

## GOLM1 基因敲除对单侧输尿管梗阻小鼠肾纤维化的影响

<https://doi.org/10.12307/2021.115>

覃健芳, 王欢, 吴冰冰, 马小京

投稿日期: 2020-04-21

送审日期: 2020-04-25

采用日期: 2020-06-12

在线日期: 2021-01-18

中图分类号:

R446; R496; R318

文章编号:

2095-4344(2021)26-04162-06

文献标识码: B

## 文章快速阅读:

创新点—探究高尔基体膜蛋白1基因在肾纤维化中的作用。

小鼠左侧肾脏行单侧输尿管结扎手术, 其右侧肾脏作为对照。

## 分组:

野生型小鼠-对照组;  
 野生型小鼠-单侧输尿管梗阻组;  
 敲除小鼠-对照组;  
 敲除小鼠-单侧输尿管梗阻组。

## 检测:

肾组织形态学变化;  
 肾组织 I 型胶原蛋白  $\alpha 1$ 、纤维连接蛋白 mRNA 的表达;  
 肾间质巨噬细胞浸润情况;  
 肾组织白细胞介素 6、肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 1 $\beta$  及趋化因子 CCL5、MCP-1 的表达。

## 文题释义:

高尔基体膜蛋白1(Golgi membrane protein 1, GOLM1): 是存在于高尔基体的一种跨膜蛋白, 它在人体组织中广泛存在, 与多种疾病密切相关, 如肝癌、肝纤维化、肾癌及前列腺癌等。

肾纤维化: 是指在各种致病因子如炎症、肾组织微环境改变等作用下, 细胞外基质过度积聚, 导致正常肾组织结构被破坏的病理过程, 是各种肾脏疾病发展到肾衰竭的共同通路。

## 摘要

背景: 高尔基体膜蛋白1在人体组织中广泛存在, 它的异常表达与癌症、病毒感染等多种疾病密切相关。研究表明, 高尔基体膜蛋白1可调控一些纤维化细胞因子, 但关于其在肾纤维化中的作用尚不清楚。

目的: 研究高尔基体膜蛋白1对单侧输尿管梗阻小鼠肾纤维化的影响。

方法: 选取6-8周龄的高尔基体膜蛋白1敲除小鼠(KO小鼠)和C57BL/6野生型小鼠(WT小鼠)各12只, 分别对小鼠左侧肾脏行单侧输尿管结扎(单侧输尿管梗阻)手术, 其右侧肾脏作为对照。单侧输尿管梗阻术后4 d取小鼠肾脏, 采用苏木精-伊红染色和Masson染色观察肾组织病理、肾纤维化程度; 流式细胞术检测肾脏巨噬细胞浸润比例; qRT-PCR检测肾组织细胞外基质成分及炎症因子mRNA表达。实验方案经上海交通大学动物实验伦理委员会批准。

结果与结论: ①WT-单侧输尿管梗阻组和KO-单侧输尿管梗阻组均可见明显肾损伤和肾纤维化, 细胞外基质成分 I 型胶原蛋白  $\alpha 1$  和纤维连接蛋白表达量显著升高, 且KO-单侧输尿管梗阻组肾损伤、肾纤维化程度及细胞外基质表达量均高于WT-单侧输尿管梗阻组( $P < 0.05$ ); WT-对照组和KO-对照组肾脏均未出现明显的肾损伤、肾纤维化及细胞外基质沉积; ②与WT-单侧输尿管梗阻组相比, KO-单侧输尿管梗阻组的巨噬细胞浸润比例显著增多( $P < 0.05$ ), 其炎症因子白细胞介素6、肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素  $1\beta$  以及趋化因子 CCL5、单核细胞趋化蛋白1 mRNA表达明显升高( $P < 0.05$ )。WT-对照组和KO-对照组肾脏巨噬细胞浸润较少, 炎症递质表达量低; ③结果说明, 高尔基体膜蛋白1在肾纤维化发展中起保护作用, 其机制可能与巨噬细胞浸润、炎症递质的调控有关。

关键词: 基因; 敲除; 蛋白; 输尿管梗阻; 肾纤维化; 细胞外基质; 炎症反应; 巨噬细胞

缩略语: 高尔基体膜蛋白1: Golgi membrane protein 1, GOLM1; 趋化因子5: C-C motif chemokine ligand 5, CCL5; 单核细胞趋化蛋白1: monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1

## Effect of GOLM1 gene knockout on renal fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction

Qin Jianfang, Wang Huan, Wu Bingbing, Ma Xiaojing

School of Life Science and Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

Qin Jianfang, Master, School of Life Science and Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

Corresponding author: Ma Xiaojing, Professor, School of Life Science and Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

上海交通大学生命科学技术学院, 上海市 200240

第一作者: 覃健芳, 女, 1997年生, 广西壮族自治区平乐县人, 2020年上海交通大学毕业, 硕士, 主要从事免疫学研究。

通讯作者: 马小京, 教授, 上海交通大学生命科学技术学院, 上海市 200240

<https://orcid.org/0000-0002-1935-3928> (覃健芳)

基金资助: 国家自然科学基金项目(31670913), 项目负责人: 马小京

引用本文: 覃健芳, 王欢, 吴冰冰, 马小京. GOLM1基因敲除对单侧输尿管梗阻小鼠肾纤维化的影响[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(26):4162-4167.



