DOI:10.16016/j.1000-5404.202007105

干预血栓调节蛋白表达对糖尿病肾病肾损伤的影响

汪 伟,李 怡,吴 松,陈 瑾,王艳梅,唐 韵,李贵森,丁涵露 610072 成都,四川省人民医院肾内科,电子科技大学医学院四川省肾脏疾病临床研究中心

[摘要] **目的** 探讨干预血栓调节蛋白(thrombomodulin,TM)表达对糖尿病肾病(diabetic nephropathy,DN)肾损伤的影响及可能机制。**方法** ①利用免疫组化检测25例DN患者肾组织以及6例正常肾组织中肝X受体-α(liver X receptor-α,LXR-α)、TM、凝血因子XⅢ-A(FXⅢ-A)和CD163表达;②在明确LXR-α激动剂T0901317上调db/db小鼠TM表达及TM干扰RNA(Ad-TM shRNA)下调TM表达作用后,将12周龄雄性db/db小鼠分为4组($n=6$):DN生理盐水组、Ad-ctrl+DN组、T0901317+DN组、Ad-TM shRNA+DN组,C57BL6野生小鼠作为正常对照组。上述5组给药4周后,Western blot、免疫组化观察干预TM表达对肾组织TM、LXR-α、FXⅢ-A、CD163表达的影响,ELISA检测血炎症介质(TNF-α、IL-6)以及尿微量白蛋白的变化。**结果** DN患者肾组织TM、LXR-α表达量较对照组下降,且与肾小球滤过率正相关($P<0.05$);而FXⅢ-A和CD163表达较对照组升高,且与肾小球滤过率负相关($P<0.05$)。动物实验显示:DN生理盐水组与野生小鼠对照组相比、Ad-TM shRNA组与DN对照组相比,均表现为尿微量白蛋白和血TNF-α、IL-6水平上升、肾组织TM和LXR-α表达减少、FXⅢ-A和CD163表达增加($P<0.05$),而T0901317+DN组较DN对照组,上述指标改善。**结论** 表达上调的TM可能通过抑制肾组织FXⅢ-A、CD163表达以及下调血炎症介质水平而改善db/db小鼠尿蛋白水平。

[关键词] 血栓调节蛋白;糖尿病肾病;肝X受体;凝血因子Ⅲ-A;db/db小鼠
[中图法分类号] R692.9;TQ937 [文献标志码] A

Effect of modulating thrombomodulin expression on renal injury in rats with diabetic nephropathy

WANG Wei, LI Yi, WU Song , CHEN Jin, WANG Yanmei, TANG Yun, LI Guisen, DING Hanlu Department of Nephrology, Sichuan Clinical Research Center for Kidney Diseases, Sichuan Provincial People's Hospital, Medical School of University of Electronic Science and Technology, Chengdu, Sichuan Province, 610072, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of modulating thrombomodulin (TM) expression on renal injury in a rat model of diabetic nephropathy (DN) and explore the possible mechanism. **Methods** We examined the expression of liver X receptor-α (LXR-α), TM, coagulation factor XⅢ-A (FXⅢ-A) and CD163 in 25 renal biopsy samples from patients with DN and in 6 normal renal tissue specimens using immunohistochemistry. Twenty-four 12-week-old male db/db mice with DN were randomly assigned into 4 equal groups and treated daily with intragastric administration of normal saline or LXR-α agonist T0901317, or with intravenous injection of an adenoviral vector carrying TM shRNA or the control adenoviral vector for 7 consecutive days; 6 wild-type C57BL6 mice with intragastric saline treatment served as the normal control group. Four weeks after the treatment, the expression of TM, LXR-α, FXⅢ-A and CD163 in the renal tissues of the mice were detected using Western blotting, the levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukine-6 (IL-6) were detected by ELISA, and the urinary microalbumin level was determined. **Results** The renal expression levels of TM and LXR-α were decreased ($P<0.05$) and those of FXⅢ-A and CD163 were increased significantly ($P<0.05$) in the kidney tissues of DN patients compared with normal kidney tissues. In db/db mouse model of DN, the expression levels of TM and LXR-α were positively correlated while those of FXⅢ-A

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81170680);四川省科技厅应用基础项目(2018JY0332);四川省人民医院2014年青年基金资助项目(3030503851)

[通信作者] 丁涵露,E-mail:dhanlu@163.com

1000-5404/Copyright © 2021,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

and CD163 were negatively correlated with glomerular filtration rate ($P<0.05$). Compared with the wild-type mice, the mouse model of DN showed significantly increased urinary microalbumin levels and serum levels of TNF-α and IL-6, lowered renal expressions of TM and LXR-α, and increased renal expression of FXⅢ-A and CD163; these changes were further exacerbated in the mice treated with Ad-TM shRNA ($P<0.05$) but significantly improved in the mouse models treated with T0901317. **Conclusion** Upregulating TM expression can reduce urinary microalbumin level in db/db mouse model of DN by inhibiting the renal expression of FXⅢ-A and CD163 and downregulating blood levels of inflammatory mediators.

