· 实验研究 ·

生长停滞特异性蛋白6/酪氨酸蛋白激酶受体信号通路经调控巨噬细胞极化参与IgA肾病肾间质纤维化的机制研究

杨淑芬[1]　朱国强[2]　孟昭曦[1]　姜鸿[1]　地丽娜亚力昆[1]　白路[1]　哈晓文[1]
[1]新疆维吾尔自治区人民医院肾脏病科，新疆维吾尔自治区肾脏病临床研究中心，乌鲁木齐 830001；[2]新疆医科大学第一附属医院肾脏病科，乌鲁木齐 830011
通信作者：姜鸿，Email：jiangh-yt@163.com

【摘要】 目的　探讨生长停滞特异性蛋白6（growth arrest-specific protein 6，Gas6）/Axl受体酪氨酸激酶（Axl receptor tyrosine kinase，Axl）信号通路对巨噬细胞极化的调控作用，并进一步阐明其在IgA肾病（IgA nephropathy，IgAN）间质纤维化进程中的作用及潜在机制。**方法**　将M0型巨噬细胞分别转染靶向Axl的小干扰RNA（small interfering RNA，siRNA）和阴性对照（negative control，NC）siRNA。采用实时荧光定量聚合酶链反应（quantitative real-time polymerase chain reaction，qPCR）和蛋白质印迹法检测Axl及M2型巨噬细胞特异性因子分化簇206（cluster of differentiation 206，CD206）、精氨酸酶1（arginase-1，Arg-1）、转化生长因子β（transforming growth factor-β，TGF-β）和白细胞介素10（interleukin-10，IL-10）的表达，并采用流式细胞术检测M1型和M2型巨噬细胞比例。构建人肾近端小管上皮细胞（human kidney-2，HK-2）与M0型巨噬细胞共培养体系，分为对照组、TGF-β1组、TGF-β1＋siRNA-NC组和TGF-β1＋siRNA-Axl组。采用酶联免疫吸附测定检测培养上清液中胶原（collagen，COL）1和COL3水平，免疫荧光染色观察HK-2中α-平滑肌肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）的表达，蛋白质印迹法检测α-SMA、纤维连接蛋白（fibronectin，FN）、Gas6、磷酸化蛋白激酶B（phosphorylated protein kinase B，p-Akt）和蛋白激酶B（protein kinase B，Akt）的蛋白表达，并计算p-Akt/Akt比值。将10只野生型（wild type，WT）小鼠和10只Axl基因敲除（$Axl^{-/-}$）小鼠分别采用随机数字表法分为WT对照组、WT IgAN组、$Axl^{-/-}$对照组和$Axl^{-/-}$ IgAN组，每组5只。采用HE及Masson染色评价肾组织病理损伤和纤维化程度，蛋白质印迹法检测α-SMA和FN蛋白表达，免疫荧光双染法评价M2型巨噬细胞浸润情况。**结果**　体外实验中，与对照组和siRNA-NC组相比，siRNA-Axl组Axl mRNA相对表达量（0.28±0.02比1.00±0.06、1.02±0.08）和蛋白相对表达量（0.07±0.01比0.35±0.03、0.32±0.04）均降低，M1型巨噬细胞比例[（73.50±7.65）%比（50.00±6.02）%、（51.00±4.98）%]升高，M2型巨噬细胞比例[（25.50±2.71）%比（49.70±5.13）%、（49.10±5.01）%]降低；CD206、Arg-1、TGF-β和IL-10的mRNA及蛋白表达均降低（均$P<0.05$）。HK-2与巨噬细胞共培养后，与对照组相比，TGF-β1组COL1[（2.07±0.21）μg/L比（0.54±0.04）μg/L]和COL3[（1.53±0.14）μg/L比（0.42±0.04）μg/L]水平升高，α-SMA免疫荧光表达增强，α-SMA（0.72±0.06比0.11±0.01）、FN（0.70±0.08比0.09±0.01）、Gas6（0.68±0.07比0.06±0.01）蛋白相对表达量及p-Akt/Akt比值（0.34±0.03比0.12±0.01）均升高；与TGF-β1＋siRNA-NC组相比，TGF-β1＋siRNA-Axl组COL1[（1.01±0.08）μg/L比（2.06±0.21）μg/L]和COL3[（0.73±0.06）μg/L比（1.53±0.14）μg/L]水平降低，α-SMA免疫荧光表达减弱，α-SMA（0.15±0.02比0.74±0.08）、FN（0.17±0.02比0.73±0.08）、Gas6（0.15±0.01比0.66±0.07）蛋白相对表达量及p-Akt/Akt比值（0.21±0.02比0.32±0.03）均降低（均P<0.05）。动物实验中，与WT对照组相比，WT IgAN组肾间质纤维化面积[（12.46±1.34）%比（1.23±0.14）%]增加，肾组织α-SMA（1.27±0.13比0.43±0.04）和FN（0.93±0.10比0.14±0.01）蛋白相对表达量升高，M2型巨噬细胞比例[（21.50±2.24）%比（6.34±0.65）%]增加；与$Axl^{-/-}$对照组相比，$Axl^{-/-}$ IgAN组肾间质纤维化面积[（7.54±0.80）%比（1.01±0.11）%]增加，α-SMA（0.63±0.06比

0.42±0.04）和 FN（0.47±0.05 比 0.13±0.01）蛋白相对表达量升高，M2 型巨噬细胞比例[（17.83±1.84）%比（6.81±0.67）%]增加；与 WT IgAN 组相比，$Axl^{-/-}$ IgAN 组肾间质纤维化面积[（7.54±0.80）%比（12.46±1.34）%]、α-SMA（0.63±0.06 比 1.27±0.13）和 FN（0.47±0.05 比 0.93±0.10）蛋白相对表达量以及 M2 型巨噬细胞比例[（17.83±1.84）%比（21.50±2.24）%]均降低（$P<0.05$）。**结论** Gas6/Axl 信号通路通过调控巨噬细胞极化参与 IgAN 肾间质纤维化进程，Axl 沉默或敲除可减轻肾间质纤维化损伤，为 IgAN 治疗提供了潜在靶点。

【关键词】 免疫球蛋白 A；肾间质纤维化；生长停滞特异性蛋白 6/酪氨酸蛋白激酶受体信号通路；巨噬细胞；肾小管上皮细胞

基金项目： 新疆维吾尔自治区自然科学基金（2022D01C628）

DOI：10.3969/j.issn.1671-2390.2026.10.009

Mechanism of growth arrest-specific protein 6/Axl receptor tyrosine kinase signaling pathway in promoting macrophage polarization and contributing to interstitial fibrosis in IgA nephropathy

Yang Shu-fen[1], *Zhu Guo-qiang*[2], *Meng Zhao-xi*[1], *Jiang Hong*[1], *Yalikun Dilina*[1], *Bai Lu*[1], *Ha Xiao-wen*[1]

[1]*Department of Nephrology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Clinical Research Center for Kidney Disease of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi* 830001, *China*; [2]*Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi* 830011, *China*

Corresponding author: Jiang Hong, Email: jiangh-yt@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the regulatory role of the growth arrest-specific protein 6 (Gas6)/Axl receptor tyrosine kinase (Axl) signaling pathway in macrophage polarization, and to further elucidate its role and underlying mechanisms during the progression of interstitial fibrosis in immunoglobulin A nephropathy (IgAN). **Methods** M0-type macrophages were transfected with Axl-targeting small interfering RNA (siRNA) and negative control (NC) siRNA, respectively. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) and Western blotting were used to detect the expression of Axl and M2-type macrophage-specific factors including cluster of differentiation 206 (CD206), arginase-1 (Arg-1), transforming growth factor-β (TGF-β), and interleukin-10 (IL-10). Flow cytometry was used to detect the proportions of M1- and M2-type macrophages. A co-culture system of human kidney-2 (HK-2) cells and M0-type macrophages was established and divided into a control group, a TGF-β1 group, a TGF-β1 + siRNA-NC group, and a TGF-β1 + siRNA-Axl group. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure collagen (COL)1 and COL3 levels in culture supernatants. Immunofluorescence staining was used to observe α-smooth muscle actin (α-SMA) expression in HK-2 cells. Western blotting was used to detect α-SMA, fibronectin (FN), Gas6, phosphorylated protein kinase B (p-Akt), and protein kinase B (Akt) protein expression, and the p-Akt/Akt ratio was calculated. For the animal experiment, 10 wild type (WT) mice and 10 Axl gene knockout ($Axl^{-/-}$) mice were randomly assigned (5 mice per group) into four groups: WT control group, WT IgAN group, $Axl^{-/-}$ control group, and $Axl^{-/-}$ IgAN group. Hematoxylin and eosin (HE) and Masson staining were used to assess renal pathological injury and fibrosis. Western blotting was used to detect α-SMA and FN protein expression. Immunofluorescence double staining was used to evaluate M2-type macrophage infiltration. **Results** *In vitro* experiments showed that compared with the control group and siRNA-NC group, the siRNA-Axl group had lower relative Axl mRNA expression (0.28±0.02 *vs* 1.00±0.06, 1.02±0.08) and lower relative Axl protein expression (0.07±0.01 *vs* 0.35±0.03, 0.32±0.04). The proportion of M1-type macrophages increased ([73.50±7.65]% *vs* [50.00±6.02]%, [51.00±4.98]%), while the proportion of M2-type macrophages decreased ([25.50±2.71]% *vs* [49.70±5.13]%, [49.10±5.01]%). The mRNA and protein expression of CD206, Arg-1, TGF-β, and IL-10 decreased (all $P<0.05$). After co-culture of HK-2 cells with macrophages, compared with the control group, the TGF-β1 group showed increased COL1 ([2.07±0.21] μg/L *vs* [0.54±0.04] μg/L) and COL3 ([1.53±0.14] μg/L *vs*

