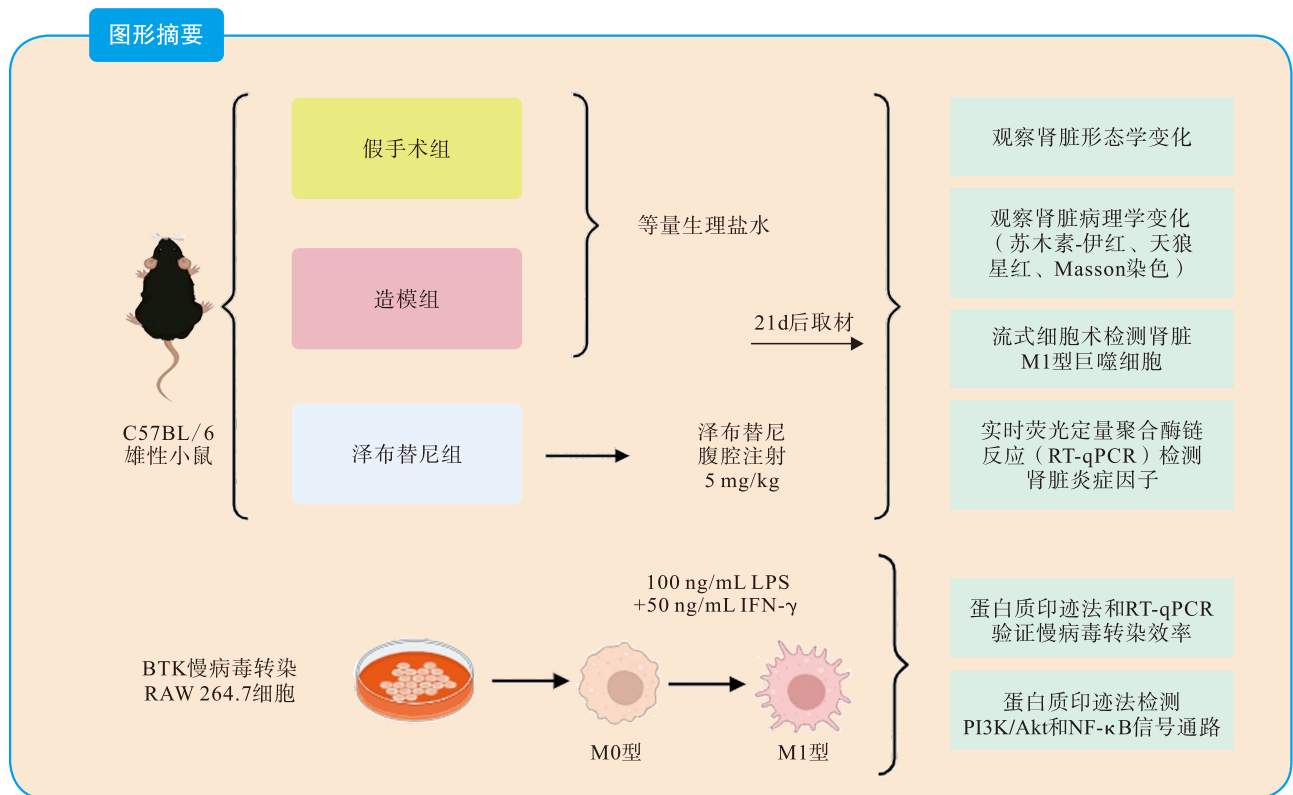


· 论著 ·

泽布替尼抑制巨噬细胞的浸润改善肾缺血-再灌注损伤后肾纤维化

刘琦 张燕楠 孙启全



【摘要】 **目的** 探讨布鲁顿酪氨酸激酶 (BTK) 抑制剂泽布替尼对肾缺血-再灌注损伤 (RIRI) 后肾纤维化的作用机制。**方法** 将 C57BL/6 小鼠随机分为假手术组、造模组和造模+泽布替尼给药组 (泽布替尼组), 每组 5 只, 分别进行假手术、RIRI 造模、RIRI 造模+泽布替尼 (5 mg/kg) 给药治疗, 21 d 后取材。观察小鼠肾脏形态学变化、组织病理学变化、肾脏 M1 型巨噬细胞水平变化、肾脏炎症反应变化, 以及脂多糖 (LPS)+干扰素 (IFN)- γ 体外诱导慢病毒转染巨噬细胞后相关炎症信号通路表达情况。**结果** 与假手术组相比, 造模组小鼠的肾脏缩小、单侧肾质量与小鼠体质量比值降低、肾小管间质纤维化加重、肾脏 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 和 I 型胶原蛋白的表达均增加、肾脏 F4/80 和 CD86 的表达均增加、肾脏近曲小管管腔明显扩张、管腔内细胞碎片

DOI: 10.12464/j.issn.1674-7445.2025107

基金项目: 国家自然科学基金 (82271805、82270783)

作者单位: 510641 广州, 华南理工大学医学院 (刘琦); 南方医科大学附属广东省人民医院 (广东省医学科学院) 肾移植科 (刘琦、张燕楠、孙启全)

作者简介: 刘琦 (ORCID 0009-0004-3234-4630), 硕士, 研究方向为移植免疫, Email: liuqi000814@163.com

通信作者: 孙启全 (ORCID 0000-0002-7296-316X), 博士, 教授, 研究方向为移植免疫, Email: sunqiquan@gdph.org.cn

堆积及炎症细胞浸润、肾脏 CD86、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、白细胞介素 (IL)-6、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 及 IL-1 β 的信使 RNA (mRNA) 水平均升高; 与造模组相比, 泽布替尼组小鼠 RIRI 后肾脏大小恢复、单侧肾质量与小鼠体质量比值升高、肾小管间质纤维化减轻、肾脏 α -SMA 和 I 型胶原蛋白的表达均减少、肾脏 F4/80 和 CD86 的表达均减少、肾脏 CD45⁺ 淋巴细胞和 CD11b⁺ F4/80⁺ 巨噬细胞的数量均减少、CD11b⁺ F4/80⁺ 和 CD86⁺ 巨噬细胞在损伤组织中浸润减少、肾脏的炎症病理改变程度较轻、肾脏 CD86、TNF- α 、IL-6、iNOS 及 IL-1 β 的 mRNA 水平均降低。体外实验利用 LPS+IFN- γ 诱导 M1 型巨噬细胞发现磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K)、蛋白激酶 B (Akt)、核因子 (NF)- κ B 的磷酸化水平均升高, 而敲低 BTK 后其磷酸化水平均降低, 表明敲低 BTK 可能通过抑制 PI3K/Akt 和 NF- κ B 相关炎症信号通路, 从而减弱 LPS+IFN- γ 诱导的 M1 型巨噬细胞促炎作用。**结论** 泽布替尼可能通过抑制 PI3K/Akt 和 NF- κ B 相关炎症信号通路, 减少 M1 型巨噬细胞浸润和相关炎症因子表达, 从而减轻 RIRI 后肾纤维化, 为其临床应用提供了潜在依据。

【关键词】 泽布替尼; 巨噬细胞; 肾缺血-再灌注损伤; 肾纤维化; 布鲁顿酪氨酸激酶; 急性肾损伤; 脂多糖; 成纤维细胞

【中图分类号】 R617, R692 【文献标志码】 A 【文章编号】 1674-7445 (2025) 04-0007-11

Zanubrutinib inhibits macrophage infiltration to ameliorate renal fibrosis after renal ischemia-reperfusion injury Liu Qi*, Zhang Yannan, Sun Qiquan. *School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China
Corresponding author: Sun Qiquan, Email: sunqiquan@gdph.org.cn