[**Key words**] thrombomodulin; diabetic nephropathy; liver X receptor-α; coagulation factor XⅢ-A; db/db mice

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81170680), the Applied Basic Science Research Project of Sichuan Provincial Department of Science and Technology (2018JY0332) and the Research Funds for Young Scholars of Sichuan Provincial People's Hospital (3030503851). Corresponding author: DING Hanlu, E-mail: dhanlu@163.com

炎症反应在糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)的发病中具有重要作用,目前无有效手段改善异常的炎症反应[1]。血栓调节蛋白(thrombomodulin, TM)是一种跨膜糖蛋白,TM 的凝集素样结构域可减轻 DN 小鼠尿蛋白,但具体机制不完全清楚[2]。TM 一方面通过其抗凝功能发挥抗炎作用,另一方面通过促进活化蛋白 C 形成及抑制高迁移率族蛋白 1 等途径发挥重要的内源性抗炎功能[3],近期发现 TM 在抗炎的同时还具有下调凝血因子Ⅲ的 A 亚单位(coagulation factor Ⅲ-A,FXⅢ-A)表达的作用[4-5],FXⅢ又称为人凝血因子 XⅢ,是参与凝血级联反应的最后一个凝血因子,FXⅢ是一种酶原,其活化形式是 FXⅢ-A,后者是一种转谷氨酰胺酶,FXⅢ-A 作用于凝血末期,交联并稳定沉积的纤维蛋白,并具有促进 M2 型巨噬细胞极化的作用[6],最新研究发现 FXⅢ-A 基因敲除小鼠可防止胰岛素抵抗[7],但 TM 与 FXⅢ-A 在 DN 中的表达以及相互影响尚不清楚。

上述研究结果提示:干预 DN 肾组织 TM 表达可能会影响 DN 炎症反应、肾组织 FXⅢ-A 表达、M2 型巨噬细胞浸润以及尿蛋白水平。凝血酶、血管内皮生长因子、1,25-二羟维生素 D3、维甲酸、他汀类药物等虽然可以上调 TM 表达[8],但并不能延缓 DN 进展。本课题组之前发现肾小球内皮细胞上的 TM 在肝 X 受体(liver X receptor, LXR)激动剂 T0901317 作用下表达升高并抑制高糖条件下内皮细胞分泌炎症介质[9],同时发现 T0901317 通过活化 db/db 小鼠肾组织 LXR-α 亚型而降低小鼠血肌酐并改善肾病理损伤[10-11],提示 LXR 激动剂 T0901317 可能通过上调 DN 肾组织 TM 表达减轻肾损伤。

因此,本研究拟首先检测 LXR-α、TM、FXⅢ-A 和 M2 型巨噬细胞标志物 CD163 在 DN 患者肾穿刺组织中的表达,然后分别观察 T0901317 上调 TM 表达及 TM 干扰 RNA 重组腺病毒 Ad-TM shRNA 下调 TM 表达后,db/db 小鼠血炎症介质、尿微量白蛋白和肾组织 LXR-α、TM、FXⅢ-A、CD163 表达变化,以期明确干预 TM 表达是否减少炎症介质水平以及 FXⅢ-A 和 CD163 表达并改善 DN 肾损伤,为 DN 的发病机制和治疗提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象、实验动物和主要试剂材料

选取 2015-2019 年在我科经肾脏穿刺活检确诊为糖尿病肾病的患者 25 例(DN 组),其中男性 14 例,女性 11 例,年龄(39±15)岁,排除原发性肾病和其他继发性肾病。患者估算的肾小球滤过率(eGFR)是基于 CKD-EPI 公式计算而得,eGFR 和 24 h 尿蛋白定量均为肾穿刺之前由本院检验科检测而得。本研究获得四川省人民医院伦理委员会审查批准(2020392),所有研究对象签署知情同意书。对照组(Control)6 例,选自因肾脏肿瘤而行肾脏切除术的患者,所取肾组织标本远离肿瘤部分。

8 周龄雄性 db/db 小鼠购于南京君科生物有限责任公司,与本实验室 8 周龄雄性 C57BL6 小鼠均饲养于四川省人民医院动物实验中心(SPF 级),20~24 ℃、12 h 光暗周期并且自由进食。兔抗小鼠/抗人 TM 多克隆抗体(sc271804)购于美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,兔抗小鼠/抗人 FXⅢ-A 抗体(#ab76105)和兔抗小鼠/抗人 CD163(#9052821)购于北京中杉金桥生物公司,小鼠肿瘤坏死因子 α(TNF-α)和小鼠白介素-6(IL-6)ELISA 试剂盒购于武汉华美公司,T0901317 购于美国 Sigma 公司,重组腺病毒 Ad-TM shRNA 和重组腺病毒空载体对照 Ad-Ctrl shRNA(简称 Ad-Ctrl)由成都帝肯科技有限公司合成并验证。

1.2 实验动物分组

根据前期实验,本研究选择出现了显著 DN 特征的 24 只 12 周龄雄性 db/db 小鼠为实验对象,平均分为 4 组:DN 生理盐水组、Ad-ctrl+DN 组、T0901317+DN 组和 Ad-TM shRNA+DN 组,同周龄雄性野生 C57BL6 小鼠(WT 组)与 DN 生理盐水组小鼠给予 0.5 mg/(kg·d)生理盐水灌胃,根据预实验结果,以可以明显降低肾组