[0.42±0.04] μg/L), enhanced α-SMA immunofluorescence expression, and increased relative expression of α-SMA (0.72±0.06 *vs* 0.11±0.01), FN (0.70±0.08 *vs* 0.09±0.01), and Gas6 (0.68±0.07 *vs* 0.06±0.01), as well as an increased p-Akt/Akt ratio (0.34±0.03 *vs* 0.12±0.01). Compared with the TGF-β1 + siRNA-NC group, the TGF-β1 + siRNA-Axl group showed decreased COL1 ([1.01±0.08] μg/L *vs* [2.06±0.21] μg/L) and COL3 ([0.73±0.06] μg/L *vs* [1.53±0.14] μg/L), weakened α-SMA immunofluorescence expression, and decreased relative protein expression of α-SMA (0.15±0.02 *vs* 0.74±0.08), FN (0.17±0.02 *vs* 0.73±0.08), and Gas6 (0.15±0.01 *vs* 0.66±0.07), as well as a decreased p-Akt/Akt ratio (0.21±0.02 *vs* 0.32±0.03) (all $P<0.05$). In animal experiments, compared with the WT control group, the WT IgAN group showed increased renal interstitial fibrosis area ([12.46±1.34]% *vs* [1.23±0.14]%), increased relative protein expression of α-SMA (1.27±0.13 *vs* 0.43±0.04) and FN (0.93±0.10 *vs* 0.14±0.01), and increased M2-type macrophage proportion ([21.50±2.24]% *vs* [6.34±0.65]%). Compared with the $Axl^{-/-}$ control group, the $Axl^{-/-}$ IgAN group showed increased renal interstitial fibrosis area ([7.54±0.80]% *vs* [1.01±0.11]%), increased relative protein expression of α-SMA (0.63±0.06 *vs* 0.42±0.04) and FN (0.47±0.05 *vs* 0.13±0.01), and increased M2-type macrophage proportion ([17.83±1.84]% *vs* [6.81±0.67]%). Compared with the WT IgAN group, the $Axl^{-/-}$ IgAN group showed decreased renal interstitial fibrosis area ([7.54±0.80]% *vs* [12.46±1.34]%), decreased relative protein expression of α-SMA (0.63±0.06 *vs* 1.27±0.13) and FN (0.47±0.05 *vs* 0.93±0.10), and decreased M2-type macrophage proportion ([17.83±1.84]% *vs* [21.50±2.24]%) ($P<0.05$). **Conclusion** The Gas6/Axl signaling pathway participates in the progression of interstitial fibrosis in IgAN by regulating macrophage polarization. Axl silencing or knockout can alleviate renal interstitial fibrosis injury, providing a potential target for IgAN treatment.

【Key words】 Immunoglobulin A; Renal fibrosis; Growth arrest specific 6/Axl receptor tyrosine kinase signaling pathway; Macrophage; Renal tubular epithelial cell

Fund program: Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region(2022D01C628)

DOI: 10.3969/j.issn.1671-2390.2026.10.009

IgA 肾病(IgA nephropathy, IgAN)是一种以肾小球系膜区 IgA 沉积为主要特征的原发性肾小球疾病。是目前全球常见的原发性肾小球疾病之一[1]。其具有慢性进展性特征,部分患者可随病程进展出现持续性肾功能下降,并最终进展至终末期肾衰竭[2],而肾间质纤维化是 IgAN 进展至终末期肾病的重要病理基础之一[3],其主要表现为肾小管结构破坏、间质炎症反应及成纤维细胞的异常增殖和细胞外基质异常沉积。这一病理过程反映了肾脏在经历慢性、持续性损伤后,未能有效修复所导致的组织重塑和功能丧失[4]。因此,抑制肾间质纤维化已成为延缓 IgAN 进展、降低终末期肾病发生风险的重要治疗策略[5]。

近年来,先天免疫细胞在 IgAN 肾间质纤维化进程中的作用逐渐受到关注,其中,巨噬细胞作为肾脏损伤后最早响应的免疫细胞之一,广泛存在于受损组织中,并根据其极化状态分为促炎的 M1 型和促修复的 M2 型[6]。在持续性组织损伤的背景下,M2 型巨噬细胞不仅参与炎症的早期控制,还通过分泌多种细胞因子和趋化因子,促进成纤维细胞的活化与迁移,从而加剧肾间质纤维化过程[7]。因此,调控巨噬细胞极化状态,特别是抑制其向 M2 型的异常极化,可能成为干预 IgAN 肾间质纤维化的重要靶点[8]。杨淑芬等[9]通过 IgAN 患者尿液蛋白质组学研究发现,磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)、Ras 相关 C3 肉毒毒素底物 1(Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, RAC1)、蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)、afamin 蛋白、丛状蛋白 B2 等差异蛋白可能通过参与炎症反应、细胞迁移和细胞外基质重塑等过程,与生长停滞特异性蛋白 6(growth arrest specific 6, Gas6)/酪氨酸蛋白激酶受体(Axl receptor tyrosine kinase, Axl)信号通路的功能相关联。在 Gas6/Axl 信号通路中,Gas6 与 Axl 结合后激活 PI3K,进而生成磷脂酰肌醇(3,4,5)-三磷酸,激活 Akt,通过抑制细胞凋亡、促进细胞存活以及激活 RAC1,调节细胞骨架重排和迁移。同时,Yang 等[10]还发现在 IgAN 肾间质纤维化评分较高的患者中,M2 型巨噬细胞在 IgAN 组织中富集。这些过程可能在 IgAN 中加剧肾小球系膜细胞的增殖和细胞外基质积累,从而推动 IgAN 的

病理进程，但Gas6/Axl信号通路是否通过调控巨噬细胞极化促进IgAN间质纤维化，目前尚不明确。

Axl是Tyro3/Axl/Mer受体家族成员之一，能够被配体Gas6激活，参与调节细胞增殖、黏附、吞噬及免疫稳态等过程[11]。已有研究表明，Gas6/Axl信号通路在巨噬细胞极化中也发挥着调控作用，该信号通路与肾脏疾病的发病机制有关，使用Axl抑制剂能够改善肾间质纤维化和肾小管损伤[12-13]。但其是否通过调控巨噬细胞极化影响IgAN中的肾间质纤维化尚未明确。为此，本研究通过建立体外细胞模型和体内小鼠模型，探讨Gas6/Axl信号通路在调控巨噬细胞极化及其参与IgAN肾间质纤维化中的作用机制，以期进一步揭示IgAN肾间质纤维化的分子机制，并为开发相关治疗靶点提供理论依据。

材料与方法

一、实验动物

本研究采用10只野生型（wild type，WT）C57BL/6小鼠和10只Axl基因敲除（$Axl^{-/-}$）小鼠进行实验，所有小鼠均为雄性，6周龄，体重20～22 g，均购自苏州生物科技有限公司。所有小鼠在无特定病原体级标准动物房中适应性饲养1周后进行实验。本研究经新疆维吾尔自治区人民医院动物实验伦理委员会审批（审批号：SYDW2023110301），所有操作符合《实验动物管理条例》。

二、主要试剂

人急性单核细胞白血病细胞（human acute monocytic leukemia cell line，THP-1）和人肾小管上皮细胞（human kidney-2，HK-2）购自广州博辉生物科技有限公司，青霉素/链霉素双抗液和胎牛血清购自武汉普诺赛生命科技有限公司，洛斯维·帕克纪念研究所（Roswell Park memorial institute，RPMI）-1640培养基购自深圳中科百抗生物科技有限公司，PepMute™小干扰RNA（small interfering RNA，siRNA）转染试剂盒购自美国SignaGen公司，TRIzol试剂盒和PrimeScript逆转录试剂盒购自日本Takara公司，iTaq Universal SYBR Green Supermix试剂盒购自美国Bio-Rad公司，放射免疫沉淀法（radioimmunoprecipitation assay，RIPA）裂解液和二喹啉甲酸（bicinchoninic acid，BCA）蛋白定量测定试剂盒购自沈阳万类生物科技有限公司，增强化学发光（enhanced chemiluminescence，ECL）购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。Axl抗体、分化簇206（cluster of differentiation 206，CD206）抗体、精氨酸酶1（arginase-1，Arg-1）抗体、转化生长因子β（transforming growth factor-β，TGF-β）抗体、白细胞介素（interleukin，IL）10抗体、α-平滑肌肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）抗体、纤维连接蛋白（fibronectin，FN）抗体、Gas6抗体、磷酸化Axl（phosphorylated Axl，p-Axl）抗体、磷酸化蛋白激酶B（phosphorylated protein kinase B，p-Akt）抗体、蛋白激酶B（protein kinase B，Akt）抗体、β-actin抗体及辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记、Alexa Fluor 488标记、Alexa Fluor 594标记的山羊抗兔IgG抗体均购自英国Abcam公司，别藻蓝蛋白（allophycocyanin，APC）标记的含表皮生长因子样模块黏蛋白样激素受体1（epidermal growth factor-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1，F4/80）抗体、藻红蛋白（phycoerythrin，PE）标记的分化簇86（cluster of differentiation 86，CD86）抗体和异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate，FITC）标记的CD206抗体均购自北京百奥创新科技有限公司。TGF-β1购自美国PeproTech公司，胶原（collagen，COL）1和COL3的酶联免疫吸附测定（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）测定试剂盒购自武汉菲恩生物科技有限公司，Triton X-100和牛血清白蛋白购自美国Sigma-Aldrich公司，葡萄球菌肠毒素B购自温州科森生物科技有限公司，HE染色试剂盒和Masson染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

三、实验方法

1. 巨噬细胞诱导培养与转染　THP-1细胞用含1%青霉素/链霉素和10%胎牛血清的RPMI-1640培养基培养，在37 ℃、5% CO_2条件下常规培养。将对数生长期的细胞按每孔1×10^6个的密度铺于6孔板，加入100 μg/L佛波酯孵育24 h，诱导为M0型巨噬细胞。根据PepMute™ siRNA转染试剂盒说明书操作，分别配制siRNA-Axl、siRNA-阴性对照（negative control siRNA，siRNA-NC）与转染试剂的混合液，再分别加入至细胞中进行转染，记为siRNA-Axl组和siRNA-NC组，并取正常培养的细胞作为对照组。转染48 h后，通过实时荧光定量聚合酶链反应（quantitative real-time polymerase chain reaction，qPCR）和蛋白质印迹法检测Axl沉默表达的效果。