【Abstract】 **Objective** To explore the action mechanism of Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor zanubrutinib on renal fibrosis after renal ischemia-reperfusion injury (RIRI). **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into sham operation group, modeling group and modeling + zanubrutinib treatment group (zanubrutinib group), with 5 mice in each group. The groups underwent sham operation, RIRI modeling and RIRI modeling + zanubrutinib (5 mg/kg) treatment, respectively. Tissues were collected after 21 days. The morphological changes of the kidneys, histopathological changes, levels of M1 macrophages in the kidneys, inflammatory responses in the kidneys, and the expression of related inflammatory signaling pathways of macrophages induced by lipopolysaccharide(LPS) + interferon(IFN)- γ *in vitro* after lentivirus transfection were observed. **Results** Compared with the sham operation group, the kidneys of the modeling group mice shrank, the ratio of unilateral kidney weight to mouse body weight decreased, renal tubular interstitial fibrosis worsened, and the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) and type I collagen in the kidneys increased. The expression of F4/80 and CD86 in the kidneys increased, the lumen of the renal proximal convoluted tubules was significantly dilated, cellular debris accumulated in the lumen and inflammatory cell infiltration occurred, and the messenger RNA (mRNA) levels of CD86, tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6, inducible nitric oxide synthase (iNOS) and IL-1 β in the kidneys increased. Compared with the modeling group, the kidneys of the zanubrutinib group mice enlarged after RIRI, the ratio of unilateral kidney weight to mouse body weight increased, renal tubular interstitial fibrosis was alleviated, and the expression of α -SMA and type I collagen in the kidneys decreased. The expression of F4/80 and CD86 in the kidneys decreased, the number of CD45⁺ lymphocytes and CD11b⁺ F4/80⁺ macrophages in the kidneys decreased, the infiltration of CD11b⁺ F4/80⁺ and CD86⁺ macrophages in the damaged tissue decreased, the degree of renal inflammatory pathological changes was milder, and the mRNA levels of CD86, TNF- α , IL-6, iNOS and IL-1 β in the kidneys decreased. *In vitro* experiments using LPS+IFN- γ to induce M1-type macrophages found that the phosphorylation levels of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt), and nuclear factor (NF)- κ B increased, while the phosphorylation levels decreased after BTK knockdown, indicating that BTK knockdown may inhibit the PI3K/Akt and NF- κ B related inflammatory signaling pathways, thereby reducing the pro-inflammatory effects of LPS+IFN- γ induced M1-type macrophages. **Conclusions** Zanubrutinib may alleviate renal fibrosis after RIRI by inhibiting the PI3K/Akt and NF- κ B related inflammatory signaling pathways, reducing the infiltration of M1 macrophages and the expression of related inflammatory factors, providing potential evidence for its clinical application.

【Key words】 Zanubrutinib; Macrophage; Renal ischemia-reperfusion injury; Renal fibrosis; Bruton's tyrosine kinase; Acute kidney injury; Lipopolysaccharide; Fibroblast

肾缺血-再灌注损伤 (renal ischemia-reperfusion injury, RIRI) 是肾脏在遭受缺血缺氧、休克、肾移植、全身性炎症反应综合征等病理损伤时出现的急性损伤^[1]。肾移植术中的 RIRI 仍然是亟待攻克的难题^[2]。RIRI 过程早期表现为急性肾损伤的特征, 伴随肾小管上皮细胞功能障碍引发的代谢失衡、电解质紊乱及血流动力学异常。若未能及时干预, 持续的缺氧微环境将诱导上皮-间质转化, 促使细胞外基质过度沉积, 最终发展为不可逆的肾间质纤维化^[3-5]。巨噬细胞影响着 RIRI 的病理生理发展过程^[6-7]。在 RIRI 过程中, 过度激活的巨噬细胞可能导致进一步的组织损伤, 它们释放的炎症介质和活性氧簇可以诱导细胞凋亡、坏死和炎症反应, 导致肾组织的破坏和功能障碍^[8-10]。近年来研究表明, 抑制巨噬细胞向损伤部位的浸润可能成为治疗 RIRI 的潜在策略^[11], 因此, 巨噬细胞浸润水平对于 RIRI 的结局和解决至关重要。

布鲁顿酪氨酸激酶 (Bruton's tyrosine kinase, BTK) 是一种参与 B 细胞受体信号通路的关键酶^[12]。BTK 可以由其他免疫细胞群表达, 并与骨髓细胞的免疫调节和功能有关。BTK 也存在于巨噬细胞中, 参与巨噬细胞极化和多种信号通路, 如 Toll 样受体信号传导, 在免疫调节中起重要作用^[13]。因此, BTK 可能是调节巨噬细胞极化的一个关键分子靶点。泽布替尼是美国食品与药品监督管理局批准的 BTK 不可逆抑制剂^[14]。为了探讨 BTK 抑制剂泽布替尼在巨噬细胞相关炎症通路与 RIRI 导致的肾纤维化的关系, 本研究利用泽布替尼作为一种 RIRI 后肾纤维化的抗炎治疗药物, 通过建立小鼠 RIRI 模型, 探讨泽布替尼对 RIRI 后肾纤维化的作用机制, 旨在为泽布替尼针对 RIRI 的临床应用提供更多依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要试剂

雌性 6~8 周龄 C57BL/6 小鼠 (体质量 20~23 g) 购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司, 所有小鼠在无特定病原体级环境中饲养。本研究获得广东省人民医院动物实验伦理委员会伦理批准 (批号: KY-N-2021-065-5)。

泽布替尼、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、干扰素 (interferon, IFN) γ 均购自美国 MedChemExpress 公司; 异氟烷、SYBR Green qPCR

Master Mix、苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色试剂盒、天狼星红染色试剂盒、Masson 染色试剂盒均购自武汉赛维尔生物科技有限公司; RIPA 裂解液、蛋白磷酸酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、蛋白定量 BCA 试剂盒均购自上海碧云天生物技术股份有限公司; α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、I 型胶原蛋白、BTK、F4/80、CD86、磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)、p-PI3K、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、p-Akt、核因子 (nuclear factor, NF)- κ B、p-NF- κ B 等抗体均购自美国 CST 公司; 亮紫色 (brilliant violet, BV) 421-CD45、异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC)-CD86、藻蓝蛋白 (allophycocyanin, APC)-F4/80、多甲藻黄素-叶绿素-蛋白质/花青 7 (peridinin-chlorophyll-protein/cyanine7, PerCP/Cy7)-CD11b 等流式抗体及凋亡试剂盒均购自美国 BD Biosciences 公司; RNA 提取试剂盒购自广州信天翁生物科技有限公司; PrimeScript II First-Strand cDNA 合成试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; 慢病毒载体购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司; 嘌呤霉素购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 实验分组与模型建立

将 C57BL/6 小鼠随机分为 3 组: 假手术组、造模组、造模+泽布替尼给药组 (泽布替尼组), 每组 5 只, 分别进行假手术、RIRI 造模、RIRI 造模+泽布替尼 (5 mg/kg) 给药治疗。利用以往 RIRI 的造模方法^[15], 在 37 °C 恒温加热垫上, 用异氟烷进行麻醉并暴露肾脏, 用无损伤血管夹夹住肾蒂 30 min, 观察肾脏颜色变化。肾脏在夹住肾蒂后 1 min 内变黑, 移除夹子后约 10 s 内恢复正常颜色。假手术组小鼠接受相同的手术, 但不夹住肾蒂。本研究中所有药物给药剂量的选择是在保证药物溶解性和排除毒性的基础上参考类似研究中的给药浓度所确定的。将泽布替尼溶解于二甲基亚砜, 并用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 稀释。RIRI 前给小鼠腹腔注射 5 mg/kg 泽布替尼, 假手术组和造模组给予等量生理盐水, 连续给药 21 d 后取材。