织 TM 表达的 2.5×10^9 pfu Ad-TM shRNA 尾静脉注射小鼠,以可显著提高肾组织 TM 表达的 0.5 mg/(kg·d) T0901317 灌胃,Ad-TMshRNA 或 Ad-ctrl 给药后 1 周,再以 T0901317 连续给药 7 d,于末次给药后 4 周收集随机尿,以安乐死处死小鼠后收集肾组织样本和血样。

1.3 免疫组化检测患者肾组织 TM、LXR-α、FXⅢ-A 和 CD163 表达

选取我院 2015-2019 年诊断为 DN 的患者的肾穿刺组织,常规石蜡包埋切片为 4 μm,常规脱蜡、水洗后,3% H_2O_2 室温 15 min,行 EDTA 微波修复,分别滴加 TM 抗体(1∶100)、LXR-α 抗体(1∶100)、FXⅢ-A 抗体(1∶500)和 CD163 抗体(1∶500),4 ℃过夜。次日 0.01 mol/L PBS 洗 5 min×3 次后,即按照超敏 SP 免疫组化试剂盒说明书进行操作,DAB 显色,苏木精复染细胞核。阴性对照以 PBS 代替一抗,同法操作。

1.4 小鼠尿微量白蛋白检测

将收集的尿样本离心后送四川省人民医院检验科行尿微量白蛋白检测。

1.5 ELISA 观察小鼠外周血 TNF-α、IL-6 水平

按照试剂盒说明书操作,样本孔按 10∶1比例加待检血清,后再以 40∶1比例加稀释液,再加 TNF-α 抗体(100∶1)和 IL-6 抗体(200∶1);空白孔不加任何试剂;酶标仪上 450 nm 处,用空白对照孔为标准,测各孔光密度值 D(450)。用 Curve 软件绘制出标准品线性回归曲线,再用 D(450)值按 Curve 软件的方程,计算各浓度,每个样本各设 5 孔,每个实验组重复 3 次。

1.6 Western blot 检测小鼠肾组织 TM 和 FXⅢ-A 表达

提取各组小鼠肾组织总蛋白,检测细胞总蛋白浓度后,取 50 μg 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,将凝胶中蛋白质转移至聚偏二氟乙烯膜上。将标记好的膜转入牛奶中,封闭 1 h,分别滴加一抗(TM 抗体 1∶1 000、FXⅢ-A 抗体 1∶1 000),4 ℃摇床孵育过夜后将膜放到各个对应的二抗(用 TBST 按 1∶1 000 比例)孵育 1 h。在膜上均匀滴加曝光液并显色曝光,每组重复 3 次。Western blot 条带采用 Image J 图像分析软件分析光密度,以目的条带和 β-actin 条带积分光密度值的比值代表目的蛋白的相对表达量,每组重复 3 次。

1.7 免疫组化阳性细胞结果判断

肾小球或间质血管中 TM 的染色强度分为以下等级:0 为阴性;1+为≤25%的毛细血管袢或间质血管阳性;2+为 26%~50%的毛细血管袢或间质血管阳性;3+为 51%~75%的毛细血管袢或间质血管阳性,4+为>75% 的毛细血管袢或间质血管呈阳性。肾组织 LXR-α 染色强度分为:0 级为阴性;1 级为弱阳性;2 级为中度阳性;3 级为强阳性。肾小球中浸润的 $CD163^+$ 和 $FXⅢ\text{-}A^+$ 细胞数以每个肾小球阳性细胞数表达,0 为 0 个阳性细胞,1 为 1~4 个阳性细胞,2 为 5~10 个阳性细胞,3 为>10 个阳性细胞。肾小管间质中浸润的 $CD163^+$ 和 $FXⅢA^+$ 细胞数在 0 到 4^+ 的范围内进行半定量评估:0 为无染色;1^+ 为≤25% 的细胞染色;2^+ 为 26%~50%的细胞染色;3^+ 为 51%~75%的细胞染色;4^+ 为>75%的细胞染色。分别取 10 个不重叠的高倍视野下肾小球或肾小管间质中 TM、LXR-α、FXⅢ-A 和 CD163 阳性染色的平均值作为该例样本的得分[12]。

1.8 统计学分析

以 SPSS 25.0 统计软件处理数据。计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,正态计量资料采用单因素方差分析和独立样本 t 检验。采用非参数检验(Spearman 秩相关)分析各指标之间的相关性。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 DN 患者临床特点

DN 组患者肾小球滤过率(eGFR)和 24 h 尿蛋白水平分别为(61.59±32.36) mL/(min·1.73m^2)和(4.2±1.2)g/24 h,对照组 eGFR 水平为(97.5±10.8) mL/(min·1.73m^2)。