2. qPCR　收集不同处理的巨噬细胞，TRIzol法提取总RNA，按照PrimeScript逆转录试剂盒制造商的说明书进行逆转录，合成互补DNA（comple-

mentary DNA, cDNA）后，使用 iTaq Universal SYBR Green Supermix 试剂盒在荧光定量系统中进行定量分析，设置循环参数：95 ℃，3 min；95 ℃，5 s；60 ℃，20 s。进行 35 个循环，检测 *Axl*、*CD206*、*Arg-1*、*TGF-β* 及 *IL-10* 的信使 RNA（messenger RNA，mRNA）表达水平，*GAPDH* 作为内参基因，引物序列见表 1。每个样品设置 3 个技术复孔，以对照组作为校准组，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析各目的基因的相对表达量。

表 1　qPCR 检测目的基因的引物序列

Tab 1　Primer sequences for qPCR detection of target genes

基因	正向引物序列	反向引物序列
AXL	5′-GTGGGCAACCCA GGGAATATC-3′	5′ -GTACTGTCCCGTG TCGGAAAG-3′
CD206	5′-AGCCCTTTACTT GACCTCCTAA-3′	5′-CAAGTTCCATCTT TCACCCAC-3′
Arg-1	5′-CTGACCTATGTG TCATTTGG-3′	5′-CATCTGGGAACTT TCCTTTC-3′
TGF-β1	5′-CCTGACGGTAAA GTGCCCAA-3′	5′-ACCTGGCACTTCT GGAAAGG-3′
IL-10	5′-GAGGTGATGCCC CAAGCTG-3′	5′-CACGGCCTTGCTC TTGTTTT-3′
GAPDH	5′-GAAGGTGAAGGT CGGAGTC-3′	5′-GAAGATGGTGATG GGATTTC-3′

3. 蛋白质印迹法　采用 RIPA 裂解液提取不同处理的巨噬细胞、HK-2 和肾脏组织的总蛋白，BCA 法测定其浓度。每组样本取等量蛋白上样并通过电泳分离，转至聚偏二氟乙烯膜，5% 脱脂奶粉封闭 1 h，分别加入 Axl 抗体、CD206 抗体、Arg-1 抗体、TGF-β 抗体、IL-10 抗体、α-SMA 抗体、FN 抗体、Gas6 抗体、p-Axl 抗体、p-Akt 抗体、Akt 抗体及内参蛋白 β-actin 抗体，各抗体均按照 1∶1000 稀释，于 4 ℃过夜。次日，洗膜后加入二抗孵育，室温处理 2 h，使用 ECL 显影，凝胶成像系统记录条带，ImageJ 软件对目的蛋白与内参蛋白条带灰度值进行分析，评估各目的蛋白的相对表达量。

4. 流式细胞术　收集各组巨噬细胞，PBS 洗涤后重悬于流式缓冲液中，调整密度为 1×10^6 个/mL。取 100 μL 细胞悬液，分别加入 2 μL APC 标记的 F4/80 抗体、PE 标记的 CD86 抗体或 FITC 标记的 CD206 抗体，室温避光孵育 30 min，PBS 洗涤后重悬细胞于缓冲液中，通过流式细胞仪进行检测，分析 $F4/80^+CD86^+$ 与 $F4/80^+CD206^+$ 细胞所占比例。

5. 体外共培养实验分组及模型构建　体外共培养实验分为 4 组，具体如下：（1）对照组，HK-2 与 M0 型巨噬细胞共培养；（2）TGF-β1 组，10 μg/L TGF-β1 处理的 HK-2 与 M0 型巨噬细胞共培养；（3）TGF-β1 + siRNA-NC 组，10 μg/L TGF-β1 处理的 HK-2 与转染 siRNA-NC 的 M0 型巨噬细胞共培养；（4）TGF-β1 + siRNA-Axl 组，10 μg/L TGF-β1 处理的 HK-2 与转染 siRNA-Axl 的 M0 型巨噬细胞共培养。采用孔径为 0.4 μm 的聚碳酸酯膜小室建立间接共培养体系，将巨噬细胞接种于上室，HK-2 接种于下室，两种细胞经聚碳酸酯膜物理分隔，但可通过可溶性分泌因子进行相互作用，各组按照上述处理条件建立相应的共培养体系，于 37 ℃、5% CO_2 条件下共培养 48 h。培养结束后，收集 HK-2 用于后续免疫荧光染色及蛋白质印迹法检测，并收集培养上清液用于 COL1 和 COL3 水平检测。

6. ELISA 法　收集各组共培养体系的培养上清液，用于检测 COL1 和 COL3 的分泌水平。按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作，将样本及标准品分别加入 96 孔板中，37 ℃孵育 1 h，洗板后加入生物素化检测抗体，继续孵育 1 h，加入 HRP 结合物，室温孵育 30 min，洗涤后加入 3，3′，5，5′-四甲基联苯胺底物显色液，避光孵育 15 min，终止反应。采用酶标仪在 450 nm 波长下读取各孔的吸光值，根据标准曲线计算各样本中 COL1 和 COL3 的浓度。

7. 细胞免疫荧光染色　用 PBS 洗涤各处理组的 HK-2，4% 多聚甲醛固定 15 min，0.1% Triton X-100 透化 10 min，再用 5% 牛血清白蛋白封闭 1 h。封闭后，加入 α-SMA 抗体（1∶200），4 ℃孵育过夜。次日，PBS 洗涤后，加入 Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔 IgG 抗体（1∶500），37 ℃避光孵育 1 h，4′，6-二脒基-2-苯基吲哚（4′，6-diamidino-2-phenylindole，DAPI）染色细胞核后，使用激光共聚焦荧光显微镜观察并采集图像。

8. 动物分组与造模　将 WT 小鼠按随机数字表法分为 WT 对照组和 WT IgAN 组，每组 5 只；将 $Axl^{-/-}$ 小鼠按随机数字表法分为 $Axl^{-/-}$ 对照组和 $Axl^{-/-}$ IgAN 组，每组 5 只。将 WT IgAN 组和 $Axl^{-/-}$ IgAN 组的小鼠参考文献[14]的方法进行 IgAN 模型诱导，采用尾静脉注射牛血清白蛋白联合葡萄球菌肠毒素 B 的方法建立模型，通过尾静脉注射 1 g/L 牛血清白蛋白，隔日 1 次，连续 15 周；第 6 周通过尾静脉注射 20 g/L 牛血清白蛋白，每日 1 次，连续 3 d；第 12 周通过尾静脉注射 0.8 mg/kg 葡萄球菌肠毒素 B，每周 1 次，连续 3 周。WT 对照组和 $Axl^{-/-}$ 对照组同期给予等体积相应溶剂。

9. HE 染色　将小鼠处死后立即剥取部分肾组织，冲洗干净后，固定于4%多聚甲醛溶液中24 h，常规脱水、石蜡包埋，切成厚度为4 μm的切片。经二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水后，进行HE染色，脱水、透明、中性树胶封片，使用光学显微镜进行观察和图像采集。

10. Masson 染色　将肾组织石蜡切片常规脱蜡复水后，按照Masson试剂说明书操作，苦味酸-甲醛-冰醋酸固定液预处理1 h，苏木素染核5 min，再依次用复红、磷钼酸、亮绿进行处理，结束后脱水、透明并封片，使用光学显微镜进行观察和图像采集。胶原纤维呈蓝色，肌纤维和细胞质呈红色，ImageJ软件对纤维化面积进行分析，结果以胶原纤维面积占视野总面积的百分比表示。

11. 组织免疫荧光双染法　取新鲜肾脏组织经4%多聚甲醛固定后，包埋于最佳切割温度包埋剂中制备冰冻切片。切片常温晾干、PBS清洗后，0.3% Triton X-100透化10 min，用5%牛血清白蛋白封闭1 h，分别加入F4/80抗体（1∶200）和CD206抗体（1∶200），4 ℃孵育过夜。次日，PBS洗涤后，加入Alexa Fluor 488和Alexa Fluor 594标记的山羊抗兔IgG抗体（1∶500），37 ℃避光孵育1 h，DAPI染核后封片，使用激光共聚焦荧光显微镜观察和图像采集，$F4/80^+CD206^+$双阳性细胞为M2型巨噬细胞，ImageJ软件分析阳性比例。

四、统计学方法

所有数据采用GraphPad Prism 8.30软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示。多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

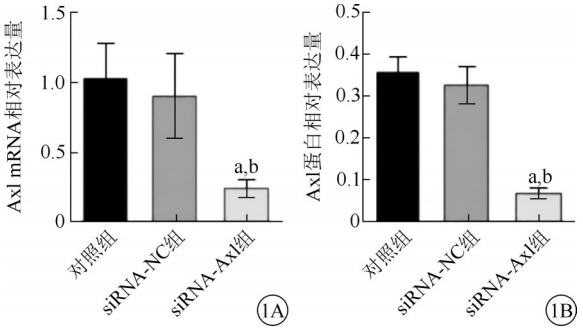
结　果

一、转染后巨噬细胞中Axl表达检测

与对照组和siRNA-NC组相比，siRNA-Axl组巨噬细胞中Axl mRNA及蛋白相对表达量显著下调（$P<0.05$）。（图1、2）

二、干扰Axl对巨噬细胞极化的影响

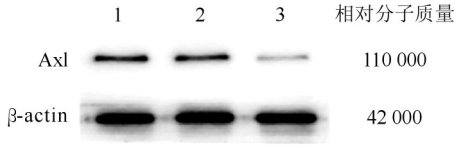
与对照组和siRNA-NC组相比，siRNA-Axl组中以$F4/80^+CD86^+$标记的M1型巨噬细胞比例显著增加（$P<0.05$），以$F4/80^+CD206^+$标记的M2型巨噬细胞比例显著减少（$P<0.05$）。与对照组和siRNA-NC组相比，siRNA-Axl组中M2型巨噬细胞特异性因子CD206、Arg-1、TGF-β、IL-10的mRNA及蛋白相对表达量均降低（$P<0.05$）。（图3～7）



