DOI:10.16016/j.2097-0927.202401019

Fgl2 对小鼠急性肾损伤中巨噬细胞极化的作用

朱 琳[1],许桂莲[2],谢 攀[1],彭侃夫[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学):第一附属医院肾内科[1],基础医学院免疫学教研室[2]

[摘要] **目的** 探讨纤维蛋白原样蛋白 2(fibrinogen-like protein2,Fgl2)对顺铂诱导的急性肾损伤(cisplatin-induced acute kidney injury,Cis-AKI)中巨噬细胞极化的作用。**方法** 选取 24 只 8~10 周龄(体质量 20~25 g)的雄性野生型($Fgl2^{+/+}$)小鼠和 Fgl2 基因敲除($Fgl2^{-/-}$)小鼠各 12 只。单次腹腔注射生理盐水(saline)或顺铂(cisplatin,Cis)处理 3 d,按随机数字表法分成 4 组($n=6$):$Fgl2^{+/+}$ Saline 组、$Fgl2^{+/+}$ Cis 组、$Fgl2^{-/-}$ Saline 组和 $Fgl2^{-/-}$ Cis 组。3 d 后,检测肾功能相关指标血肌酐(serum creatinine,Scr)、尿素氮(blood urea nitrogen,BUN)的水平,HE 染色评估肾损伤程度;Western blot 检测肾组织中 Fgl2 和肾损伤分子 1(kidney injury molecule 1,Kim-1)的表达;RT-qPCR 检测 Fgl2、Kim-1、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL)、IL-6、IL-12p40、IL-1β、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase,iNOS)、TNF-α 的表达;免疫组化检测肾脏 Fgl2 和巨噬细胞($F4/80^+$)的表达;免疫荧光检测肾组织中巨噬细胞($F4/80^+$)和 M1 型巨噬细胞($F4/80^+CD86^+$)的表达;流式细胞术检测肾组织中巨噬细胞($F4/80^+$)及 M1 型巨噬细胞($F4/80^+MHC\ \text{Ⅱ}^+$)、M2 型巨噬细胞($F4/80^+CD206^+$)的表达。**结果** 与 $Fgl2^{+/+}$ Saline 组比较,$Fgl2^{+/+}$ Cis 组小鼠肾功能显著下降($P<0.05$),肾小管损伤病理评分显著升高($P<0.05$),肾组织 Fgl2 表达显著上调($P<0.05$);与 $Fgl2^{+/+}$ Cis 组相比,$Fgl2^{-/-}$ Cis 组小鼠肾功能显著下降($P<0.05$),肾损伤相关分子 Kim-1、NGAL 表达显著升高($P<0.05$),肾小管损伤病理评分显著升高($P<0.05$),巨噬细胞浸润显著增加($P<0.05$),M1 型巨噬细胞相关分子 IL-6、IL-1β、TNF-α 和 iNOS 表达显著上升($P<0.05$),流式细胞术结果显示 M1 型巨噬细胞百分比显著升高($P<0.05$),M2 型巨噬细胞百分比无明显变化,且 M1 型占比显著高于 M2 型($P<0.05$)。**结论** Fgl2 基因敲除可通过促进巨噬细胞向 M1 型转化加重 Cis-AKI。

[关键词] 顺铂;急性肾损伤;纤维蛋白原样蛋白 2;巨噬细胞
[中图法分类号] R363.21; R392.12; R692 [文献标志码] A

Role of Fgl2 in macrophage polarization during acute kidney injury in mice

ZHU Lin[1], XU Guilian[2], XIE Pan[1], PENG Kanfu[1] [1]Department of Nephrology, First Affiliated Hospital; [2]Department of Immunology, College of Basic Medical Sciences, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of fibrinogen-like protein 2 (Fgl2) in macrophage polarization during cisplatin (Cis)-induced acute kidney injury (Cis-AKI). **Methods** Twelve male wild-type ($Fgl2^{+/+}$) mice and 12 Fgl2 gene knockout ($Fgl2^{-/-}$) mice, aged 8~10 weeks and weighing 20~25 g, were selected, and then after being administered with a single intraperitoneal injection of either saline or Cis for 3 d, they were randomly divided into 4 groups ($n=6$): $Fgl2^{+/+}$ Saline group, $Fgl2^{+/+}$ Cis group, $Fgl2^{-/-}$ Saline group and $Fgl2^{-/-}$ Cis group. Kidney function indicators such as serum creatinine (Scr) and blood urea nitrogen (BUN) levels were measured 3 d later, and kidney injury was assessed by HE staining. Western blot analysis was performed to evaluate the expression of Fgl2 and kidney injury molecule 1 (Kim-1) in the renal tissues. RT-qPCR was conducted to assess the expression levels of Fgl2, Kim-1, neutrophil gelatinase-associated

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(8187032042);重庆市自然科学基金面上项目(CSTB2023NSCQ-MSX0570)
[通信作者] 彭侃夫,E-mail: 392906786@qq.com

2097-0927/Copyright © 2024, 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/)

lipocalin (NGAL), IL-6, IL-12p40, IL-1β, inducible nitric oxide synthase (iNOS) and TNF-α in the renal tissues. Immunohistochemical assay was employed to detect the expression of Fgl2 and macrophages ($F4/80^+$) in the kidneys. Immunofluorescence staining was utilized to examine the expression of macrophages ($F4/80^+$) and M1-type macrophages ($F4/80^+CD86^+$) in the renal tissues. Flow cytometry was employed to analyze the expression of macrophages ($F4/80^+$) as well as M1-type macrophages ($F4/80^+$ MHC Ⅱ$^+$) and M2-type macrophages ($F4/80^+CD206^+$) in the renal tissues. **Results** Compared with the $Fgl2^{+/+}$ Saline group, the $Fgl2^{+/+}$ Cis group exhibited a significant decline in renal function ($P<0.05$), a notable increase in pathological score of renal tubular injury ($P<0.05$), and an obvious upregulation of renal tissue Fgl2 expression ($P<0.05$). Compared with the $Fgl2^{+/+}$ Cis group, the $Fgl2^{-/-}$ Cis group demonstrated a significant decline in renal function ($P<0.05$), an elevation in the expression of renal injury-associated molecules Kim-1 and NGAL ($P<0.05$), an increase in pathological score of renal tubular injury ($P<0.05$), increase in macrophage infiltration ($P<0.05$), and an upregulation in the expression of M1-type macrophage-related molecules IL-6, IL-1β, TNF-α and iNOS ($P<0.05$), as well as obviously increase in the percentage of M1-type macrophages as indicated by flow cytometry ($P<0.05$), while there was no significant change in the percentage of M2-type macrophages, and the proportion of M1-type macrophages was significantly higher than that of M2-type macrophages ($P<0.05$). **Conclusion** Fgl2 gene knockout exacerbates Cis-AKI by promoting macrophage polarization towards the M1 phenotype.