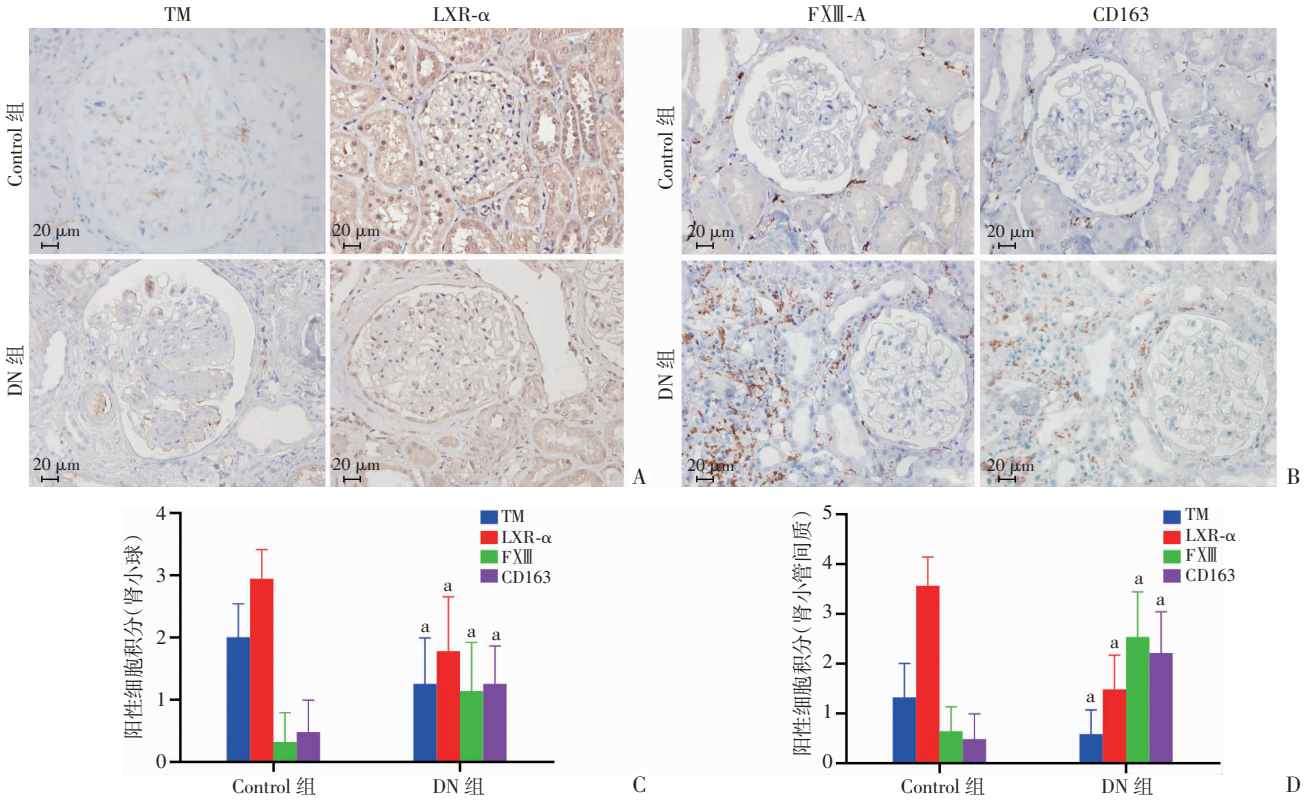
2.2 DN 患者肾组织 TM、LXR-α、FXⅢ-A、CD163 表达及其与临床指标相关性分析

免疫组化显示:在 DN 患者肾组织中,TM^+ 细胞主要分布于肾小球毛细血管和管周毛细血管(图 1A),$LXR\text{-}\alpha^+$ 细胞主要分布于肾小球细胞和肾小管上皮细胞(图 1A),$FXⅢ\text{-}A^+$ 细胞和 $CD163^+$ 细胞主要分布在肾小管间质(图 1B),半定量分析显示:DN 患者的 TM^+ 细胞和 $LXR\text{-}\alpha^+$ 细胞数量较正常肾组织表达量减少、$FXⅢ\text{-}A^+$ 细胞和 $CD163^+$ 细胞表达增加(图 1C、D)。相关性分析发现:肾小球和肾小管间质的 TM^+ 细胞分值分别与肾小球和肾小管间质的 $LXR\text{-}\alpha^+$ 细胞评分呈正相关($r=0.84$,$P<0.001$;$r=0.67$,$P=0.004$),肾小球、肾小管间质的 TM^+ 和 $LXR\text{-}\alpha^+$ 细胞数均与尿蛋白负相关($r=-0.64$、-0.71、-0.60、-0.82,P 均<0.01);肾小球、肾小管间质的 TM^+ 细胞评分和 $LXR\text{-}a^+$ 细胞评分均与 eGFR 水平呈正相关($r=0.97$、0.85、0.86、0.85;P 均<0.001)。肾小球、肾小管间质 $FXⅢ\text{-}A^+$ 细胞、$CD163^+$ 细胞计分分别与 eGFR 负相关($r=-0.71$、-0.89、-0.95、-0.93,P 均<0.01),$FXⅢ\text{-}A^+$ 细胞、$CD163^+$ 细胞计分与尿蛋白水平无相关性(数据未显示)。

