTC
Mouse *Tnf-α*	F	CACGCTCTTCTGTCTACTGAACTTC
	R	ACTGTCCTTCTTGCCCTCCTAAC
Mouse *Col1*	F	GGTATGCTTGATCTGTATCTG
	R	AGTCCAGTTCTTCATTGCATT
Mouse *Col3*	F	AGCACCTGTTTCTCCCTT
	R	CTGGTATGAAAGGACACAGAG
Mouse *Acta2*	F	CTGACAGAGGCACCACTGAA
	R	CATCTCCAGAGTCCAGCACA
Mouse *FN*	F	ATGTGGACCCCTCCTGATAGT
	R	GCCCAGTGATTTCAGCAAAGG
Mouse *Cxcl12*	F	TTCAGTGCCAGGGTCGGGAAG
	R	ATTGGTCCGTCAGGCTACAGAGG
Mouse *Postn*	F	GCCCTCCACTCCCTTCCTGAC
	R	GGATGCTGATGCCTTCTTGAGACC
Mouse *S100a4*	F	GTGGGTCCTGCCTGTGTATTGC
	R	AGGTGGTTCATTGTGGTTCCGTAC
Mouse *Gapdh*	F	GGCAAATTCAACGGCACAGT
	R	AGATGGTGATGGGCTTCCC
Rat *Gapdh*	F	GTCCATGCCATCACTGCCACTC
	R	GATGACCTTGCCCACAGCCTTG
Rat *Acta2*	F	GCGTGGCTATTCCTTCGTGACTAC
	R	TTCATGGCACCAGCATTCCTTCC
Rat *IL-6*	F	TCTGACTGGTGTGAGGTGGAATC
	R	AACTGAGGAATACTGAATGGCTGAG

Masson染色和PAS染色 肾组织用4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,制成5 μm切片。用Masson染色和PAS染色试剂盒对石蜡切片进行染色。肾纤维化评分由不知道切片来源的病理学家通过光镜评估,并使用评分系统确定。使用Image J通过调整颜色设置阈值来量化纤维化程度。图像分析方法为计算Masson染色的每个肾横切面内的蓝色胶原蛋白面积。采用背景反选法计算肾实质面积。胶原面积百分数被认为是胶原面积与总肾实质面积的比例。石蜡切片进行PAS染色。组织学损伤评分采用盲法评估。严重程度以半定量的方式确定,表现为上皮坏死的小管百分比、刷状缘的丧失、铸型形成和小管扩张等,采用5分制,0:无损伤;1:小于25%;2:25%~50%;3:50%~75%;4:超过75%。

免疫组化 石蜡切片脱蜡水化,EDTA进行抗原修复,3% H_2O_2溶液去除内源性过氧化氢酶,1%BSA封闭,一抗4 ℃孵育过夜。α-SMA(1∶200稀释)和纤连蛋白(fibronectin,FN)(1∶200稀释)染色。HRP标记二抗室温孵育1h,DAB显色,苏木素染核5 min,盐酸乙醇反蓝,封片后于新正置显微镜采集图像。通过计算5个高倍视野中成纤维细胞活化标志物α-SMA和FN的染色阳性面积来量化各组结果(×200)。以阳性面积百分比定量评价各组纤维化程度。

免疫荧光 石蜡切片进行免疫荧光共染色。脱蜡水化,EDTA抗原修复缓冲液进行抗原修复,组化笔画圈,1%BSA封闭后,一抗4 ℃孵育过夜。石蜡切片用抗兔α-SMA抗体(1∶200)、抗小鼠E-cadherin抗体(1∶100)、抗兔IL-6抗体(1∶100)、抗小鼠Ki-67抗体(1∶200)孵育。磷酸缓冲盐水(PBS)洗涤后,用Alexa Fluor488偶联二抗(1∶100,美国Thermo Fisher Scientific公司)和Alexa Fluor594偶联驴抗小鼠IgG(1∶100,美国Absin公司)。图像在共聚焦显微镜下进行观察和采集。

酶联免疫吸附试验 眼眶采静脉血,4 ℃过夜,3 000×*g*离心5 min,得到血清。NRK-52E细胞培养物上清1 000×*g*离心20 min,取上清进行检测。采用Elisa试剂盒(上海江莱生物公司)检测小鼠血清和NRK-52E细胞上清中IL-6的分泌水平。

Western blot 在-80 ℃取出肾脏组织,研磨成匀浆提取蛋白质,或利用细胞裂解液提取蛋白质,进行Western blot实验。蛋白质样品在SDS-PAGE凝胶上电泳。然后将其转移至PVDF膜上,并用5%的脱脂牛奶封闭。PVDF膜与一抗4℃孵育过夜,GAPDH(1∶5 000)、α-SMA(1∶1 000)、E-cadherin(1∶2 000)、FN(1∶1 000)、Kim-1(1∶1 000)、IL-6(1∶1 000)、IL-6R(1∶1 000)、STAT3(1∶1 000)、p-STAT3(1∶1 000),然后与二抗室温孵育1 h。使用化学发光ECL可视化蛋白进行检测,并以GAPDH为内参进行分析。

膜蛋白/胞质蛋白提取 将组织按照膜蛋白/胞质蛋白分离试剂盒(美国赛默飞公司)说明书提取蛋白,并立即转移至-80 ℃进行冻存。

细胞培养 大鼠成纤维细胞NRK-49F(上海中桥新舟生物科技有限公司)和大鼠肾小管上皮细胞NRK-52E(中国科学院细胞库)在DMEM/F12高

糖培养基中培养。细胞在37 ℃、5% CO_2培养箱中培养，直到细胞融合传代。为了体外诱导成纤维细胞纤维化，NRK-49F用IL-6（50 ng/mL）和sIL-6R（200 ng/mL）处理，NRK-52E用TGF-β（10 ng/mL）处理。为了特异性阻断IL-6反式信号通路，NRK-49F细胞使用sgp130Fc（500 ng/mL）处理。重组蛋白处理后，NRK-49F和NRK-52E在无血清FBS培养基中培养48 h，然后用于各项实验。虫草素处理细胞的浓度为40 μmol/L。

CCK-8试验 成纤维细胞以每孔5 000个细胞的密度接种在96孔板上。处理后，用CCK-8试剂孵育检测细胞活性。在450 nm处用酶标仪测定吸光度。

统计学分析 使用GraphPad Prism 9.0软件进行统计学分析。所有结果均以n次试验的$\bar{x} \pm s$表示。两组间比较采用双尾非配对t检验。多组间的比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA）。多组间的两两比较采用Tukey检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

