

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.19.004

网络首发 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210719.1832.007.html>(2021-07-20)

不同来源的巨噬细胞在小鼠肾脏纤维化中的作用*

姜亚丽,何娟[△]

(空军军医大学第一附属医院肾脏内科,西安 710032)

[摘要] **目的** 探讨不同来源的巨噬细胞在小鼠肾纤维化中的作用。**方法** 8~10 周龄巨噬细胞 CX3CR1^{GFP} 转基因雄性 C57/B6 小鼠 12 只和 6 只同样周龄大小的雄性 C57/B6 小鼠(WT 组),其中转基因小鼠随机分为两组,其中一组采用单侧输尿管结扎(UUO)的方法建立 UUO 模型,另一组为 Sham 组,均于建模后 2 周处死动物,留取肾组织标本。共分为 4 组:WT 组、Sham 组、UUO(-)组(UUO 模型未结扎输尿管一侧)、UUO(+)组(UUO 模型结扎输尿管一侧)。Masson 和苏木素-伊红(HE)染色检测肾组织胶原纤维沉积及炎性巨噬细胞浸润;流式细胞术检测组织定居型巨噬细胞及增殖变化,免疫荧光染色法检测肾间质组织定居型巨噬细胞及增殖变化。**结果** Masson 和 HE 染色显示:与 WT 组、Sham 组和 UUO(-)组比较,UUO(+)组小鼠肾组织胶原纤维沉积和炎性巨噬细胞浸润增多($P<0.05$),且 WT 组、Sham 组、UUO(-)组多组间无明显差异($P>0.05$);流式细胞术结果显示:与 Sham 组和 UUO(-)组比较,UUO(+)组小鼠肾组织定居型巨噬细胞(CD11B⁺ F4/80⁺ CX3CR1^{GFP+})和骨髓来源的炎性巨噬细胞(CD11B⁺ F4/80⁺ CRR2⁺)浸润明显增多($P<0.05$),且组织定居型巨噬细胞基本为 Ly6c⁻ 巨噬细胞;免疫荧光染色结果显示:与 Sham 组和 UUO(-)组比较,UUO(+)组小鼠组织定居型巨噬细胞浸润(CX3CR1^{GFP+})及其增殖(CX3CR1^{GFP+} KI67⁺)明显增加($P<0.05$)。**结论** UUO 诱导的肾间质纤维化模型中,组织定居型巨噬细胞和骨髓来源的炎性巨噬细胞的浸润均增加,且以组织定居型巨噬细胞及其增殖为主,推测组织定居型巨噬细胞及其增殖主要参与肾纤维化形成。

[关键词] 组织定居型巨噬细胞;增殖;输尿管梗阻;单侧;肾纤维化

[中图法分类号] R692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)19-3261-06

The role of macrophages from different sources in renal fibrosis in mice*

JIANG Yali, HE Juan[△]

(Department of Nephrology, the First Afiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of macrophages from different sources in renal fibrosis in mice. **Methods** A total of 12 macrophages CX3CR1^{GFP} transgenic male C57/B6 mice with the age of 8-10 weeks and six mice with the same age (the WT group) were selected. The transgenic mice were randomly divided into two groups, the unilateral ureteral obstruction (UUO) model was established in one group, and the other group was the Sham group. All mice were sacrificed at 2 weeks after the modeling and the kidney tissue samples were collected. All mice were divided into four groups: the WT group, the Sham group, the UUO(-) group (UUO model without obstruction on the ureter side), and the UUO(+) group (UUO model with obstruction on the ureter side). The collagen fiber deposition and inflammatory macrophages infiltration were detected by the Masson and hematoxylin-eosin (HE) staining. The flow cytometry was used to detect the proliferation and changes of tissue-dwelling macrophages, and immunofluorescence staining was used to detect the proliferation and changes of renal tissue-dwelling macrophages. **Results** Masson and HE staining showed that the collagen fiber deposition and inflammatory macrophages infiltration increased in the renal tissues of the mice in the UUO(+) group, when compared with those in the WT, Sham and UUO(-) groups ($P<0.05$), there was no significant difference between the WT, Sham and UUO(-) groups. The flow cytometry results showed that the infiltration of the renal tissue-dwelling macrophages (CD11B⁺ F4/80⁺ CX3CR1^{GFP+}) and bone marrow-derived inflammatory macrophages (CD11B⁺ F4/80⁺ CRR2⁺) increased significantly in the UUO(+) group, when compared with that in the Sham and UUO(-) groups ($P<0.05$), and the tissue-dwelling macrophages were basically Ly6c⁻ macrophages. Immunofluorescence staining results showed that the infiltration