2.3 干预 db/db 小鼠肾组织 TM 表达对 TM、LXR-α、FXⅢ-A 和 CD163 表达的影响

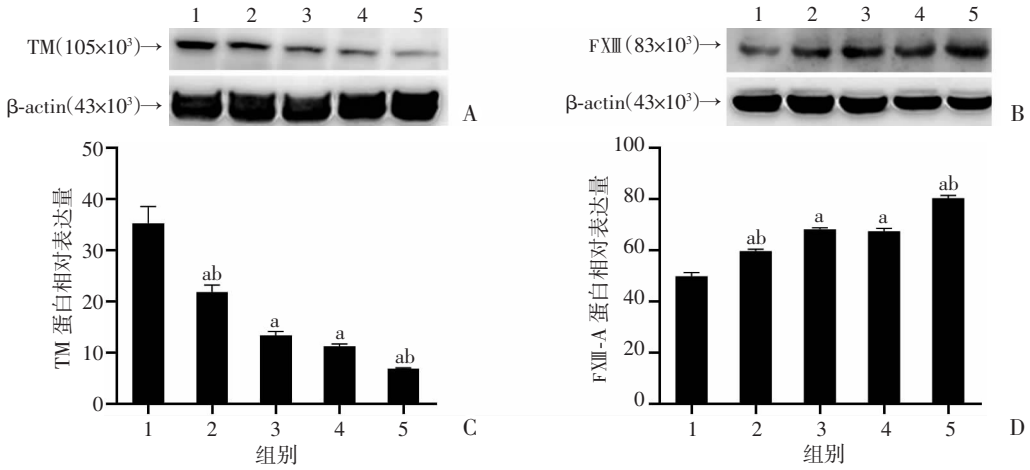
预实验及 Western blot 检测结果显示:与 DN 生理盐水组小鼠比较,LXR-α 激动剂 T0901317 成功上调 db/db 小鼠肾组织 TM 表达,而 Ad-TM shRNA 成功下调 TM 表达;伴随 TM 表达上调的同时,FXⅢ-A 表达下降(图 2)。免疫组化显示:TM^+ 细胞主要分布于肾

小球毛细血管和管周毛细血管,LXR-α$^+$细胞主要分布于肾小管上皮细胞和肾小球细胞,FXⅢ-A$^+$细胞和CD163$^+$细胞在野生鼠肾组织表达较少,但db/db小鼠肾组织中存在大量FXⅢ-A$^+$细胞和CD163$^+$细胞(图3A);半定量分析发现:DN生理盐水组与野生小鼠相比、Ad-TM shRNA沉默TM组与DN生理盐水组相比,均表现为肾组织TM和LXR-α表达减少、FXⅢ-A和CD163表达增加($P<0.05$),而T0901317上调TM表达同时,伴随LXR-α表达增加,FXⅢ-A和CD163表达减少(图3B、C)。



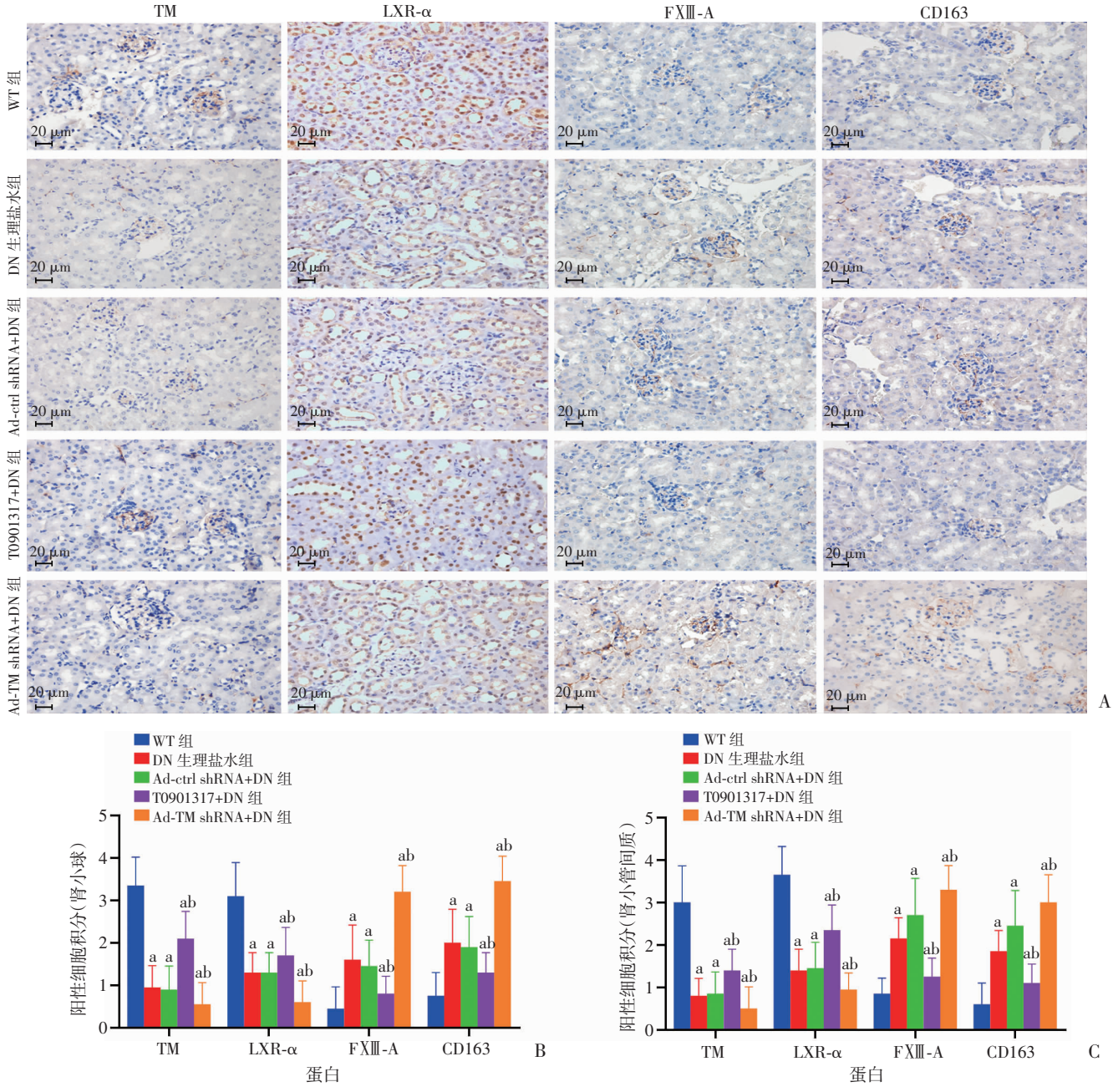
A:免疫组化检测TM和LXR-α表达(S-P);B:免疫组化检测FXⅢ-A和CD163表达(S-P);C、D:分别为肾小球和肾小管间质TM$^+$、LXR-α$^+$、FXⅢ-A$^+$、CD163$^+$细胞分值比较($n=6$)　a:$P<0.05$,与Control组比较