注：与对照组相比，$^aP<0.05$；与siRNA-NC组相比，$^bP<0.05$；siRNA为小干扰RNA；NC为阴性对照；Axl为酪氨酸蛋白激酶受体。

图1　各组巨噬细胞中Axl表达比较　1A. Axl mRNA相对表达量；1B. Axl蛋白相对表达量

Fig 1　Comparison of Axl expression among macrophages in each group　1A. relative Axl mRNA expression; 1B. relative Axl protein expression



注：1为对照组；2为siRNA-NC组；3为siRNA-Axl组；siRNA为小干扰RNA；NC为阴性对照；Axl为酪氨酸蛋白激酶受体；β-actin为β-肌动蛋白。

图2　各组巨噬细胞中Axl蛋白表达的蛋白质印迹条带图

Fig 2　Western blot bands showing Axl protein expression among macrophages in each group

三、各组HK-2细胞培养上清液中COL1和COL3水平比较

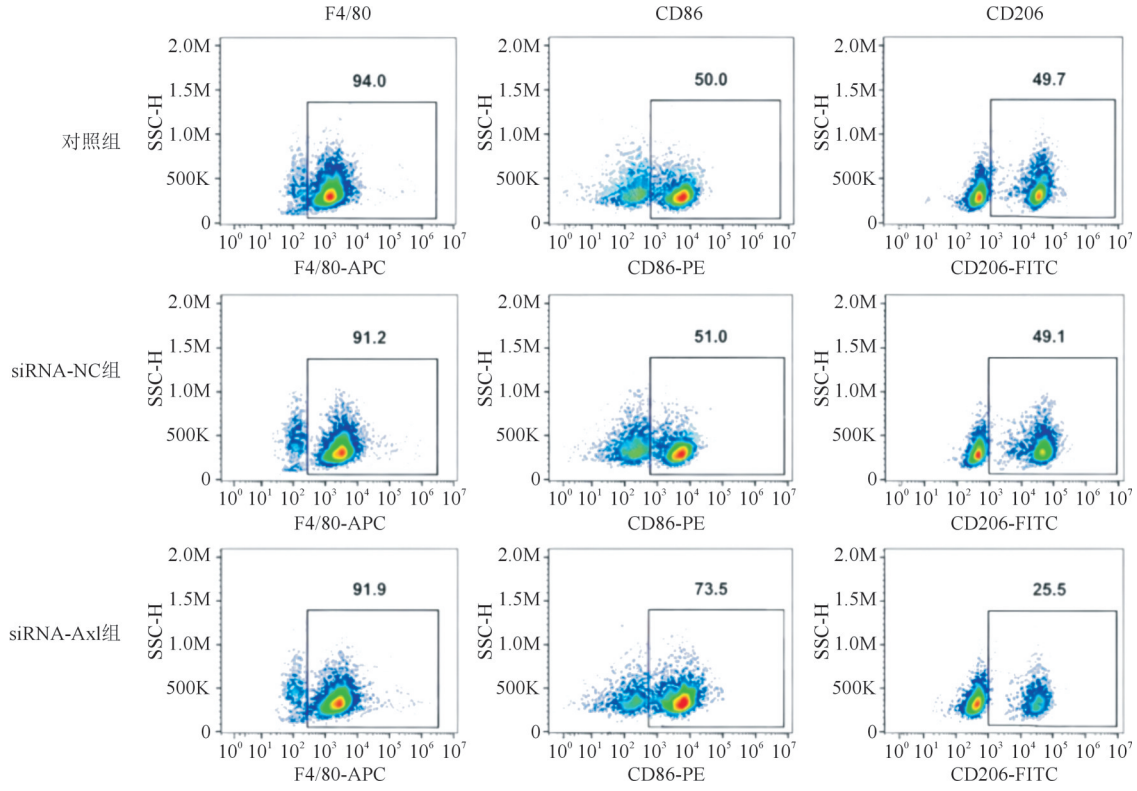
与对照组相比，TGF-β1组HK-2培养上清液中COL1和COL3水平显著升高（$P<0.05$）。与TGF-β1+siRNA-NC组相比，TGF-β1+siRNA-Axl组HK-2培养上清液中COL1和COL3水平显著降低（$P<0.05$）。（图8）

四、各组HK-2中α-SMA表达比较

激光共聚焦荧光显微镜观察显示，对照组α-SMA绿色荧光较弱；与对照组相比，TGF-β1组绿色荧光增强，提示α-SMA表达升高；与TGF-β1+siRNA-NC组相比，TGF-β1+siRNA-Axl组绿色荧光明显减弱，提示α-SMA表达降低，差异有统计学意义（$P<0.05$）。（图9）

五、各组HK-2中α-SMA、FN及Gas6/Axl信号通路蛋白表达比较

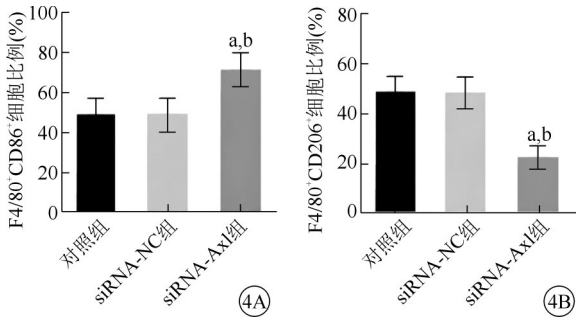
与对照组相比，TGF-β1组HK-2中α-SMA和FN蛋白相对表达量均显著升高，同时Gas6蛋白相对表达量和p-Akt/Akt蛋白比值均明显升高，差异



注：F4/80为含表皮生长因子样模块黏蛋白样激素受体1；CD86为分化簇86；CD206为分化簇206；siRNA为小干扰RNA；NC为阴性对照；Axl为酪氨酸蛋白激酶受体；APC为别藻蓝蛋白；PE为藻红蛋白；FITC为异硫氰酸荧光素；SSC-H为侧向散射信号高度。

图3　各组巨噬细胞极化的流式细胞术图

Fig 3　Flow cytometry plots of macrophage polarization in each group



注：与对照组相比，[a]$P<0.05$；与siRNA-NC组相比，[b]$P<0.05$；F4/80为含表皮生长因子样模块黏蛋白样激素受体1；CD86为分化簇86；CD206为分化簇206；siRNA为小干扰RNA；NC为阴性对照；Axl为酪氨酸蛋白激酶受体。

图4　各组M1型和M2型巨噬细胞比例的比较　4A. $F4/80^+CD86^+$标记的M1型巨噬细胞比例；4B. $F4/80^+CD206^+$标记的M2型巨噬细胞比例

Fig 4　Comparison of the proportions of M1 and M2 macrophages in each group　4A. proportion of M1 macrophages labeled with $F4/80^+CD86^+$; 4B. proportion of M2 macrophages labeled with $F4/80^+CD206^+$

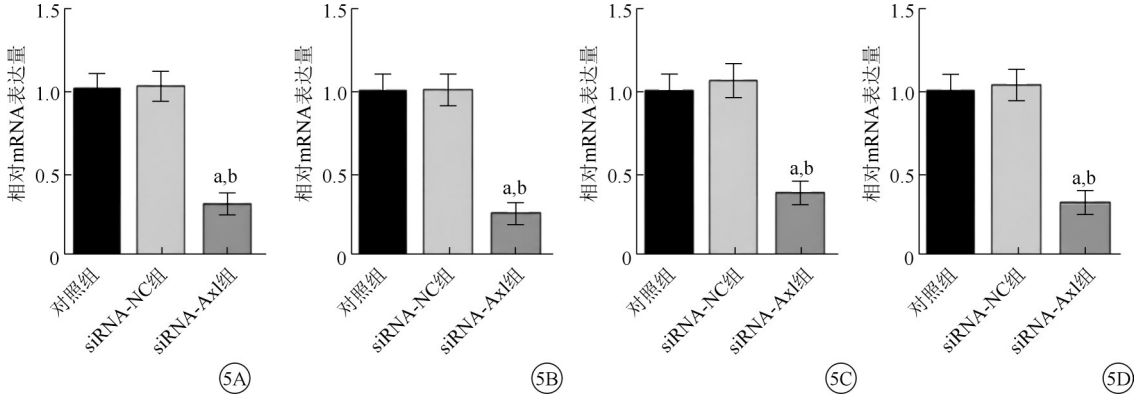
均有统计学意义（$P<0.05$）。与TGF-β1＋siRNA-NC组相比，TGF-β1＋siRNA-Axl组中α-SMA和FN蛋白相对表达量均显著降低，Gas6蛋白相对表达量及p-Akt/Akt比值也明显降低，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。（图10、11）

六、各组小鼠肾脏组织病理学变化及纤维化情况比较

HE及Masson染色结果显示，WT对照组和$Axl^{-}/^{-}$对照组小鼠肾组织结构清晰，肾小管排列整齐、大小较均匀，未见明显组织损伤及纤维化；WT IgAN组和$Axl^{-}/^{-}$ IgAN组均出现不同程度的肾小管结构紊乱，上皮细胞空泡样变及坏死，并伴有局灶性炎症细胞浸润和明显纤维化，其纤维化面积均显著高于相应对照组（$P<0.05$）。与WT IgAN组相比，$Axl^{-}/^{-}$ IgAN组小鼠肾小管上皮细胞损伤程度明显减轻，纤维化面积亦显著减少（$P<0.05$）。（图12～14）

七、各组小鼠肾脏组织中α-SMA和FN蛋白表达比较

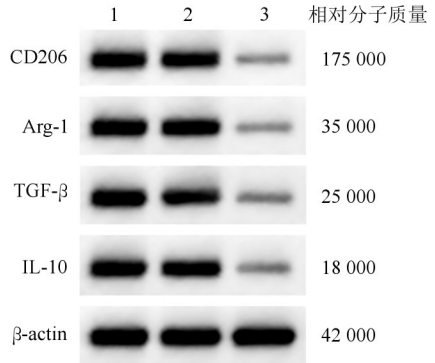
与WT对照组相比，WT IgAN组小鼠肾脏组织中α-SMA和FN蛋白相对表达量均显著升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）。与$Axl^{-}/^{-}$对照组相比，$Axl^{-}/^{-}$ IgAN组α-SMA和FN蛋白相对表达量亦显著升高（$P<0.05$）。与WT IgAN组相比，$Axl^{-}/^{-}$