* 基金项目:国家自然科学基金项目(82000644,81700676)。 作者简介:姜亚丽(1987-),主治医师,硕士,主要从事巨噬细胞参与肾脏纤维化作用及机制的研究。 [△] 通信作者, E-mail: hejuan0212@163.com。

(CX3CR1^{GFP+}) and proliferation (CX3CR1^{GFP+} KI67⁺) of the tissue-dwelling macrophages were significantly increased in the UUO(+) group, when compared with that in the Sham and UUO(-) groups ($P < 0.05$).

Conclusion In the UUO-induced renal interstitial fibrosis model, the infiltration of both the tissue-dwelling macrophages and the bone marrow-derived macrophages increased, and the infiltration was dominated by tissue-dwelling macrophages and their proliferation. It is suggested that the tissue-dwelling macrophages and their proliferation are mainly involved in the formation of renal fibrosis.

[Key words] tissue resident macrophages; proliferation; ureteral obstruction; unilateral; renal fibrosis

全球 13%~15% 的成年人患有慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD), 肾脏纤维化是慢性肾脏病进展至终末期肾病的共同病理过程, 其主要病理改变是细胞外基质蛋白 (胶原、层粘连蛋白、纤维连接蛋白) 的大量产生和堆积^[1]。单侧输尿管结扎 (unilateral ureteral obstruction, UUO) 模型是小管间质纤维化常见的实验模型。肾纤维化是炎症损伤修复过程, 肾脏损伤的实质细胞会释放一系列炎性介质、趋化因子, 招募炎性细胞到肾间质, 募集的炎性细胞和肾脏原位活化的免疫细胞共同参与肾纤维化的发生发展^[2-3], 其中单核巨噬细胞浸润是小管间质主要病变特征。

大量研究证实巨噬细胞可通过多种方式参与肾纤维化, 由于巨噬细胞异质性及肾纤维化机制复杂性^[4-5], 因而研究肾纤维化发病的细胞学和分子机制具有重要的临床意义。以往的研究显示, 骨髓来源的炎性巨噬细胞及其增殖主要贡献了肾纤维化形成^[6]。而近年研究发现, 肾脏组织定居型巨噬细胞也参与了肾纤维化的形成^[7]。但肾脏组织定居型巨噬细胞和骨髓来源的炎性巨噬细胞在肾纤维化中究竟哪一个发挥主要作用, 目前尚不清楚。本研究利用巨噬细胞 CX3CR1^{GFP} 转基因小鼠建立 UUO 模型, 初步探讨肾纤维化过程中不同来源巨噬细胞对肾纤维化的贡献。

1 材料与方法

1.1 材料

CX3CR1^{GFP} 转基因雄性 C57/B6 小鼠 12 只和未转基因 C57/B6 小鼠 6 只 (WT 组, 作为对照), 8~10 周龄, 体重 20~25 g, 由中国人民解放军空军军医大学实验动物中心提供。饲养于无特定病原体 (SPF) 级环境, 恒温恒湿, 24 h 自由进食和饮水。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及 UUO 模型建立

12 只 8~10 周龄大小的 CX3CR1^{GFP} 转基因雄性 C57/B6 小鼠分为两组 (每组 6 只): Sham 组和 UUO 组, 其中 UUO 组又分为 UUO(-) 和 UUO(+), UUO 组 2 周处死动物, 留取结扎侧肾脏作为 UUO(-) 组, 对侧肾脏作为 UUO(+) 组, 同时 Sham 组在同一时间点处死, 留取小鼠肾组织进行后续实验; 另外 6 只同样周龄大小的 WT 组雄性 C57/B6 小鼠, 不进行手术。

