

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research氯沙坦调控 GPR84 表达抑制巨噬细胞 M1 极化
减轻脓毒症肾损伤的研究Research of losartan inhibits GPR84 – mediated M1 polarization of macrophages to
alleviate renal injury in sepsis魏思灿, 张洪玲, 吴青青,
林天来(泉州市第一医院 重症医学科, 福建 泉州
362000)WEI Si – can, ZHANG Hong – ling,
WU Qing – qing, LIN Tian – lai(Department of Critical Care Medicine,
Quanzhou First Hospital, Quanzhou
362000, Fujian Province, China)基金项目: 福建省自然科学基金资助项目
(2023J011771)作者简介: 魏思灿(1980 –), 男, 副主任医师, 主
要从事急危重症医学方面的研究通信作者: 林天来, 主任医师, 硕士生导师
MP: 13655911688
E – mail: wscqzsdyyy@163.com

摘要:目的 探讨氯沙坦减轻脓毒症肾损伤的分子机制。方法 动物实验部分将小鼠随机分为假手术组、模型组(利用盲肠结扎穿孔术建模)、氯沙坦组(建模后给予 $15\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的氯沙坦治疗)、拮抗剂组[建模后给予 $30\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 G 蛋白偶联受体 84(GPR84)拮抗剂 GLPG1205 治疗], 每组 10 只。用酶联免疫吸附(ELISA)实验法检测血清肾损伤指标, 用免疫组化法检测肾组织 GPR84 和分化簇 86(CD86)蛋白相对表达水平; 用实时荧光定量聚合酶链反应(RT – qPCR)法检测肾组织细胞因子表达。细胞实验部分把 THP – 1 细胞随机分为对照组、诱导组(M1 型巨噬细胞诱导)、药物组(诱导 + $10\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的氯沙坦)、药物 + 6 – OAU 组(诱导 + $10\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的氯沙坦 + $1\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GPR84 激动剂 6 – OAU), 用蛋白质印迹(Western blot)实验法检测 GPR84 蛋白相对表达水平, 用免疫荧光实验法检测 CD86 相对表达水平, 用 RT – qPCR 法检测细胞因子相对表达水平。**结果** 动物实验部分假手术组、模型组、氯沙坦组和拮抗剂组小鼠的血尿素氮(BUN)水平分别为 (48.55 ± 4.54) 、 (111.28 ± 5.83) 、 (71.52 ± 4.79) 和 $(79.10 \pm 8.12)\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 血清肌酐酐(SCr)分别为 (13.33 ± 1.58) 、 (64.12 ± 6.91) 、 (30.43 ± 5.80) 和 $(40.09 \pm 4.49)\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; GPR84 平均光密度值分别为 0.05 ± 0.01 、 0.08 ± 0.01 、 0.05 ± 0.01 和 0.05 ± 0.01 , CD86 平均光密度值分别为 0.03 ± 0.01 、 0.08 ± 0.01 、 0.05 ± 0.01 和 0.06 ± 0.01 ; GPR84 mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.13 、 2.70 ± 0.23 、 1.78 ± 0.15 和 1.12 ± 0.09 ; $IL - 1\beta$ mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.14 、 1.78 ± 0.24 、 1.41 ± 0.13 和 1.50 ± 0.19 ; 肿瘤坏死因子 – α (TNF – α) mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.10 、 1.85 ± 0.12 、 1.39 ± 0.10 和 1.56 ± 0.12 ; 诱导型一氧化氮合酶(iNOS) mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.14 、 3.33 ± 0.23 、 1.93 ± 0.16 和 2.30 ± 0.24 , 模型组的上述指标与假手术组比较, 氯沙坦组和拮抗剂组的上述指标分别与模型组比较, 拮抗剂组的上述指标分别与氯沙坦组比较, 在统计学上差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。细胞实验部分对照组、诱导组、药物组和药物 + 6 – OAU 组 GPR84 蛋白相对表达水平分别为 0.58 ± 0.06 、 0.94 ± 0.11 、 0.63 ± 0.07 和 1.45 ± 0.09 ; CD86 荧光强度分别为 $(1\ 072.36 \pm 105.92)$ 、 $(3\ 209.59 \pm 206.38)$ 、 $(1\ 903.95 \pm 172.73)$ 和 $(2\ 471.43 \pm 273.18)\text{ a.u.}$; iNOS mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.11 、 3.06 ± 0.23 、 1.98 ± 0.27 和 2.85 ± 0.24 ; 诱导组的上述指标与对照组比较, 药物组的上述指标与诱导组比较, 药物 + 6 – OAU 组的上述指标与药物组比较, 在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$)。**结论** 氯沙坦可减轻脓毒症肾损伤, 这与抑制 GPR84 介导的巨噬细胞 M1 极化相关。

关键词: 氯沙坦; 脓毒症肾损伤; G 蛋白偶联受体 84; 巨噬细胞极化; 炎症反应

DOI: 10.13699/j.cnki.1001 – 6821.2025.21.012

中图分类号: R972 文献标志码: A

文章编号: 1001 – 6821(2025)21 – 3067 – 08

Abstract: Objective To explore the molecular mechanism of losartan in alleviating renal injury in sepsis. **Methods**