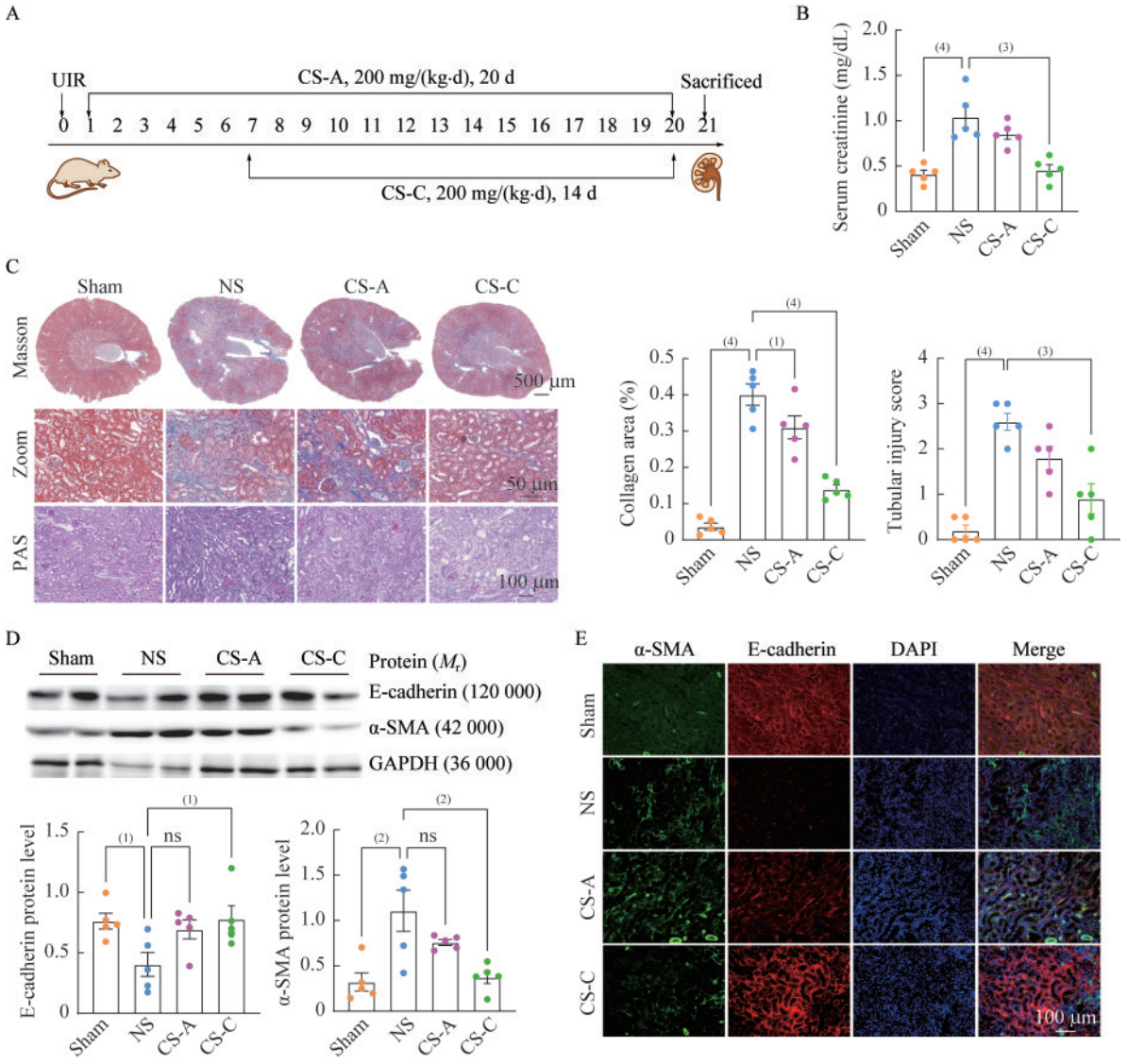
结 果

在肾损伤慢性期给予CS治疗效果更显著 为探究最佳用药时机，UIR小鼠在不同时间开始灌胃CS（图1A）。CS-A组于UIR术后第1天开始给药[200 mg/(kg·d)]，CS-C组在术后第7天开始治疗[200 mg/(kg·d)]。NS组按照相同频率给予等量生理盐水。生化检测发现（图1B），NS组血清肌酐水平升高；与NS组相比，CS-C组有效降低血清肌酐水平。Western blot结果显示（图1C），与Sham组相比，NS组α-SMA表达量升高（P=0.001 6），E-cadherin表达量降低（P=0.032 0），同时Masson染色结果显示纤维化程度加重（$P<0.000\ 1$）。这表明UIR模型构建成功。CS-C组α-SMA表达降低（P=0.0028），E-cadherin表达升高（P=0.024 6），而CS-A组改善效果较差。免疫荧光染色也表现出相同的结果（图1D）。Masson染色结果（图1E）显示CS-C组纤维化程度降低（$P<0.000\ 1$）。PAS染色结果（图1E）显示，CS-C组同样表现出更好的治疗效果，肾小管损伤评分显著降低（P=0.000 3）。以上结果表明，在肾损伤慢性期给药CS产生更显著的治疗效果。

CS有助于减轻UIR小鼠肾损伤 根据以上结果，我们在UIR术后7天开始给药，并探究CS的治疗剂量范围。给药剂量分别设定为100、200和400 mg/(kg·d)（CS-L组、CS-M组和CS-H组）。结果显示，Sham组小鼠的体质量逐渐增加，反应敏捷，毛发顺滑光亮；NS组的小鼠表现出消瘦、活动减少和毛发稀疏。所有动物在UIR手术21天后处死，收集肾脏和血液样本（图2A）。与Sham组相比，NS组肾脏表现出明显的整体改变，具体为肾萎缩、黄白色、表面凹凸不平和弥漫性细颗粒。CS组肾脏大体表现出不同程度的改善。我们评估了肾指数（绝对肾质量/体质量）和血清肌酐水平（图2A、2B）。NS组血清肌酐水平显著高于对照组（P=0.000 1）。CS治疗可改善肾脏指数（$P<0.05$），显著降低血清肌酐水平（$P<0.001$）。Western blot结果显示，CS-M组（P=0.007 4）与CS-H组（P=0.000 7）的Kim-1蛋白水平明显降低（图2C）。PAS染色显示，CS-M组（P=0.046 7）与CS-H组（P=0.020 6）肾小管损伤减轻，病理评分明显低于NS组（图2D）。

CS可减轻UIR小鼠肾纤维化程度 进一步评估CS对小鼠纤维化的治疗效果。采用Masson染色评估胶原沉积程度（图3A），半定量评分法计算肾纤维化面积百分比。结果显示，NS组胶原蛋白沉积明显增加（$P<0.000\ 1$），CS组间质纤维化明显减少（$P<0.000\ 1$）。α-SMA主要作为间质内成肌细胞的细胞骨架蛋白表达。FN主要位于肾小球基底膜和系膜区。α-SMA和FN的免疫组化分析表明，CS显著抑制了UIR诱导的α-SMA（$P<0.000\ 1$）和FN（$P<0.05$）水平的升高（图3A）。Western blot结果显示，NS组α-SMA（P=0.002 2）和FN（P=0.000 5）蛋白水平明显升高（图3B）。与NS组相比，CS组α-SMA（$P<0.01$）和FN（$P<0.01$）蛋白水平明显降低。这些结果表明，CS可有效减轻UIR诱导的肾间质纤维化。我们利用免疫荧光双染色进一步验证，结果显示，与NS组相比，CS组α-SMA表达降低，E-cadherin表达升高（图3C）。

qPCR结果显示（图3D），NS组α-SMA、FN、TGF-β、COL1、COL3 mRNA表达量显著升高。CS治疗显著降低肾组织α-SMA、FN、TGF-β、COL1、COL3 mRNA表达水平。Postn和S100a4是肌成纤维细胞的特征性标志物。Postn是活化成纤维细胞



A: Flow chart of *in vivo* study; B: Serum creatinine of mice in Sham, NS and CS groups, n=5; C: Representative images of Masson's trichrome staining (scale bar=500 μm, zoom=50 μm), n=5; Representative images of PAS staining (scale bar=100 μm), n=5; D: Western blot analysis of E-cadherin and α-SMA expression in Sham, NS, CS-A and CS-C groups, n=5; E: Co-immunostaining for E-cadherin and α-SMA (scale bar=100 μm); $^{(1)}P<0.05$, $^{(2)}P<0.01$, $^{(3)}P<0.001$, $^{(4)}P<0.000\ 1$ by One-way ANOVA, $\bar{x}\pm s$; ns:Not significant.