[**Key words**] cisplatin; acute kidney injury; fibrinogen-like protein 2; macrophage

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (8187032042) and the General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTB2023NSCQ-MSX0570). Corresponding author: PENG Kanfu, E-mail: 392906786@qq.com

近年来,急性肾损伤(acute kidney injury,AKI)的发病率和病死率居高不下,且呈逐年上升趋势[1]。引起 AKI 的常见原因有肾缺血/再灌注损伤、肾毒性药物、脓毒血症等,主要临床表现为短时间内(数小时至数天)肾功能突然或持续下降,导致有害、有毒代谢物在体内积聚,重症患者还可进展为肾衰竭甚至死亡[2]。目前,除透析外,尚无确切的干预手段可以限制肾损伤的进展、提高 AKI 患者的存活率及促进损伤肾组织的恢复[3]。因此,研究 AKI 发生发展的机制,以制定相应的治疗方法和途径,将有助于降低 AKI 的发病率和病死率。

炎症反应在各种 AKI 的发病机制中起着重要作用[4-6]。其中,巨噬细胞在免疫介导 AKI 的发生发展中起重要作用[7]。它既是效应细胞,也是抗原提呈细胞,可以连接先天免疫系统和适应性免疫系统,巨噬细胞的缺失可以保护肾脏免受急性损伤[8-11]。

巨噬细胞具有高度异质性,取决于微环境和疾病的性质或阶段,可分化为形态和功能上截然不同的两种表型:M1 型(促炎型)和 M2 型(抑炎型)[12]。AKI 发生后,M1 型巨噬细胞被招募到肾脏,起放大炎症反应并促进实质损伤的作用,而 M2 型巨噬细胞则表现出抗炎作用,促进肾脏修复[13]。

纤维蛋白原样蛋白 2(fibrinogen-like protein2,Fgl2)是纤维蛋白原相关蛋白家族成员,具有免疫凝血和免疫调节的作用,主要由活化的巨噬细胞、T 细胞、内皮细胞和肿瘤细胞产生[14]。本课题组前期的研究表明,Fgl2 通过影响巨噬细胞极化介导肾纤维化的发生发展[15],但对 Fgl2 在炎症密切相关的 AKI 中巨噬细胞极化的作用尚不清楚。本研究拟通过建立顺铂诱导的急性肾损伤(cisplatin-induced acute kidney injury,Cis-AKI)模型,利用 Fgl2 基因敲除小鼠,观察 Fgl2 对小鼠 Cis-AKI 中巨噬细胞极化的作用,旨在为 Fgl2 的应用提供新的免疫学视角,为临床靶向治疗 AKI 提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取 24 只 8 ~10 周龄,体质量 20~25 g 的雄性 C57BL/6J $Fgl2^{+/+}$小鼠(购自重庆腾鑫比尔实验动物销售有限公司)和 $Fgl2^{-/-}$小鼠(由美国纽约 Trudeau 研究所 Stephen Smiley 教授馈赠)各 12 只。饲养于陆军军医大学免疫学研究所 SPF 级层流动物房,环境温度和湿度为中央空调统一控制[室温(22±2)℃,湿度 60%~70%,12 h 昼夜交替照明],$Fgl2^{+/+}$和 $Fgl2^{-/-}$小鼠各 2 笼,每笼 6 只,自由摄食饮水。本研究经陆军军医大学实验动物福利伦理审理委员会审核(AMUWEC20232763),符合动物伦理和动物福利要求。

1.2 主要试剂与仪器

顺铂(cisplatin,Cis)购自美国 Selleck 公司;RT-qPCR 采用 SYBR Green 染料法,PCR 试剂盒购自

武汉 Abclonal 公司,引物由上海生工生物合成;本研究采用的抗体有:Fgl2(中国 Novus 公司),F4/80(美国 CST 公司),CD86、CD206(英国 Abcam 公司),Percp-antimouse CD45、PE/Cy7-antimouse CD11b、PE-antimouse F4/80、Brilliant violet-antimouse MHC Ⅱ、APC-antimouse CD206(美国 Biolegend 公司)。Western blot 仪器购自美国 Bio-Rad 公司;电泳凝胶试剂盒、电泳液、转膜液均购自武汉塞维尔公司;化学发光成像仪购自美国 LI-COR 公司;PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司;流式细胞仪(FACS Canto Ⅱ)购自美国 BD 公司。

1.3 小鼠实验模型构建与分组

通过单次腹腔注射 20 mg/kg Cis 处理 72 h 构建 Cis-AKI 小鼠模型,生理盐水(Saline)组则在同等条件下注射等体积无菌生理盐水,按随机数字表法将小鼠分成 4 组($n=6$)。Cis-AKI 模型组:$Fgl2^{+/+}$ Cis 组、$Fgl2^{-/-}$ Cis 组,对照组:$Fgl2^{+/+}$ Saline 组、$Fgl2^{-/-}$ Saline 组。Cis 溶液现配现用,将 Cis 粉末溶于无菌生理盐水中涡旋混匀,45 ℃水浴锅中加热 20 min,使其充分溶解成浓度为 1 mg/mL 的淡黄色澄清工作液。

1.4 动物标本采集及处理

给药 3 d 后取小鼠眼球血,室温下放置 1 h 后 4 ℃冰箱过夜,室温下 1 000×g 离心 10 min,取上清,用于后续肾功能检测。所有小鼠取血后,经麻醉,立即颈椎脱臼处死,摘取双侧肾脏去除包膜,一部分组织固定于 4%多聚甲醛中用于组织学检测,另一部分迅速放入液氮速冻后冻存于 -80 ℃冰箱中。

1.5 肾功能检测

小鼠血清送至陆军军医大学第一附属医院中心试验室检测血肌酐(serum creatinine,Scr)、尿素氮(blood urea nitrogen,BUN)水平,由生化自动分析器(奥林巴斯 AU5400)完成。

1.6 实验方法

1.6.1 HE 染色 肾脏组织常规固定、脱水,包埋制成石蜡标本,将包埋好的组织切成 4 μm 薄片,脱蜡至水,苏木精染色 30 s,自来水冲洗 10 min,1%盐酸-乙醇分化 3 s,自来水冲洗反蓝 10 min,伊红染色 25 s。切片染色完成后,经透明处理,中性树脂封片,光镜下拍照并评分。由 2 位经验较丰富的肾内科医生在显微镜下观察病理损伤,采用双盲法分析肾小管上皮细胞损伤,包括以下参数:小管刷状缘脱落、小管扩张、管型形成、上皮细胞坏死和炎性细胞浸润。每个标本采用双盲随机选取 5 个视野(400×)对肾小管上皮细胞损伤百分率进行量化并评分(0 分:正常;1 分:>0%~10%;2 分:>10%~25%;3 分:>25%~45%;4 分:>45%~75%;5 分:>75%~100%)。

1.6.2 免疫组化染色与免疫荧光染色 将石蜡切片脱蜡后浸于柠檬酸盐(pH 值为 6)或 EDTA 抗原修复液(pH 值为 9)中,大火煮沸 3 min,转至中低火 15 min 进行抗原修复,3%过氧化氢阻断 10 min、5%牛血清白蛋白室温封闭 1 h,一抗 4 ℃孵育过夜,PBS 洗片 4 次,每次 5 min,二抗孵育 1 h,光镜下 DAB 显色,苏木精染色 30 s,二甲苯透明后中性树脂封片。免疫荧光步骤基本同上,注意避光孵育荧光二抗,Hoechst 染色 10 min 后,抗荧光淬灭封片剂封片。