图1　免疫组化检测对照组和DN患者肾组织TM、LXR-α、FXⅢ-A、CD163表达及定量分析



A、B:分别为Western blot检测TM和FXⅢ-A表达;C、D:分别为TM和FXⅢ-A表达半定量分析($n=6$)　1:WT组;2:T0901317+DN组;3:DN生理盐水组;4:Ad-ctrl shRNA+DN组;5:Ad-TM shRNA+DN组;a:$P<0.05$,与WT组比较;b:$P<0.05$,与DN生理盐水组和Ad-ctrl shRNA+DN组比较

图2　Western blot检测野生鼠和db/db小鼠肾组织TM和FXⅢ-A表达



A:免疫组化检测(S-P);B、C:分别为肾小球、肾小管间质 TM^+、LXR-α^+、FXⅢ-A^+、$CD163^+$细胞分值比较($n=6$)

a:$P<0.05$,与 WT 组比较;b:$P<0.05$,与 DN 生理盐水组和 Ad-ctrl shRNA+DN 组比较

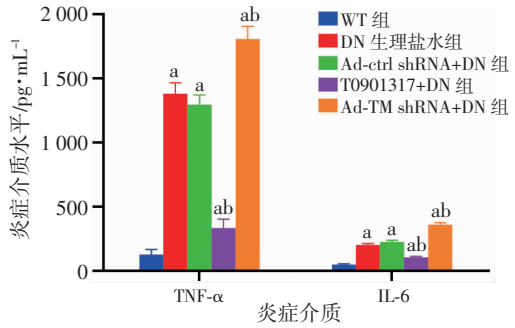
图 3 免疫组化检测野生鼠和 db/db 小鼠肾组织 TM、LXR-α、FXⅢ-A 和 CD163 表达及定量分析

2.4 干预 db/db 小鼠肾组织 TM 表达对尿微量白蛋白的影响

野生小鼠的尿微量白蛋白水平是(0.61±0.07)mg/L,DN 生理盐水组和 Ad-ctrl+DN 组小鼠尿微量白蛋白水平分别增加至(1.25±0.12)mg/L 和(1.25±0.13)mg/L,与 DN 生理盐水组比较,沉默 TM 后小鼠尿微量白蛋白增至(1.78±0.11)mg/L($P<0.05$),而 T0901317 刺激 TM 表达后尿微量白蛋白降至(0.77±0.11)mg/L($P<0.05$)。

2.5 干预 db/db 小鼠肾组织 TM 表达对外周血 TNF-α 和 IL-6 水平的影响

ELISA 检测结果显示:DN 生理盐水组较野生小鼠组,其外周血 TNF-α 和 IL-6 水平均下降($P<0.05$),与 DN 生理盐水组比较,沉默 TM 后小鼠外周血 TNF-α 和 IL-6 水平增加($P<0.05$),而 T0901317 上调 TM 表达后 TNF-α 和 IL-6 的水平明显减少($P<0.05$,图 4)。



a: $P<0.05$,与 WT 组比较;b: $P<0.05$,与 DN 生理盐水组和 Ad-ctrl shRNA+DN 比较

图 4 ELISA 检测各组小鼠外周血 TNF-α 和 IL-6 水平 ($n=6,\bar{x}\pm s$)

3 讨论

为探讨干预 TM 表达对 DN 肾损伤的影响及是否与炎症反应有关,本研究首先利用免疫组化检测 DN 患者肾组织中 TM、LXR-α、FXⅢ-A 和 CD163 表达,结果发现 DN 患者肾组织 TM、LXR-α 表达量较对照组下降,与肾小球滤过率正相关;而 FXⅢ-A 和 CD163 表达较对照组升高,且与肾小球滤过率负相关,提示干预 TM 表达可能会通过影响炎症介质表达而改善 DN 肾损伤。故以 db/db 糖尿病肾病小鼠为模型,探讨在体调控 TM 表达后对肾组织 FXⅢ-A、CD163 表达、尿蛋白以及血炎症介质水平的影响,结果发现:LXR-α 激动剂 T0901317 上调 db/db 小鼠肾组织 TM 表达后,伴随肾组织 FXⅢ-A 和 CD163 表达较 db/db 对照组下降,而尿微量白蛋白以及血炎症介质 TNF-α、IL-6 水平均下降;在 Ad-TM shRNA 沉默 db/db 小鼠 TM 表达后,肾组织 FXⅢ-A 和 CD163 表达量较 DN 生理盐水组升高、尿微量白蛋白和血炎症介质水平升高。上述结果提示 TM 可能通过下调 FXⅢ-A 表达、抑制炎症介质分泌而改善 db/db 小鼠尿微量白蛋白水平。