In animal experiment, mice were randomly divided into the sham group, the model group (modeled by cecal ligation and perforation), losartan group (losartan treatment at $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ after modeling) and antagonist group [treated with the G protein-coupled receptor 84 (GPR84) antagonist GLPG1205 at $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ after modeling], each group contained 10 mice. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) experiments were used to detect serum renal injury indicators, and immunohistochemistry was used to detect the protein expressions of GPR84 and cluster of differentiation 86 (CD86) in renal tissues. The expression of cytokines in renal tissues was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). In cell experiment, THP-1 cells were randomly divided into control group, induce group (induced to M1-type macrophages), medicine group (inducing + $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ losartan) and medicine + 6-OAU group (induction + $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ losartan + $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GPR84 antagonist 6-OAU), the relative expression levels of GPR84 protein was detected by Western blot assay, the relative expression level of CD86 was detected by immunofluorescence assay, and the expression of cytokines in cells was detected by RT-qPCR. **Results** In animal experiments, the levels of blood urea nitrogen (BUN) in mice of the sham group, model group, losartan group and antagonist group were (48.55 ± 4.54), (111.28 ± 5.83), (71.52 ± 4.79) and (79.10 ± 8.12) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; serum creatinine (SCr) were (13.33 ± 1.58), (64.12 ± 6.91), (30.43 ± 5.80) and (40.09 ± 4.49) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; the average optical density values of GPR84 were 0.05 ± 0.01 , 0.08 ± 0.01 , 0.05 ± 0.01 and 0.05 ± 0.01 , respectively; the average optical density values of CD86 were 0.03 ± 0.01 , 0.08 ± 0.01 , 0.05 ± 0.01 , 0.06 ± 0.01 , respectively; the relative expression levels of GPR84 mRNA were 1.00 ± 0.13 , 2.70 ± 0.23 , 1.78 ± 0.15 and 1.12 ± 0.09 , respectively; interleukin (IL)- 1β mRNA were 1.00 ± 0.14 , 1.78 ± 0.24 , 1.41 ± 0.13 and 1.50 ± 0.19 , respectively; tumor necrosis factor- α (TNF- α) mRNA were 1.00 ± 0.10 , 1.85 ± 0.12 , 1.39 ± 0.10 and 1.56 ± 0.12 , respectively; the relative expression levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA were 1.00 ± 0.14 , 3.33 ± 0.23 , 1.93 ± 0.16 and 2.30 ± 0.24 , respectively. Compared between the model group and the sham group; compared the losartan group or the antagonist group with the model group and compared between the losartan group with antagonist group, the differences of the above-mentioned indicators were statistically significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). In cell experiments, the relative expression levels of GPR84 protein in the control group, induce group, medicine group and medicine + 6-OAU group were 0.58 ± 0.06 , 0.94 ± 0.11 , 0.63 ± 0.07 and 1.45 ± 0.09 , respectively; the fluorescence intensities of CD86 were ($1\ 072.36 \pm 105.92$), ($3\ 209.59 \pm 206.38$), ($1\ 903.95 \pm 172.73$) and ($2\ 471.43 \pm 273.18$) a.u.; the relative expression levels of iNOS mRNA were 1.00 ± 0.11 , 3.06 ± 0.23 , 1.98 ± 0.27 and 2.85 ± 0.24 , respectively, the above-mentioned indicators compared between the control group and the induce group, compared between the medicine group and the induce group, and compared between the medicine + 6-OAU group and the medicine group, the differences were all statistically significant (all $P < 0.001$). **Conclusion** Losartan can alleviate renal injury in sepsis, which is related to the inhibition of GPR84-mediated M1 polarization of macrophages.

Key words: losartan; septic kidney injury; G protein-coupled receptor 84; macrophage polarization; inflammatory response

脓毒症是一种由感染引起的全身炎症反应综合征,可发展为多器官衰竭,包括急性肾损伤(acute kidney injury, AKI),脓毒症-AKI的死亡率高于其他形式的AKI,即使采用感染源控制、抗生素和肾替代治疗等,脓毒症引起的AKI死亡率仍非常高^[1],因此探究治疗脓毒症-AKI新策略十分重要。研究表明,脓毒症-AKI可涉及肾素-血管紧张素-醛固酮系统(renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS),特

别是典型的血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)血管紧张素-Ⅱ(angiotensin-Ⅱ, Ang Ⅱ)/血管紧张素Ⅱ受体1轴紊乱^[2];有证据表明,使用RAAS拮抗剂治疗脓毒症肾损伤有较好的结果^[3],氯沙坦是Ang Ⅱ受体拮抗剂,能够选择性地阻断Ang Ⅱ与其受体的结合,从而抑制RAAS的激活,发挥保护靶器官的作用^[4]。证据表明,氯沙坦可以通过调控巨噬细胞极化改善脓毒症诱发的脏器损伤^[5],

巨噬细胞是先天免疫和适应性免疫的重要组成部分,在脓毒症 - AKI 的炎症反应调节中发挥重要作用^[6],这提示,氯沙坦在脓毒症 - AKI 中具有较大的治疗潜力,但目前关于氯沙坦治疗脓毒症 - AKI 的研究十分有限。因此,本研究旨在探究氯沙坦是否可通过介导巨噬细胞极化减轻脓毒症 - AKI 损伤,并探讨其可能的机制。

材料与方法

1 材料

动物 健康的雄性 C57BL/6 小鼠,共 70 只,8~9 周龄,体质量:22~24 g,购自厦门万泰沧海生物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(闽)2023-0001。小鼠饲养在温度为 23~25℃ 环境下,自由进食、饮水,适应性饲养 1 周后进行实验。本研究已获得本院实验动物伦理委员会的批准,伦理批号:泉医高专动物伦理审字(2024061)号。