1.3 研究内容与方法

1.3.1 病理学观察 取出肾脏观察形态学变化后, 立即放入 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 再逐步放入不同浓度乙醇中去除水分。二甲苯透明化组织后放入熔化的石蜡中浸泡, 使用切片将石蜡包埋的组织切成

5 μm 的薄片。将制备好的肾组织切片进行 HE、天狼星红和 Masson 染色。免疫组织化学染色检测 α -SMA、I 型胶原蛋白、F4/80、CD86。

1.3.2 流式细胞术 取出小鼠肾脏，置于预冷的 PBS 中，去除肾脏周围的脂肪和结缔组织。在小皿中将肾组织剪成约 1 mm^3 的小块，37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴摇床消化 60 min，使组织块与消化液充分接触。消化完成后，将细胞悬液通过 40 μm 的细胞筛过滤至新离心管中，Ficoll 离心后弃去上清液，收集白膜层免疫细胞并调整细胞浓度，确保细胞浓度适合后对目标细胞表面标记具有特异性的荧光标记抗体肾组织的单细胞悬浮液，使用荧光标记抗体 BV421-CD45、FITC-CD86、APC-F4/80、PerCP/Cy7-CD11b 检测肾脏 M1 型巨噬细胞。

1.3.3 实时荧光定量聚合酶链反应 使用 RNA 提取试剂盒从小鼠肾组织或巨噬细胞中提取总 RNA。使用 PrimeScript II First-Strand cDNA 合成试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。使用 SYBR Green qPCR Master Mix 等配置实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 反应体系混合物，进行扩增，计算信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 相对表达量，检测相关炎症因子的 mRNA 水平，引物序列如表 1 所示。

1.3.4 蛋白质印迹法 提取蛋白，通过制胶、电泳、转膜等步骤后，把稀释的一抗 (α -SMA、I 型胶原蛋白、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、NF- κ B、p-NF- κ B、 β -actin、GAPDH) 和聚偏氟乙烯膜一起放入盒中，4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜，洗涤后加入二抗稀释液于室温下孵育 30 min，

随后行化学发光检测，检测相关纤维化和炎症信号通路指标的蛋白水平。

1.3.5 BTK 慢病毒转染 RAW264.7 细胞 将 RAW 264.7 (鼠源巨噬细胞系) 细胞以 50%~70% 的融合度接种到 6 孔板中，置于含 10% 胎牛血清的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM) 中培养过夜。按照 BTK 慢病毒的生产说明书，以 MOI=50 的病毒感染浓度转染细胞，培养 16 h 后，将转染培养基更换为新鲜培养基，继续培养 72 h，使用 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素进行筛选成功转染的细胞。RT-qPCR 和蛋白质印迹法验证转染效率，BTK 基因稳定敲除的细胞系用于后续实验。将转染阴性对照慢病毒 (shNC) 作为对照，shNC-M0 不添加任何处理 (shNC-M0)，使用 100 ng/mL LPS 和 50 ng/mL IFN- γ 分别处理转染 shNC 和 BTK 敲除慢病毒 (shBTK) 的 RAW 264.7 细胞 24 h，以诱导 M1 型巨噬细胞极化 (shNC-M1、shBTK-1-M1、shBTK-2-M1)。

1.4 统计学方法

使用 Image J 软件对图片进行量化处理。使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析和可视化。符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差表示，两组间比较采用独立样本 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 泽布替尼给药恢复小鼠 RIRI 后肾脏大小及质量 与假手术组相比，造模组小鼠的肾脏缩小；与造模组相比，泽布替尼组小鼠 RIRI 后肾脏大小得到恢复 (图 1 A)。与假手术组相比，造模组小鼠的单侧

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')
β -actin ^①	AGGCCAACCGTGAAAAGATG	TGGCGTGAGGGAGAGCATAG
CD86	TGTTTCCGTGGAGACGCAAG	TTGAGCCTTTGTAAATGGGCA
IL-1 β ^②	GAAATGCCACCTTTTGACAGTG	TGGATGCTCTCATCAGGACAG
iNOS ^③	GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA	GTGGACGGGTTCGATGTCAC
IL-6 ^④	TGCAAGAGACTTCCATCCAGT	TAAGCCTCCGACTTGTGAAGT
TNF- α ^⑤	GCCTCTTCTCATTCTGCTTG	GGGTCTGGGCCATAGAAGT
BTK	CCAGAAAGACAGATTCCGAGGAG	AATCCAGCGCTTTCTCAGCTC

注：① β -actin为 β -肌动蛋白；②IL-1 β 为白细胞介素-1 β ；③iNOS为诱导型一氧化氮合酶；④IL-6为白细胞介素-6；⑤TNF- α 为肿瘤坏死因子- α 。

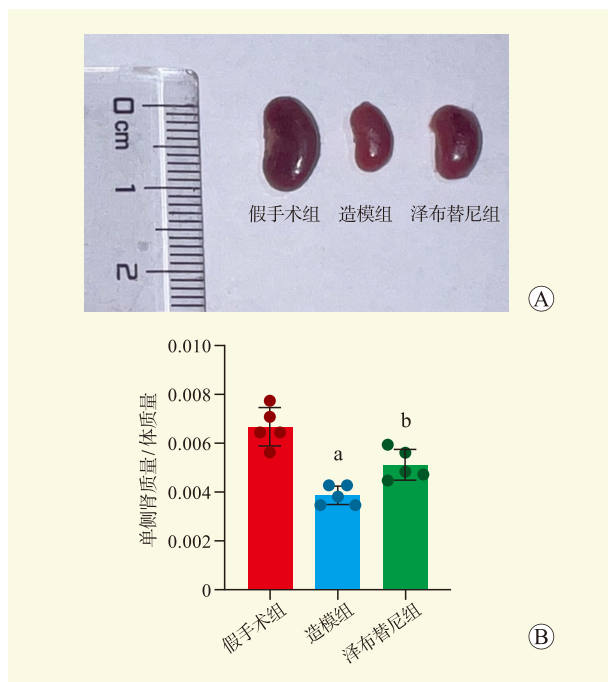
肾质量与小鼠体质量比值降低;与造模组相比,泽布替尼组小鼠 RIRI 后单侧肾质量与小鼠体质量比值升高(图 1 B)。以上结果提示,泽布替尼给药后可在一定程度上恢复了小鼠 RIRI 后肾脏的大小及质量。

2.2 泽布替尼给药减轻小鼠 RIRI 后肾纤维化

利用天狼星红和 Masson 染色评估小鼠 RIRI 后肾小管间质纤维化,结果显示,与假手术组相比,造模组小鼠肾小管间质纤维化加重;与造模组相比,泽布替尼组小鼠 RIRI 后肾小管间质纤维化减轻(图 2 A、B)。与假手术组相比,造模组小鼠肾脏 α -SMA 和 I 型胶原蛋白的表达均增加;与造模组相比,泽布替尼组小鼠 RIRI 后肾脏 α -SMA 和 I 型胶原蛋白的表达均减少(图 2 C~E)。

2.3 泽布替尼给药减少小鼠 RIRI 后肾脏巨噬细胞浸润

免疫组化染色结果显示,与假手术组比较,造模组小鼠肾脏 F4/80 和 CD86 的表达均增加;与造模组比较,泽布替尼组小鼠 RIRI 后肾脏 F4/80 和 CD86 的表达均减少(图 3 A)。流式细胞术结果显示,与造模组比较,泽布替尼组小鼠 RIRI 后肾脏 CD45⁺淋巴细胞和 CD11b⁺ F4/80⁺巨噬细胞的数量均减少,且