1.2.2 UUO

5% 的水合氯醛 (10 μ L/g) 腹腔注射麻醉, 选择腹正中切口, 依次切开皮肤至腹腔, 游离肾脏及输尿管,

将左侧输尿管用组织钳托起中段部位, 止血钳夹住, 两端用 4-0 丝线两次结扎左侧输尿管靠近肾盂段, 剪断输尿管, 然后缝合肌肉和皮肤。

1.2.3 肾组织病理学检查

麻醉后, 用 PBS 从左心室灌注冲走肾脏组织血液, 一部分肾组织用 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 4 μ m 厚度切片, 用于 Masson 染色和苏木素-伊红 (HE) 染色, 分别评价胶原纤维沉积及间质炎性细胞浸润。Masson 染色: 用带显微装置的数字照相机扫描胶原纤维染色区域, 并通过 NIS-Elements Br 3.0 软件行半定量分析, 胶原纤维沉积程度以胶原染色面积占总面积的百分比表示。HE 染色: 定量统计每高倍镜下间质炎性细胞数量。

1.2.4 免疫荧光染色

肾组织用 4% 多聚甲醛固定, 蔗糖脱水, OCT 包埋后放入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱速冻, 在低温恒温箱中冰冻切片 (5 μ m), -80 $^{\circ}$ C 冰箱贮存。切片用丙酮在室温下固定 10 min, 牛血清清蛋白 (BSA) 封闭。甩掉封闭液后, 分别滴加抗 KI67 抗体和抗 α -SMA 抗体 (美国 eBioscience 公司, 1:400, 1:200), 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜, PBS 冲洗 3 次, 每次 7~8 min。然后 Hoechst (1:10 000) 染核, 50% 甘油封片, 荧光显微镜观察并照相。每张切片选 5 个视野, 计数 CX3CR1^{GFP+} KI67⁺ 双阳性细胞占 CX3CR1^{GFP} 阳性细胞的百分比及 α -SMA 阳性细胞数。

1.2.5 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

TGF- β 和 Col-1 引物设计与合成由日本 TaKaRa 公司完成。反应体系为 20 μ L, 其中 SYBR mix 10 μ L, 荧光定量 PCR 参比染料 ($\times 50$) 0.4 μ L、上下游引物各为 0.5 μ L、cDNA 模板 1.0 μ L、ddH₂O 7.6 μ L。反应条件: 预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 72 $^{\circ}$ C, 45 个循环。每 1 个样本设 3 个复孔, 以 β -actin 为内参照。实验数据用 ABI 7500 自带软件进行分析。

1.2.6 肾脏单细胞悬液的流式细胞术

采用 1.2.4 方法获取肾脏组织。制备肾脏细胞: 取一小部分肾组织称重, 充分研磨, 37 $^{\circ}$ C 摇床上用胶原酶 IV (2 mg/mL) 消化 30 min, 尼龙膜过滤, 4 $^{\circ}$ C 离心机 1 200 r/min 离心 4 min, 弃上清液, 加入红细胞裂解液重悬细胞, 静置 5 min, 流式液终止裂红, 1 200 r/min 离心 4 min, 洗涤 2 次。肾脏细胞密度大, 加流式液 5 mL 重悬, 冰上静置 30 min, 吸取上层 2/3 上清液, 1 200 r/min 离心 4 min, 重悬获得单细胞悬液, 显

显微镜下计数。平均每管 6×10^5 个细胞,加入 $10 \mu\text{L}$ 10%大鼠血清,4℃封闭 10 min,加 APC-Iy6c 抗体(1:50 稀释)、PE-F4/80 抗体(1:100 稀释);APC-CD11B 抗体(1:100 稀释)、APC-CD11B(1:100 稀释)、PE-CCR2(1:100 稀释),4℃孵育 25 min。加入 2 mL 流式液重悬清洗细胞,4℃离心机 1 200 r/min 离心 4 min。将碘化丙啶(Pi)用流式液稀释(1:1 000),每管以 300~400 μL Pi 稀释液重悬细胞,上机分析。

1.3 统计学处理

采用 Image Pro V6.0 软件行组织的半定量分析,Graphpad V 4.0 软件进行数据的统计分析与作图,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用成组 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 UUO 导致肾脏纤维化和炎性细胞浸润