1.6.3 肾脏浸润炎症细胞分离与流式细胞术 将肾组织浸于 DMEM 培养基中,剪至约 1 mm^3 的碎块,加入Ⅳ型胶原酶 37 ℃消化 30 min,70 μm 细胞筛网去除筋膜等杂质,加红细胞裂解液冰上裂解红细胞 5 min,用 Percoll 进行梯度离心,上层为 40% Percoll 溶液,下层为 80% Percoll 溶液,4 ℃、800×g 离心 30 min,缓升缓降,溶液分层后,位于中间白膜层的细胞即为肾脏中的炎症细胞。用 1 mL 胎牛血清与 99 mL PBS 溶液混合成流式染色缓冲液,洗涤离心后的白膜层细胞沉淀用残液重悬,每个流式管加入 1 μL anti-mouse CD16/32 封闭液,冰上封闭 15 min 后,不洗涤直接加入一定量抗小鼠抗体混悬液(Percp-CD45、PE/Cy7-CD11b、PE-F4/80、Brilliant violet-MHC Ⅱ、APC-CD206),冰上避光孵育 30 min 后洗涤离心,400 μL 流式染色缓冲液重悬后立即上机进行检测。

1.6.4 肾脏 mRNA 提取与 RT-qPCR 检测 使用 RNA 提取液(武汉塞维尔公司)从肾脏组织中提取总 mRNA,并使用分光光度计测定 mRNA 浓度,采用 cDNA 反转录试剂盒(武汉 Abclonal 公司)反转录合成 cDNA,RT-qPCR 反应体系:引物 1 μL,cDNA 1 μL,无 RNA 酶水 3 μL,SYBR 5 μL,总体积 10 μL。反应条件:预变性 95 ℃,3 min,共 40 个循环:95 ℃ 5 s,58 ℃ 15 s,72 ℃ 30 s。得到各组样品扩增反应的 Ct 值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量。引物序列见表 1。

1.6.5 Western blot 检测 取约 30 mg 肾组织于研磨管中,加入蛋白裂解液,将样品放入研磨仪(Servicebio,KZ-Ⅲ-F)中,以 60 Hz 的频率研磨 30 s,循环 2 次后转移研磨管中的组织匀浆至 1.5 mL 标记好的离心管中,冰上裂解 30 min,15 000×g、4 ℃离心 15 min,取上清用分光光度计检测蛋白浓度,按照 4∶1 的比例加入 loading buffer,100 ℃变性 10 min。取 40 μg 蛋白加入聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳,150 mA 1 h 电转至 PVDF 膜,封闭 30 min,一抗 4 ℃孵育过夜;0.1% TBST 漂洗后加入 HRP 标记二抗(山羊抗兔抗体 1∶3 000,山羊抗小鼠抗体 1∶3 000),室温孵育 1 h;

0.1% TBST 漂洗后 ECL 化学发光剂显色,LI-COR 曝光仪显影照相。

表 1 引物序列

基因	序列(5′→3′)
GAPDH	正向:GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG 反向:ATGCCACAGGATTCCATACC
FGL2	正向:GGTGCTCAAAGAAGTGCGGA 反向:GTTCCTGGACTCTACTGTCCTC
IL-6	正向:ACAGAAGGAGTGGCTAAGGA 反向:AGGCATAACGCACTAGGTTT
IL-12P40	正向:TGGTTTGCCATCGTTTTGCTG 反向:ACAGGTGAGGTTCACTGTTTCT
IL-1β	正向:GAAATGCCACCTTTTGACAGTG 反向:TGGATGCTCTCATCAGGACAG
TNF-α	正向:GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT 反向:GCCATAGAACTGATGAGAGGGAG
iNOS	正向:ACATCGACCCGTCCACAGTAT 反向:CAGAGGGGTAGGCTTGTCTC

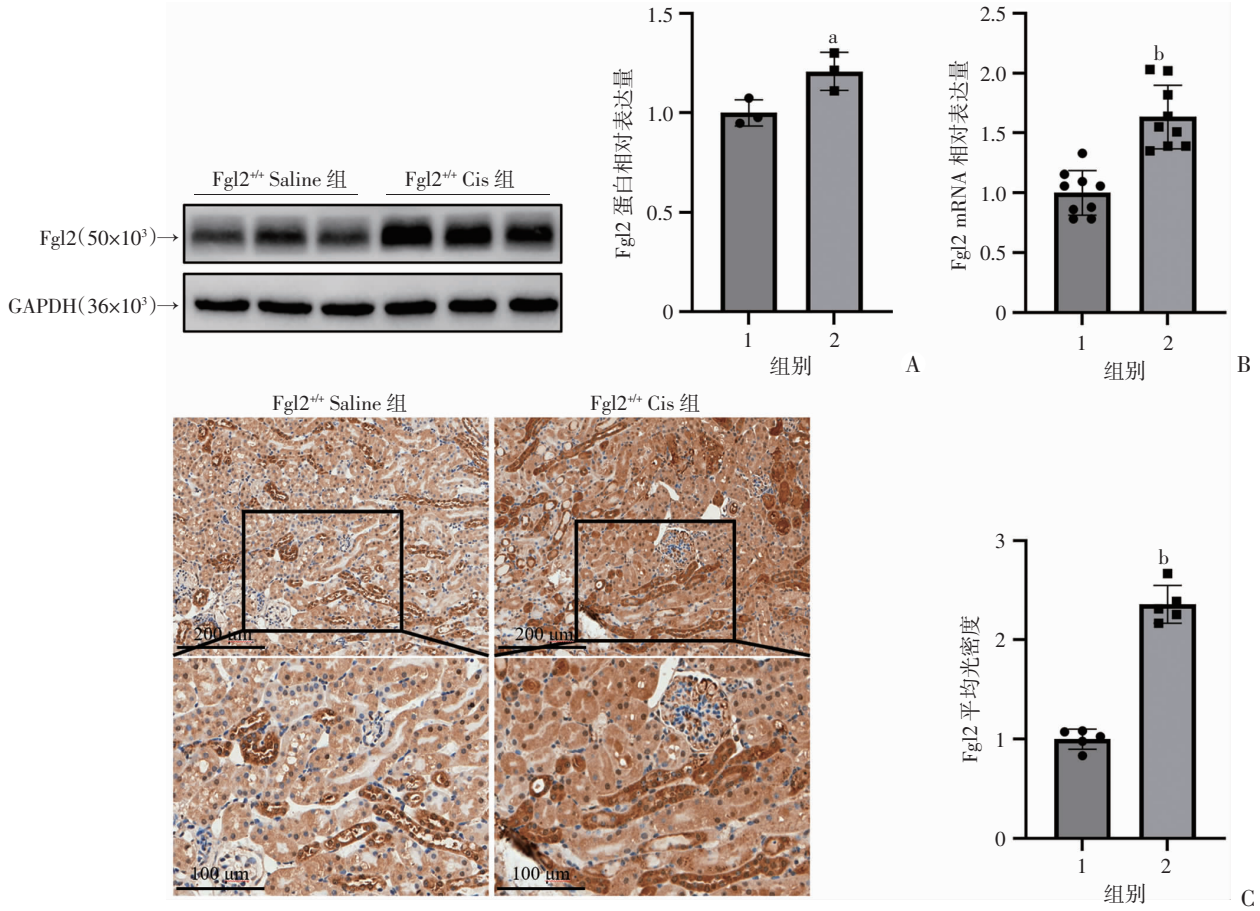
1.7 统计学分析

Image J 软件分析 Western blot、免疫组化染色及荧光染色结果,Flow Jo 10.8.1 软件分析流式细胞术结果。实验数据采用 GraphPad Prism 9.5.1 软件进行分析和绘图,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两两比较采用非配对 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,P 值已经 LSD 事后检验法进行校正,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Fgl2 在 Cis-AKI 小鼠肾脏中的表达上调