注：与对照组相比，$^{a}P<0.05$；与 siRNA-NC 组相比，$^{b}P<0.05$；CD206 为分化簇 206；Arg-1 为精氨酸酶 1；TGF-β 为转化生长因子 β；IL-10 为白细胞介素 10；siRNA 为小干扰 RNA；NC 为阴性对照；Axl 为酪氨酸蛋白激酶受体。

图 5　各组巨噬细胞中 M2 型特异性因子 mRNA 表达的比较　5A. CD206 mRNA 表达比较；5B. Arg-1 mRNA 表达比较；5C. TGF-β mRNA 表达比较；5D. IL-10 mRNA 表达比较

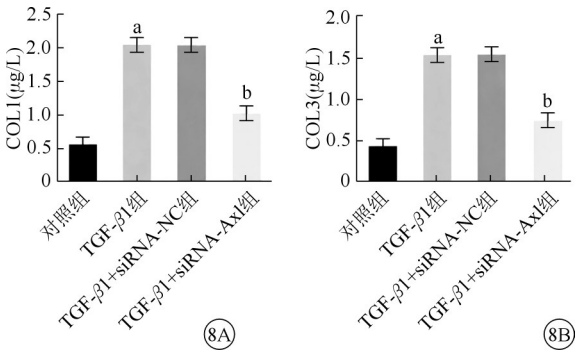
Fig 5　Comparison of mRNA expression of M2-specific factors in macrophages in each group　5A. CD206 mRNA expression; 5B. Arg-1 mRNA expression; 5C. TGF-β mRNA expression; 5D. IL-10 mRNA expression



注：1 为对照组；2 为 siRNA-NC 组；3 为 siRNA-Axl 组；CD206 为分化簇 206；Arg-1 为精氨酸酶 1；TGF-β 为转化生长因子 β；IL-10 为白细胞介素 10；β-actin 为 β-肌动蛋白；siRNA 为小干扰 RNA；NC 为阴性对照；Axl 为酪氨酸蛋白激酶受体。

图 6　各组巨噬细胞中 M2 型特异性因子的蛋白质印迹条带图

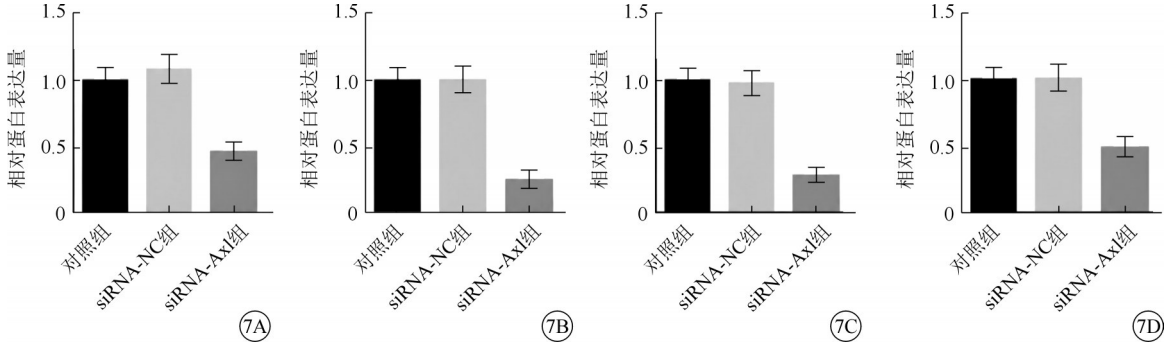
Fig 6　Western blot bands of M2-specific factors protein expression in macrophages in each group



注：与对照组相比，$^{a}P<0.05$；与 TGF-β1 + siRNA-NC 组相比，$^{b}P<0.05$；HK-2 为人肾小管上皮细胞；COL 为胶原；TGF-β1 为转化生长因子 β1；siRNA 为小干扰 RNA；NC 为阴性对照；Axl 为酪氨酸蛋白激酶受体。

图 8　各组 HK-2 培养上清液中 COL1 和 COL3 水平比较　8A. COL1；8B. COL3

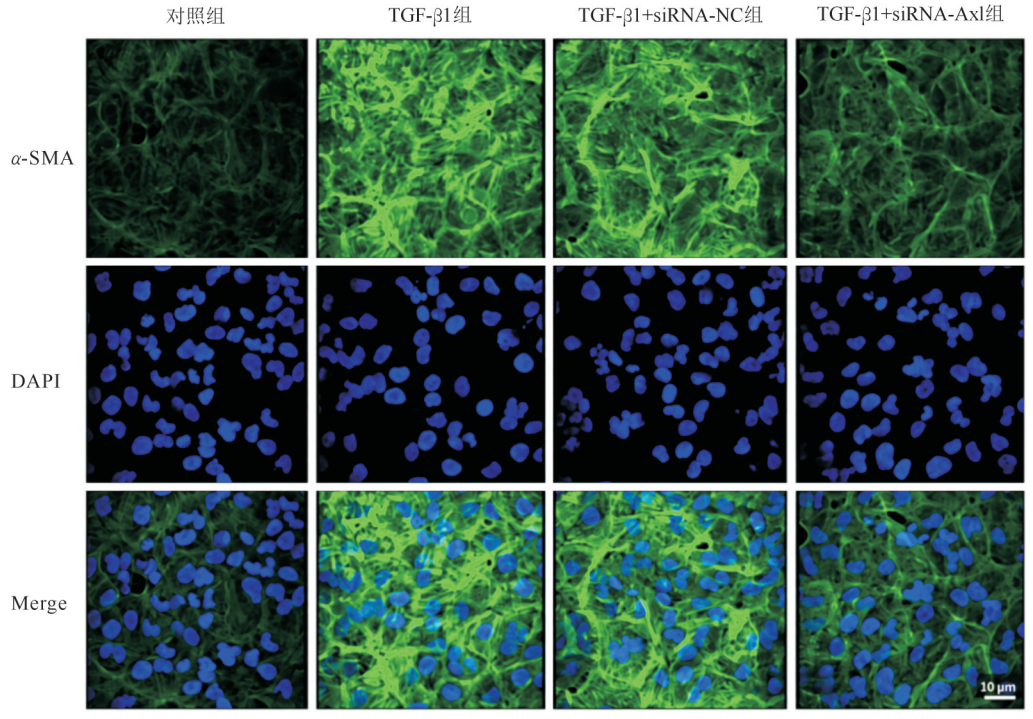
Fig 8　Comparison of COL1 and COL3 levels in HK-2 culture supernatants among the groups　8A. COL1; 8B. COL3



注：CD206 为分化簇 206；Arg-1 为精氨酸酶 1；TGF-β 为转化生长因子 β；IL-10 为白细胞介素 10；siRNA 为小干扰 RNA；NC 为阴性对照；Axl 为酪氨酸蛋白激酶受体。

图 7　各组巨噬细胞中 M2 型特异性因子蛋白表达及定量分析　7A. CD206；7B. Arg-1；7C. TGF-β；7D. IL-10

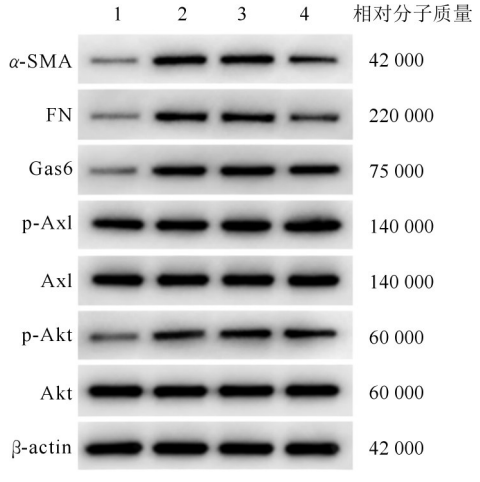
Fig 7　Protein expression and quantitative analysis of M2-specific factors in macrophages in each group　7A. CD206; 7B. Arg-1; 7C. TGF-β; 7D. IL-10



注：HK-2为人肾小管上皮细胞；α-SMA为α-平滑肌肌动蛋白；DAPI为4′,6-二脒基-2-苯基吲哚；Merge为图像叠加；Control为对照组；TGF-β1为转化生长因子β1；siRNA为小干扰RNA；NC为阴性对照；Axl为酪氨酸蛋白激酶受体。

图9　各组HK-2中α-SMA表达的比较（细胞免疫荧光染色，×100）

Fig 9　Comparison of α-SMA expression in HK-2 cells among the groups (cell immunofluorescence staining, ×100)



注：1为对照组；2为TGF-β1组；3为TGF-β1＋siRNA-NC组；4为TGF-β1＋siRNA-Axl组；HK-2为人肾小管上皮细胞；α-SMA为α-平滑肌肌动蛋白；FN为纤维连接蛋白；Gas6为生长停滞特异性蛋白6；Axl为酪氨酸蛋白激酶受体；p-Axl为磷酸化Axl；Akt为蛋白激酶B；p-Akt为磷酸化Akt；β-actin为β-肌动蛋白；TGF-β1为转化生长因子β1；siRNA为小干扰RNA；NC为阴性对照。

图10　各组HK-2中α-SMA、FN及Gas6/Axl信号通路相关蛋白的表达（蛋白质印迹法）

Fig 10　Expression of proteins related to the α-SMA, FN, and Gas6/Axl signaling pathways in HK-2 cells among the groups (Western blot)