细胞 人急性单核白血病细胞 THP-1,货号:C6960,购自上海碧云天生物公司。

药品与试剂 氯沙坦钾,纯度:≥98%,规格:10 mg,批号:240624,美国 Sigma Aldrich 公司生产;GLPG1205,纯度:99.94%,规格:1 mg,批号:240813,美国 MedChemExpress 公司生产;6-OAU,规格:5 mg,纯度:98%,货号:S86653-5mg,上海源叶生物科技有限公司生产;苏木精-伊红(hematoxylin eosin, HE)病理染色液,南昌雨露实验器材有限公司生产;佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA),纯度:98%,规格:1 mg,货号:P6741、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),纯度:≥99%,规格:10 mg,货号:L8880,均由北京索莱宝科技有限公司生产;血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、血清肌酐(serum creatinine, SCr)试剂盒,南京建成生物工程研究所生产;分化簇 86(cluster of differentiation 86, CD86)、G 蛋白偶联受体 84(G protein-coupled receptor 84, GPR84)一抗及二抗,均由美国 Affinity biosciences 公司生产;3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒,北京百奥莱博科技有限公司生产;逆转录试剂盒、引物合成,均由上海碧云天生物公司生产;二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒,北京索莱宝科技有限公司生产;重组人干扰素(interferon, IFN)- γ ,上海华雅思创生物科技有限公司生产;RPMI1640 培养基,上海北诺生物科技有限公司生产。

仪器 Infinite M200 PRO 酶标仪,瑞士 TECAN 公司产品;NanoDropOne 分光光度计,美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品;ProFlex PCR 仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品;REB-100 显微镜,美国 Echo 公司产品;TH4-200 荧光显微镜,日本 OLYMPUS 公司产品。

2 方法

2.1 动物实验

2.1.1 模型构建^[7]

造模前 12 h 禁食,将小鼠麻醉后固定在手术板上,剔除肚子上绒毛并消毒,沿腹部中央切开,找到盲肠,并在盲肠末端和底部之间的部位进行结扎,结扎后,用针从肠系膜向反肠系膜的方向穿刺,完成后从穿孔中挤出一滴排泄物,然后将盲肠收回到腹腔中,随后闭合腹腔。

2.1.2 动物分组与处理方法

将小鼠随机分为假手术组、模型组、氯沙坦组和拮抗剂组,假手术组 10 只小鼠,其余组每组 20 只,假手术组小鼠仅接受腹腔切开和盲肠分离;其余组小鼠均建模,其中氯沙坦组小鼠术后腹腔注射 15 mg·kg⁻¹的氯沙坦,拮抗剂组小鼠在术前 1 d 灌胃给予 30 mg·kg⁻¹的 GPR84 拮抗剂 GLPG1205(氯沙坦、GLPG1205 的剂量均根据其半数致死剂量确定安全上限分别为 150、300 mg·kg⁻¹,并以安全剂量上限的 1/10 进行预实验确定其最终剂量),假手术组和模型组均给予等量的生理盐水,每隔 24 h 治疗 1 次,72 h 后眼眶采血后处死小鼠收集肾组织备用。

2.1.3 HE 染色法观察肾组织病理改变^[8]

取小鼠肾组织,用多聚甲醛固定 24 h 后,经脱水、透明、浸蜡后制备石蜡切片,然后取切片脱蜡至水,用苏木素染色 10 min,使细胞核染色为蓝色,然后用分化液分化 1 min,用流水冲洗 4 min,然后用伊红染色液染色 2 min,出去多去的染色液,用 75%、85%、95%、100% 的乙醇依次处理切片 3 s,再用二甲苯透明,中性树胶封片后,显微镜观察。并根据 Paller 评分标准评分,共包括 4 点:肾小管官腔内是否有脱落、坏死细胞;肾小管是否有明显扩张、细胞扁平;是否有管型;刷状缘是否有脱落、损伤。根据不同损伤程度进行评分。

2.1.4 酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)实验检测血清肾损伤指标水平^[9]

收集各组小鼠血液样本,在室温下以 3 500 r·min⁻¹离心 15 min 后收集上清液,然后严格

按照试剂盒的操作步骤逐步添加相应的试剂,反应后用酶标仪检测样本吸光值,并根据事先制作的标准曲线计算 BUN 和 Scr 浓度值。

2.1.5 免疫组化检测相关蛋白表达^[10]

收集各组小鼠肾组织石蜡切片,复温后脱蜡至水,加入 Trion(0.01%) 在 37℃ 下孵育 10 min, PBS 冲洗后加入过氧化氢-CH₃OH 孵育 10 min, 然后用柠檬酸抗原修复液处理 15 min, 清洗切片后用山羊血清(10%) 封闭 60 min, 之后滴加 GRP84 和 CD86 抗体孵育过夜(4℃), 次日清晨冲洗切片之后滴加相应种属的二抗孵育 60 min, DAB 显色后苏木素复染, 最后经过乙醇梯度脱水后封片, 在光学显微镜下观察, 棕黄色颗粒为阳性表达, 并用 Image J 软件计算平均光密度值(mean optical density, MOD)。

2.1.6 实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 实验检测相关因子 mRNA 表达^[11]

收集小鼠肾组织, 提取组织中总 RNA(用 TRIzol 法提取), 并用分光光度计检测 RNA OD 260/280 比值和浓度。各样本根据逆转录试剂盒操作步骤进行逆转录, 然后进行定量 PCR 扩增, 反应条件为: 95℃ 2 min、95℃ 60 s、55℃ 60 s、72℃ 3 s, 40 个循环; 以 β -肌动蛋白(β -actin) 为内参, 目的基因 mRNA 相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。目的基因引物序列见表 1。

2.2 细胞实验

2.2.1 细胞培养与分组^[12]

THP-1 细胞培养在 RPMI1640 培养基(含有 10% 胎牛血清、1% 青链霉素)中, 置于培养箱中培养(37℃, 5% CO₂), 每隔 2 d 更换培养液, 当细胞密度达到每毫升 8×10^5 个时进行传代。