为研究 Fgl2 在 AKI 中的作用,通过单次腹腔注射 Cis 构建 Cis-AKI 小鼠模型。结果显示:与 $Fgl2^{+/+}$ Saline 组比较,$Fgl2^{+/+}$ Cis 组小鼠肾组织中 Fgl2 的蛋白和 mRNA 水平均显著升高($P<0.05$,$P<0.001$,图 1A、B);免疫组化染色结果显示,Fgl2 在肾组织中的表达明显增加,且主要表达于皮质中的肾小管上皮细胞,肾间质中也有少量表达($P<0.001$,图 1C)。提示 Fgl2 可能参与 Cis-AKI 的发生发展。



1:$Fgl2^{+/+}$ Saline 组;2:$Fgl2^{+/+}$ Cis 组;a:$P<0.05$,b:$P<0.001$,与 $Fgl2^{+/+}$ Saline 组比较

A:Western blot 检测 Fgl2 蛋白表达水平及半定量分析;B:RT-qPCR 检测 Fgl2 mRNA 水平;C:免疫组化染色显示肾组织中 Fgl2 的表达及平均光密度统计

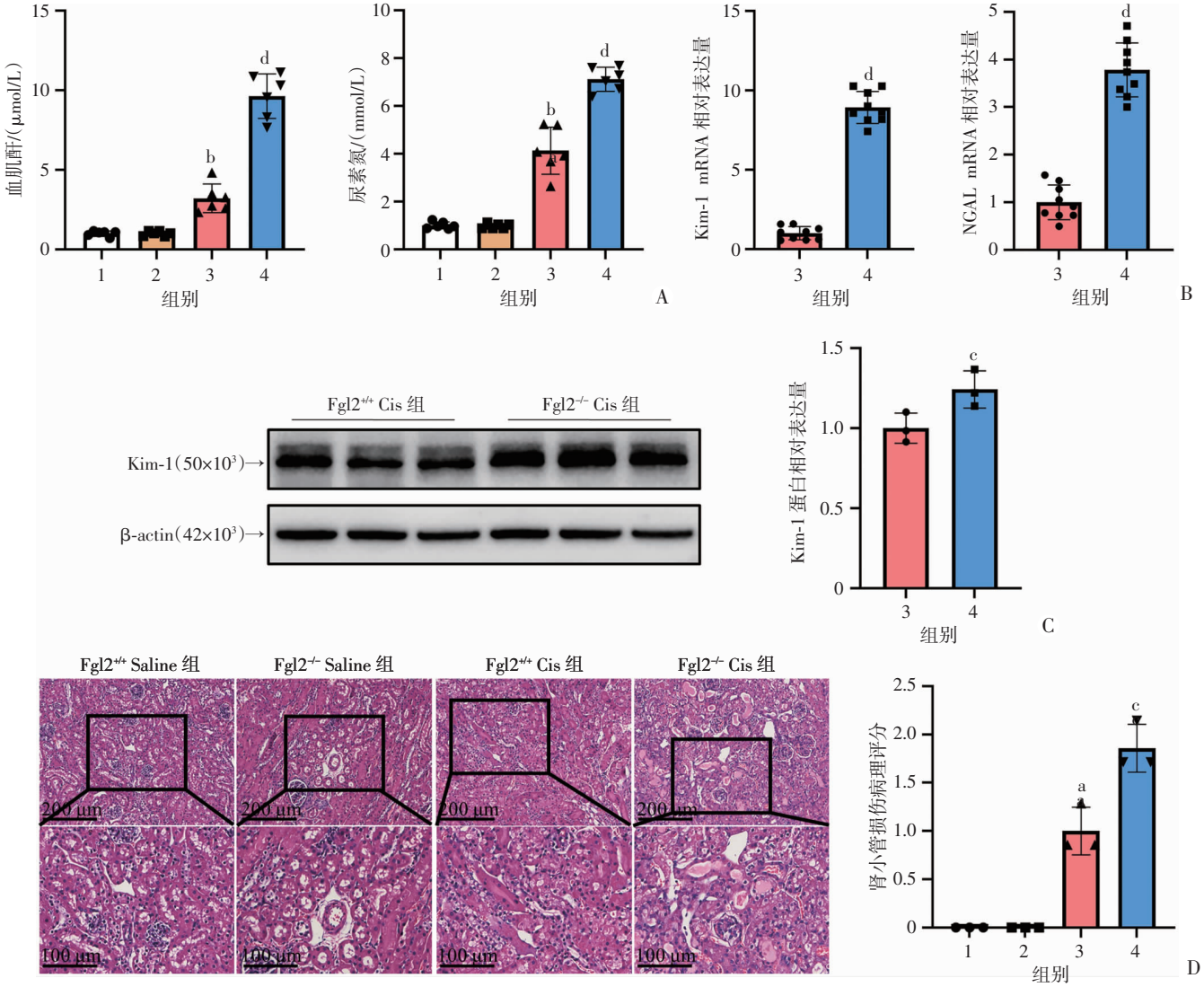
图 1 Fgl2 在 Cis-AKI 小鼠肾脏中的表达

2.2　Fgl2 的缺失加重小鼠 Cis-AKI

进一步研究发现,与 $Fgl2^{+/+}$ Cis 组比较,$Fgl2^{-/-}$ Cis 组小鼠血清中 Scr、BUN 水平显著升高,反映肾功显著下降($P<0.001$,图 2A),肾组织中肾损伤相关分子:肾损伤分子 1(kidney injury molecule 1,Kim-1)蛋白及 mRNA 水平均显著上升,中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(neutrophil gelatinase-associated lipocalin,NGAL)mRNA 水平显著上升($P<0.001$,$P<0.05$,图 2B、C)。HE 染色显示,与 $Fgl2^{+/+}$ Saline 组比较,$Fgl2^{+/+}$ Cis 组小鼠肾小管上皮细胞明显肿胀、刷状缘消失、细胞从基底膜上坏死脱落、管型形成、管腔扩张,肾小管损伤病理评分明显升高;与 $Fgl2^{+/+}$ Cis 组比较,$Fgl2^{-/-}$ Cis 组小鼠肾脏上述病理改变更为显著($P<0.05$,图 2D)。以上结果表明,Fgl2 基因敲除对 Cis-AKI 的发展起促进作用。