## Abstract

**BACKGROUND:** Golgi membrane protein 1 (GOLM1) is widespread in human tissues, and its abnormal expression is closely related to cancer, viral infections and other diseases. Studies have shown that GOLM1 can regulate some fibrotic cytokines, but its role in renal fibrosis is unclear.

**OBJECTIVE:** To study the potential effects of GOLM1 on renal fibrosis in mice.

**METHODS:** Twelve 6–8-week-old GOLM1 knockout mice and 12 C57BL/6 wild type mice were selected and received an operation with left ureteral obstruction. The right kidney served as a control. The mice were sacrificed on the 4<sup>th</sup> day after the operation. The kidneys of the mice were divided into four groups: WT-C, WT-UUO, KO-C and KO-UUO. Hematoxylin-eosin staining and Masson staining were used to observe the renal tissue pathology and the degree of renal fibrosis. The mRNA expression of extracellular matrix components such as type I collagen  $\alpha$ 1 and fibronectin were detected by qRT-PCR. Flow cytometry was used to detect the proportion of macrophages. The expressions of inflammatory factors were detected by qRT-PCR. The study protocol was approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Shanghai Jiaotong University.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The kidneys of the WT-UUO and KO-UUO groups showed obvious kidney injury and renal interstitial fibrosis, and the expression of type I collagen  $\alpha$ 1 and fibronectin was remarkably increased. Compared with the WT-UUO group, the KO-UUO group had significantly severer renal damage, severer inflammatory cell infiltration and higher expression of extracellular matrix components ( $P < 0.05$ ). There was no obvious renal injury, renal fibrosis, and extracellular matrix deposition in the kidneys of WT-C group and KO-C group. Compared with the WT-UUO group, the mRNA expression of interleukin-6, tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin  $\beta$ , C-C motif chemokine ligand 5 and monocyte chemoattractant protein 1 increased significantly in the KO-UUO group ( $P < 0.05$ ). Besides, the proportion of macrophage infiltration was also increased significantly in the KO-UUO group ( $P < 0.05$ ). In the two control groups, there was less macrophage infiltration and low expression of inflammatory mediators in the renal tissue. To conclude, GOLM1 plays a protective role in the development of renal fibrosis. Its mechanism may be related to macrophage infiltration and the regulation of inflammatory mediators.

**Key words:** gene; knockout; protein; ureteral obstruction; renal fibrosis; extracellular matrix; inflammation; macrophages

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 31670913 (to MXJ)

**How to cite this article:** QIN JF, WANG H, WU BB, MA XJ. Effect of GOLM1 gene knockout on renal fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2021;25(26):4162-4167.

## 0 引言 Introduction

肾纤维化是指在各种致病因子如炎症、肾组织微环境改变等作用下,细胞外基质过度积聚,导致正常肾组织结构被破坏的病理过程<sup>[1]</sup>。肾纤维化几乎是所有慢性肾脏疾病发展到末期的共同特征,随着肾纤维化的进行性发展,慢性肾脏疾病患者的肾功能逐渐恶化,并最终走向肾衰竭<sup>[2-3]</sup>。数据显示,目前全球约有2100万肾衰竭患者需依赖透析或肾脏移植维持生命,高额的治疗费用给社会和家庭带来沉重的负担。因此,研究肾纤维化的机制对于制定有效措施防止慢性肾脏疾病发展到终末期肾衰竭显得尤为重要<sup>[4]</sup>。单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)是研究肾纤维化的发生机制及其治疗措施的理想模型<sup>[5-6]</sup>。