把 THP-1 细胞随机分为对照组、诱导组、药物组和药物 + 6-OAU 组; 对照组细胞仅使用 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ PMA 刺激细胞 48 h 诱导其为 M0 巨噬细胞; 诱导组细胞用 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ PMA 刺激细胞 48 h 后再用 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LPS 与 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IFN- γ 处理细胞 24 h^[12]; 药物组细胞用 PMA 刺激后, 再用 LPS、IFN- γ 联合 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的氯沙坦刺激细胞 24 h; 药物 + 6-OAU 组细胞用 PMA 刺激后用 LPS、IFN- γ 联合 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的氯沙坦和 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GPR84 激动剂 6-OAU 处理细胞 24 h。

2.2.2 蛋白质印迹(Western blot)法检测 GPR84 蛋白表达^[13]

收集各组细胞后用放射性免疫沉淀分析(radio-

immunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液裂解细胞并离心收集上清液, 蛋白浓度用 BCA 法测定, 然后将蛋白变性后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 电泳进行分析, 而后转至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜, 用脱脂奶粉封闭膜 2 h, 而后将膜置于 1:1 000 的 GPR84 一抗中, 并稀释过夜, 次日清洗膜后进行二抗(稀释比为 1:5 000) 孵育 2 h, 最后滴加发光液后曝光、成像。

2.2.3 免疫荧光法检测 CD86 蛋白表达^[8]

各组细胞处理结束后, 用甲醛固定 20 min, PBS 清洗, 加入 Triton-100 试剂对细胞透化处理(10 min), 然后用牛血清白蛋白封闭 1 h, 滴加 CD86 一抗(1:200) 试剂孵育过夜(4℃), PBS 清洗, 滴加同种属的荧光二抗室温下孵育 1 h, PBS 清洗, 然后加入 4', 6-联脒-2'-苯基吡啶试剂染核 5 min, PBS 清洗后滴加抗荧光淬灭剂并封片, 用荧光显微镜观察。

2.2.4 RT-qPCR 实验法检测相关因子 mRNA 表达^[11]

取处理后的各组细胞, 用 TRIzol 法提取总 RNA, 然后根据“2.1.6”中描述的方法检测细胞因子 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

3 统计学处理

用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用单因素方差分析, 组间两两比较用 LSD-t 检验。

表 1 各基因引物序列

Table 1 Primer sequences of each gene

Gene	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')
GPR84	AGACCTGCTCTTTAGTCTCCA	AGCCCAACACAGACTCATGG
IL-1 β	TGCCACCTTTTGACAGTGATG	TGATGTGCTGCTGCGAGATT
TNF- α	GATCGGTCCCAAGGGATG	CCACTTGGTGTTTGTGAGTG
IL-6	GACAAAGCCAGAGTCTTCAGA	TGTGACTCCAGCTTATCTCTTGG
iNOS	CTAGTGAAGCAAGCCCAACA	CCTCACATACTGTGGACGGG
IL-10	TGAATTCCTGGGTGAGAAGC	AGACACCTTGGTCTTGAGCTTATT
β -actin	CACTGTCGAGTCGCTCC	TCATCCATGGCGAAGTCTG

IL: Interleukin; TNF- α : Tumor necrosis factor - alpha; iNOS: Inducible nitric oxide synthase.

结 果

1 氯沙坦和 GPR84 拮抗剂减轻模型小鼠肾组织病理学损伤并提高其生存率

假手术组、模型组、氯沙坦组和拮抗剂组小鼠在 72 h 内死亡数量分别为 0、9、5、6 只, 相比模型组, 氯沙

坦组和拮抗剂组小鼠死亡率均降低,随后每组选取 10 只小鼠收集血液和组织样本进行后续实验,见图 1。假手术组小鼠肾组织切片无明显病理变化,相比假手术组,模型组小鼠肾组织细胞发生变性,表现为肾小管扩张、细胞质空泡形成、有大量炎症细胞浸润;相比模型组,氯沙坦组、拮抗剂组小鼠肾组织可见少量肾细胞出现核萎等变性及少量的炎症细胞浸润,见图 2。假手术组、模型组、氯沙坦组和拮抗剂组 Paller 评分水平分别为 (0.20 ± 0.40)、(3.20 ± 0.40)、(2.10 ± 0.30)和(2.70 ± 0.46)分,模型组与假手术组比较,氯沙坦组、拮抗剂组分别与模型组比较,在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

2 氯沙坦和 GPR84 拮抗剂改善模型小鼠肾功能

与假手术组比较,模型组小鼠血清 BUN 和 SCr 水平均显著升高 (均 $P < 0.001$);相比模型组,氯沙坦组和拮抗剂组小鼠 BUN 和 SCr 水平均显著降低 (均 $P < 0.001$);氯沙坦组 BUN 和 SCr 水平均显著低于拮抗剂组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表 2。

3 氯沙坦抑制模型小鼠肾组织 GPR84 表达

如图 3 和表 3 所示,相比假手术组,模型组小鼠肾组织 GPR84 MOD 水平及 mRNA 相对表达水平均显著升高 ($P < 0.001$);相比模型组,氯沙坦组和拮抗剂组小鼠肾组织 GPR84 MOD 水平及 mRNA 相对表达水平均显著降低 (均 $P < 0.001$);氯沙坦组 GPR84

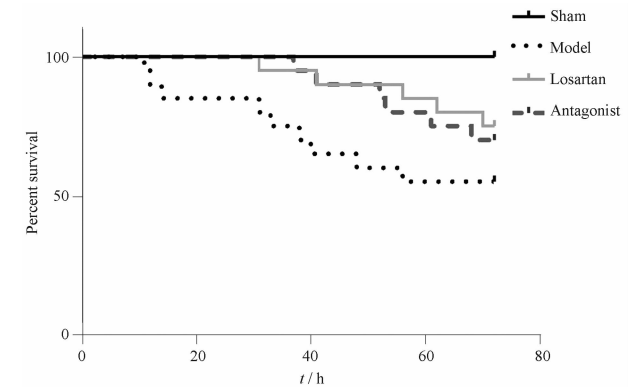


图 1 Kaplan - Meier 生存曲线显示各组小鼠生存情况
Figure 1 The survival status of mice in each group through the Kaplan - Meier survival curve

Sham group: Normal culture; Model group: Cecal ligation and perforation model; Losartan group: CLP model and 15 mg · kg⁻¹ losartan; Antagonist group: CLP model and 15 mg · kg⁻¹ losartan and 30 mg · kg⁻¹ GLPG1205.