注: A 图为各组小鼠处死后取出的肾脏; B 图为各组小鼠单侧肾质量与小鼠体质量比值。与假手术组比较, $^aP < 0.05$; 与造模组比较, $^bP < 0.05$ 。

图 1 各组小鼠肾脏形态学变化

Figure 1 Morphological changes of kidneys in different groups of mice

泽布替尼给药能抑制 CD11b⁺ F4/80⁺和 CD86⁺巨噬细胞在损伤组织中的浸润(图 3 B)。

2.4 泽布替尼给药减少小鼠 RIRI 后肾脏炎症反应

HE 染色结果显示,假手术组小鼠肾脏结构完整,而造模组小鼠肾脏的近曲小管管腔明显扩张、管腔内细胞碎片堆积及炎症细胞浸润;与造模组相比,泽布替尼组小鼠 RIRI 后肾脏的炎症病理改变程度较轻(图 4 A)。利用 RT-qPCR 对小鼠肾脏巨噬细胞相关炎症因子进行检测,结果显示,与假手术组相比,造模组小鼠肾脏 CD86、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 、白细胞介素(interleukin, IL)-6、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)及 IL-1 β 的 mRNA 水平均升高;与造模组相比,泽布替尼组小鼠 RIRI 后肾脏 CD86、TNF- α 、IL-6、iNOS 及 IL-1 β 的 mRNA 水平均降低(图 4 B)。

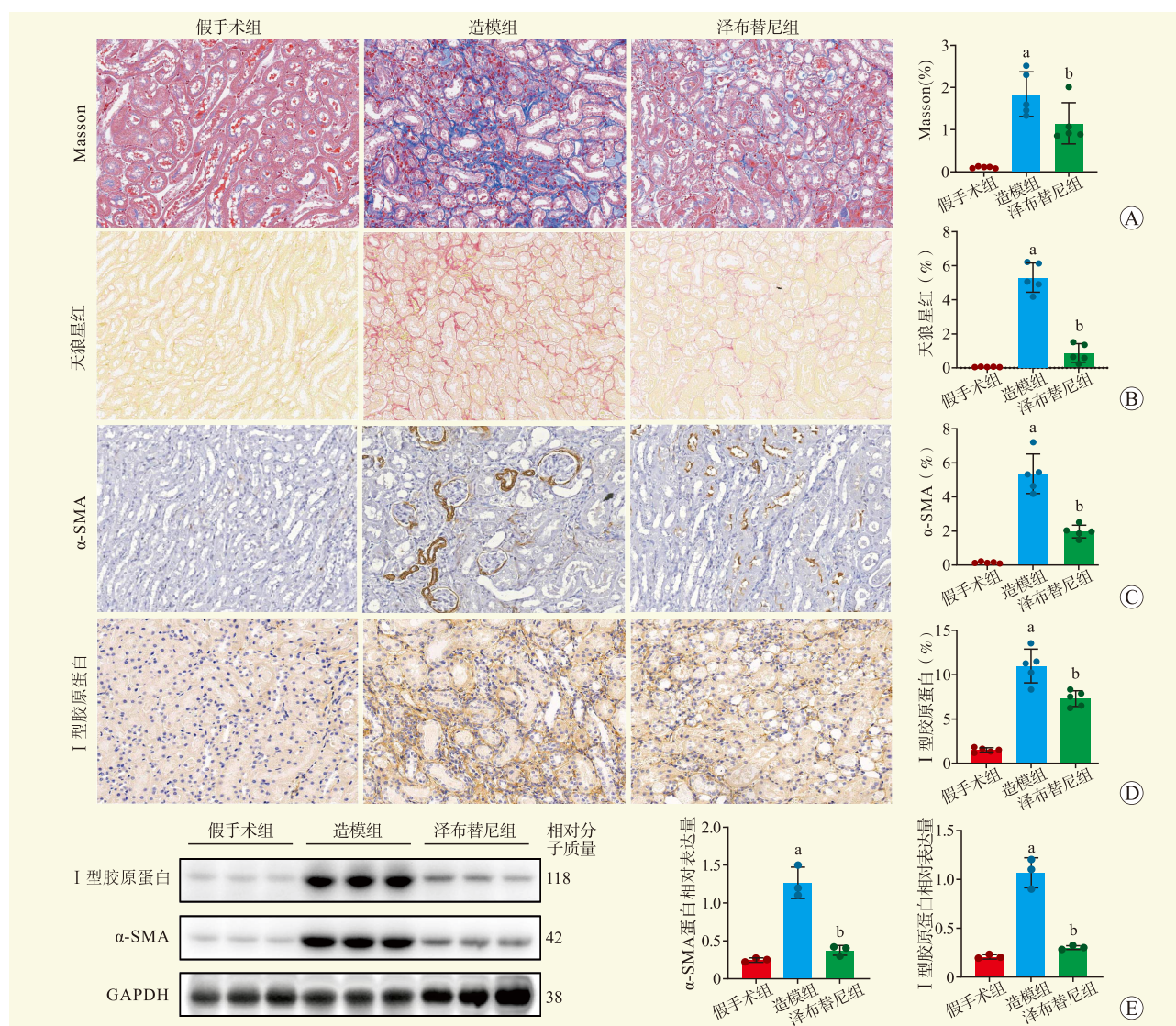
2.5 敲低 BTK 通过抑制 PI3K/Akt 和 NF- κ B 炎症信号通路减弱 LPS+IFN- γ 诱导的 M1 型巨噬细胞促炎作用

为探讨 BTK 在巨噬细胞中的功能,体外实验利用慢病毒载体转染 RAW 264.7 细胞以敲低 BTK,通过蛋白质印迹法和 RT-qPCR 分别检测转染后 BTK 蛋白和 mRNA 水平。结果显示, BTK 慢病毒转染组的 RAW 264.7 细胞中 BTK 蛋白和 mRNA 水平均低于阴性对照组(图 5 A、B),表明 BTK 基因在转录和翻译水平上均成功敲低,验证了该慢病毒转染的有效性。

为探索泽布替尼在体外发挥抗炎作用的潜在机制,本研究对 LPS+IFN- γ 诱导的巨噬细胞相关炎症信号通路进行检测,包括 PI3K/Akt 和 NF- κ B^[16-18]。蛋白质印迹法结果显示, LPS+IFN- γ 诱导的 M1 型巨噬细胞的 PI3K、Akt、NF- κ B 的磷酸化水平均升高,而敲低 BTK 基因后其磷酸化水平均降低(图 5 C、D),表明敲低 BTK 基因可能通过抑制 PI3K/Akt 和 NF- κ B 相关炎症信号通路,从而减弱 LPS+IFN- γ 诱导的 M1 型巨噬细胞促炎作用。

3 讨论

肾纤维化是 RIRI 后常见且严重的不良结局,严重威胁患者的肾脏功能及生命健康^[9]。RIRI 是引发肾纤维化的重要诱因,一旦进展为肾纤维化,肾脏正常的组织结构被破坏,逐渐被纤维瘢痕组织取代,肾



注：A~D 图分别为各组小鼠肾脏石蜡切片 Masson 染色、天狼星红染色、α-SMA 及 I 型胶原蛋白免疫组化染色及量化结果（均为×200）；E 图为蛋白质印迹法检测小鼠肾脏 α-SMA 和 I 型胶原蛋白的表达水平及蛋白条带量化结果。与假手术组比较，^a*P*<0.05；与造模组比较，^b*P*<0.05。