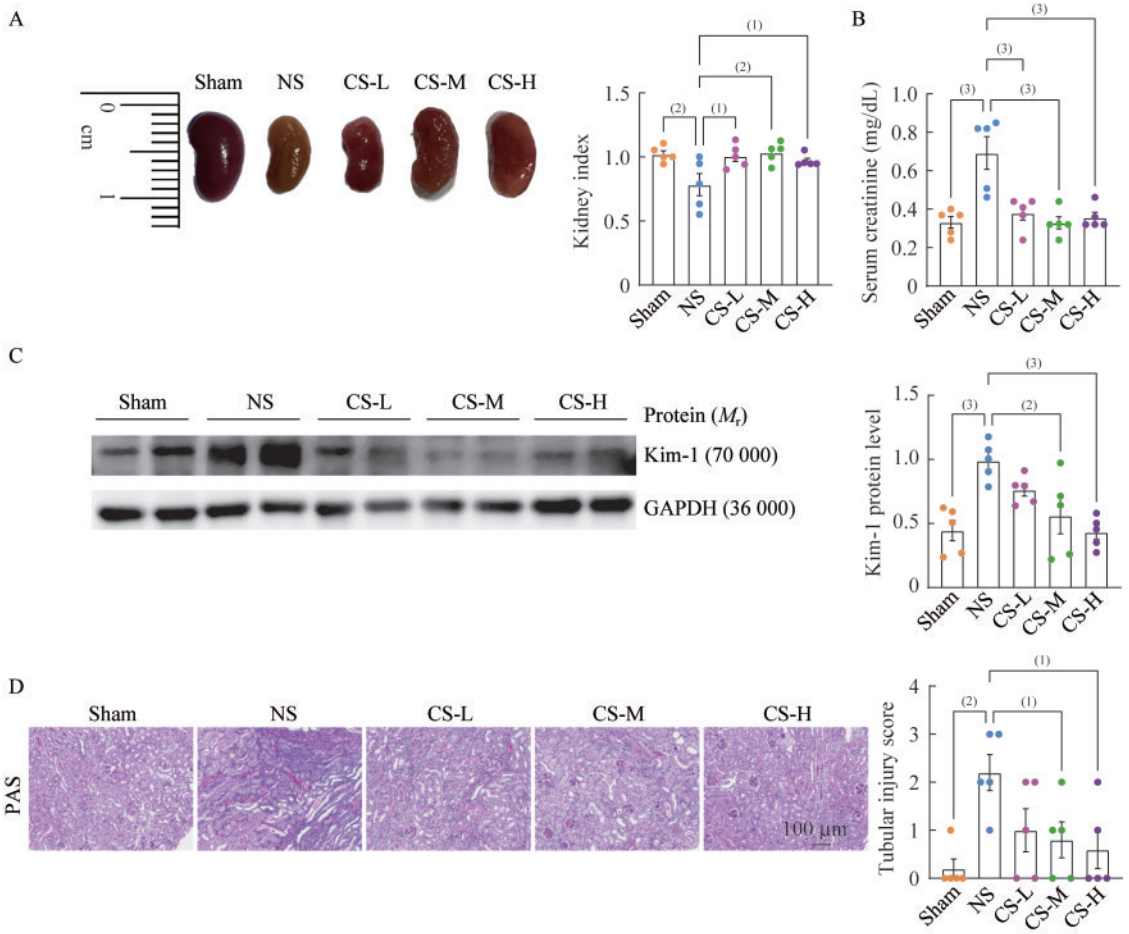
图1 CS给药对小鼠肾损伤急性期或慢性期发展的影响

Fig 1 Effects of CS administration in acute and chronic phases of renal injury development in mice

分泌的细胞外基质蛋白,而S100a4是参与肌成纤维细胞活化的S100钙结合蛋白家族的成员。qPCR结果显示,CS组Postn和S100a4的mRNA表达量均显著降低。

CS可显著抑制肾间质IL-6反式信号通路的激活 为了探究CS治疗机制是否与IL-6反式信号通路相关,我们针对IL-6和α-SMA进行了免疫荧光双染色,结果显示(图4A),NS组的肾小管上皮细胞损伤后IL-6分泌增加,相邻间质中α-SMA表达上调。而CS组肾小管IL-6分泌减少,周围间质α-SMA阳性成纤维细胞减少。此外,ELISA结果显示(图4B),NS组血清IL-6表达水平显著升高(P=0.000 6),与NS组相比,CS组血清IL-6表达水平明显降低($P<0.05$)。以上结果提示,CS可通过减少肾小管上皮细胞分泌IL-6,抑制成纤维细胞IL-6反式信号通路的激活,从而抑制纤维化进程。

我们对IL-6信号通路的受体IL-6R及下游蛋白p-STAT3进行测定。UIR诱导肾损伤后,Western blot结果显示sIL-6R(P=0.001 1)和p-STAT3(P=0.000 3)蛋白水平显著升高(图4C)。与NS组相比,



A：Photos of representative mice kidneys and kidney index；B：Serum creatinine of mice in Sham，NS and CS groups，n=5；C：Western blot analysis of Kim-1 expression，n=5；D：Representative images of PAS staining（scale bar=100 μm），n=5. $^{(1)}P<0.05$，$^{(2)}P<0.01$，$^{(3)}P<0.001$，by One-way ANOVA，$\bar{x}\pm s$.

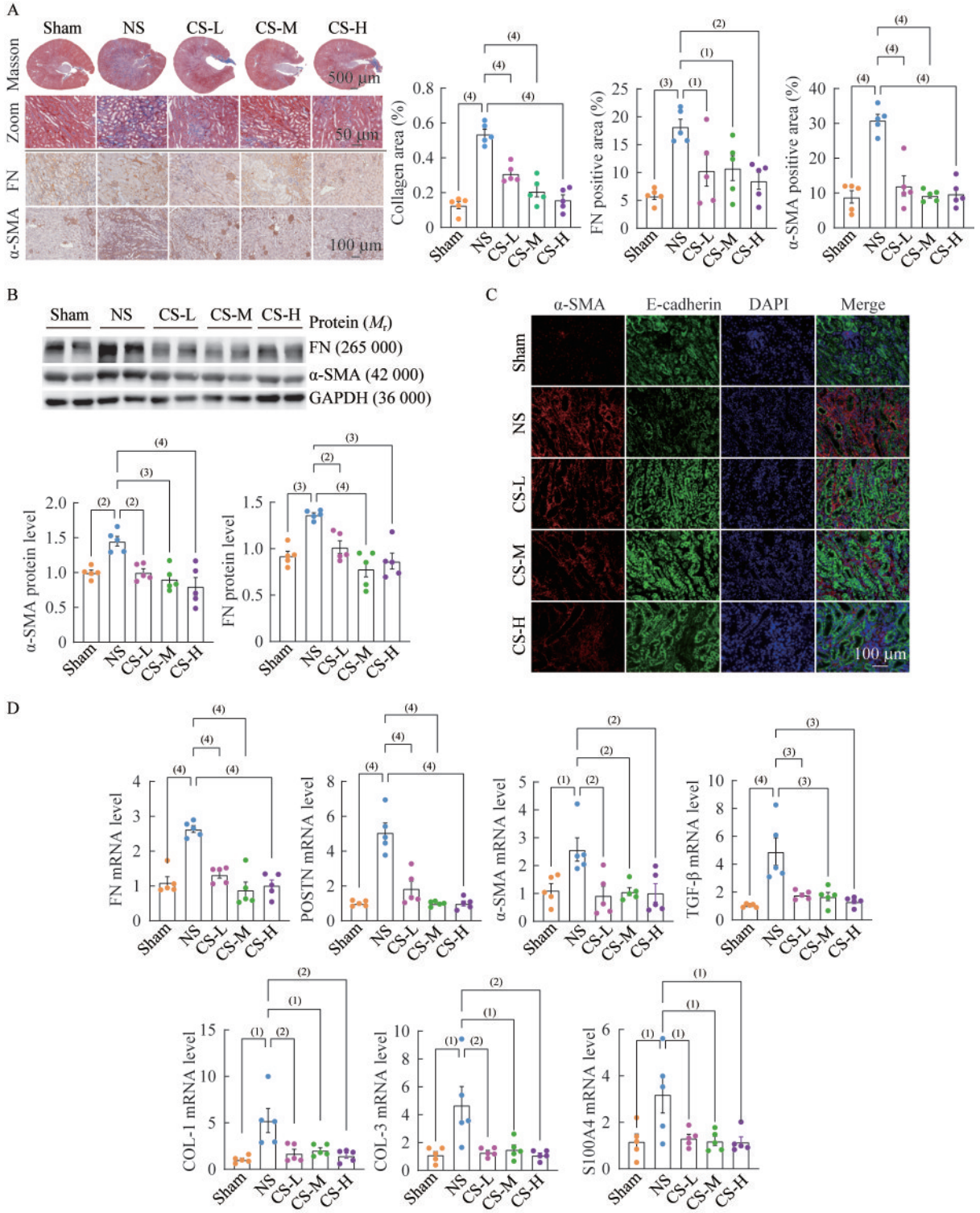
图2 不同浓度CS减轻小鼠单侧肾缺血再灌注模型肾损伤

Fig 2 Different concentrations of CS mitigated renal injury in unilateral ischemia/reperfusion mice model