2.3　Fgl2 敲除促进 Cis-AKI 小鼠肾脏巨噬细胞浸润

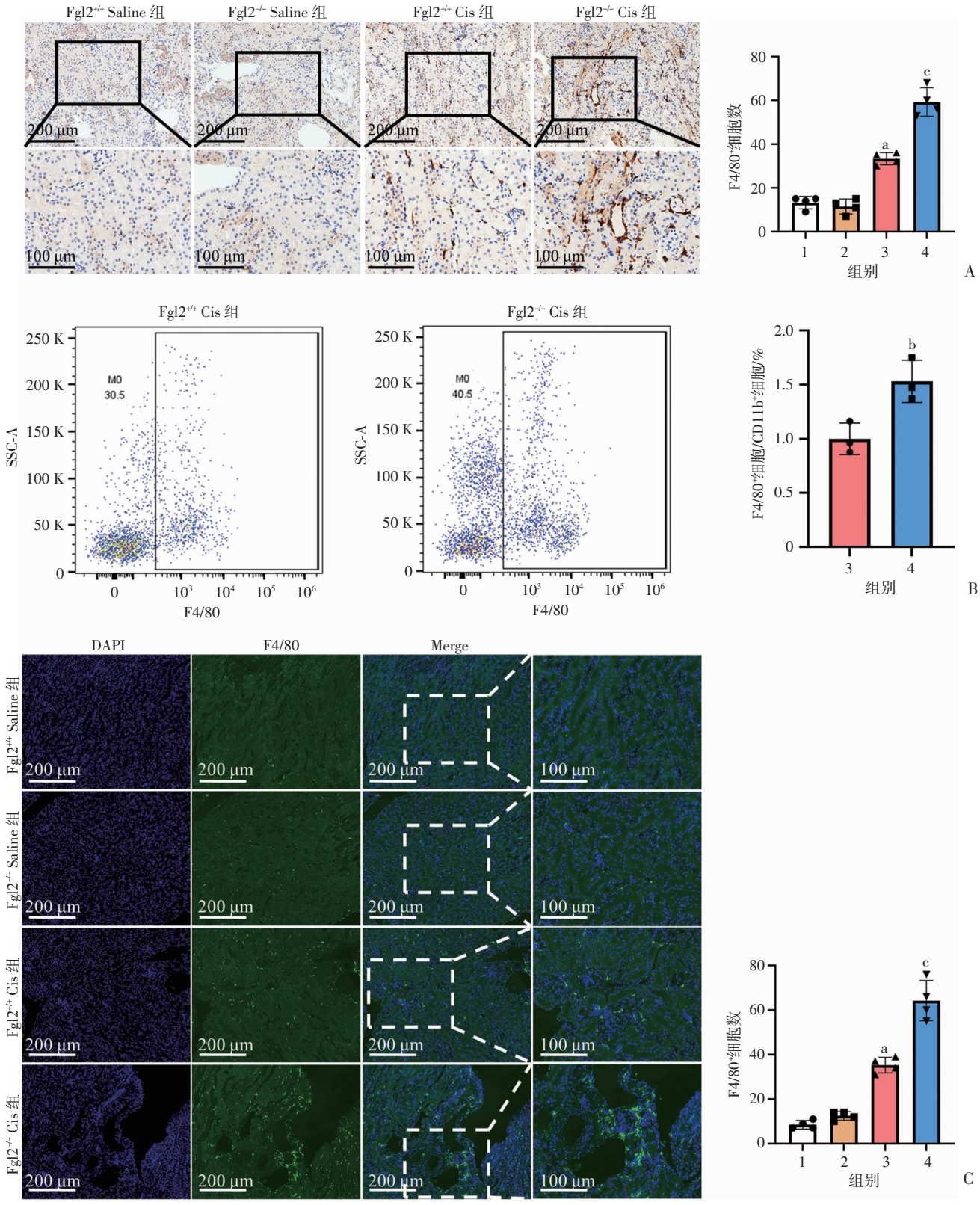
为探究 Fgl2 敲除促进 Cis-AKI 的作用机制,检测各组小鼠肾脏巨噬细胞的浸润情况。免疫组化与免疫荧光染色结果发现,与 $Fgl2^{+/+}$ Cis 组比较,$Fgl2^{-/-}$ Cis 组小鼠肾脏浸润的巨噬细胞($F4/80^{+}$)数量显著增多($P<0.001$,图 3A、C)。流式细胞术结果示,与 $Fgl2^{+/+}$ Cis 组比较,$Fgl2^{-/-}$ Cis 组小鼠肾脏免疫细胞中 $F4/80^{+}$ 细胞百分比明显升高($P<0.05$,图 3B)。以上结果表明 Fgl2 敲除促进 Cis-AKI 小鼠肾脏中巨噬细胞的浸润。



1:$Fgl2^{+/+}$ Saline 组;2:$Fgl2^{-/-}$ Saline 组;3:$Fgl2^{+/+}$ Cis 组;4:$Fgl2^{-/-}$ Cis 组;a:$P<0.01$,b:$P<0.001$,与 $Fgl2^{+/+}$ Saline 组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.001$,与 $Fgl2^{+/+}$ Cis 组比较

A:检测各组小鼠 Scr、BUN 水平;B:RT-qPCR 检测 Kim-1、NGAL mRNA 水平;C:Western blot 检测 Kim-1 蛋白水平及半定量分析;D:HE 染色及肾小管损伤病理评分

图 2　Fgl2 基因敲除对 Cis-AKI 的影响



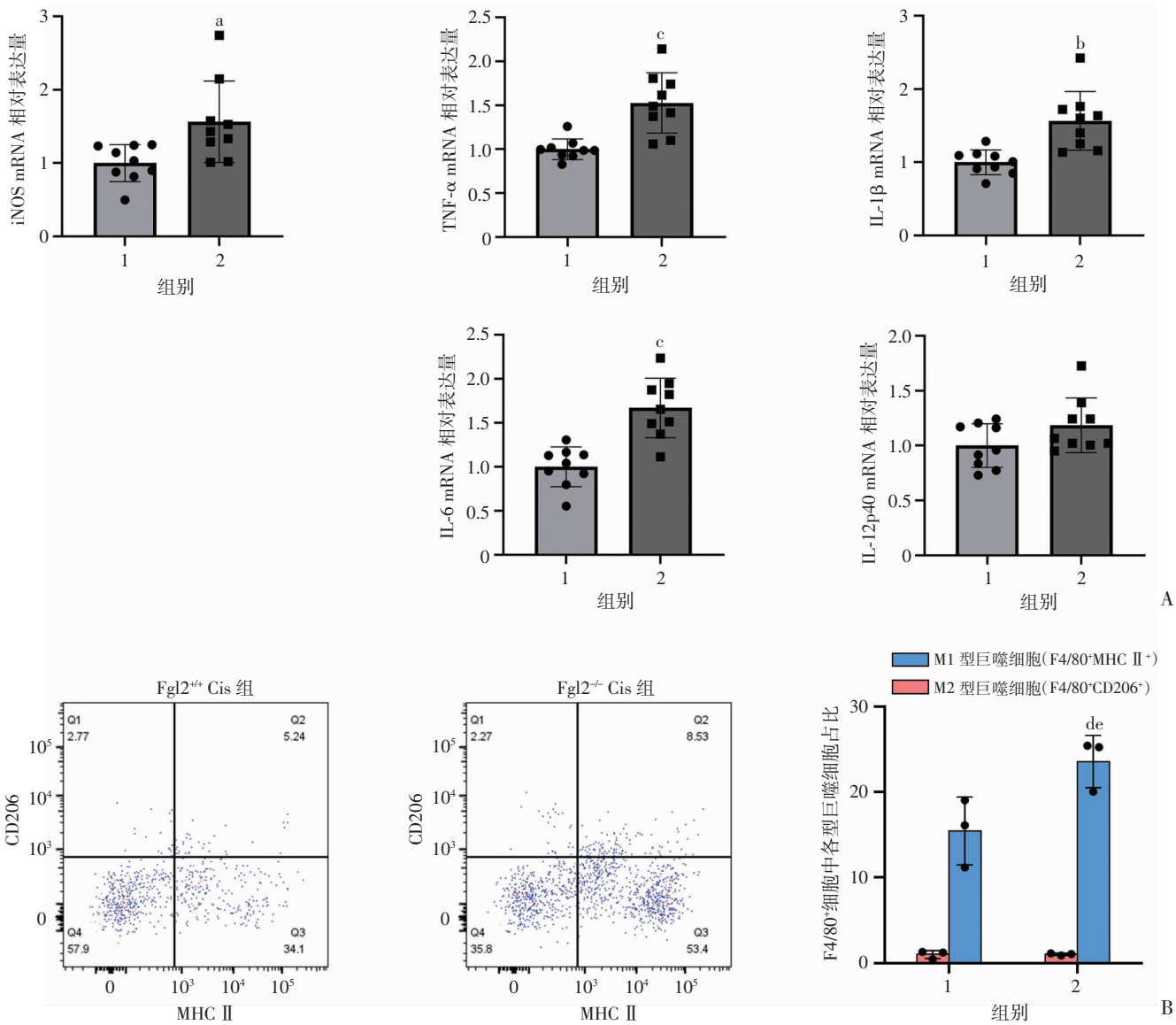
1:Fgl2$^{+/+}$ Saline 组;2:Fgl2$^{-/-}$ Saline 组;3:Fgl2$^{+/+}$ Cis 组;4:Fgl2$^{-/-}$ Cis 组;a:$P<0.001$,与 Fgl2$^{+/+}$ Saline 组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.001$,与 Fgl2$^{+/+}$ Cis 组比较