图 2 各组小鼠肾脏纤维化指标的比较

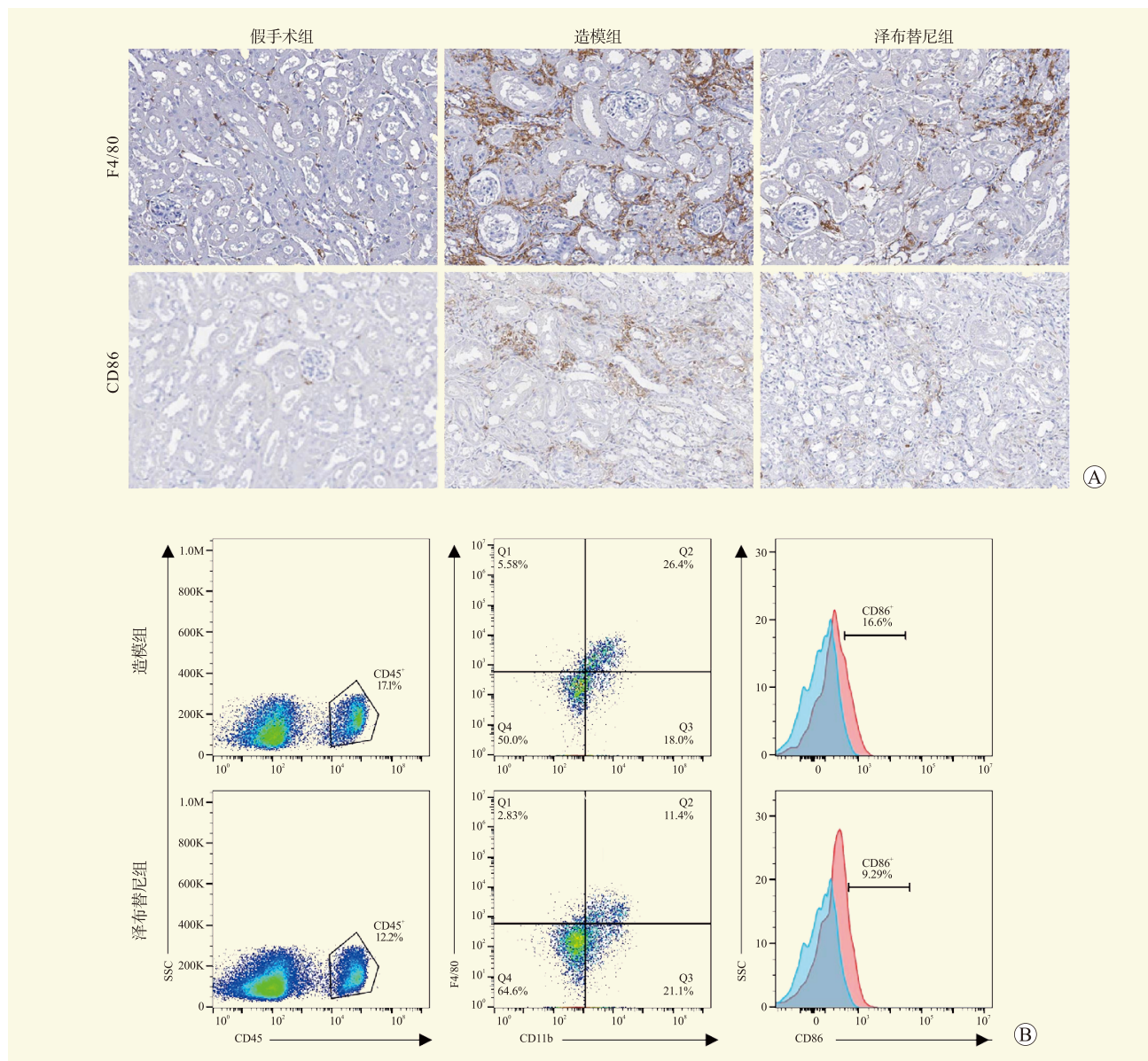
Figure 2 Comparison of renal fibrosis indicators among different groups of mice

功能呈进行性下降，最终可发展为终末期肾病，极大地降低患者的生活质量，并带来沉重的医疗负担^[20-22]。

巨噬细胞作为免疫系统的重要组成部分，在 RIRI 导致肾纤维化的进程中发挥着关键作用^[23-24]。在正常生理状态下，肾脏内部巨噬细胞数量和活性维持在相对稳定的水平，参与正常的免疫监视和维持组织内稳态。然而当处于 RIRI 时，血液重新流入缺血的肾组织，此时肾功能非但不能立即恢复正常，反而触发了一系列复杂且剧烈的炎症级联反应^[25-27]。在这种情况下，大量巨噬细胞会浸润肾组织，并迅速被激

活。被激活的巨噬细胞成为炎症因子的“生产工厂”，释放出多种促炎因子，对肾小管上皮细胞和内皮细胞造成损伤，严重干扰肾脏的滤过和重吸收等关键生理功能^[28-29]。

随着炎症反应的持续进展，巨噬细胞浸润水平持续升高，这与肾纤维化的发生发展密切相关。持续高水平浸润的巨噬细胞不断释放炎症介质，激活肾脏内的成纤维细胞，促使这些成纤维细胞大量增殖，并合成和分泌过量的细胞外基质，比如胶原蛋白、纤维连接蛋白等。这些细胞外基质过度沉积，逐渐取代正常



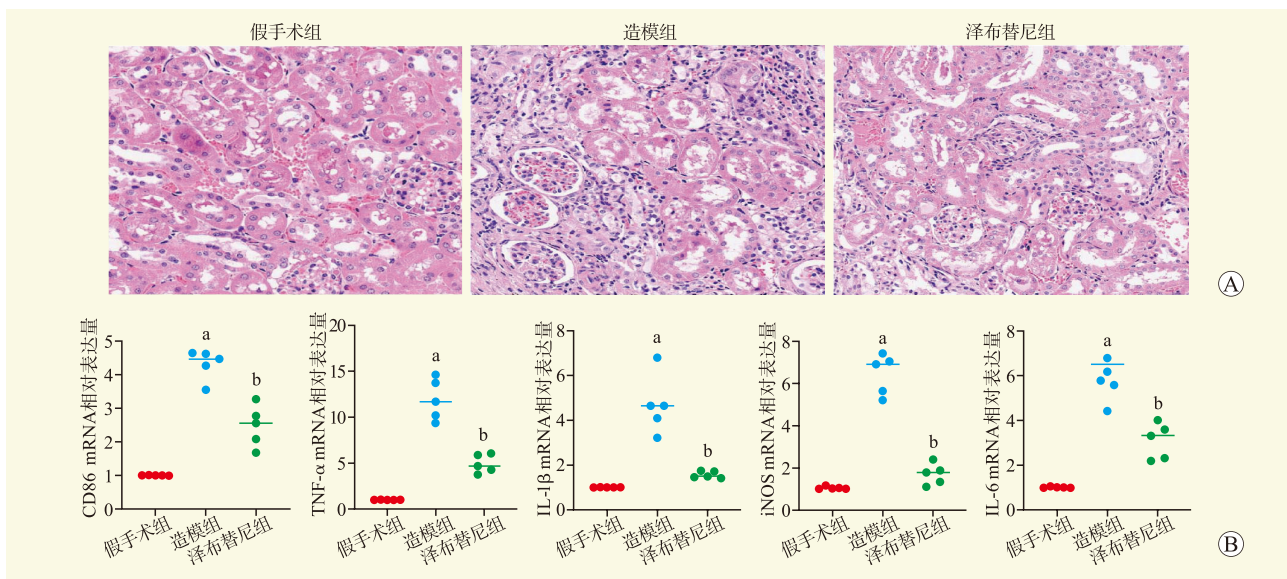
注：A 图为各组小鼠肾脏石蜡切片 F4/80 和 CD86 免疫组化染色 ($\times 200$)；B 图为流式细胞术检测小鼠肾组织中 CD45⁺ 细胞、CD11b⁺ F4/80⁺ 细胞和 CD86⁺ 细胞的水平。