CS组sIL-6R和p-STAT3明显降低（$P<0.001$）。而各组间mIL-6R蛋白表达差异无统计学意义。qPCR结果显示（图4D），CS组TNF-α、IL-6、MCP-1、CXCL12 mRNA表达水平均显著下调。以上结果表明，CS可抑制IL-6反式信号通路，作为一种潜在的抗纤维化的治疗方法。

虫草素抑制NRK-52E细胞IL-6表达 CS的主要有效单体成分是虫草素（cordycepin），进入体内后会被腺苷脱氨酶（adenosine deaminase，ADA）迅速代谢，半衰期短。CS中含有一种ADA抑制剂——喷司他汀，可有效地抑制虫草素在体内的降解。因此，我们的体内实验使用CS，体外实验使用虫草素。重组蛋白TGF-β用于诱导NRK-52E慢性纤维化模型，分为4组：（1）Control组；（2）TGF-β组（10ng/mL）；（3）Cord组（40 μmol/L虫草素处理）；（4）T+Cord组（10 ng/mL TGF-β+40 μmol/L虫草素处理）。Western blot结果与体内观察一致（图5A），TGF-β组细胞IL-6蛋白表达水平显著升高（P=0.023 6），虫草素显著抑制IL-6蛋白水平（P=0.014 4）。ELISA结果显示（图5B），TGF-β组细胞上清中IL-6分泌水平升高（P=0.001 1），T+Cord组显著降低（P=0.000 1）。qPCR结果和免疫荧光结果同样显示虫草素可以降低IL-6 mRNA含量（图5C、5D）。以上结果表明，虫草素可抑制TGF-β诱导NRK-52E纤维化模型中IL-6的表达上调。

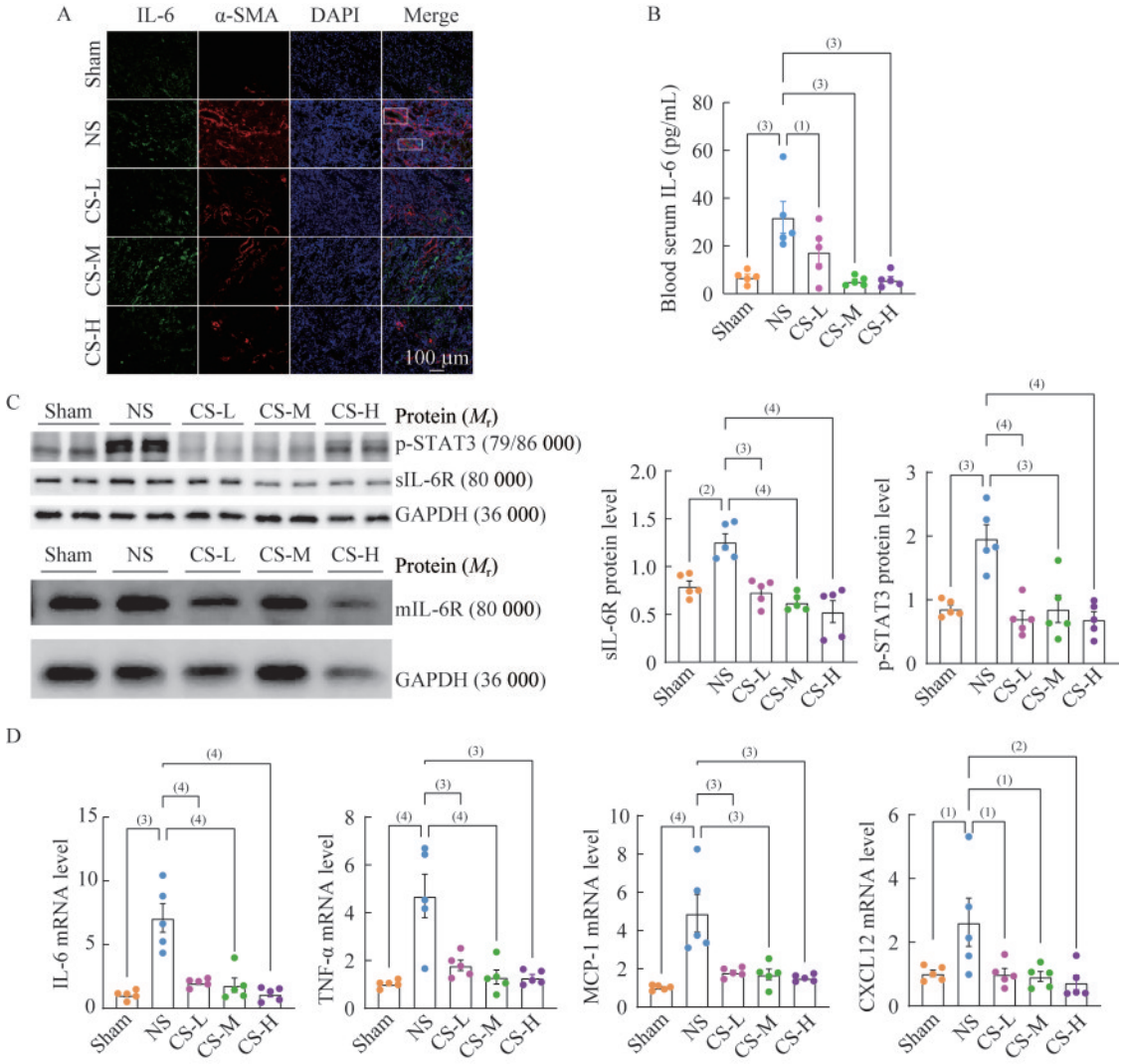
虫草素有效抑制IL-6和sIL-6R诱导的NRK-49F活化 为了模拟体内与成纤维细胞相关的IL-6反式信号通路，我们使用IL-6（50 ng/mL）和IL-6R（200 ng/mL）重组蛋白处理NRK-49F，并将其分为4组：Control组、IL-6+IL-6R组、Cord组、IL-6+IL-



A: Representative images of Masson's trichrome staining (scale bar=500 μm, zoom=50 μm), n=5; Representative immunohistochemical staining for α-SMA, E-cadherin and FN in Sham, NS and CS groups (scale bar 100=μm), n=5; B: Western blot analysis of α-SMA and FN expression; C: Co-immunostaining for α-SMA and E-cadherin; D: Real-time qPCR analysis of FN, α-SMA, POSTN, S100a4, COL-1, COL-3, TGF-β mRNA level, n=5. $^{(1)}P<0.05$, $^{(2)}P<0.01$, $^{(3)}P<0.001$, $^{(4)}P<0.000\ 1$ by One-way ANOVA, $\bar{x}\pm s$.

图3 CS显著减轻小鼠肾间质纤维化

Fig 3 CS demonstrated a significant reduction in renal interstitial fibrosis in mice



A：Co-immunostaining for IL-6 and α-SMA in Sham，NS and CS groups（scale bar=100 μm），n=5；Adjacent location of IL-6 and α-SMA（white box）. B：ELISA analysis of blood serum IL-6，n=5. C：Western blot analysis of p-STAT3，sIL-6R and mIL-6R expression，n=5；D：Real-time qPCR analysis of IL-6，TNF-α，MCP-1，CXCL12 mRNA level，n=5. $^{(1)}P<0.05$，$^{(2)}P<0.01$，$^{(3)}P<0.001$，$^{(4)}P<0.000\ 1$ by One-way ANOVA，$\bar{x}\pm s$.