转基因小鼠 CX3CR1^{GFP} 鉴定:流式细胞术检测发现转基因小鼠出现 CX3CR1^{GFP+} F4/80⁺ 双阳性巨噬细胞,而 WT 组仅有 F4/80⁺ 阳性巨噬细胞出现,见图 1。Masson 染色结果提示:与 WT 组、UUO(-)组和 Sham 组比较,UUO(+)组小鼠肾组织胶原纤维沉积增多,组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),且 WT 组、Sham 组与 UUO(-)组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。HE 染色结果显示:UUO(+)组间质炎

性巨噬细胞浸润明显多于 WT 组、Sham 组和 UUO(-)组,且差异有统计学意义($P < 0.01$),且 WT 组、Sham 组与 UUO(-)组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。 α -SMA 免疫荧光染色结果提示:与 WT 组、UUO(-)组和 Sham 组比较,UUO(+)组小鼠肾组织 α -SMA 阳性细胞数明显增多,差异有统计学意义($P < 0.05$),且 WT 组、Sham 组与 UUO(-)组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。进一步通过 RT-qPCR 实验发现,UUO(+)组肾组织 TGF- β 、Col-1 mRNA 相对表达水平明显高于 WT 组、Sham 组和 UUO(-)组,且差异有统计学意义($P < 0.05$),而 WT 组与 Sham 组、UUO(-)组 3 组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2。

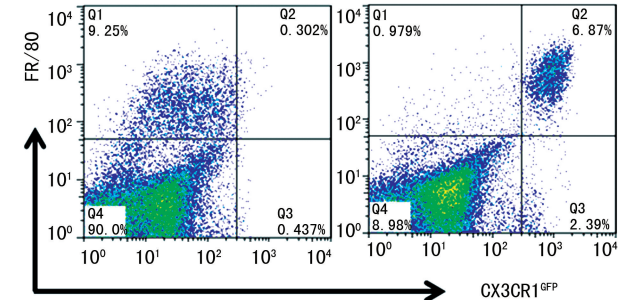
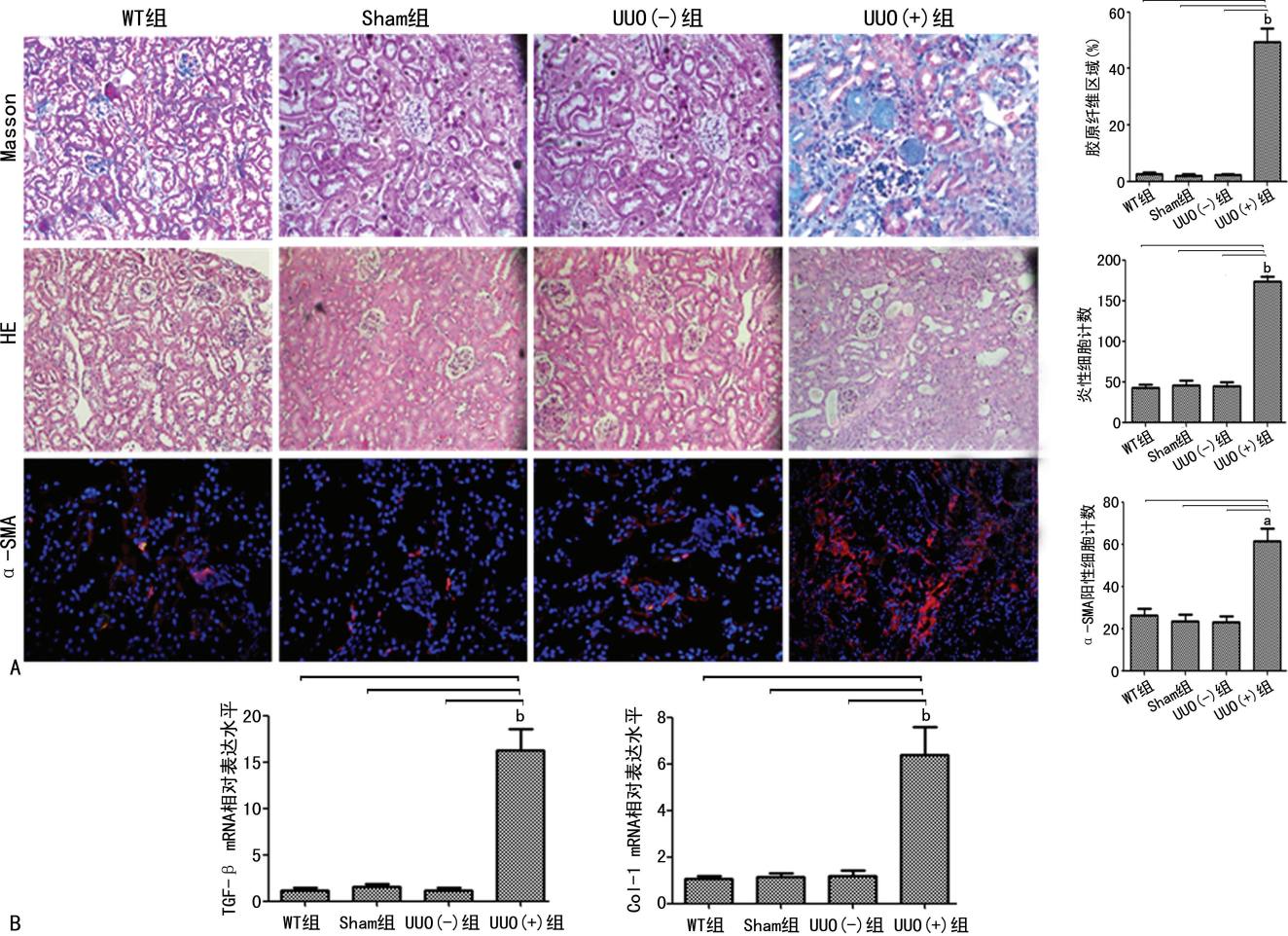