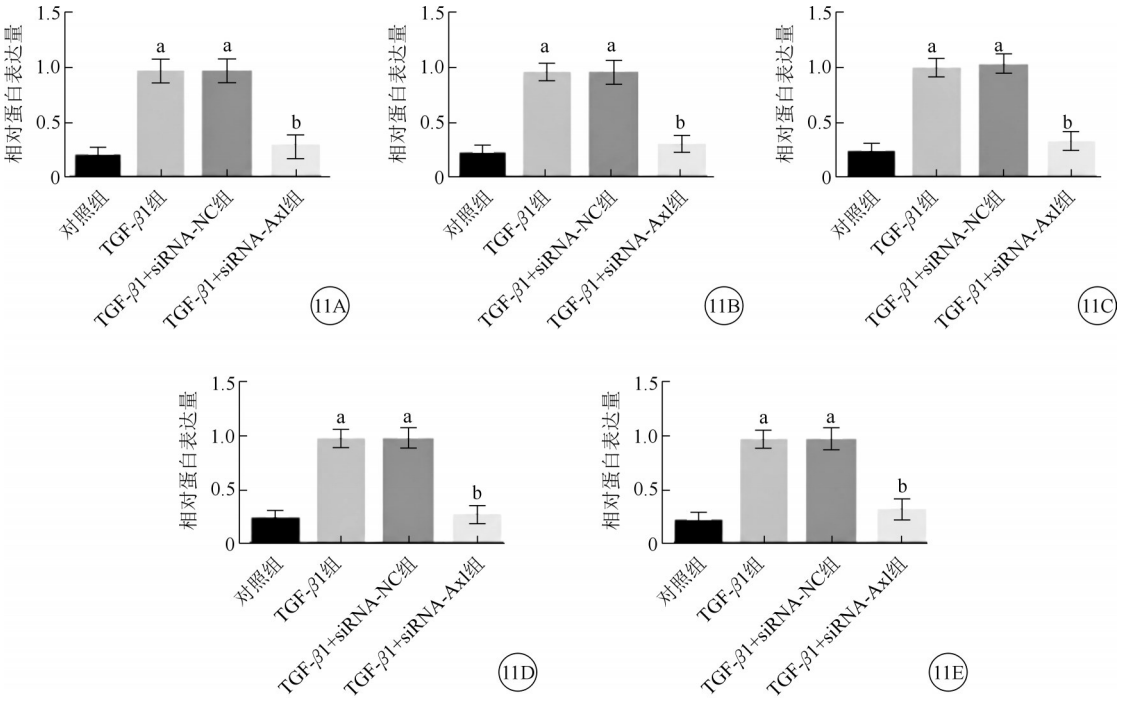
IgAN组α-SMA和FN蛋白相对表达量均显著降低，差异有统计学意义（$P<0.05$）。（图15、16）

八、各组小鼠肾脏组织中巨噬细胞向M2型极化情况比较

激光共聚焦荧光显微镜观察显示，与WT对照组相比，WT IgAN组小鼠肾脏组织中F4/80$^+$CD206$^+$ M2型巨噬细胞明显增多，差异有统计学意义（$P<0.05$）。与Axl$^{-/-}$对照组相比，Axl$^{-/-}$ IgAN组小鼠肾脏组织中F4/80$^+$CD206$^+$ M2型巨噬细胞亦明显增多，差异有统计学意义（$P<0.05$）。与WT IgAN组相比，Axl$^{-/-}$ IgAN组小鼠肾脏组织中F4/80$^+$CD206$^+$ M2型巨噬细胞明显减少，差异有统计学意义（$P<0.05$）。（图17、18）

讨　论

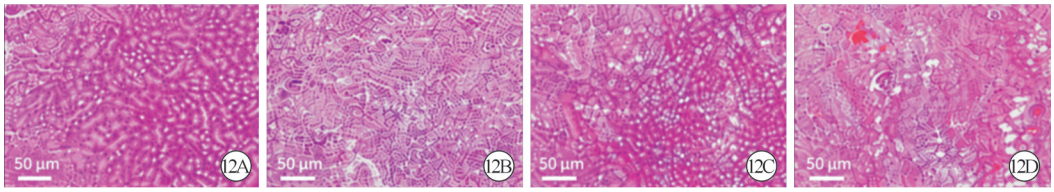
IgAN是一种常见的原发性肾小球肾炎，其临床表现具有高度异质性，且缺乏有效的治疗手段[1]。目前，关于IgAN的发病机制仍存在诸多未解之谜，但“四重打击学说”被认为是其核心理论之一，该学说指出IgA1糖基化异常、免疫复合物形成、系膜区沉积及系膜细胞反应共同作用，最终引发肾脏炎症和损伤[15]。此外，有研究发现，肾脏损伤后的修复过程可能进一步促进肾间质纤维化的发展，而肾间质纤维化是IgAN及其他进展性肾脏疾病的共同病理特征，也是其走向终末期肾病的关键机制[16]。M2



注：与对照组相比，$^{a}P<0.05$；与 TGF-β1 + siRNA-NC 组相比，$^{b}P<0.05$；HK-2 为人肾小管上皮细胞；α-SMA 为 α-平滑肌肌动蛋白；FN 为纤维连接蛋白；Gas6 为生长停滞特异性蛋白 6；Axl 为酪氨酸蛋白激酶受体；p-Axl 为磷酸化 Axl；Akt 为蛋白激酶 B；p-Akt 为磷酸化 Akt；TGF-β1 为转化生长因子 β1；siRNA 为小干扰 RNA；NC 为阴性对照。

图 11　各组 HK-2 中 α-SMA、FN 及 Gas6/Axl 信号通路相关蛋白表达的比较　11A. α-SMA；11B. FN；11C. Gas6；11D. p-Axl/Axl 比值；11E. p-Akt/Akt 比值

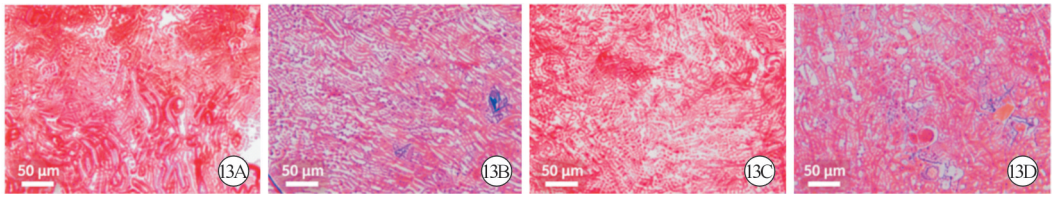
Fig 11　Comparison of protein expression related to the α-SMA, FN, and Gas6/Axl signaling pathways in HK-2 cells among the groups　11A. α-SMA; 11B. FN; 11C. Gas6; 11D. p-Axl/Axl ratio; 11E. p-Akt/Akt ratio



注：WT 为野生型；IgAN 为 IgA 肾病；$Axl^{-/-}$ 为 Axl 基因敲除；Axl 为酪氨酸蛋白激酶受体。

图 12　各组小鼠肾脏组织病理学变化比较（HE 染色，×40）　12A. WT 对照组；12B. WT IgAN 组；12C. $Axl^{-/-}$ 对照组；12D. $Axl^{-/-}$ IgAN 组

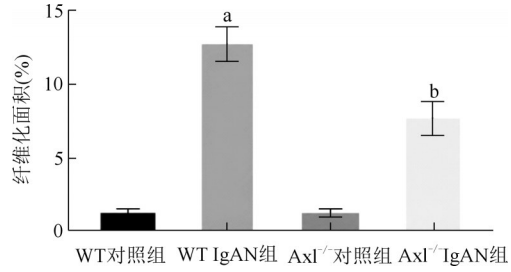
Fig 12　Comparison of renal histopathological changes in mouse tissue among the groups (HE staining, ×40)　12A. WT control group; 12B. WT IgAN group; 12C. $Axl^{-/-}$ control group; 12D. $Axl^{-/-}$ IgAN group



注：WT 为野生型；IgAN 为 IgA 肾病；$Axl^{-/-}$ 为 Axl 基因敲除；Axl 为酪氨酸蛋白激酶受体。

图 13　各组小鼠肾脏组织纤维化情况比较（Masson 染色，×40）　13A. WT 对照组；13B. WT IgAN 组；13C. $Axl^{-/-}$ 对照组；13D. $Axl^{-/-}$ IgAN 组

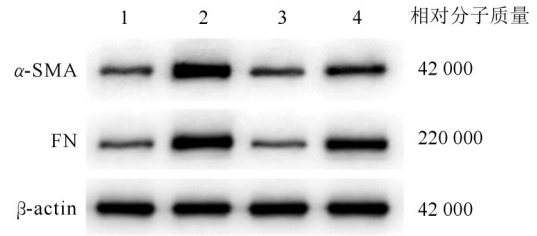
Fig 13　Comparison of renal fibrosis in mouse tissue among the groups (Masson staining, ×40)　13A. WT control group; 13B. WT IgAN group; 13C. $Axl^{-/-}$ control group; 13D. $Axl^{-/-}$ IgAN group



注：与 WT 对照组相比，$^{a}P<0.05$；与 WT IgAN 组相比，$^{b}P<0.05$；WT 为野生型；IgAN 为 IgA 肾病；Axl$^{-/-}$为 Axl 基因敲除；Axl 为酪氨酸蛋白激酶受体。

图 14　各组小鼠肾脏组织纤维化比较

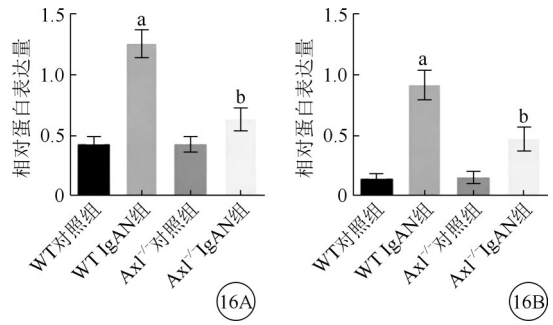
Fig 14　Comparison of renal fibrosis in mouse tissue among the groups



注：1 为 WT 对照组；2 为 WT IgAN 组；3 为 Axl$^{-/-}$对照组；4 为 Axl$^{-/-}$ IgAN 组；WT 为野生型；IgAN 为 IgA 肾病；Axl$^{-/-}$为 Axl 基因敲除；α-SMA 为 α-平滑肌肌动蛋白；FN 为纤维连接蛋白；β-actin 为 β-肌动蛋白；Axl 为酪氨酸蛋白激酶受体。