表 2 各组小鼠血清肾损伤指标的比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of serum renal injury indicators in each group of mice ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	BUN (mmol · L ⁻¹)	SCr (μmol · L ⁻¹)
Sham	10	48.55 ± 4.54	13.33 ± 1.58
Model	10	111.28 ± 5.83 ***	64.12 ± 6.91 ***
Losartan	10	71.52 ± 4.79 ^{ΔΔΔ#}	30.43 ± 5.80 ^{ΔΔΔ##}
Antagonist	10	79.10 ± 8.12 ^{ΔΔΔ}	40.09 ± 4.49 ^{ΔΔΔ}

BUN: Blood urea nitrogen; SCr: Serum creatinine; Compared with the sham group, *** $P < 0.001$; Compared with the model group, ^{ΔΔΔ} $P < 0.001$; Compared with the antagonist group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

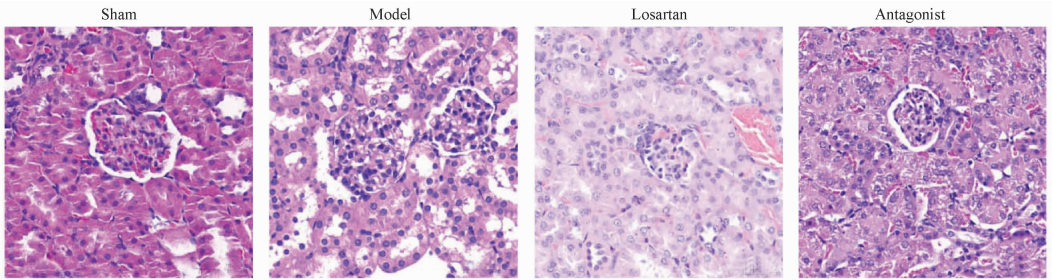


图 2 HE 染色检测小鼠肾组织病理学改变 (× 400)
Figure 2 The histopathological changes of mouse renal tissue detected by HE staining (× 400)

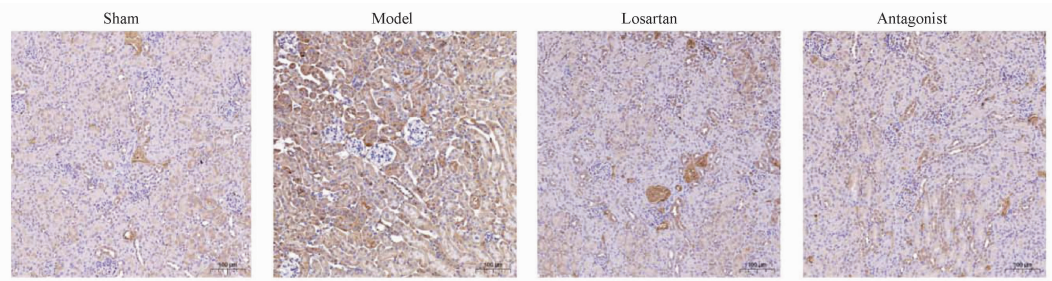


图 3 免疫组化检测肾组织中 GPR84 表达 (× 200 , bar: 100 μm)
Figure 3 Immunohistochemical detection of GPR84 expression in renal tissue (× 200 , bar: 100 μm)

mRNA相对表达水平显著高于拮抗剂组($P < 0.001$)。

4 氯沙坦调控 GPR84 抑制模型小鼠 M1 巨噬细胞活化

相比假手术组,模型组小鼠肾组织 CD86 蛋白及 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 和 $iNOS$ mRNA 相对表达水平均显著升高, $IL-10$ mRNA 相对表达水平显著降低(均 $P < 0.001$);相比模型组,氯沙坦组和拮抗剂组小鼠肾组织 CD86 蛋白及 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 和 $iNOS$ mRNA 相对表达水平均显著降低, $IL-10$ mRNA 相对表达水平显著升高(均 $P < 0.01$, $P < 0.001$);氯沙坦组小鼠肾组织 CD86 蛋白及 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 和 $iNOS$ mRNA 相对表达水平均显著低于拮抗剂组($P < 0.05$,

$P < 0.01$),见图 4 和表 4。

5 氯沙坦下调 GPR84 抑制 THP-1 向 M1 巨噬细胞极化

与对照组比较,诱导组细胞 GPR84、CD86 表达及 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $iNOS$ mRNA 相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.001$);相比诱导组,药物组细胞 GPR84、CD86 表达及 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 和 $iNOS$ mRNA 相对表达水平均显著下降(均 $P < 0.001$);相比药物组,药物 + 6-OAU 组细胞 GPR84、CD86 表达及 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 和 $iNOS$ mRNA 相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.001$),见图 5 和表 5。