A:免疫组化 F4/80^{+}细胞染色及统计结果;B:流式细胞术检测肾免疫细胞中 F4/80^{+}细胞占比及统计结果;C:免疫荧光 F4/80^{+}细胞染色及统计结果

图 3 Fgl2 敲除对 Cis-AKI 小鼠肾巨噬细胞浸润的影响

2.4　Fgl2 敲除促进 Cis-AKI 小鼠肾脏巨噬细胞向 M1 型极化

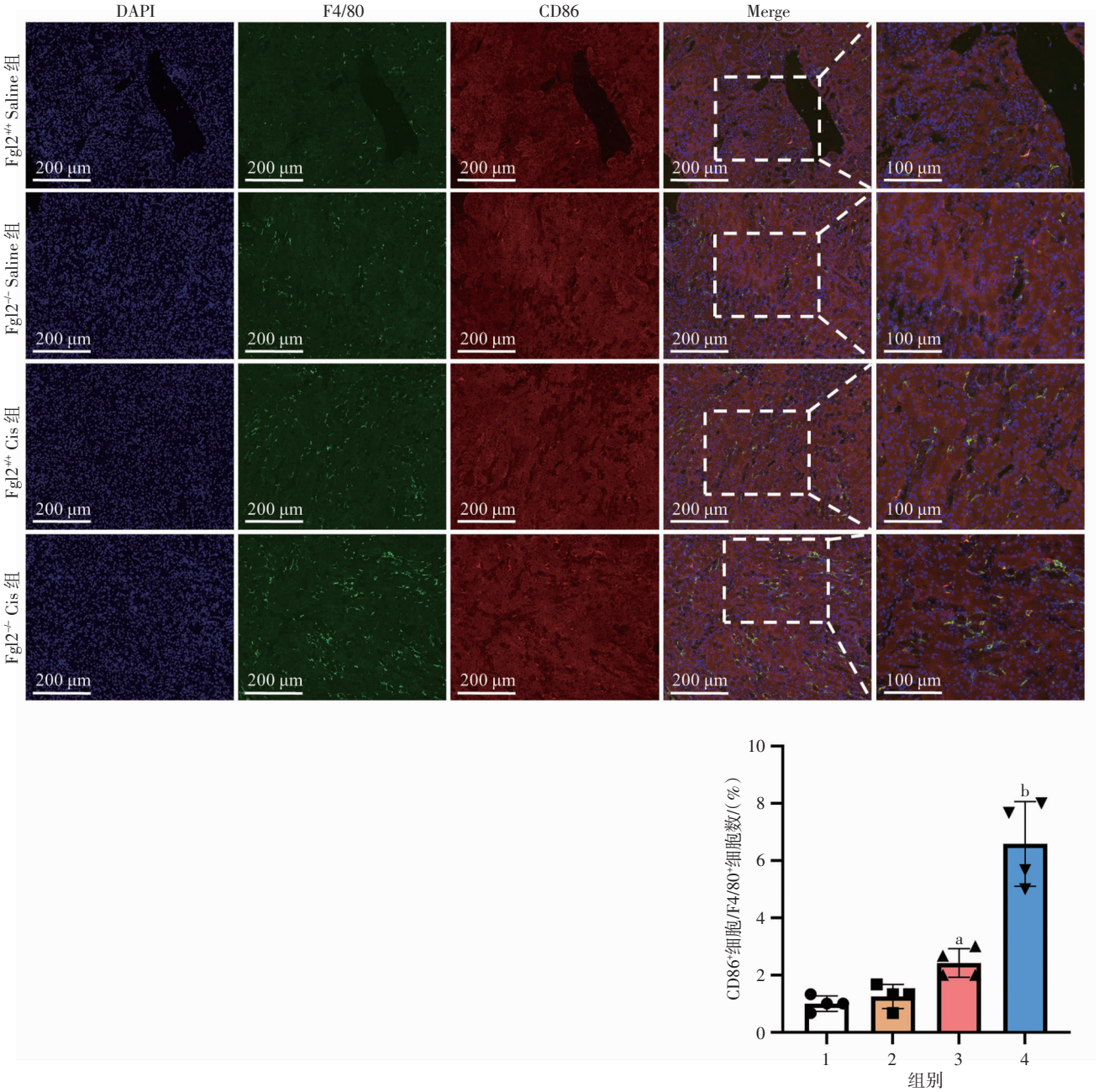
为进一步探讨 Fgl2 对 AKI 中肾脏巨噬细胞极化的影响,检测各组小鼠肾组织中巨噬细胞极化情况。RT-qPCR 结果发现:与 $Fgl2^{+/+}$ Cis 组比较,$Fgl2^{-/-}$ Cis 组小鼠肾脏 M1 型巨噬细胞相关炎症因子 IL-1β、IL-6、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase,iNOS)、TNF-α 的表达水平均显著升高($P<0.05$,图 4A),IL-12P40 表达差异无统计学意义。流式结果显示,与 $Fgl2^{+/+}$ Cis 组鼠比较,$Fgl2^{-/-}$ Cis 组小鼠肾脏总巨噬细胞中,M1 型巨噬细胞($F4/80^{+}MHC\ Ⅱ^{+}$)百分比明显升高,而 M2 型巨噬细胞($F4/80^{+}CD206^{+}$)百分比无明显变化,且 M1 型巨噬细胞百分比明显高于 M2 型($P<0.001$,图 4B)。双色免疫荧光结果显示:与 $Fgl2^{+/+}$ Cis 组比较,$Fgl2^{-/-}$ Cis 组小鼠肾脏 M1 型巨噬细胞($F4/80^{+}CD86^{+}$)浸润显著增多,与流式细胞术结果一致($P<0.01$,图 5)。