高尔基体膜蛋白1(Golgi membrane protein 1, GOLM1),又称GP73或GOLPH2,是II型高尔基体跨膜蛋白,最初由KLADNEY等<sup>[7]</sup>在成年人巨细胞肝炎患者的肝组织cDNA文库中筛选克隆得出。GOLM1基因编码一种糖基化蛋白,相对分子质量为73000,属于GOLM1/CASC4家族。GOLM1在许多物种如大猩猩、小鼠、斑马鱼中高度保守<sup>[8]</sup>。GOLM1在人体组织中广泛存在,它的异常表达与癌症、病毒感染等多种疾病密切相关<sup>[9-14]</sup>。研究表明,GOLM1可调控一些纤维化细胞因子,如转化生长因子 $\beta$ 1、基质金属蛋白酶2及基质金属蛋白酶9等<sup>[14-16]</sup>。然而,关于GOLM1在肾纤维化中的作用尚未有报道。此次研究利用GOLM1敲除小鼠建立单侧输尿管结扎(单侧输尿管梗阻)诱导的小鼠肾纤维化模型,初步探讨GOLM1在肾纤维化中的作用及潜在的机制,并为发现慢性肾脏疾病新的治疗靶点提供基础和实验依据。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 分组对比动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2019年4至12月在上海交通大学完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 全身GOLM1<sup>-/-</sup>小鼠(KO小鼠)和C57BL/6野

生型小鼠(WT小鼠)各12只,6–8周龄,体质量18–23g。全身性GOLM1敲除小鼠,以C57BL/6为背景,使用TALEN技术对其第4外显子进行定向缺失而得,由课题组构建<sup>[17]</sup>,C57BL/6野生型小鼠购买于浙江维通利华公司,许可证号:SCXK(浙)2019-0001。

1.3.2 实验用主要试剂及仪器设备 苏木精-伊红染色试剂盒、Masson染色试剂盒(索莱宝生物科技公司产品);反转录试剂盒(Takara公司);流式荧光抗体APC-F4/80、FITC-CD11b(BD公司);Trizol(Thermo Fisher公司);荧光定量PCR引物由上海桑尼生物科技公司合成;普通PCR仪、荧光定量PCR仪(Bio-rad);多功能酶标仪(Bio-tek);离心机(Thermo);流式细胞仪C6(BD);倒置相差显微镜(Olympus);石蜡切片机(Leica)。

1.4 实验方法

1.4.1 单侧输尿管梗阻动物模型建立 WT和KO所有小鼠术前禁食12h,自由饮水。称量体质量,并以1%戊巴比妥钠(5 $\mu$ L/g)腹腔注射,对小鼠进行麻醉并切开腹部,随后分离小鼠左侧输尿管,在其中上1/3处结扎并剪断,随后逐层缝合,关闭腹腔,再次消毒切口,使用无菌敷料覆盖包扎。术后小鼠自由饮水、进食。

1.4.2 肾脏标本收集 于术后第4天麻醉小鼠后处死,切取双侧肾脏,剥离肾包膜,生理盐水冲洗后,将收集到的肾脏分为4组:WT-对照组(WT小鼠右肾)、WT-单侧输尿管梗阻组(WT小鼠左肾)、KO-对照组(WT小鼠右肾)、KO-单侧输尿管梗阻组(WT小鼠左肾)。将每一个肾脏组织分成3部分:一部分置于40g/L多聚甲醛中固定24h,经石蜡包埋后进行病理学染色,一部分立即做流式检验巨噬细胞,剩余组织保留于液氮中,用于提取RNA。

1.4.3 苏木精-伊红染色和Masson染色观察肾组织病理、肾纤维化程度 取肾脏组织标本,常规脱水、透明、浸蜡、包埋,制成石蜡切片,按照常规方法分别行苏木精-伊红染色和Masson染色,在显微镜下观察肾组织并拍照。每张切片随机选取10个不重叠视野( $\times 200$ 倍)进行分析。Masson染色结果,

实验动物造模过程的相关问题

|              |  |
|--------------|--|
| 造模目的:        | GOLM1 对单侧输尿管梗阻小鼠肾纤维化的影响  |
| 借鉴已有标准实施     | 建立单侧输尿管梗阻小鼠模型  |
| 动物造模:        |  |
| 动物来源及品系:     | C57BL/6 野生型小鼠购买于浙江维通利华公司   |
| 模型与所研究疾病的关系: | 利用 GOLM1 敲除小鼠建立单侧输尿管结扎 (单侧输尿管梗阻) 诱导的小鼠肾纤维化模型, 初步探讨 GOLM1 在肾纤维化中的作用及潜在的机制                   |
| 造模技术描述:      | 麻醉 WT 和 KO 小鼠后切开腹部, 分离小鼠左侧输尿管, 在其中上 1/3 处结扎并剪断, 随后逐层缝合, 关闭腹腔                               |
| 动物数量及分组方法:   | 取小鼠肾脏分为: WT- 对照组 (WT 小鼠右肾)、WT- 单侧输尿管梗阻组 (WT 小鼠左肾)、KO- 对照组 (WT 小鼠右肾)、KO- 单侧输尿管梗阻组 (WT 小鼠左肾) |
| 造模后实验观察指标:   | ①小鼠肾组织形态学变化; ②肾组织细胞外基质主要成分的表达; ③肾间质巨噬细胞浸润情况; ④肾组织中炎症相关细胞因子的表达                              |
| 造模后动物处理:     | 于术后第 4 天麻醉小鼠后处死, 切取双侧肾脏进行相关指标检测  |
| 伦理委员会批准:     | 实验方案经上海交通大学动物实验伦理委员会批准   |