表 3 各组小鼠肾组织 GPR84 表达的比较($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Comparison of GPR84 expression in renal tissues of mice in each group($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Group	MOD of GPR84	GPR84 mRNA
Sham	0.05 ± 0.01	1.00 ± 0.13
Model	0.08 ± 0.01 ***	2.70 ± 0.23 ***
Losartan	0.05 ± 0.01 $\Delta\Delta\Delta$	1.78 ± 0.15 $\Delta\Delta\Delta\#\#$
Antagonist	0.05 ± 0.01 $\Delta\Delta\Delta$	1.12 ± 0.09 $\Delta\Delta\Delta$

GPR84: G protein-coupled receptor 84; Compared with the sham group, *** $P < 0.001$; Compared with the model group, $\Delta\Delta\Delta$ $P < 0.001$; Compared with the antagonist group, $\#\#$ $P < 0.001$;

表 4 各组小鼠肾组织细胞因子表达的比较($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Comparison of cytokine expression in renal tissues of mice in each group($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Group	MOD of CD86	$IL-1\beta$	$IL-6$	$TNF-\alpha$	$IL-10$	$iNOS$
Sham	0.03 ± 0	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.14
Model	0.08 ± 0.01 ***	1.78 ± 0.24 ***	2.29 ± 0.13 ***	1.85 ± 0.12 ***	0.53 ± 0.06 ***	3.33 ± 0.23 ***
Losartan	0.05 ± 0.01 $\Delta\Delta\Delta\#\#$	1.41 ± 0.13 $\Delta\Delta\Delta$	1.63 ± 0.10 $\Delta\Delta\Delta\#$	1.39 ± 0.10 $\Delta\Delta\Delta\#\#$	0.79 ± 0.12 $\Delta\Delta\Delta\#$	1.93 ± 0.16 $\Delta\Delta\Delta\#\#$
Antagonist	0.06 ± 0.01 $\Delta\Delta\Delta$	1.50 ± 0.19 $\Delta\Delta$	1.78 ± 0.14 $\Delta\Delta\Delta$	1.56 ± 0.12 $\Delta\Delta\Delta$	0.66 ± 0.09 $\Delta\Delta\Delta$	2.30 ± 0.24 $\Delta\Delta\Delta$

CD86: Cluster of differentiation 86; Compared with the sham group, *** $P < 0.001$; Compared with the model group, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta$ $P < 0.001$; Compared with the antagonist group, $\#$ $P < 0.05$, $\#\#$ $P < 0.01$.

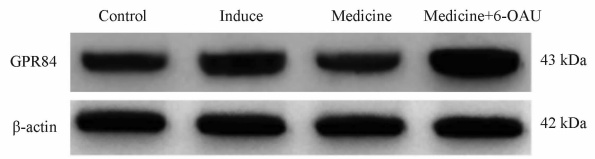


图 5 用蛋白质印迹实验法检测 GPR84 相对表达水平

Figure 5 The relative expression levels of GPR84 detected by Western blot

Control group; 100 ng · mL⁻¹ PMA; Induce group; 100 ng · mL⁻¹ PMA + 100 ng · mL⁻¹ LPS + 20 ng · mL⁻¹ IFN- γ ; Medicine group; 100 ng · mL⁻¹ PMA + 100 ng · mL⁻¹ LPS + 20 ng · mL⁻¹ IFN- γ + 10 μ g · mL⁻¹ Losartan; Medicine + 6-OAU group; 100 ng · mL⁻¹ PMA + 100 ng · mL⁻¹ LPS + 20 ng · mL⁻¹ IFN- γ + 10 μ g · mL⁻¹ Losartan + 1 μ mol · L⁻¹ 6-OAU.

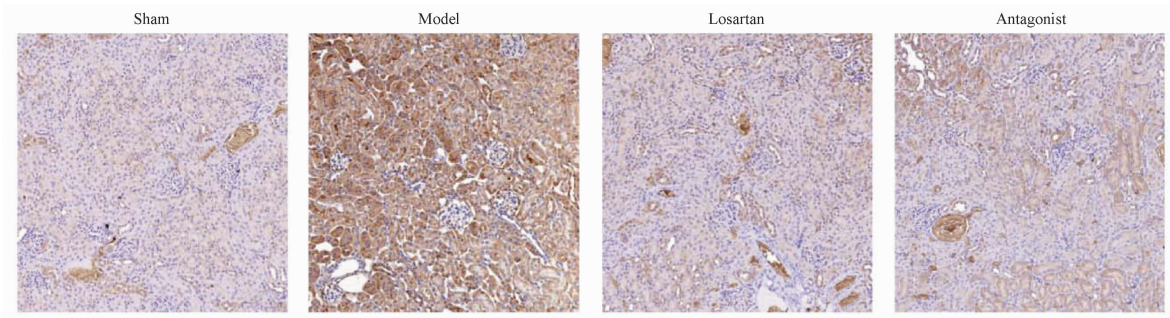


图 4 免疫组化检测 CD86 蛋白表达($\times 200$, bar: 100 μ m)

Figure 4 Immunohistochemical detection of CD86 protein expression($\times 200$, bar: 100 μ m)