图 1 流式细胞术结果显示转基因小鼠 CX3CR1^{GFP}+ F4/80⁺ 双阳性巨噬细胞明显高于 WT 小鼠



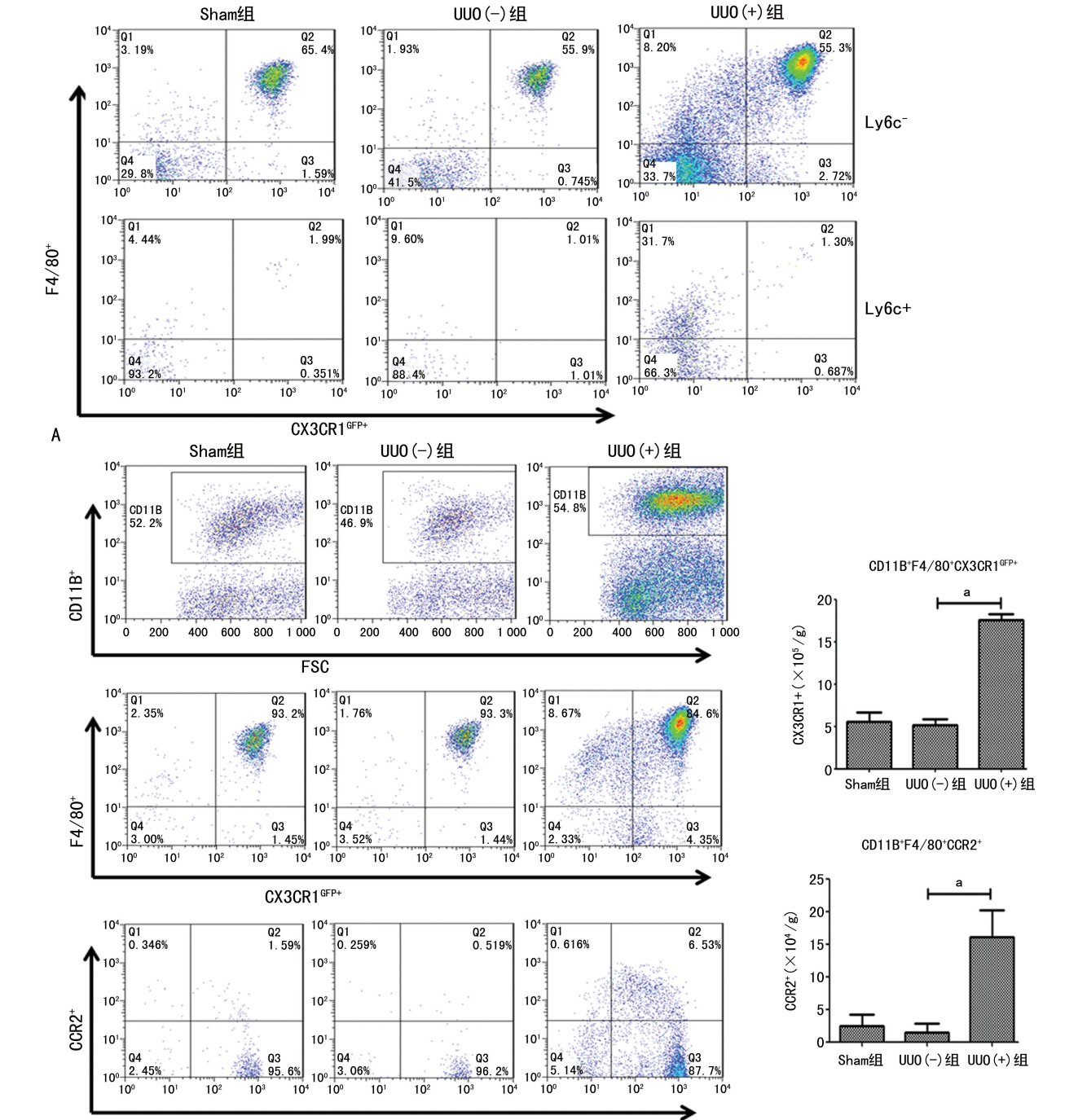
A: Masson、HE、 α -SMA 免疫荧光染色(40 $\times$)及定量分析;B: RT-qPCR 定量分析;C: RT-qPCR 定量分析;^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$ 。