图 3 各组小鼠肾脏巨噬细胞水平比较

Figure 3 Comparison of renal macrophage levels among different groups of mice

的肾组织，导致肾纤维化的发生和进展^[30-32]。临床研究发现，在 RIRI 患者的肾活组织检查中，巨噬细胞浸润水平与肾纤维化程度呈显著正相关，巨噬细胞浸润水平越高，肾纤维化的进程越快，肾功能受损越严重^[33-34]。动物实验也进一步证实，通过抑制巨噬细胞的浸润，能够有效减轻 RIRI 诱导的肾纤维化程度，显著改善肾功能^[35-37]。深入探究巨噬细胞浸润水平与 RIRI 导致的肾纤维化之间的关系，对于揭示肾纤维化的发病机制，寻找有效的临床防治靶点，改善患者预后具有至关重要的意义。

在 RIRI 中，中性粒细胞通常在早期发生浸润，导致急性肾损伤，而巨噬细胞在后期阶段发挥作用，是急性肾损伤的核心驱动者，尤其是 M1 型巨噬细胞促进炎症反应，M2 型巨噬细胞促进修复作用，T 细胞、树突状细胞、B 细胞和自然杀伤细胞的作用则相对次要，他们通过调节适应性免疫来放大损伤作用，又因为肾脏 BTK 主要表达于巨噬细胞和 B 细胞，参与调控巨噬细胞的极化，因此，本研究主要聚焦于 RIRI 中 BTK 在巨噬细胞中的作用^[38]。近年来，BTK 抑制剂泽布替尼因其具有高度选择性和良好的



注：A 图为各组小鼠肾脏石蜡切片 HE 染色（ $\times 200$ ）；B 图为 RT-qPCR 检测各组小鼠肾脏巨噬细胞膜表达分子 CD86 及相关炎症因子的 mRNA 水平。与假手术组比较，^a $P < 0.05$ ；与造模组比较，^b $P < 0.05$ 。

图 4 各组小鼠肾脏炎症反应比较

Figure 4 Comparison of renal inflammatory responses among different groups of mice

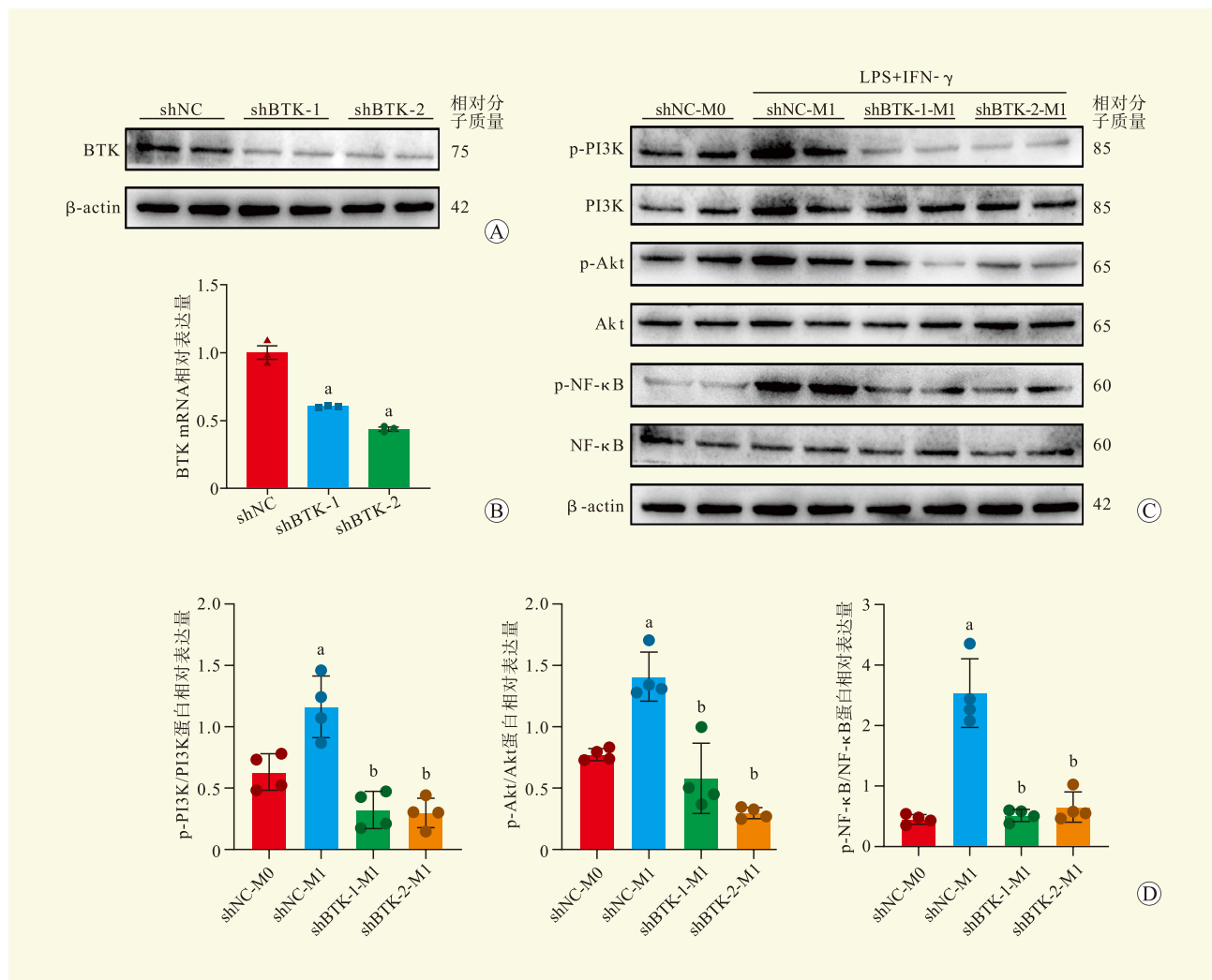
抗炎作用，在多种免疫性疾病中展现出巨大的潜力，对表皮生长因子受体、IL-2 和其他激酶均表现出较低的脱靶活性。在临床前研究中，泽布替尼显示出良好的口服生物利用度，实现更大的暴露范围，并且在靶组织中显示出相比于伊布替尼更完全的 BTK 抑制作用^[39]。已有研究利用泽布替尼治疗 LPS 诱导的小鼠急性肺损伤模型，发现泽布替尼可以减轻 LPS 诱导的肺损伤，抑制 LPS 诱导的炎症反应，改善小鼠的肺功能^[40]。Chen 等^[41]证明泽布替尼治疗能够显著减轻博来霉素诱导的肺纤维化病理变化，并降低肺组织中转化生长因子- $\beta 1$ 的表达水平，但泽布替尼在 RIRI 引起的肾纤维化中的具体作用及其机制仍未明确。

本研究通过建立小鼠 RIRI 模型，探讨了泽布替尼对肾纤维化的影响及其潜在机制。实验结果表明，与造模组相比，泽布替尼给药能够减轻小鼠 RIRI 后的肾脏结构损伤，并降低肾小管间质纤维化的程度。泽布替尼给药后纤维化标志物 α -SMA 和 I 型胶原蛋白的表达水平均降低，表明其能够抑制肾纤维化。泽布替尼通过抑制 F4/80 和 CD86 的表达，减少 M1 型巨噬细胞的浸润，通过流式细胞术进一步证实其抑制了 M1 型巨噬细胞的极化。PI3K/Akt 和 NF- κ B 相关炎症信号通路是巨噬细胞最经典的下游信号通路^[42-43]，作者进一步研究了敲低 BTK 对巨噬细胞炎症反应的