表 5 各组细胞相关因子表达的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of the expression of cell - related factors in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	GPR84 protein	CD86 fluorescence intensity(a. u.)	<i>IL</i> - 1 β mRNA	<i>IL</i> - 6 mRNA	<i>TNF</i> - α mRNA	<i>iNOS</i> mRNA
Control	10	0. 58 $\pm$ 0. 06	1 072. 36 $\pm$ 105. 92	1. 00 $\pm$ 0. 14	1. 00 $\pm$ 0. 15	1. 00 $\pm$ 0. 10	1. 00 $\pm$ 0. 11
Induce	10	0. 94 $\pm$ 0. 11 ***	3 209. 59 $\pm$ 206. 38 ***	2. 48 $\pm$ 0. 28 ***	2. 11 $\pm$ 0. 26 ***	2. 45 $\pm$ 0. 34 ***	3. 06 $\pm$ 0. 23 ***
Medicine	10	0. 63 $\pm$ 0. 07 ^{ΔΔΔ}	1 903. 95 $\pm$ 172. 73 ^{ΔΔΔ}	1. 62 $\pm$ 0. 23 ^{ΔΔΔ}	1. 48 $\pm$ 0. 20 ^{ΔΔΔ}	1. 63 $\pm$ 0. 13 ^{ΔΔΔ}	1. 98 $\pm$ 0. 27 ^{ΔΔΔ}
Medicine + 6 - OAU	10	1. 45 $\pm$ 0. 09 ^{@@@}	2 471. 43 $\pm$ 273. 18 ^{@@@}	2. 31 $\pm$ 0. 23 ^{@@@}	1. 87 $\pm$ 0. 15 ^{@@@}	2. 34 $\pm$ 0. 24 ^{@@@}	2. 85 $\pm$ 0. 24 ^{@@@}

Compared with the control group, *** $P < 0. 001$; Compared with the induce group, ^{ΔΔΔ} $P < 0. 001$; Compared with the medicine group, ^{@@@} $P < 0. 001$.

讨 论

RAAS 的激活是脓毒症低血压期必不可少的对抗机制,然而,过度激活与过度的促氧化和炎症反应相关,从而加重器官损伤;研究已经证实,用 RAAS 抑制剂治疗脓毒症可以降低脓毒症 - AKI 的发生率,降低其严重程度,并改善脓毒症患者的预后^[2]。氯沙坦是一种作用于 Ang II 的 RAAS 抑制剂,多个研究已经证实,其对脓毒症相关脏器损伤具有明显的改善作用,如在最新的研究报道中,氯沙坦可通过抑制氧化应激、炎症反应和细胞凋亡途径减轻脓毒症相关肝损伤^[14];在另一项研究中表明,氯沙坦可通过阻止巨噬细胞向 M1 型极化,进而改善脓毒症相关心肌损伤^[5];这些证据支持氯沙坦作为一种全身器官保护的治疗方法。然而氯沙坦在脓毒症相关肾损伤中的保护作用及其机制还不清楚。因此本研究通过构建脓毒症 - AKI 小鼠模型,探究氯沙坦的治疗作用,结果发现,在建模后的 72 h 内,模型小鼠死亡率为 45. 0 %,氯沙坦治疗后,小鼠死亡率为 25. 0 %,氯沙坦明显降低了脓毒症 - AKI 小鼠死亡率,同时病理结果显示,氯沙坦改善了模型小鼠肾组织的病理损伤,减轻炎性细胞浸润,并降低血清 BUN 和 SCr 水平,BUN 和 SCr 是临床用于反映肾功能的常用指标,该结果表明,在小鼠模型中,氯沙坦可明显减轻脓毒症 - AKI 肾组织损伤,改善肾功能。

巨噬细胞是机体固有免疫系统的重要组成部分,巨噬细胞具有吞噬、抗原提呈、免疫调节的 3 种基本功能,其不同因子刺激下可表现出不同的表型特征,包括促炎 M1 型和抗炎 M2 型^[15];研究表明,M1 巨噬细胞作为一种促炎表型,可通过促进促炎细胞因子(如 *IL* - 1 β 、*IL* - 6、*TNF* - α 、*iNOS*)的分泌,诱导脓毒症相关 AKI 的发生,因此抑制 M1 型巨噬细胞极化

是治疗脓毒症脏器损伤的潜在机制之一^[16]。GPR84 是一种主要在免疫细胞上表达的 G 蛋白偶联受体^[17],研究表明,在 THP - 1 巨噬细胞中,GPR84 激活剂增加了促炎细胞因子的产生^[18];此外在多种炎性疾病中,GPR84 缺失或药物抑制与 M1 型促炎巨噬细胞减少和疾病严重程度降低相关^[19]。这些证据表明,抑制GPR84 介导的 M1 型巨噬细胞极化可能在脓毒症相关 AKI 中发挥治疗作用。在本研究中,通过使用 GPR84 拮抗剂 GLPG1205 治疗小鼠,观察到 72 h 内模型小鼠死亡率明显降低,且 GLPG1205 减轻了肾组织的炎性细胞浸润,并降低 BUN 和 SCr 水平,提示 GPR84 是改善脓毒症 - AKI 损伤的一种新的治疗靶点;此外 GLPG1205 治疗后模型小鼠肾组织中 CD86 (一种 M1 型巨噬细胞标记物)表达水平明显降低,且促炎因子 *IL* - 1 β 、*IL* - 6、*TNF* - α 、*iNOS* 的分泌受到抑制,抑炎因子 *IL* - 10 表达升高,表明抑制 GPR84 表达可通过抑制巨噬细胞 M1 极化改善脓毒症肾损伤;值得注意的是,氯沙坦治疗后也表现出对模型小鼠 CD86 及促炎因子分泌的抑制,且氯沙坦可以显著抑制模型组小鼠 GPR84 的表达,提示氯沙坦对脓毒症 - AKI 小鼠的改善作用至少部分通过调控 GPR84 实现。此外,在本研究中,氯沙坦对肾功能指标及炎症因子的改善作用优于 GLPG1205,分析其原因,氯沙坦能同时靶向脓毒症肾损伤的炎症激活与肾血流障碍双核心病理环节,且其对 GPR84 的调控是源头性下调,而 GLPG1205 仅单一阻断 GPR84 受体且无法干预肾血流。