图 2 UUO 后纤维化加重、炎性细胞浸润增多

2.2 UUO 后肾脏组织定居型巨噬细胞和骨髓来源巨噬细胞明显增加

上述结果已证实 WT 组与 Sham 组在组织学和炎性细胞方面无差异,接下来将不阐述 WT 组结果。流式细胞术结果显示,与 Sham 和 UUO(-) 组比较,UUO(+) 组 $ly6c^{-} F4/80^{+} CX3CR1^{GFP+}$ 细胞数明显增多。结果还显示 3 组间 $ly6c^{+} F4/80^{+} CX3CR1^{GFP+}$ 细胞几乎为 0(提示 $ly6c^{+}$ 细胞与募集炎性细胞有关),见图 3A;进一步通过流式细胞术分析组织定居型巨噬细胞,发现 UUO(+) 组中 $CD11b^{+} F4/80^{+} CX3CR1^{GFP+}$ 细胞

(组织定居型巨噬细胞)明显高于 Sham 组和 UUO(-) 组,差异有统计学意义($P<0.05$),且 Sham 组与 UUO(-) 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结果还显示 UUO(+) 组中 $CD11b^{+} F4/80^{+} CCR2^{+}$ 细胞(骨髓来源的炎性巨噬细胞)同样高于 Sham 组和 UUO(-) 组,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3B。但 $CD11b^{+} F4/80^{+} CX3CR1^{GFP+}$ 细胞增加数量明显多于 $CD11b^{+} F4/80^{+} CCR2^{+}$ 细胞,说明肾间质中组织定居型巨噬细胞和骨髓来源的炎性巨噬细胞均参与肾纤维化进展,前者贡献可能更突出。