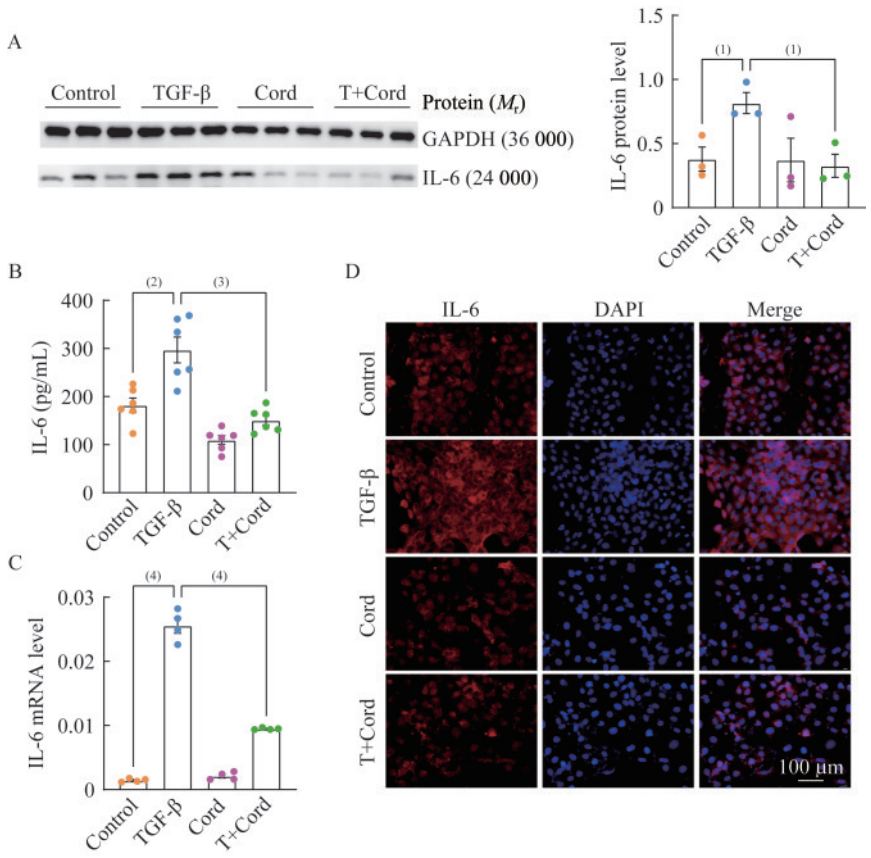
图4　CS对小鼠中IL-6反式信号通路和炎症反应的影响

Fig 4　Effects of CS on IL-6 trans-signaling pathway and inflammation in mice

6R+Cord组。Western blot结果表明（图6A），与IL-6+IL-6R组相比，IL-6+IL-6R+Cord组细胞中p-STAT3（P=0.041 3）、α-SMA（P=0.025 1）和FN（P=0.000 8）蛋白水平降低，这表明虫草素可减轻IL-6和IL-6R共处理诱导的细胞纤维化程度。qPCR结果显示（图6B），与对照组相比，IL-6+IL-6R组α-SMA和FN mRNA的表达水平上调，表明IL-6反式信号通路在诱导NRK-49F纤维化中发挥了重要作用。IL-6+IL-6R+Cord组上述指标均下调，证明虫草素对肾成纤维细胞IL-6反式信号通路具有抑制作用。

Ki-67是一种通常用于评估细胞增殖活性的蛋白标志物。免疫荧光双染色结果显示（图6C），IL-6+IL-6R组Ki-67$^+$和α-SMA$^+$细胞的阳性数量显著升高。而IL-6+IL-6R+Cord组Ki-67$^+$和α-SMA$^+$细胞数量明显减少，说明虫草素对IL-6和sIL-6R诱导的成纤维细胞增殖和活化有抑制作用。CCK-8结果表明（图6D），IL-6和IL-6R刺激导致细胞增殖，虫草素抑制细胞增殖。

IL-6反式信号通路激活剂Hyper-IL-6与阻断剂sgp130Fc影响肾纤维化　为进一步探讨IL-6反式信号通路在改善CS治疗肾间质纤维化中的作用，



A: Western blot analysis of IL-6 expression from each groups, n=3; B: ELISA analysis of IL-6 secretion in cell supernatant, n=3; C: Real-time qPCR analysis of IL-6 mRNA level, n=3; D: Immunofluorescence staining for IL-6 (scale bar=100 μm). $^{(1)}P<0.05$, $^{(2)}P<0.01$, $^{(3)}P<0.001$, $^{(4)}P<0.000\ 1$ by One-way ANOVA, $\bar{x}\pm s$.

图5 虫草素抑制小鼠中IL-6在NRK-52E中的分泌和表达

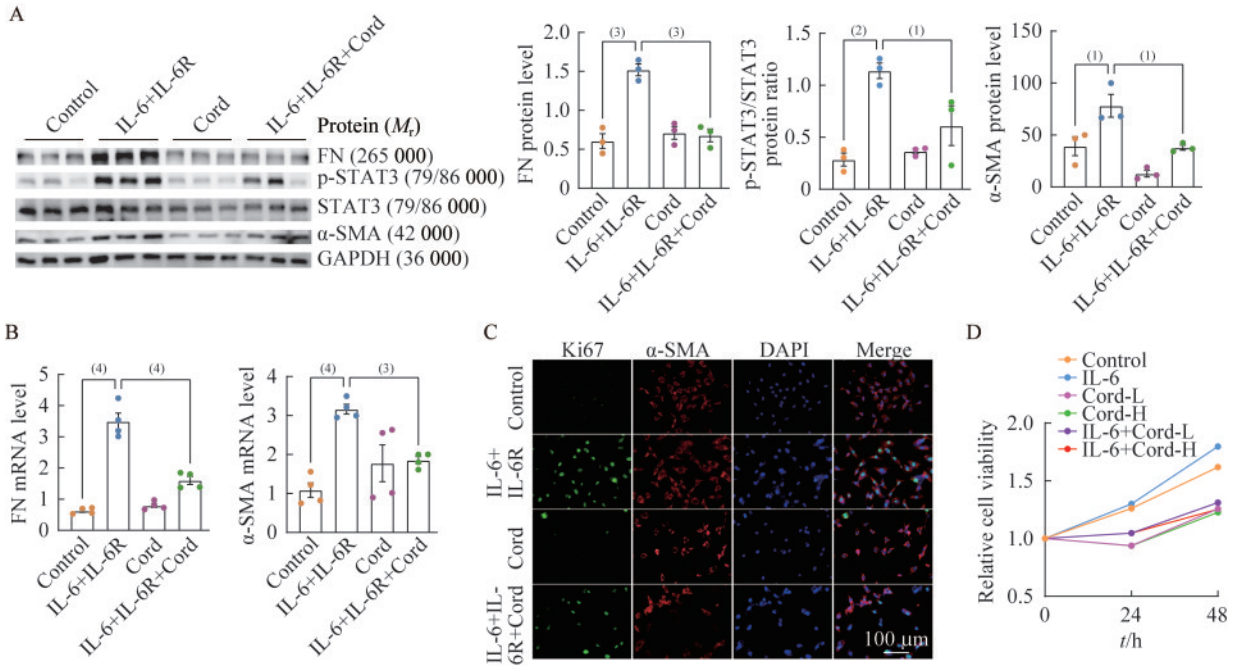
Fig 5 Cordycepin suppressed secretion and expression of IL-6 in NRK-52E in mice

我们分别对UIR术后的小鼠进行了Hyper-IL-6+CS或sgp130Fc处理。Masson染色结果显示(图7A),与NS组相比,CS组和sgp130Fc组的胶原面积百分比显著减少($P<0.000\ 1$)。与CS组相比,Hyper-IL-6+CS组的胶原面积百分比显著增加($P=0.000\ 3$)。Western blot结果表明(图7B、7C),与NS组相比,CS组和sgp130Fc组小鼠的纤维化程度显著减轻($P<0.001$),同时IL-6反式信号通路下游p-STAT3蛋白水平显著下降($P<0.000\ 1$)。与CS组相比,HIL-6+CS组的肾纤维化水平增加,且p-STAT3蛋白水平上升($P=0.005\ 3$)。这些实验结果验证了Hyper-IL-6激活IL-6反式信号通路削弱了CS的治疗效果,也进一步证明了虫草的抗纤维化作用是通过IL-6反式信号通路实现的。