THP - 1 细胞是永生化细胞系,具有细胞表型均一、增殖稳定的特点,THP - 1 细胞分化的巨噬细胞在 GPR84 基础表达水平、对氯沙坦的响应一致性上,远高于小鼠原代巨噬细胞,因此,本研究进一步通过体外诱导 THP - 1 细胞验证氯沙坦介导 GPR84 调控巨噬细胞 M1 极化的机制,发现 THP - 1 细胞经 PMA、LPS、IFN - γ 刺激后,CD86 及

$IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $iNOS$ 表达均增强,提示成功诱导为M1型巨噬细胞,且GPR84表达也同步增强;氯沙坦刺激后,GPR84表达及CD86和促炎因子的表达均受到抑制,不过这种抑制作用被GPR84激活剂6-OAU部分逆转,表明氯沙坦可通过下调GPR84表达抑制巨噬细胞向M1型极化。不过THP-1细胞与C57BL/6小鼠的物种差异是本研究的局限性,本研究将通过后续研究(如在小鼠原代巨噬细胞中验证)进一步完善。

本研究提示:在脓毒-AKI小鼠模型中,氯沙坦可能通过调控GPR84介导的巨噬细胞极化减轻肾损伤。

参考文献:

- [1] ZARBOCK A, KOYNER J L, GOMEZ H, *et al.* Sepsis - associated acute kidney injury - treatment standard [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2023, 39(1): 26—35.
- [2] GARCIA B, ZARBOCK A, BELLOMO R, *et al.* The role of renin - angiotensin system in sepsis - associated acute kidney injury: Mechanisms and therapeutic implications[J]. *Curr Opin Crit Care*, 2023, 29(6): 607—613.
- [3] TIBI S, ZERNALVAND G, MOHSIN H. Role of the Renin angiotensin aldosterone system in the pathogenesis of sepsis - induced acute kidney injury: A systematic review[J]. *J Clin Med*, 2023, 12(14): 566.
- [4] 吴济强. 氯沙坦减轻间断性缺氧诱导的大鼠肾小管周毛细血管丧失和肾脏纤维化机制的研究[D]. 甘肃 兰州: 兰州大学, 2020.
- [5] CHEN X S, WANG S H, LIU C Y, *et al.* Losartan attenuates sepsis - induced cardiomyopathy by regulating macrophage polarization via TLR4 - mediated NF - κ B and MAPK signaling[J/OL]. *Pharmacol Res*, 2022, 185: 106473. 2022 - 09 - 28 [2025 - 04 - 22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36182039/>.
- [6] 王海曼, 张萌, 段美丽. 巨噬细胞在脓毒症小鼠急性肾损伤发生中的可能作用机制[J]. *临床和实验医学杂志*, 2023, 22(15): 1569—1573.
- [7] 杨磊. 衣康酸在脓毒症相关急性肾损伤中的作用及其机制研究[D]. 湖北 武汉: 华中科技大学, 2024.
- [8] 杨佳楠. *miR-93-5p* 在高尿酸诱导的小鼠肾脏纤维化中的作用研究[D]. 吉林 吉林: 北华大学, 2024.
- [9] 曹雯, 徐玉祥, 范丽, 等. 川陈皮素通过激活 SIRT1/FOXO3a 信号来减轻肾缺血再灌注损伤[J]. *世界中医药*, 2023, 18(15): 2134—2141.
- [10] 王思童, 刘运华, 周楷栋, 等. 基于内质网应激探讨糖肾平对糖尿病肾病 db/db 小鼠肾脏保护作用及 MCP - 1/CCR2 信号通路的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2024, 39(5): 2527—2533.
- [11] 向朝雪, 李福祥, 朱忠立, 等. NLRP3 炎症小体在 ICU 获得性衰弱大鼠呼吸肌和下肢肌中的表达[J]. *中华肺部疾病杂志(电子版)*, 2020, 13(2): 198—203.
- [12] 杨银银, 李惠武, 刘玲, 等. THP - 1 来源的 M1 型巨噬细胞对食管鳞癌细胞的凋亡、增殖与迁移作用[J]. *生命的化学*, 2022, 42(5): 921—927.
- [13] 陈妍, 薄丽艳, 李聪聪. 通过 NF - κ B 调控蛋白激酶 SPAK 通路促进 NR8383 细胞炎症介质释放及氧化应激发生[J]. *中华肺部疾病杂志(电子版)*, 2022, 15(2): 146—150.
- [14] AI - KADI A, EL - DALY M, EL - TAHAWY N F G, *et al.* Therapeutic potential of ramipril, losartan, and spironolactone against sepsis - associated liver tissue injury induced by cecal ligation and puncture in rats[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2024, 28(5): 1821—1836.
- [15] CHEN X, LIU Y, GAO Y, *et al.* The roles of macrophage polarization in the host immune response to sepsis[J/OL]. *Int Immunopharmacol*. 2021, 96: 107791. 2021 - 05 - 29 [2025 - 04 - 22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34162154/>.
- [16] 唐巧. 恩贝灵阻断 NF - κ B 通路且抑制巨噬细胞 M1 极化抗脓毒症急性肾损伤的研究[D]. 四川 南充: 川北医学院, 2023.
- [17] AKTAR R, RONDINELLI S, PEIRIS M. GPR84 in physiology - many functions in many tissues[J]. *Br J Pharmacol*, 2024, 181(10): 1524—1535.
- [18] SCHWARZFISCHER M, WALKER M R, CURCIO M, *et al.* Synthetic GPR84 agonists in colorectal cancer: Effective in THP - 1 cells but ineffective in BMDMs and MC38 mouse tumor models[J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(2): 490.
- [19] ZHANG Q, CHEN L H, YANG H, *et al.* GPR84 signaling promotes intestinal mucosal inflammation via enhancing NLRP3 inflammasome activation in macrophages[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(8): 2042—2054.

(收稿日期 2025 - 06 - 13)