TM 最初发现于血管内皮细胞,最近发现 TM 亦存在于血小板、单核细胞、中性粒细胞、平滑肌细胞和肿瘤细胞等多个细胞上。在炎症反应以及氧化应激作用下,内皮细胞受损,TM 胞外段从内皮细胞脱落而释放入血[4],DN 患者血可溶性 TM 表达升高[13],上调 TM 表达可能是炎症所致 DN 微血管疾病的潜在治疗方法。TM 从细胞外到细胞内,分别是 N 末端血凝素样结构区、内皮生长因子样结构区、富含丝氨酸/苏氨酸结构区、跨膜结构区及胞内结构区,已有的研究发现:缺乏 TM 凝集素样结构域的糖尿病小鼠肾病更严重,而重组凝集素样结构域能减少尿蛋白和巨噬细胞进入肾脏,改善肾小管上皮细胞和肾小球内皮细胞凋亡[2]。本研究发现在 DN 患者肾组织和 db/db 小鼠中,TM^+细胞主要表达于肾小球毛细血管和管周血管,LXR-α^+细胞主要表达于肾小管上皮细胞和肾小球细胞中,TM 和 LXR-α 表达部位相接近,且二者的表达量呈正相关;进一步进行体内实验发现:T0901317 促进 db/db 小鼠肾组织 TM 表达后,血炎症介质和尿蛋白水平下降,沉默 TM 后血炎症介质水平和尿蛋白上升,提示 T0901317 可能通过间接接触机制上调 TM 表达并减轻 DN 炎症反应和降低尿蛋白水平。

巨噬细胞通过多重机制参与 DN 的发病[14],巨噬细胞在组织微环境的刺激作用下获得多种表型功能。目前公认的巨噬细胞表型有两种,即经典激活巨噬细胞 Ml 和替代激活巨噬细胞 M2[15]。巨噬细胞从早期促炎、促损伤的 Ml 活化状态逐渐向晚期抗炎、参与组织修复作用的 M2 表型转化,故巨噬细胞表型并不是一成不变的,随着疾病的进展,巨噬细胞表型和功能发生持续的变化,以适应其所处的微环境,发挥相应的生物学效应,CD163 是 M2 型巨噬细胞的标志物。本研究发现 FXⅢ-A^+细胞在 DN 患者和 db/db 小鼠肾组织 $CD163^+$细胞附近表达,表明 FXⅢ-A 的表达可能局限于 M2 亚型巨噬细胞,针对环状肉芽肿病变的研究也证实了 FXⅢ-A 和 CD163 可共表达在巨噬细胞[16]。既往研究认为 FXⅢ-A 调节伤口愈合[17]、血管生成[18]、内皮屏障[19]以及细胞吞噬、迁移等免疫功能[20],FXⅢ-A 在 M2 巨噬细胞中的选择性表达与 FXⅢ-A 作为抗炎和促进伤口愈合分子的能力相一致[20],但本研究发现 DN 患者肾组织中 FXⅢ-A^+细胞水平与 eGFR 呈负相关,与野生鼠相比,db/db 小鼠肾组织中存在大量 FXⅢ-A^+和 $CD163^+$细胞,沉默 TM 后,肾组织 FXⅢ-A、CD163 表达和尿微量白蛋白均增加,而 T0901317 上调 TM 表达后,FXⅢ-A、CD163 表达和尿微量白蛋白水平均下降,提示干预 TM 表达可影响 FXⅢ-A 表达。结合已有的研究,我们推测 FXⅢ-A 可能通过促进 M2 型巨噬细胞极化以及促进细胞外纤维蛋白沉积而加重 DN 肾损伤。

关于 TM 调控 FXⅢ-A 表达的机制,目前报道的较少。针对环状肉芽肿和类脂坏死菌的样本进行的研究显示,由于纤维蛋白与凝血酶外显子 1 中氨基酸侧链的结合对凝血酶截断 FXⅢ上的辅因子活性至关重要,因此,TM 通过竞争性结合凝血酶而抑制纤维蛋白表面 FXⅢ-A 激活和表达[5]。另外,TM 与凝血酶结合后可降低凝血酶的凝血活性而加强其激活蛋白 C 的活性,活化蛋白 C 可裂解 FXⅢ-A 而导致 FXⅢ-A 表达减少[5]。

综上所述,TM 可能通过下调 FXⅢ-A 表达、抑制

炎症介质分泌而改善 db/db 小鼠尿蛋白。进一步研究需要明确 TM 调控 FXⅢ-A 表达的具体信号通路以及 FXⅢ-A 和 M2 型巨噬细胞不同亚型 M2a、M2b、M2c 的表达对 DN 患者预后的影响。

参考文献:

[1] ANDERS H J, HUBER T B, ISERMANN B, *et al*. CKD in diabetes: diabetic kidney disease versus nondiabetic kidney disease[J]. Nat Rev Nephrol, 2018, 14(6): 361-377. DOI:10.1038/s41581-018-0001-y.