我们使用sgp130Fc(500 ng/mL)处理NRK-49F细胞,将其分为4组:Control组、IL-6+IL-6R组、IL-6+IL-6R+Cord组、IL-6+IL-6R+sgp130Fc组。Western blot结果显示(图7D、7E),与IL-6+IL-6R组相比,IL-6+IL-6R+Cord组和IL-6+IL-6R+sgp130Fc组的纤维化水平显著降低($P<0.05$),p-STAT3/STAT3水平下降($P<0.000\ 1$)。

讨 论

全球慢性肾脏病流行病学数据公布,CKD患病率逐年上升,目前已高于10%[2]。CKD的发病机制复杂,临床表现异质性高。高血压、糖尿病和原发性肾小球肾炎等因素均可导致肾脏损害并最终发展为终末期肾衰竭,这一过程的主要病理生理学特征是肾纤维化[32-35]。该过程涉及炎症反应增强、成纤维细胞活化和细胞外基质沉积等[36-38],而确切的机制尚不清楚。冬虫夏草性甘味平,归肺、肾经。其主要活性成分是虫草素。虫草素可以通过多种信号通路减少肝、肺和肾纤维化[24,39-41]。冬虫夏草在



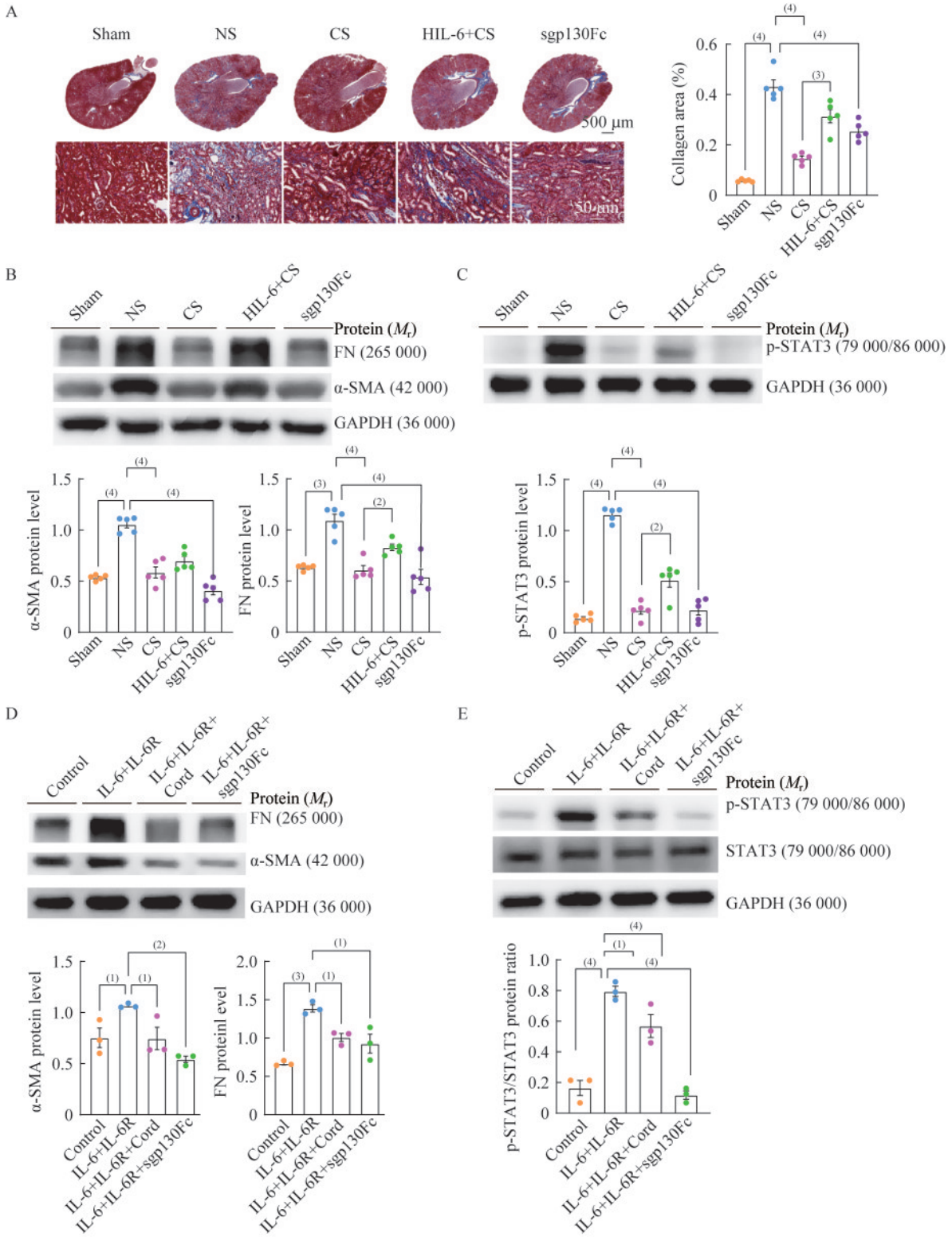
A：Western blot analysis of FN, p-STAT3/STAT3 and α-SMA expression from each groups; B：Real-time qPCR analysis of FN and α-SMA mRNA level; C：Co-immunostaining for Ki-67 and α-SMA (scale bar=100 μm); D：Relative cell viability (CCK-8 test kit) in Control, IL-6 (50 ng/mL IL-6 + 200 ng/mL IL-6R), Cord-L (20 μmol/L cordycepin), Cord-L (40 μmol/L cordycepin), and corresponding treatment groups, n=3. $^{(1)}P<0.05$, $^{(2)}P<0.01$, $^{(3)}P<0.001$, $^{(4)}P<0.000\ 1$ by One-way ANOVA, $\bar{x}\pm s$.

图6 虫草素对小鼠NRK-49F中IL-6反式信号通路的影响

Fig 6 Effect of cordycepin on IL-6 trans-signaling pathway in NRK-49F in mice

不同病因所致肾纤维化中均表现出了良好的治疗作用。Zhang等[42]的研究表明冬虫夏草可显著缓解单侧输尿管结扎(unilateral ureteral occlusion, UUO)导致的肾纤维化，减轻TGF-β引起的肾小管上皮细胞EMT；Pan等[43]的研究指出，冬虫夏草可抑制5/6肾切除导致的肾纤维化；Zheng等[15]发现虫草素可减轻小鼠糖尿病肾病的肾间质纤维化。由于CS中含有天然的ADA抑制剂喷司他汀，可以提高虫草素的生物利用率。因此，在小鼠体内实验中，我们通过灌胃CS来保持虫草素的功效，设置了低、中、高3个剂量梯度，均表现出对肾纤维化良好的治疗效果。在细胞实验中，我们使用虫草素单体处理成纤维细胞，进一步证实其抗纤维化的具体机制。

成纤维细胞是肾纤维化的主要效应细胞，受微环境包括细胞外基质组成、局部炎症和细胞相互作用等因素调控[44-46]。在纤维化进程中，常驻成纤维细胞发生FMT，其典型特征是α-SMA的表达上调[42]。Humphreys等[22]使用Foxd1-Cre报道的菌株进行了一项研究，并证明几乎100%的肌成纤维细胞来自血管周细胞或常驻成纤维细胞，这强调了成纤维细胞活化在肾纤维化中的重要作用。成纤维细胞具有双面性，一方面促进组织修复，另一方面也诱导纤维化。郭春元等[47]研究发现，在小管损伤修复的初始阶段，成纤维细胞介导适应性修复。Zhou等[48]和Zhang等[49]进一步发现成纤维细胞在肾损伤的早期修复和再生中起着至关重要的作用。相反，严重或持续的损伤可诱导成纤维细胞持续活化，导致非适应性修复和纤维化。Fu等[36]提出这一过程受间质成纤维细胞和炎症细胞相互作用的影响。在本研究中，我们观察到在小鼠UIR模型的慢性期给药可获得显著的抗纤维化效果，而在急性损伤期给药治疗效果则相对较弱，推测与CS对成纤维细胞的抑制有关；同时观察到急性期给予CS对成纤维细胞活化的抑制作用。肾损伤慢性期成纤维细胞释放炎症介质，分泌胶原蛋白和细胞外基质蛋白，促进炎症加剧和纤维化进程，参与肾脏纤维化和瘢痕形成[5]。而在急性期，成纤维细胞参与了肾损伤的修复过程，通过释放细胞因子、金属蛋白酶等在患处促进愈合[49]。因此，在急性期给予CS阻碍成纤维细胞的修复功能。我们不仅验证了CS给药在减轻肾损伤方面的有效性，而且还对其适当