作用，发现敲低 BTK 可以抑制 PI3K/Akt 和 NF- κ B 的磷酸化水平，从而抑制 M1 型巨噬细胞的促炎作用，说明 BTK 可能是潜在的抗炎药物靶点。这些结果表明，泽布替尼不仅能够通过调控 BTK 信号通路有效干预巨噬细胞的极化，还可抑制炎症因子的释放，从而对抗 RIRI 引起的过度炎症反应和肾纤维化。

尽管本研究为泽布替尼在 RIRI 中的作用提供了明确的实验依据，但其临床转化仍面临多方面的挑战。泽布替尼在长期使用中的安全性和有效性有待进一步验证，其对其他器官功能的潜在影响也需进行全面评估。BTK 信号通路在不同类型巨噬细胞中的具体调控机制尚需深入探讨，以明确其在纤维化过程中的核心作用。此外，结合其他抗炎或抗纤维化药物的联合治疗是否能进一步提高治疗效果也值得深入探索。未来的研究应聚焦于进一步揭示 BTK 在 RIRI 中的分子调控网络，以期开发出更精准、高效的治疗策略。

综上所述，本研究系统揭示了泽布替尼通过调控 M1 型巨噬细胞极化改善 RIRI 导致的肾纤维化的作用机制，为 BTK 抑制剂在 RIRI 治疗中的应用提供了坚实的理论依据和实验支持。这一研究不仅拓展了 BTK 抑制剂的潜在应用范围，也为肾纤维化相关疾病的治疗提供了新的思路，以期将泽布替尼从实验室研究推向临床应用，造福更多患者。



注: A 图为蛋白质印迹法检测慢病毒转染 RAW 264.7 细胞后 BTK 的蛋白表达水平; B 图为 RT-qPCR 检测慢病毒转染 RAW 264.7 细胞后 BTK 的 mRNA 水平, 与 shNC 组比较, ^a $P < 0.05$; C、D 图为蛋白质印迹法检测慢病毒转染 RAW 264.7 细胞后 PI3K/Akt 和 NF- κ B 相关炎症信号通路的蛋白表达水平及蛋白条带量化结果, 与 shNC-M0 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 shNC-M1 组比较, ^b $P < 0.05$ 。

图 5 慢病毒敲低 RAW 264.7 细胞的 BTK 验证及 M1 型巨噬细胞极化相关炎症信号通路的检测

Figure 5 Validation of BTK knockdown in RAW 264.7 cell using lentivirus and detection of inflammatory signaling pathways related to M1 macrophage polarization

参考文献:

- [1] SHIVA N, SHARMA N, KULKARNI Y A, et al. Renal ischemia/reperfusion injury: an insight on in vitro and in vivo models[J]. Life Sci, 2020, 256: 117860. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117860.
- [2] ZHAO H, ALAM A, SOO A P, et al. Ischemia-reperfusion injury reduces long term renal graft survival: mechanism and beyond[J]. EBioMedicine, 2018, 28: 31-42. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.01.025.
- [3] GONG Y, ZHU W, LI Y, et al. Dynamic regulation of proximal tubular autophagy from injury to repair after ischemic kidney damage[J]. Cell Mol Biol Lett, 2024, 29(1): 151. DOI: 10.1186/s11658-024-00663-w.
- [4] 邵丽鹏. 肾纤维化发病机制和治疗研究进展[J]. 医学理论与实践, 2024, 37(13): 2196-2198. DOI: 10.19381/j.issn.1001-7585.2024.13.010.
- [5] SHAO L P. Progress in the pathogenesis and treatment of renal fibrosis[J]. J Med Theory Pract, 2024, 37(13): 2196-2198. DOI: 10.19381/j.issn.1001-7585.2024.13.010.
- [6] YUAN Y, WEI X, XIONG X, et al. STAP2 promotes the progression of renal fibrosis via HSP27[J]. J Transl Med, 2024, 22(1): 1018. DOI: 10.1186/s12967-024-05776-6.
- [7] 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.
- [8] 刘琦, 张燕楠, 孙启全. 巨噬细胞与缺血-再灌注损伤相关研究进展[J]. 器官移植, 2024, 15(1): 40-45. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2023161.