1:$Fgl2^{+/+}$ Cis 组;2:$Fgl2^{-/-}$ Cis 组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$,与 $Fgl2^{+/+}$ Cis 组比较;d:$P<0.05$,与 $Fgl2^{+/+}$ Cis 组中 M1 型巨噬细胞占比比较;e:$P<0.001$,与 $Fgl2^{-/-}$ Cis 组中 M2 型巨噬细胞占比比较

A:RT-qPCR 检测小鼠肾肾脏 M1 型巨噬细胞相关炎症因子(iNOS、TNF-α、IL-1β、IL-6 及 IL-12p40)的 mRNA 水平;B:流式细胞术检测肾组织中 M1 型巨噬细胞($F4/80^{+}MHC\ Ⅱ^{+}$)或 M2 型巨噬细胞($F4/80^{+}CD206^{+}$)占比及统计结果

图 4　Fgl2 敲除对 Cis-AKI 小鼠肾巨噬细胞极化及 M1 型相关炎症因子表达的影响



1:$Fgl2^{+/+}$ Saline 组;2:$Fgl2^{-/-}$ Saline 组;3:$Fgl2^{+/+}$ Cis 组;4:$Fgl2^{-/-}$ Cis 组;a:$P<0.01$,与 $Fgl2^{+/+}$ Saline 组比较;b:$P<0.01$,与 $Fgl2^{+/+}$ Cis 组比较

图 5 Fgl2 敲除对 Cis-AKI 小鼠肾 M1 型巨噬细胞极化的影响

3 讨论

AKI 是一组以肾功能快速下降为主要特征的临床综合征,有着较高的发病率和死亡率,每年约有 170 万人因此死亡;其病因复杂,常由肾缺血/再灌注损伤、肾毒性药物、脓毒血症等引起[2, 16]。Cis 临床应用复杂,以肾毒性为主的副作用阻碍了其在化疗中的应用,高达 25%的 AKI 病例由临床药物如 Cis 的使用引起[17]。本研究构建了 Cis-AKI 动物模型,模拟临床上 Cis 所致的肾毒性作用,通过研究其作用机制,为临床预防或治疗 Cis 的肾毒性作用提供新的理论依据。

强烈的炎症反应是 AKI 的重要特征,也是加剧肾损伤的重要因素,本课题组前期研究表明,Fgl2 基因敲除对横纹肌溶解诱导急性肾损伤(rhabdomyolysis induced acute kidney injury,RM-AKI)的保护作用可能与炎症反应减轻有关[18]。巨噬细胞是肾脏炎症的主

要效应细胞,可产生一系列具有细胞毒性、促炎和抗炎等特性的介质,影响损伤的发生发展[19-20]。Fgl2 具有免疫调节活性,可通过与巨噬细胞相互作用参与多种炎症相关疾病的进展[14],如 XIAO 等[21]发现 Fgl2 基因的缺失通过影响巨噬细胞活性抑制病毒诱导的暴发性肝炎的进展。HU 等[22]发现 Fgl2 通过与 TLR4 相互作用加重非酒精性脂肪性肝炎,引起巨噬细胞炎症并诱导肝脂代谢紊乱。HU 等[23]的研究证实了 Fgl2 可通过调控巨噬细胞糖酵解重编程,加重酒精性肝损伤。现有的与 Fgl2 和巨噬细胞相互作用有关的文献中,Fgl2 主要通过参与巨噬细胞极化这一机制对炎症相关疾病的发生发展产生影响。因此推测,Fgl2 或许可通过调节 AKI 中巨噬细胞极化影响疾病的进程。有研究表明,Fgl2 可通过影响巨噬细胞极化介导肾纤维化的发生发展[15],但 Fgl2 对 AKI 中炎症反应、巨噬细胞的作用尚不清楚。本研究通过建立小鼠 Cis-AKI 模型,发现与 $Fgl2^{+/+}$ 小鼠比较,$Fgl2^{-/-}$ 小鼠肾功能下降,肾组织病理损伤明显加重,早期肾损伤相关分子表达显著升高,肾组织中浸润的巨噬细胞明显增多,这些结果表明 *Fgl2* 基因缺失通过增加巨噬细胞浸润,促进炎症反应加重 Cis-AKI。

巨噬细胞被认为在免疫介导的肾损伤中具有重要功能,连接先天性免疫系统和适应性免疫系统[5]。巨噬细胞具有高度异质性,可根据其微环境、疾病类型和阶段表现出不同的表型和功能特征[12],通常可极化为促炎(M1 型)巨噬细胞和抗炎(M2 型)巨噬细胞,这两种亚型之间的平衡在组织炎症、损伤和修复过程的调节中起着关键作用[24]。在 AKI 的发生发展过程中,M1 型巨噬细胞的作用至关重要,可产生促炎细胞因子(TNF-α、IL-12 和 IL-6)和一氧化氮(nitric oxide,NO)。NO 与 ROS 相互作用产生 $ONOO^-$ 引起脂质过氧化;TNF-α 则通过促进肾损伤后肾小管凋亡导致进一步肾小管损伤[25];M1 型巨噬细胞还可以与受损小管上皮细胞产生的富含 miR-23a 的外泌体或损伤相关分子模式(damage associated molecular patterns,DAMPs)相互作用募集更多的 M1 型巨噬细胞,促进肾间质炎症[26];有研究表明,在 AKI 发生前使 M1 型巨噬细胞耗竭可缓解 AKI 的进展[25],说明抑制 M1 型巨噬细胞极化可作为治疗 AKI 的重要方法。本研究发现在 Cis-AKI 模型中,与 $Fgl2^{+/+}$ 小鼠比较,$Fgl2^{-/-}$ 小鼠肾组织中巨噬细胞的数量明显增加,且 M1 型巨噬细胞的极化明显增强,表明 *Fgl2* 基因敲除显著增强了 AKI 肾组织中 M1 型巨噬细胞的极化。

本研究仍存在以下不足:在进行 *Fgl2* 基因敲除时,模型选用的是 *Fgl2* 基因全敲小鼠,而并未探讨在条件性敲除小鼠巨噬细胞中 *Fgl2* 基因的情况下,对 Cis-AKI 病理过程的影响。既往研究表明,可通过将原代肝细胞与 $Fgl2^{+/+}$ 或 $Fgl2^{-/-}$ 骨髓源性巨噬细胞(bone marrow-derived macrophages,BMDMs)共培养,在体外模拟条件性敲除巨噬细胞中 *Fgl2* 基因的情况下,对疾病可能产生的影响,探索 Fgl2 在非酒精性脂肪性肝炎中的作用机制[22]。因此,在后续研究中,将以此为参考,将原代肾小管细胞与 $Fgl2^{+/+}$ 或 $Fgl2^{-/-}$ BMDMs 共培养,讨论在特异性敲除巨噬细胞中 *Fgl2* 基因的情况下,Cis-AKI 将如何发生发展。

综上所述,本研究通过建立 Cis-AKI 小鼠模型,发现 *Fgl2* 基因敲除可通过促进肾脏中炎症因子水平、巨噬细胞浸润与活化以及 M1 型巨噬细胞极化,参与 AKI 的病理过程。该发现为 Fgl2 的应用提供了新的免疫学视角,为临床靶向治疗 AKI 提供了新的理论依据。

参考文献:

[1] LIU K D, GOLDSTEIN S L, VIJAYAN A, *et al*. AKI! Now initiative: recommendations for awareness, recognition, and management of AKI[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2020, 15(12): 1838-1847. DOI: 10.2215/CJN.15611219.