[2] LOGHMANI H, CONWAY E M. Exploring traditional and nontraditional roles for thrombomodulin[J]. Blood, 2018, 132(2): 148-158. DOI:10.1182/blood-2017-12-768994.

[3] FIUZA C, BUSTIN M, TALWAR S, *et al*. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells[J]. Blood, 2003, 101(7): 2652-2660. DOI:10.1182/blood-2002-05-1300.

[4] DROŻDŻ D, ŁĄTKA M, DROŻDŻ T, *et al*. Thrombomodulin as a new marker of endothelial dysfunction in chronic kidney disease in children[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 1619293. DOI:10.1155/2018/1619293.

[5] PHILIPPOU H, RANCE J, MYLES T, *et al*. Roles of low specificity and cofactor interaction sites on thrombin during factor XⅢ activation. Competition for cofactor sites on thrombin determines its fate[J]. J Biol Chem, 2003, 278(34): 32020-32026. DOI:10.1074/jbc.m305364200.

[6] TÖRÖCSIK D, BÁRDOS H, NAGY L, *et al*. Identification of factor XⅢ-A as a marker of alternative macrophage activation[J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62(18): 2132-2139. DOI: 10.1007/s00018-005-5242-9.

[7] MYNENI V D, MOUSA A S, KAARTINEN M T. Factor XⅢ-A transglutaminase deficient mice show signs of metabolically healthy obesity on high fat diet[J]. Sci Rep, 2016, 6: 35574. DOI:10.1038/srep35574.

[8] PALOMER X, GONZÁLEZ-CLEMENTE J M, BLANCO-VACA F, *et al*. Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus[J]. Diabetes Obes Metab, 2008, 10(3): 185-197. DOI:10.1111/j.1463-1326.2007.00710.x.

[9] DING H, LI Y, FENG Y, *et al*. LXR agonist T0901317 upregulates thrombomodulin expression in glomerular endothelial cells by inhibition of nuclear factor-κB[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(6): 4888-4896. DOI:10.3892/mmr.2016.5138.

[10] 吴松, 李怡, 陈惠宇, 等. 肝 X 受体激动剂对 db、db 鼠肾脏肝 X 受体表达及其活性的影响[J]. 实用医院临床杂志, 2018, 15(2): 1-3.
WU S, LI Y, CHEN H Y, *et al*. The effect of liver X receptor agonists on expressions and activity of liver X receptors in the kidney of db/db mice[J]. Pract J Clin Med, 2018, 15(2): 1-3.

[11] 吴松, 杜亚琴, 张萍, 等. T0901317 激活肝 X 受体 α 改善 db/db 小鼠肾损伤[J]. 第三军医大学学报,2020,42(1):75-80. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201907232.
WU S,DU Y Q,ZHANG P, *et al*. T0901317 improves renal injury in db/db mice by activating liver X receptor α[J]. J Third Mil Med Univ, 2020, 42(1): 75-80. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201907232.

[12] PALLER M S, HOIDAL J R, FERRIS T F. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat[J]. J Clin Invest, 1984, 74(4): 1156-1164. DOI:10.1172/jci111524.

[13] ISERMANN B, VINNIKOV I A, MADHUSUDHAN T, *et al*. Activated protein C protects against diabetic nephropathy by inhibiting endothelial and podocyte apoptosis[J]. Nat Med, 2007, 13(11): 1349-1358. DOI:10.1038/nm1667.

[14] GUITERAS R, SOLA A, FLAQUER M, *et al*. Exploring macrophage cell therapy on diabetic kidney disease[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(2): 841-851. DOI: 10.1111/jcmm.13983.

[15] TESCH G H. Role of macrophages in complications of type 2 diabetes[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2007, 34(10): 1016-1019. DOI:10.1111/j.1440-1681.2007.04729.x.

[16] TÖRÖCSIK D, BÁRDOS H, HATALYÁK Z, *et al*. Detection of factor XⅢ-A is a valuable tool for distinguishing dendritic cells and tissue macrophages in granuloma annulare and necrobiosis lipoidica[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2014, 28(8): 1087-1096. DOI:10.1111/jdv.12290.

[17] DICKNEITE G, HERWALD H, KORTE W, *et al*. Coagulation factor XⅢ: a multifunctional transglutaminase with clinical potential in a range of conditions[J]. Thromb Haemost, 2015, 113(4): 686-697. DOI:10.1160/th14-07-0625.

[18] DARDIK R, LOSCALZO J, ESKARAEV R, *et al*. Molecular mechanisms underlying the proangiogenic effect of factor XⅢ[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(3): 526-532. DOI: 10.1161/01.atv.0000154137.21230.80.

[19] ZAETS S B, XU D Z, LU Q, *et al*. Recombinant factor XⅢ mitigates hemorrhagic shock-induced organ dysfunction[J]. J Surg Res, 2011, 166(2): e135-e142. DOI:10.1016/j.jss.2010.12.001.

[20] LOOF T G, MÖRGELIN M, JOHANSSON L, *et al*. Coagulation, an ancestral serine protease cascade, exerts a novel function in early immune defense[J]. Blood, 2011, 118(9): 2589-2598. DOI:10.1182/blood-2011-02-337568.

(**收稿**:2020-07-12;**修回**:2020-09-07)

(编辑 吴培红)