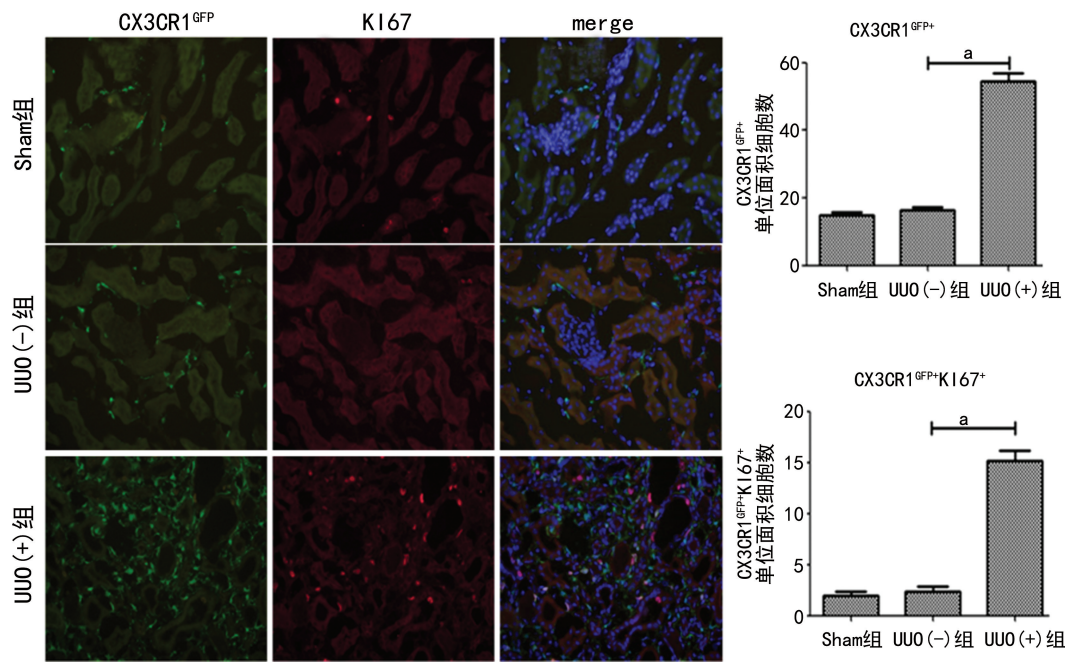
A:UUO 后,肾间质中组织定居型巨噬细胞($ly6c^{-} F4/80^{+} CX3CR1^{GFP+}$) 浸润明显增多;B: UUO 后,肾组织中骨髓来源炎性巨噬细胞($CD11b^{+} CX3CR1^{GFP+} CCR2^{+}$) 浸润明显增多。^a: $P<0.05$ 。

图 3 流式细胞术检测组织定居型巨噬细胞、骨髓来源炎性巨噬细胞变化

2.3 纤维化肾组织定居型巨噬细胞增殖明显增加

与 Sham 组和 UUO(-) 组比较, UUO(+) 组小鼠肾组织 CX3CR1^{GFP+} 及 CX3CR1^{GFP+} KI67⁺ 的细胞明显增多, 且差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。Sham

组和 UUO(-) 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示组织定居型巨噬细胞及其增殖在肾纤维化中发挥重要作用。见图 4。



^a: $P < 0.01$.

图4 UUO后肾脏组织定居型巨噬细胞增殖(CX3CR1^{GFP+} KI67⁺)明显增加(×40)

3 讨论

大量研究已经证实巨噬细胞与肾纤维化密切相关。由于巨噬细胞具有高度可塑性、局部组织功能特异性、炎症因子诱导下分化异常等特点, 使其在肾纤维化过程中具有促纤维化形成及促纤维化降解的双重作用^[8-10]。以往研究已证实, 骨髓来源的炎性巨噬细胞在肾脏纤维化的发生发展中起重要作用^[6]。而近年研究发现, 肾脏定居型巨噬细胞也参与了肾脏纤维化的形成^[7, 11-12]。

在各种肾脏损伤模型中, CX3CR1 介导的巨噬细胞浸润在肾纤维化中发挥重要作用, 而且是第 1 个被证实的趋化因子受体贡献了肾纤维化的形成^[13-14]。而最近的一项研究显示, 敲除 CX3CR1 基因的巨噬细胞肾脏纤维化加重, 提示 CX3CR1⁺ 巨噬细胞对肾脏纤维化具有保护作用^[15]。可见肾脏 CX3CR1⁺ 巨噬细胞对肾纤维化作用仍存在争议, 值得进一步研究。本研究使用 CX3CR1^{GFP} 转基因小鼠建立 UUO 模型, 结果显示 UUO 后 UUO(+) 组肾脏中组织定居型巨噬细胞(CD11B⁺ F4/80⁺ CX3CR1^{GFP+})和骨髓来源的炎性巨噬细胞(CD11B⁺ F4/80⁺ CCR2⁺)浸润均增加, 且前者明显多于后者, 因此笔者推测组织定居型巨噬细胞在肾脏纤维中可能发挥主要作用。