A: Representative images of Masson's trichrome staining in Sham, NS and treatment groups (scale bar=500 μm, zoom=50 μm), n=5; B: Western blot analysis of α-SMA and FN expression *in vivo*, n=5; C: Western blot analysis of p-STAT3 expression *in vivo*, n= 5; D: Western blot analysis of α-SMA and FN expression *in vitro*, n= 3; E: Western blot analysis of p-STAT3 expression *in vitro*, n=3. $^{(1)}P<0.05$, $^{(2)}P<0.01$, $^{(3)}P<0.001$, $^{(4)}P<0.000\ 1$ by One-way ANOVA, $\bar{x}\pm s$.

图7 IL-6反式信号通路激活剂Hyper-IL-6与阻断剂sgp130Fc的影响

Fig 7 Effects of IL-6 trans-signaling pathway activator Hyper-IL-6 and blocking agent sgp130Fc

的剂量和最佳给药时间进行了探讨。这为临床治疗的安全性和有效性提供了相关动物实验依据。

近期研究报道IL-6反式信号通路是成纤维细胞激活的关键途径，其阻滞剂Fc-gp130可抑制成纤维细胞的激活[29]。受损肾小管通过分泌IL-6激活临近成纤维细胞的现象也已被发现[50]。在经典信号通路中，IL-6和膜IL-6受体（membrane-bound interleukin-6 receptor，mIL-6R）结合并募集gp130形成同型二聚体，主要在抗炎和维持稳态中发挥保护作用。相反，在IL-6介导的反式信号通路中，IL-6与可溶性IL-6受体（soluble interleukin-6 receptor，sIL-6R）结合激活靶细胞膜上的gp130。这一途径主要发挥促炎作用[51]。健康个体的IL-6水平很低，在败血症或急性炎症期间，IL-6可以急剧升高1 000倍，sIL-6R的水平也相应增加10倍[26,30]。在许多慢性炎症条件下，IL-6反式信号通路也被激活，如类风湿关节炎[52]和神经退行性疾病等[53]。本研究的免疫荧光双染色结果显示，小鼠损伤小管合成较高水平的IL-6，并在周围间质富集高表达α-SMA的活化肌成纤维细胞，提示肾成纤维细胞被IL-6激活，加重肾间质纤维化。

在肾固有细胞中，只有足细胞表达mIL-6R，其他细胞不表达mIL-6R，不参与经典的IL-6信号通路[6,27]。我们观察到IL-6反式信号通路可激活肾成纤维细胞转化为肌成纤维细胞。CS显著抑制sIL-6R蛋白含量，而对mIL-6R蛋白含量无显著影响。IL-6反式信号通路下游蛋白STAT3的磷酸化激活与肾纤维化密切相关，CS抑制可显著降低患肾p-STAT3的蛋白水平。在细胞实验中，我们观察到虫草素可以抑制NRK-52E在TGF-β刺激下的IL-6的分泌。虫草素也可以抑制NRK-49F中的IL-6反式信号通路的激活。Hyper-IL-6是一种人工合成的融合蛋白，由人IL-6和人sIL-6R通过柔性肽链连接组成，模拟了IL-6和sIL-6R的复合物，能够结合gp130并激活下游信号通路，从而选择性激活IL-6反式信号通路[54]。在小鼠体内实验中，同时给予CS与Hyper-IL-6进行干预，结果显示削弱了CS对肾纤维化的治疗效果，证实了CS通过抑制IL-6反式信号通路的激活发挥作用；而外源的sgp130Fc可以选择性阻断IL-6反式信号传导发挥治疗作用。该结果进一步验证了CS通过抑制IL-6反式信号通路减弱成纤维细胞活化，进而抑制肾纤维化。

综上所述，CS可通过抑制小鼠肾小管上皮细胞分泌IL-6与成纤维细胞中IL-6反式信号通路的激活，改善肾间质纤维化。IL-6反式信号通路可能是CS抑制肾纤维化的重要治疗靶点。未来，我们将聚焦CS调控IL-6反式信号通路的具体分子靶点，以期为改善CKD患者的治疗策略作出贡献。

作者贡献声明 孙滢雪 实验实施，数据采集，论文撰写和修订。陈军 实验实施，文献调研。唐培宸 数据采集，文献调研。张健，陈威泽，颜芷昕 分子生物学实验指导。宋娜娜 实验设计和指导，论文指导和修订。

利益冲突声明 所有作者均声明不存在利益冲突。

参 考 文 献

[1] GBD CHRONIC KIDNEY DISEASE COLLABORATION. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990－2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *Lancet*, 2020, 395(10225): 709-733.

[2] WEBSTER AC, NAGLER EV, MORTON RL, *et al*. Chronic kidney disease [J]. *Lancet*, 2017, 389(10075): 1238-1252.

[3] FOREMAN KJ, MARQUEZ N, DOLGERT A, *et al*. Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016－40 for 195 countries and territories [J]. *Lancet*, 2018, 392(10159): 2052-2090.

[4] PEEK JL, WILSON MH. Cell and gene therapy for kidney disease[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2023, 19(7): 451-462.

[5] HUMPHREYS BD. Mechanisms of renal fibrosis[J]. *Annu Rev Physiol*, 2018, 80: 309-326.

[6] JONES SA, HORIUCHI S, TOPLEY N, *et al*. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease[J]. *Faseb*, 2001, 15(1): 43-58.

[7] HAN F, DOU M, WANG Y, *et al*. Cordycepin protects renal ischemia/reperfusion injury through regulating inflammation, apoptosis, and oxidative stress [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2020, 52(2): 125-132.

[8] XU H, CHENG J, HE F. Cordycepin alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by enhancing autophagy via AMPK-mTOR pathway [J]. *J Physiol Biochem*, 2022, 78(2): 401-413.

[9] YU H, HONG X, LIU L, *et al*. Cordycepin decreases Ischemia/Reperfusion injury in diabetic hearts via upregulating AMPK/Mfn2-dependent mitochondrial fusion [J].*Front Pharmacol*,2021,12:754005.

[10] DENG Q,LI X,FANG C,*et al*.Cordycepin enhances anti-tumor immunity in colon cancer by inhibiting phagocytosis immune checkpoint CD47 expression [J]. *Int Immunopharmacol*,2022,107:108695.

[11] ALAMOUDI AJ, ALESSI SA, RIZG WY, *et al*. Cordycepin attenuates testosterone-induced benign prostatichyperplasia in rats via modulation of AMPK and AKT activation [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(8): 1652-1665.

[12] PANWONG S,WATHIKTHINNAKON M,KAEWKOD T,*et al*.Cordycepin sensitizes cholangiocarcinoma cells to be killed by natural killer-92 (NK-92) cells[J].*Molecules*,2021,26(19):5973-5989.

[13] WEI P,WANG K,LUO C,*et al*.Cordycepin confers long-term neuroprotection via inhibiting neutrophil infiltration and neuroinflammation after traumatic brain injury [J]. *J Neuroinflamm*,2021,18(1):137-153.

[14] YONG T, CHEN S, XIE Y, *et al*. Cordycepin, a characteristic bioactive constituent in cordyceps militaris, ameliorates hyperuricemia through URAT1 in hyperuricemic mice[J].*Front Microbiol*,2018,9:58.