图 15　各组小鼠肾脏组织中 α-SMA 和 FN 蛋白表达（蛋白质印迹法）

Fig 15　Expression of α-SMA and FN proteins in mouse renal tissue among the groups (Western blot)



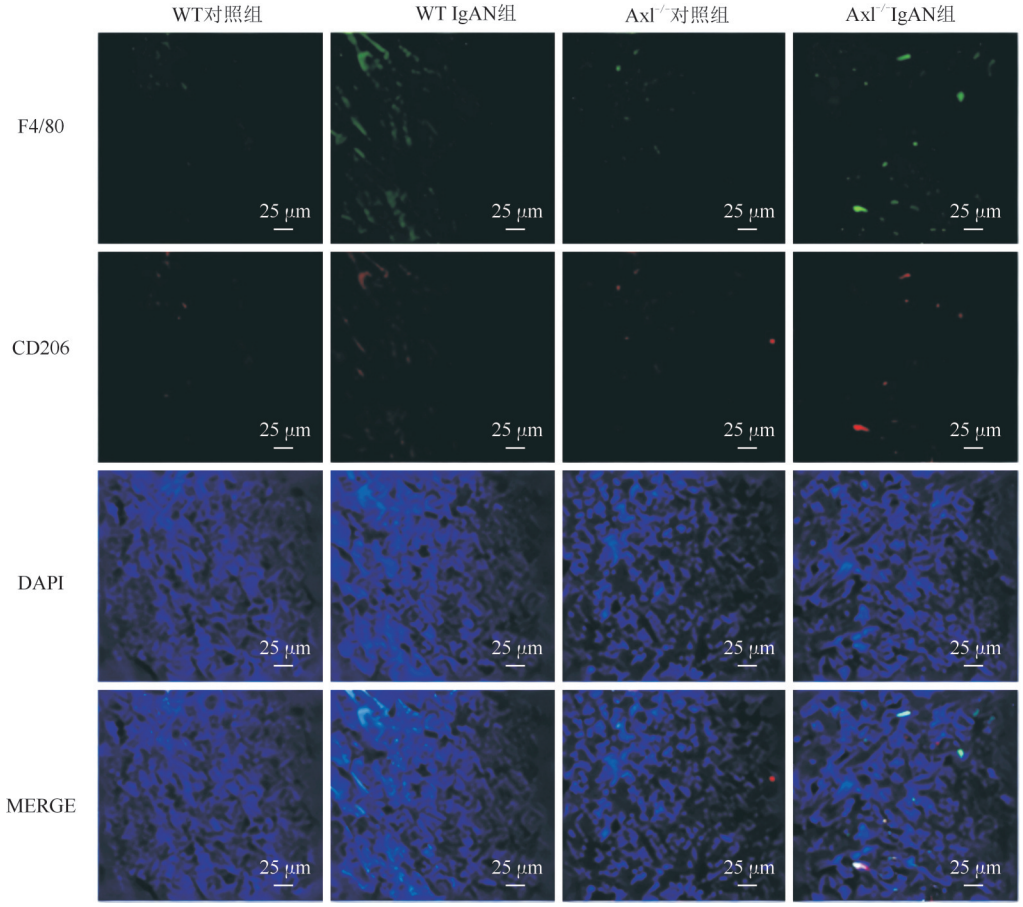
注：与 WT 对照组相比，$^{a}P<0.05$；与 WT IgAN 组相比，$^{b}P<0.05$；WT 为野生型；IgAN 为 IgA 肾病；Axl$^{-/-}$为 Axl 基因敲除；Axl 为酪氨酸蛋白激酶受体；α-SMA 为 α-平滑肌肌动蛋白；FN 为纤维连接蛋白。

图 16　各组小鼠肾脏组织中 α-SMA 和 FN 蛋白表达比较　16A. α-SMA；16B. FN

Fig 16　Comparison of α-SMA and FN protein expression in mouse renal tissue among the groups　16A. α-SMA; 16B. FN

型巨噬细胞在肾脏炎症和纤维化中发挥关键作用，其长期极化状态通过分泌 TGF-β、IL-10 等细胞因子，促进胶原沉积和间质重塑，加重肾间质纤维化[17]。因此，深入研究巨噬细胞极化调控机制，对开发 IgAN 肾间质纤维化的预防和治疗策略具有重要意义。

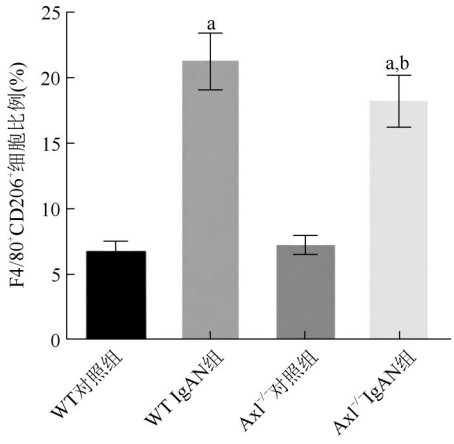
Gas6/Axl 信号通路是调控炎症反应与免疫稳态的核心分子轴，通过驱动巨噬细胞极化在多种疾病中发挥关键作用[18]。已有研究证实，该通路在不同病理背景下具有显著影响：呼吸道合胞病毒感染可诱导肺泡巨噬细胞高表达 Gas6，激活 Axl 并促使其向 M2 型转化，削弱抗菌免疫，加剧继发感染[19]。在乳腺癌（尤其是三阴性亚型）中，Gas6/Axl 信号通路通过信号转导及转录激活因子 6 转录因子促进巨噬细胞向免疫抑制性 M2 型极化，分泌 IL-10 并抑制 IL-1β，加速肿瘤进展[20]。心脏巨噬细胞中 Axl 的激活则促进 IL-1β 释放，加重心肌炎症、心室重塑和功能障碍[21]。本研究进一步证实了 Axl 在巨噬细胞极化过程中的调节作用，通过 siRNA 干扰 Axl 表达后，M0 型巨噬细胞向 M2 型极化减少，CD206、Arg-1、TGF-β、IL-10 等 M2 型巨噬细胞标志因子表达也下调，提示 Gas6/Axl 信号通路在调控巨噬细胞表型极化中发挥关键作用。与此同时，F4/80^{+}CD86^{+}标记的 M1 型巨噬细胞比例显著增加，表明 Axl 缺失使 M1/M2 平衡向 M1 偏移，可能进一步抑制促肾间质纤维化微环境的形成。在 IgAN 肾间质纤维化的进程中，一系列细胞因子和细胞外基质蛋白的异常表达共同参与了该病理改变。TGF-β1 是该过程中的核心促纤维化因子，能够诱导肾小管上皮细胞发生上皮-间质转分化，并促进成纤维细胞活化和细胞外基质成分的过度合成[22]。TGF-β1 的高表达与间质扩张、胶原沉积及肾小管萎缩密切相关，因而被视为肾间质纤维化的重要分子标志和治疗靶点[23]。α-SMA 是肌成纤维细胞的特征性标志物，正常肾脏组织中其表达水平较低，但在肾脏损伤及纤维化过程中其表达上调，并与肾间质纤维化程度呈正相关[24]。FN 作为重要的细胞外基质糖蛋白，在细胞与基质间起黏附作用，并为胶原蛋白的沉积提供结构支架，参与纤维基质的形成[25]。此外，COL1 和 COL3 是肾间质中主要的结构性胶原蛋白，其水平增加是肾间质纤维化的直接表现，过量 COL1 和 COL3 沉积可导致肾小管周围间质增宽和组织结构破坏，最终造成不可逆的肾功能损害[26]。有研究表明，Gas6 结合其受体 Axl 后可激活多条下游信号通路，其中 Akt 通路是其主要的效应通路之一，活化的 Axl 能够促进 Akt 的磷酸化，而 Akt 信号通路激活是其发挥促纤维化作用的关键分子机制[27]。本研究



注：WT为野生型；IgAN为IgA肾病；Axl$^{-/-}$为Axl基因敲除；Axl为酪氨酸蛋白激酶受体；F4/80为含表皮生长因子样模块黏蛋白样激素受体1；CD206为分化簇206；DAPI为4′,6-二脒基-2-苯基吲哚；Merge为图像叠加。

图17　各组小鼠肾脏组织中F4/80和CD206表达比较（免疫荧光染色）

Fig 17　Comparison of F4/80 and CD206 expression in mouse renal tissue among the groups (immunofluorescence staining)



注：与WT对照组相比，$^{a}P<0.05$；与WT IgAN组相比，$^{b}P<0.05$；WT为野生型；IgAN为IgA肾病；Axl$^{-/-}$为Axl基因敲除；Axl为酪氨酸蛋白激酶受体；F4/80为含表皮生长因子样模块黏蛋白样激素受体1；CD206为分化簇206。

图18　各组小鼠肾脏组织中F4/80^{+}CD206^{+}细胞比例比较

Fig 18　Comparison of the proportion of F4/80^{+}CD206^{+} cells in mouse renal tissue among the groups

结果显示，在巨噬细胞与肾小管上皮细胞HK-2共培养体系中，TGF-β1刺激可上调HK-2中α-SMA和FN蛋白的表达，促进COL1和COL3的分泌，同时Gas6蛋白表达和Akt磷酸化水平也明显上调；相反，与干扰Axl表达的巨噬细胞共培养时，α-SMA和FN蛋白表达下调，COL1和COL3的分泌减少，Gas6和p-Akt/Akt水平也下调，提示M2型巨噬细胞可能通过Gas6/Axl信号通路介导肾小管上皮细胞的纤维化反应。在既往研究中，Gas6/Axl信号通路已被证实在其他组织中通过调控巨噬细胞极化影响纤维化过程[28-29]。例如，在博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型中，巨噬细胞中Axl表达显著增强，伴随M2型巨噬细胞比例升高，而*Axl*敲除或Axl抑制剂处理则可减少巨噬细胞向M2型极化，减轻肺纤维化程度并提高小鼠生存率[30]。与体外实验结果相一致，本研究动物实验显示*Axl*基因缺失明显减轻了IgAN小鼠肾脏组织结构破坏及纤维化，抑制α-SMA和FN蛋白表达，并减少肾脏组织中M2型巨噬细胞的浸润，进一步验证了Gas6/Axl信号通路在IgAN相关肾间质纤维化中的重要调控作用。

综上所述，本研究结果表明Gas6/Axl信号通路通过促进巨噬细胞向M2型极化，增强其促纤维化功能，参与IgAN肾间质纤维化，而干扰Axl表达可抑制巨噬细胞向M2型极化，减弱其对肾小管上皮细胞的促纤维化效应，此外，$Axl^{-/-}$能够减轻IgAN小鼠肾间质纤维化程度，改善肾脏损伤。本研究结果进一步揭示了IgAN肾间质纤维化进展中的分子机制，并为延缓或抑制肾间质纤维化提供了新的治疗策略。

利益冲突　所有作者均声明没有利益冲突

参 考 文 献

[1] Xu LC, Wu CW, Li GS. Prevalence and trend of biopsy-proven IgA nephropathy in China: a systematic review[J]. J Nephrol, 2025, 38(6): 1557-1564. DOI: 10.1007/s40620-025-02261-1.