[2] RONCO C, BELLOMO R, KELLUM J A. Acute kidney injury[J]. Lancet, 2019, 394(10212): 1949-1964. DOI: 10.1016/s0140-6736(19)32563-2.

[3] LEVEY A S, JAMES M T. Acute kidney injury[J]. Ann Intern Med, 2017, 167(9): ITC66-ITC80. DOI: 10.7326/aitc201711070.

[4] ANDRADE-OLIVEIRA V,FORESTO-NETO O,WATANABE I K M, *et al*. Inflammation in renal diseases: new and old players[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1192. DOI: 10.3389/fphar.2019.01192.

[5] JANG H R, RABB H. Immune cells in experimental acute kidney injury[J]. Nat Rev Nephrol, 2015, 11(2): 88-101. DOI: 10.1038/nrneph.2014.180.

[6] RABB H, GRIFFIN M D, MCKAY D B, *et al*. Inflammation in AKI: current understanding, key questions, and knowledge gaps[J]. J Am Soc Nephrol, 2016, 27(2): 371-379. DOI: 10.1681/ASN.2015030261.

[7] LV L L, TANG P M, LI C J, *et al*. The pattern recognition receptor, Mincle, is essential for maintaining the M1 macrophage phenotype in acute renal inflammation[J]. Kidney Int, 2017, 91(3): 587-602. DOI: 10.1016/j.kint.2016.10.020.

[8] CAO Q, WANG Y P, WANG X M, *et al*. Renal F4/80$^+$ CD11c$^+$ mononuclear phagocytes display phenotypic and functional characteristics of macrophages in health and in adriamycin nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2015, 26(2): 349-363. DOI: 10.1681/ASN.2013121336.

[9] DUFFIELD J S, TIPPING P G, KIPARI T, *et al*. Conditional ablation of macrophages halts progression of crescentic glomerulonephritis[J]. Am J Pathol, 2005, 167(5): 1207-1219. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)61209-6.

[10] FERENBACH D A, SHELDRAKE T A, DHALIWAL K, *et al*. Macrophage/monocyte depletion by clodronate, but not diphtheria toxin, improves renal ischemia/reperfusion injury in mice[J]. Kidney Int, 2012, 82(8): 928-933. DOI: 10.1038/ki.2012.207.

[11] GUO S H, WIETECHA T A, HUDKINS K L, *et al*. Macrophages are essential contributors to kidney injury in murine cryoglobulinemic membranoproliferative glomerulonephritis[J]. Kidney Int, 2011, 80(9): 946-958. DOI: 10.1038/ki.2011.249.

[12] CAO Q, WANG Y P, HARRIS D C H. Macrophage heterogeneity, phenotypes, and roles in renal fibrosis[J]. Kidney Int Suppl, 2014, 4(1): 16-19. DOI: 10.1038/kisup.2014.4.

[13] WATANABE S, ALEXANDER M, MISHARIN A V, *et al*. The role of macrophages in the resolution of inflammation[J]. J Clin Invest, 2019, 129(7): 2619-2628. DOI: 10.1172/JCI124615.

[14] YU J, LI J, SHEN J, *et al*. The role of fibrinogen-like proteins in cancer[J]. Int J Biol Sci, 2021, 17(4): 1079-1087. DOI: 10.7150/ijbs.56748.

[15] WU S, LI M, XU F, *et al*. Fibrinogen-like protein 2 deficiency aggravates renal fibrosis by facilitating macrophage polarization[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 130: 110468. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110468.

[16] HSU C Y, MCCULLOCH C E, FAN D, *et al*. Community-based incidence of acute renal failure[J]. Kidney Int, 2007, 72(2): 208-212. DOI: 10.1038/sj.ki.5002297.

[17] KELLUM J A, PROWLE J R. Paradigms of acute kidney injury in the intensive care setting[J]. Nat Rev Nephrol, 2018, 14(4): 217-230. DOI: 10.1038/nrneph.2017.184.

[18] 邓秋苗, 潘鑫, 许桂莲, 等. Fgl2 在小鼠横纹肌溶解诱导急性肾损伤中的作用及其机制[J]. 陆军军医大学学报, 2023, 45(12): 1272-1280. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202301122.
DENG Q M, PAN X, XU G L, *et al*. Role and mechanism of Fgl2 in rhabdomyolysis-induced acute kidney injury in mice[J]. J Army Med Univ, 2023, 45(12): 1272-1280. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202301122.

[19] RAMESH G, REEVES W B. TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity[J]. J Clin Invest, 2002, 110(6): 835-842. DOI: 10.1172/JCI15606.

[20] LASKIN D L, SUNIL V R, GARDNER C R, *et al*. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction?[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2011, 51: 267-288. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.010909.105812.

[21] XIAO F, WANG H W, HU J J, *et al*. Fibrinogen-like protein 2 deficiency inhibits virus-induced fulminant hepatitis through abrogating inflammatory macrophage activation[J]. World J Gastroenterol, 2022, 28(4): 479-496. DOI: 10.3748/wjg.v28.i4.479.

[22] HU J J, WANG H W, LI X T, *et al*. Fibrinogen-like protein 2 aggravates nonalcoholic steatohepatitis *via* interaction with TLR4, eliciting inflammation in macrophages and inducing hepatic lipid metabolism disorder[J]. Theranostics, 2020, 10(21): 9702-9720. DOI: 10.7150/thno.44297.

[23] HU X, WAN X Y, DIAO Y T, *et al*. Fibrinogen-like protein 2 regulates macrophage glycolytic reprogramming by directly targeting PKM2 and exacerbates alcoholic liver injury[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 124(Pt B): 110957. DOI: 10.1016/j.intimp.2023.110957.

[24] HU Q, LYON C J, FLETCHER J K, *et al*. Extracellular vesicle activities regulating macrophage- and tissue-mediated injury and repair responses[J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(6): 1493-1512. DOI: 10.1016/j.apsb.2020.12.014.

[25] HUEN S C, CANTLEY L G. Macrophages in renal injury and repair[J]. Annu Rev Physiol, 2017, 79: 449-469. DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034219.

[26] RAYEGO-MATEOS S, MARQUEZ-EXPÓSITO L, RODRIGUES-DIEZ R, *et al*. Molecular mechanisms of kidney injury and repair[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(3): 1542. DOI: 10.3390/ijms23031542.

(收稿:2024-01-04;修回:2024-04-26)
(编辑 刘秋池)