- LIU Q, ZHANG Y N, SUN Q Q. Research progress on association between macrophages and ischemia-reperfusion injury[J]. *Organ Transplant*, 2024, 15(1): 40-45. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2023161.
- [8] PENG Q, NOWOCIN A, RATNASOTHY K, et al. Inhibition of thrombin on endothelium enhances recruitment of regulatory T cells during IRI and when combined with adoptive treg transfer, significantly protects against acute tissue injury and prolongs allograft survival[J]. *Front Immunol*, 2023, 13: 980462. DOI: 10.3389/fimmu.2022.980462.
- [9] MARYAM B, SMITH M E, MILLER S J, et al. Macrophage ontogeny, phenotype, and function in ischemia reperfusion-induced injury and repair[J]. *Kidney360*, 2024, 5(3): 459-470. DOI: 10.34067/KID.0000000000000376.
- [10] ZHOU H, ZHAO S, ZHOU M, et al. CD11b deficiency attenuates the ischemia/reperfusion-induced AKI-to-CKD process by regulating macrophage polarization[J]. *FASEB J*, 2024, 38(23): e70216. DOI: 10.1096/fj.202402318R.
- [11] CHEN M, MENON M C, WANG W, et al. HCK induces macrophage activation to promote renal inflammation and fibrosis via suppression of autophagy[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 4297. DOI: 10.1038/s41467-023-40086-3.
- [12] DING Q, ZHOU Y, FENG Y, et al. Bruton's tyrosine kinase: a promising target for treating systemic lupus erythematosus[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 142(pt a): 113040. DOI: 10.1016/j.intimp.2024.113040.
- [13] MARRON T U, ROHR K, MARTINEZ-GALLO M, et al. TLR signaling and effector functions are intact in XLA neutrophils[J]. *Clin Immunol*, 2010, 137(1): 74-80. DOI: 10.1016/j.clim.2010.06.011.
- [14] TAM C S, BALENDRAN S, BLOMBERY P. Novel mechanisms of resistance in CLL: variant BTK mutations in second-generation and noncovalent BTK inhibitors[J]. *Blood*, 2025, 145(10): 1005-1009. DOI: 10.1182/blood.2024026672.
- [15] ZHENG H, ZHANG Y, HE J, et al. Hydroxychloroquine inhibits macrophage activation and attenuates renal fibrosis after ischemia-reperfusion injury[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 645100. DOI: 10.3389/fimmu.2021.645100.
- [16] XU H, ZHANG F, CHE Y, et al. Thesium chinense Turcz. and its compound astragalin alleviate lipopolysaccharide-induced acute lung injury via the PI3K/AKT/p53 signaling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 346: 119691. DOI: 10.1016/j.jep.2025.119691.
- [17] DENG L, OUYANG B, TANG W, et al. Icariside II modulates pulmonary fibrosis via PI3K/Akt/ β -catenin pathway inhibition of M2 macrophage program[J]. *Phytomedicine*, 2024, 130: 155687. DOI: 10.1016/j.phymed.2024.155687.
- [18] ALANAZI F J, ALRUWAILI A N, ALDHAFEERI N A, et al. Pathological interplay of NF- κ B and M1 macrophages in chronic inflammatory lung diseases[J]. *Pathol Res Pract*, 2025, 269: 155903. DOI: 10.1016/j.prp.2025.155903.
- [19] HONG Q, KIM H, CAI G Y, et al. Modulation of TGF- β signaling new approaches toward kidney disease and fibrosis therapy[J]. *Int J Biol Sci*, 2025, 21(4): 1649-1665. DOI: 10.7150/ijbs.101548.
- [20] HYSI E, BAEK J, KOVEN A, et al. A first-in-human study of quantitative ultrasound to assess transplant kidney fibrosis[J]. *Nat Med*, 2025, 31(3): 970-978. DOI: 10.1038/s41591-024-03417-5.
- [21] CHOTINARUEMOL K, LEURCHARUSMEE P, CHATTIPAKORN S C, et al. Dexmedetomidine mitigation of renal ischaemia-reperfusion injury: comprehensive insights from cellular mechanisms to clinical application[J]. *Br J Anaesth*, 2025, 134(5): 1350-1372. DOI: 10.1016/j.bja.2025.02.006.
- [22] ZHANG T, WIDDOP R E, RICARDO S D. Transition from acute kidney injury to chronic kidney disease: mechanisms, models, and biomarkers[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2024, 327(5): F788-F805. DOI: 10.1152/ajprenal.00184.2024.
- [23] 陈凤, 桂明, 赵丽娟. 中性粒细胞、单核/巨噬细胞、淋巴细胞在肾纤维化发生发展中的作用研究进展[J]. *山东医药*, 2023, 63(35): 112-115. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2023.35.028.
- CHEN F, GUI M, ZHAO L J. Progress in the roles of neutrophils, monocytes/macrophages, and lymphocytes in the development of renal fibrosis[J]. *Shandong Med J*, 2023, 63(35): 112-115. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2023.35.028.
- [24] 张雅飞, 朱杰夫, 宋志霞. 巨噬细胞在急性肾损伤向慢性肾脏病转化中的作用[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2022, 31(1): 68-72. DOI: 10.3969/j.issn.1006.298X.2022.01.014.
- ZHANG Y F, ZHU J F, SONG Z X. The role of macrophages in the transition from acute kidney injury to chronic kidney disease[J]. *Chin J Nephrol Dial Transplant*, 2022, 31(1): 68-72. DOI: 10.3969/j.issn.1006.298X.2022.01.014.
- [25] NIU Z, GUO J, LIU X, et al. Renal tubular epithelial-derived follistatin-like 1 protects against UUO-induced renal fibrosis in mice via inhibiting NF- κ B-mediated epithelial inflammation[J]. *Theranostics*, 2025, 15(6): 2413-2427. DOI: 10.7150/thno.100969.
- [26] JIA H, YUE G, LI P, et al. Neutrophil extracellular traps license macrophage production of chemokines to facilitate CD8⁺ T cell infiltration in obstruction-induced renal fibrosis[J]. *Protein Cell*, 2025: pwaf020. DOI: 10.1093/procel/pwaf020.
- [27] ZHANG Z, ZHAO Z, QI C, et al. Butyrolactone I blocks the transition of acute kidney injury to chronic kidney disease in mice by targeting JAK1[J]. *MedComm*, 2025, 6(2): e70064. DOI: 10.1002/mco2.70064.
- [28] SU C T, SEE D H W, HUANG Y J, et al. LTBP4 protects against renal fibrosis via mitochondrial and vascular impacts[J]. *Circ Res*, 2023, 133(1): 71-85. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.123.322494.
- [29] MA N, LU H, LI N, et al. CHOP-mediated Gasdermin E expression promotes pyroptosis, inflammation, and mitochondrial damage in renal ischemia-reperfusion injury[J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(2): 163. DOI: 10.1038/s41419-024-06525-9.
- [30] WEINMANN-MENKE J, GONZALEZ-SANCHEZ H

- M, IWATA Y, et al. Ptpz signaling, tubule-mediated and macrophage-mediated kidney injury, and subsequent CKD[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2025, DOI: 10.1681/asn.0000000640[Epub ahead of print].
- [31] HOU L, GUO Y, XU S, et al. HNF3 α targets Nckap11 and promotes renal fibrosis following ischemia-reperfusion injury[J]. *Adv Sci*, 2025: e2410764. DOI: 10.1002/advs.202410764.
- [32] ABBAD L, ESTEVE E, CHATZIANTONIOU C. Advances and challenges in kidney fibrosis therapeutics[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2025, 21(5): 314-329. DOI: 10.1038/s41581-025-00934-5.
- [33] HUSAIN I, SHAH H, JORDAN C Z, et al. Targeting allograft inflammatory factor 1 reprograms kidney macrophages to enhance repair[J]. *J Clin Invest*, 2025, 135(5): e185146. DOI: 10.1172/JCI185146.
- [34] XIA Y, YE Z, LI B, et al. EZH2-mediated macrophage-to-myofibroblast transition contributes to calcium oxalate crystal-induced kidney fibrosis[J]. *Commun Biol*, 2025, 8(1): 286. DOI: 10.1038/s42003-025-07735-3.
- [35] ZHANG Y, LIU Y, LUO S, et al. An adoptive cell therapy with TREM2-overexpressing macrophages mitigates the transition from acute kidney injury to chronic kidney disease[J]. *Clin Transl Med*, 2025, 15(3): e70252. DOI: 10.1002/ctm2.70252.
- [36] YAN J J, KIM H, KIM B, et al. Synthetic bilirubin-based nanomedicine protects against renal ischemia/reperfusion injury through antioxidant and immune-modulating activity[J]. *Adv Healthc Mater*, 2025, 14(7): e2403846. DOI: 10.1002/adhm.202403846.
- [37] HUANG X R, YE L, AN N, et al. Macrophage autophagy protects against acute kidney injury by inhibiting renal inflammation through the degradation of TARM1[J]. *Autophagy*, 2025, 21(1): 120-140. DOI: 10.1080/15548627.2024.2393926.
- [38] 曹守青, 来东, 焦启龙, 等. 免疫细胞在肾脏缺血再灌注损伤修复中的作用研究进展[J/OL]. *中华细胞与干细胞杂志(电子版)*, 2024, 14(1): 45-50. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2024.01.007.
- CAO S Q, LAI D, JIAO Q L, et al. The role of immune cells in renal ischemia-reperfusion injury and repair[J/OL]. *Chin J Cell Stem Cell (Electr Edit)*, 2024, 14(1): 45-50. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2024.01.007.
- [39] GU Y, HUANG B, YANG Y, et al. Ibrutinib exacerbates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via promoting inflammation[J]. *Inflammation*, 2018, 41(3): 904-913. DOI: 10.1007/s10753-018-0745-3.
- [40] LI X, WEI Y, LI S, et al. Zanubrutinib ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via regulating macrophage polarization[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 111: 109138. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.109138.
- [41] CHEN S, WEI Y, LI S, et al. Zanubrutinib attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by inhibiting the TGF- β 1 signaling pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 113(Pt A): 109316. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.109316.
- [42] GU M, PANG Z. Luteolin inhibits inflammation and M1 macrophage polarization in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute pneumonia through suppressing EGFR/PI3K/AKT/NF- κ B and EGFR/ERK/AP-1 signaling pathways[J]. *Phytomedicine*, 2025, 141: 156663. DOI: 10.1016/j.phymed.2025.156663.
- [43] ZHUANG C, GUO Z, ZHU J, et al. PTEN inhibitor attenuates cardiac fibrosis by regulating the M2 macrophage phenotype via the PI3K/AKT/TGF- β /Smad 2/3 signaling pathway[J]. *Int J Cardiol*, 2022, 356: 88-96. DOI: 10.1016/j.ijcard.2022.04.007.

(收稿日期: 2025-03-05)

(本文编辑: 谢诗韵 吴秋玲)