[2] Cheung CK, Alexander S, Reich HN, et al. The pathogenesis of IgA nephropathy and implications for treatment[J]. Nat Rev Nephrol, 2025, 21(1): 9-23. DOI: 10.1038/s41581-024-00885-3.

[3] Robert T, Berthelot L, Cambier A, et al. Molecular insights into the pathogenesis of IgA nephropathy[J]. Trends Mol Med, 2015, 21(12): 762-775. DOI: 10.1016/j. molmed. 2015. 10. 003.

[4] Dreher L, Nilges L, Wiech T, et al. Recent advances in pathogenetic concepts and disease modeling of IgA nephropathy[J/OL]. Clin Kidney J, 2025, 18(6): sfaf152. DOI: 10.1093/ckj/sfaf152. https://doi. org/10.1093/ckj/sfaf152.

[5] Smeijer JD, Kohan DE, Dhaun N, et al. Endothelin receptor antagonists in chronic kidney disease[J]. Nat Rev Nephrol, 2025, 21(3): 175-188. DOI: 10.1038/s41581-024-00908-z.

[6] Tang PM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. Macrophages: versatile players in renal inflammation and fibrosis[J]. Nat Rev Nephrol, 2019, 15(3): 144-158. DOI: 10.1038/s41581-019-0110-2.

[7] Liu YW, Gong Y, Xu GS. The role of mononuclear phagocyte system in IgA nephropathy: pathogenesis and prognosis[J/OL]. Front Immunol, 2023, 14: 1192941. DOI: 10.3389/fimmu. 2023.1192941. https: //doi. org/10.3389/fimmu. 2023.1192941.

[8] Liu HX, Chen WJ, Tian CY, et al. The mechanism of Shenbing Decoction II against IgA nephropathy renal fibrosis revealed by UPLC-MS/MS, network pharmacology and experimental verification[J/OL]. Heliyon, 2023, 9(11): e21997. DOI: 10.1016/j. heliyon. 2023. e21997. https: //doi. org/10.1016/j. heliyon. 2023. e21997.

[9] 杨淑芬，张玲，陆晨. 新疆地区IgA肾病尿液差异蛋白质组学分析[J]. 国际泌尿系统杂志，2019，39(1)：126-129. DOI: 10.3760/cma. j. issn. 1673-4416. 2019. 01. 036.
Yang SF, Zhang L, Lu C. Screening of urinary disease-related proteins in Xinjiang patients with IgA nephropathy based on proteomics data analysis[J]. Int J Urol Nephrol, 2019, 39(1): 126-129. DOI: 10.3760/cma. j. issn. 1673-4416. 2019. 01. 036.

[10] Yang SF, Abdulla R, Lu C, et al. Inhibition of microRNA-376b protects against renal interstitial fibrosis *via* inducing macrophage autophagy by upregulating Atg5 in mice with chronic kidney disease[J]. Kidney Blood Press Res, 2018, 43(6): 1749-1764. DOI: 10.1159/000495394.

[11] Engelsen AST, Lotsberg ML, Abou Khouzam R, et al. Dissecting the role of AXL in cancer immune escape and resistance to immune checkpoint inhibition[J/OL]. Front Immunol, 2022, 13: 869676. DOI: 10.3389/fimmu. 2022. 869676. https://doi. org/10.3389/fimmu. 2022. 869676.

[12] DeRyckere D, Huelse JM, Earp HS, et al. TAM family kinases as therapeutic targets at the interface of cancer and immunity[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2023, 20(11): 755-779. DOI: 10.1038/s41571-023-00813-7.

[13] Bian Q, Huang ZQ, Anderson JC, et al. Can the cross-talk between PDGF receptor and axl in mesangial cells represent a possible therapeutic target in IgA nephropathy : PO1806[J]. J Am Soc Nephrol, 2020, 31(10S): 564. DOI: 10.1681/asn. 2020311 0s1564a.

[14] 高明，张连栋，张莉，等. 改良大鼠IgA肾病模型建立及氧化应激状态评估[J]. 临床肾脏病杂志，2018，18(4)：243-247. DOI: 10.3969/j. issn. 1671-2390. 2018. 04. 011.
Gao M, Zhang LD, Zhang L, et al. Establishment of modified IgA nephropathy rat model and assessment of oxidative stress [J]. J Clin Nephrol, 2018, 18(4): 243-247. DOI: 10.3969/j. issn. 1671-2390. 2018. 04. 011.

[15] Rajasekaran A, Julian BA, Rizk DV. IgA nephropathy: an interesting autoimmune kidney disease[J]. Am J Med Sci, 2021, 361(2): 176-194. DOI: 10.1016/j. amjms. 2020. 10. 003.

[16] Stamellou E, Seikrit C, Tang SCW, et al. IgA nephropathy[J/OL]. Nat Rev Dis Primers, 2023, 9: 67. DOI: 10.1038/s41572-023-00476-9. https: //doi. org/10.1038/s41572-023-00476-9.

[17] Zhou X, Chen H, Hu Y, et al. Enhancer of zeste homolog 2 promotes renal fibrosis after acute kidney injury by inducing epithelial-mesenchymal transition and activation of M2 macrophage polarization[J/OL]. Cell Death Dis, 2023, 14(4): 253. DOI: 10.1038/s41419-023-05782-4. https://doi. org/10.1038/s41419-023-05782-4.

[18] Prouse T, Majumder S, Majumder R. Functions of TAM receptors and ligands protein S and Gas6 in atherosclerosis and cardiovascular disease[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(23): 12736. DOI: 10.3390/ijms252312736.

[19] Grøndal SM, Blø M, Nilsson LIH, et al. Targeting AXL cellular networks in kidney fibrosis[J/OL]. Front Immunol, 2024, 15: 1446672. DOI: 10.3389/fimmu. 2024.1446672. https: // doi. org/10.3389/fimmu. 2024.1446672

[20] Yadav M, Sharma A, Patne K, et al. AXL signaling in cancer: from molecular insights to targeted therapies[J]. Sig Transduct

Target Ther, 2025, 10(1): 37. DOI: 10.1038/s41392-024-02121-7.

[21] Chen RK, Zhang HR, Tang BT, et al. Macrophages in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and therapeutic targets [J]. Sig Transduct Target Ther, 2024, 9(1): 130. DOI: 10.1038/s41392-024-01840-1.

[22] Zhao XY, Han DH, Zhao C, et al. New insights into the role of Klotho in inflammation and fibrosis: molecular and cellular mechanisms[J/OL]. Front Immunol, 2024, 15: 1454142. DOI: 10.3389/fimmu. 2024.1454142. https: //doi. org/10.3389/fimmu.2024.1454142

[23] Liu Y, Kors L, Butter LM, et al. NLRX1 prevents M2 macrophage polarization and excessive renal fibrosis in chronic obstructive nephropathy[J/OL]. Cells, 2024, 13(1): 23. DOI: 10.3390/cells13010023. https://doi.org/10.3390/cells1301 0023.

[24] Zhou YY, Li ZL, Yu SY, et al. Iguratimod prevents renal fibrosis in unilateral ureteral obstruction model mice by suppressing M2 macrophage infiltration and macrophage-myofibroblast transition[J/OL]. Ren Fail, 2024, 46(1): 2327498. DOI: 10.1080/0886022X. 2024.2327498. https://doi. org/10.1080/0886022X.2024.2327498.

[25] Shibata T, Makino A, Ogata R, et al. Respiratory syncytial virus infection exacerbates pneumococcal pneumonia *via* Gas6/Axl-mediated macrophage polarization[J]. J Clin Invest, 2020, 130(6): 3021-3037. DOI: 10.1172/JCI125505.

[26] Phi LTH, Cheng YT, Funakoshi Y, et al. AXL promotes inflammatory breast cancer progression by regulating immunosuppressive macrophage polarization[J]. Breast Cancer Res, 2025, 27(1): 70. DOI: 10.1186/s13058-025-02015-8.

[27] Chen DQ, Feng YL, Chen L, et al. Poricoic acid A enhances melatonin inhibition of AKI-to-CKD transition by regulating Gas6/Axl-NF-κB/Nrf2 axis[J]. Free Radic Biol Med, 2019, 134: 484-497. DOI: 10.1016/j. freeradbiomed. 2019.01.046.

[28] Gifford CC, Tang JQ, Costello A, et al. Negative regulators of TGF-β1 signaling in renal fibrosis; pathological mechanisms and novel therapeutic opportunities[J]. Clin Sci (Lond), 2021, 135(2): 275-303. DOI: 10.1042/CS20201213.

[29] Kim DH, Kim HC, Im K, et al. Inhibition of AXL ameliorates pulmonary fibrosis *via* attenuation of M2 macrophage polarisation[J]. Eur Respir J, 2025, 65(6): 2400615. DOI: 10.1183/13993003.00615-2024.

[30] Poświata A, Kozik K, Miączyńska M, et al. Endocytic trafficking of GAS6-AXL complexes is associated with sustained AKT activation[J]. Cell Mol Life Sci, 2022, 79(6): 316. DOI: 10.1007/s00018-022-04312-3.

（收稿日期：2025-08-05）