本研究还发现, UUO(+) 组肾脏中 CX3CR1^{GFP+}

巨噬细胞明显高于 UUO(-) 组和 Sham 组, 因此笔者猜想, CX3CR1^{GFP+} 巨噬细胞在 UUO 过程中是否发生了增殖或表型转化? 于是笔者又通过增殖实验进一步探讨 CX3CR1⁺ 巨噬细胞的增殖对肾脏纤维化产生的影响。结果显示, UUO(+) 组肾脏中 CX3CR1^{GFP+} 巨噬细胞的增殖明显高于 UUO(-) 组和 Sham 组, 提示组织定居型巨噬细胞的增殖参与了肾纤维化过程。且已有研究显示在 UUO 诱导的肾纤维化模型中, 药理性抑制 ERK 可以减少肾间质巨噬细胞的增殖, 但巨噬细胞增殖的减少并没有造成肾纤维化的减轻^[16]。由此可见, 肾脏定居型巨噬细胞的增殖在肾纤维化中发挥重要作用。

本研究显示, UUO 过程中肾间质中组织定居型巨噬细胞和炎性巨噬细胞浸润均增多, 且以前者为主, 进一步通过增殖实验证明组织定居型巨噬细胞增殖在肾纤维化过程中发挥重要作用。但是否骨髓来源的炎性巨噬细胞发生表型转化贡献了组织定居型巨噬细胞, 需进一步研究证实。

参考文献

[1] NIEWCZAS M A, PAVKOV M E, SKUPIEN J, et al. A signature of circulating inflammatory

- proteins and development of end-stage renal disease in diabetes[J]. *Nat Med*, 2019, 25(5): 805-813.
- [2] WAIKAR S S, SRIVASTAVA A, PALSSON R, et al. Association of urinary oxalate excretion with the risk of chronic kidney disease progression[J]. *JAMA*, 2019, 179(4): 542-551.
- [3] DJUDJAJ S, BOOR P. Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis[J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 65: 16-36.
- [4] HUEN S C, CANTLEY L G. Macrophage-mediated injury and repair after ischemic kidney injury[J]. *Pediatr Nephrol*, 2015, 30(2): 199-209.
- [5] LIU Y, WANG K, LIANG X, et al. Complement C3 produced by macrophages promotes renal fibrosis via IL-17A secretion[J]. *Front Immunol*, 2018, 22(9): 2385.
- [6] JANG H S, KIM J I, HAN S J, et al. Recruitment and subsequent proliferation of bone marrow-derived cells in the postischemic kidney are important to the progression of fibrosis[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014, 306(12): F1451-1461.
- [7] KITCHIND A R. Dendritic cells in progressive renal disease: some answers, many questions[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2014, 29(12): 2185-2193.
- [8] LEE S, HUEN S, NISHIO H, et al. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(2): 317-326.
- [9] CAO Q, HARRIS D C, WANG Y. Macrophages in kidney injury, inflammation, and fibrosis[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2015, 30(3): 183-194.
- [10] TANG P M K, NIKOLIC-PATERSON D J, LAN H Y. Macrophages: versatile players in renal inflammation and fibrosis[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15(3): 144-158.
- [11] HOCHHEISER K, HEUSER C, KRAUSE T A, et al. Exclusive CX3CR1 dependence of kidney DCs impacts glomerulonephritis progression[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(10): 4242-4254.
- [12] SOOS T J, SIMS T N, BARISONNI L, et al. CX3CR1 interstitial dendritic cells form a contiguous network throughout the entire kidney[J]. *Kidney Int*, 2006, 70(3): 591-596.
- [13] SONG K H, PARK J, PARK J H, et al. Fractalkine and its receptor mediate extracellular matrix accumulation in diabetic nephropathy in mice[J]. *Diabetologia*, 2013, 56(7): 1661-1669.
- [14] DURKAN A M, ALEXANDER R T, LIU G Y, et al. Expression and targeting of CX3CL1 (Fractalkine) in renal tubular epithelial cells[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(1): 74-83.
- [15] LIONAKIS M S, SWAMYDAS M, FISCHER B G, et al. CX3CR1-dependent renal macrophage survival promotes *Candida* control and host survival[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(12): 5035-5051.
- [16] HAN Y, MASAKI T, HURST L A, et al. Extracellular signal-regulated kinase-dependent interstitial macrophage proliferation in the obstructed mouse kidney[J]. *Nephrology (Carlton)*, 2008, 13(5): 411-418.

(收稿日期: 2021-01-13 修回日期: 2021-05-18)