[15] ZHENG R,ZHANG W,SONG J,*et al*.Cordycepin from cordyceps militaris ameliorates diabetic nephropathy via the miR-193b-5p/MCL-1 axis [J]. *Chin Med-UK*, 2023, 18(1):134-152.

[16] YANG J,DONG H,WANG Y,*et al*.Cordyceps cicadae polysaccharides ameliorated renal interstitial fibrosis in diabetic nephropathy rats by repressing inflammation and modulating gut microbiota dysbiosis [J]. *Int J Biol Macromol*,2020,163:442-456.

[17] ZHANG Q, XIAO X, LI M, *et al*. Bailing capsule (cordyceps sinensis) ameliorates renal triglyceride accumulation through the PPARα pathway in diabetic rats [J].*Front Pharmacol*,2022,25(13):915592.

[18] YU S, DUBEY NK, LI W, *et al*. Cordyceps militaris treatment preserves renal function in type 2 diabetic nephropathy mice[J].*Plos One*,2016,11(11):e0166342.

[19] WANG H, DUAN M, XU M, *et al*. Cordycepin ameliorates cardiac hypertrophy via activating the AMPKα pathway[J].*J Cell Mol Med*,2019,23(8):5715-5727.

[20] 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.

[21] TALBOTT HE, MASCHARAK S, GRIFFIN M, *et al*. Wound healing, fibroblast heterogeneity, and fibrosis [J]. *Cell Stem Cell*,2023,29(8):1161-1180.

[22] HUMPHREYS BD, LIN S-L, KOBAYASHI A, *et al*. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis [J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(1):85-97.

[23] QUAGGIN SE, KAPUS A. Scar wars: mapping the fate of epithelial-mesenchymal-myofibroblast transition [J]. *Kindey Int*,2011,80(1):41-50.

[24] LI L, HE D, YANG J, *et al*. Cordycepin inhibits renal interstitial myofibroblast activation probably by inducing hepatocyte growth factor expression [J].*J Pharmacol Sci*, 2011,117(4):286-294.

[25] MAGNO AL, HERAT LY, CARNAGARIN R, *et al*. Current knowledge of IL-6 cytokine family members in acute and chronic kidney disease [J].*Biomedicines*, 2019, 7(1):19-33.

[26] KNüPFER H, PREISS R. sIL-6R: more than an agonist? [J].*Immunol Cell Biol*,2008,86(1):87-91.

[27] SU H, LEI C, ZHANG C. Interleukin-6 signaling pathway and its role in kidney disease: an update[J].*Front Immunol*, 2017,8:405.

[28] GROZA Y, JEMELKOVA J, KAFKOVA LR, *et al*. IL-6 and its role in IgA nephropathy development [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*,2022,66:1-14.

[29] CHEN W, YUAN H, CAO W, *et al*. Blocking interleukin-6 trans-signaling protects against renal fibrosis by suppressing STAT3 activation [J]. *Theranostics*, 2019, 9(14):3980-3991.

[30] ROSE-JOHN S, JENKINS BJ, GARBERS C, *et al*. Targeting IL-6 trans-signalling: past, present and future prospects[J].*Nat Rev Immunol*,2023,23(10):666-681.

[31] HAN H, MA Q, LI C, *et al*. Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors [J].*Emerg Microbes Infec*, 2020, 9(1): 1123-1130.

[32] SUN T, DONG W, JIANG G, *et al*. Cordyceps militaris improves chronic kidney disease by affecting TLR4/NF-κB redox signaling pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019,2019:7850863.

[33] CHEN TK, KNICELY DH, GRAMS ME. Chronic kidney disease diagnosis and management: a review [J]. *JAMA*, 2020,322(13):1294-1304.

[34] LIU M, LI XC, LU L, *et al*. Cardiovascular disease and its relationship with chronic kidney disease [J]. *Eur Rev Med Pharmaco*, 2014, 19:2918-2926.

[35] TUTTLE KR, JONES CR, DARATHA KB, *et al*.

Incidence of chronic kidney disease among adults with diabetes, 2015–2020[J]. *N Engl J Med*, 2022, 387(15): 1430-1431.

[36] FU Y, XIANG Y, LI H, *et al*. Inflammation in kidney repair: mechanism and therapeutic potential[J]. *Pharmacol Therapeut*, 2022, 237: 108240.

[37] BÜLOW RD, BOOR P. Extracellular matrix in kidney fibrosis: more than just a scaffold [J]. *J Histochem Cytochem*, 2019, 67(9): 643-661.

[38] LI L, HE M, TANG X, *et al*. Proteomic landscape of the extracellular matrix in the fibrotic kidney[J]. *Kidney Int*, 2023, 103(6): 1063-1076.

[39] XIAO L, GE Y, SUN L, *et al*. Cordycepin inhibits albumin-induced epithelialmesenchymal transition of renal tubular epithelial cells by reducing reactive oxygen species production[J]. *Free Radical Res*, 2022, 46(2): 174-183.

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

[41] ZHANG Y, LI K, ZHANG C, *et al*. Research progress of cordyceps sinensis and its fermented mycelium products on ameliorating renal fibrosis by reducing epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *J Inflamm Res*, 2023, 16: 2817-2830.

[42] ZHANG XL, LIU BC, AL-ASSAF S, *et al*. Cordyceps sinensis decreases TGF- β1 dependent epithelial to mesenchymal transdifferentiation and attenuates renal fibrosis[J]. *Food Hydrocolloids*, 2012, 28: 200-212.

[43] PAN MM, ZHANG MH, NI HF, *et al*. Inhibition of TGF-β1/Smad signal pathway is involved in the effect of cordyceps sinensis against renal fibrosis in 5/6 nephrectomy rats[J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 58: 487-494.

[44] ZHAO Q, SHAO T, ZHU Y, *et al*. An MRTF-A-ZEB1-IRF9 axis contributes to fibroblast-myofibroblast transition and renal fibrosis[J]. *Exp Mol Med*, 2023, 55(5): 987-998.

[45] HONG W, ZHANG G, LU H, *et al*. Epithelial and interstitial Notch1 activity contributes to the myofibroblastic phenotype and fibrosis[J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 17(1): 145-160.

[46] GUO C, DONG G, LIANG X, *et al*. Epigenetic regulation in AKI and kidney repair: mechanisms and therapeutic implications[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2021, 15(4): 220-239.

[47] ZHOU D, FU H, XIAO L, *et al*. Fibroblast-specific β-catenin signaling dictates the outcome of AKI[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2018, 29(4): 1257-1271.

[48] ZHOU D, FU H, LIU S, *et al*. Early activation of fibroblasts is required for kidney repair and regeneration after injury[J]. *Faseb J*, 2019, 33(11): 12576-12587.

[49] ZHANG Y, QIN X, YANG Y, *et al*. Ginkgo biloba extract attenuates cisplatin-induced renal interstitial fibrosis by inhibiting the activation of renal fibroblasts through down-regulating the HIF-1α/STAT3/IL-6 pathway in renal tubular epithelial cells [J]. *Phytomedicine*, 2023, 115: 154809.

[50] NECHEMIA-ARBELY Y, BARKAN D, PIZOV G, *et al*. IL-6/IL-6R axis plays a critical role in acute kidney injury [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(6): 1106-1115.

[51] PANDOLFI F, FRANZA L, CARUSI V, *et al*. Interleukin-6 in rheumatoid arthritis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): 5238-5250.

[52] FEIGERLOVÁ E, BATTAGLIA-HSU SF. IL-6 signaling in diabetic nephropathy: from pathophysiology to therapeutic perspectives[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2017, 37: 57-65.

[53] PETER M, BLINN G, SOLEM F, *et al*. *In vivo* and *in vitro* activities of the gp130-stimulating designer cytokine hyper-IL-6[J]. *J Immuno*, 1998, 161(7): 3575-3781.

[54] NECHEMIA-ARBELY Y, BARKAN D, PIZOV G, *et al*. IL-6/IL-6R axis plays a critical role in acute kidney injury [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(6): 1106-1115.

（收稿日期：2024-05-06；编辑：王蔚）