使用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行图像分析, 以蓝色胶原沉积为阳性面积, 计算肾间质胶原沉积面积占总面积的百分比。

**1.4.4 流式细胞术检测肾脏巨噬细胞浸润比例** 将新鲜的肾组织剪碎成小块, 加入 2 mL 组织消化液 (含 2 g/L 胶原酶 D、200 mg/L DNase I), 37°C 消化 30min, 取出细胞悬液, 加入 4 mL staining buffer (PBS+2% FBS) 终止消化, 用 5 mL 注射器柄部将肾组织研磨, 70 μm 滤膜过滤, 离心 (350×g, 4°C, 5 min), 弃上清, 加入 3 mL 红细胞裂解液裂解 5 min, 加入 10 mL staining buffer 终止裂解, 离心 (350×g, 4°C, 5 min), 洗涤 2 次, 细胞重悬计数后, 用 100 μL staining buffer 制备单细胞悬液 (1×10<sup>6</sup>), 每管加入适量的细胞表面荧光抗体 APC-F4/80、FITC-CD11b, 冰上避光孵育 30 min, staining buffer 洗涤细胞, 重复 3 次, 100 μL staining buffer 重悬, 上机检测。用 Flow Jo 软件分析结果。

**1.4.5 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 检测 肾组织细胞外基质成分及炎症因子 mRNA 表达** 取出各组肾组织, 放于液氮预冷过的研钵中, 研磨成粉末, 加入 Trizol 提取肾组织总 RNA, 测定 RNA 浓度和纯度, 按试剂盒说明操作反转录为 cDNA, 加入 SYBR Green Mix、引物和水, 置入荧光定量 PCR 仪中进行扩增。扩增条件: 95°C 3 min; 95°C 15 s, 60°C 20 s, 72°C 1 min, 40 个循环; 最后 95°C 5 s, 65-95°C 5 s。各基因引物序列见表 1。

**1.5 主要观察指标** ①肾组织形态学变化; ②肾组织 I 型胶原蛋白 α1、纤维连接蛋白 mRNA 的表达; ③肾间质巨噬细胞浸润情况; ④肾组织白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 1β 及趋化因子 5 (C-C motif chemokine ligand 5, CCL5) 单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1) 的表达。

**1.6 统计学分析** 实验结果数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 t 检验法进行分析,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

表 1 | 荧光定量引物序列

Table 1 | Primer sequences for qRT-PCR

| 引物名称       | 引物序列 (5'-3')  |
|------------|---|
| GAPDH      | F: TGA TGG GTG TGA ACC ACG AG R: GCC CTT CCA CAA TGT GAA AG                 |
| I 型胶原蛋白 α1 | F: TAG GCC ATT GTG TAT GCA GC R: TAG GCC ATT GTG TAT GCA GC                 |
| 纤维连接蛋白     | F: AAG GCA ATG GGC GTA TCA C R: TGG GTC TGG GGT TGG TAA AT                  |
| 白细胞介素 6    | F: GGC GGA TCG GAT GTT GTG AT R: GGA CCC CAG ACA ATC GGT TG                 |
| 肿瘤坏死因子 α   | F: CAA AGT CAA ATC CTA CCA AAG TGA CC R: TGC TAC AGT TCC GAG CGT CAA AGA CC |
| 白细胞介素 1β   | F: AAG GAG AAC CAA GCA ACG ACA AAA R: TGG GGA ACT CTG CAG ACT CAA ACT       |
| 趋化因子 5     | F: GCT GCT TTG CCT ACC TCT CC R: TCG AGT GAC AAA CAC GAC TGC                |
| 单核细胞趋化蛋白 1 | F: TTA AAA ACC TGG ATC GGA ACC AA R: GCA TTA GCT TCA GAG TAT ACC GGT        |

2 结果 Results

**2.1 肾组织形态学变化** 苏木精-伊红染色结果显示, KO- 对照组和 WT- 对照组小鼠肾组织形态未见异常, 肾小管间质无扩大、无明显炎性细胞浸润。在单侧输尿管梗阻术后, 小鼠结扎侧肾组织, KO- 单侧输尿管梗阻组和 WT- 单侧输尿管梗阻组肾间质均出现了不同程度的水肿、存在炎性细胞的浸润, 而 KO- 单侧输尿管梗阻组小鼠肾组织相对于 WT- 单侧输尿管梗阻组而言, 这些症状更为严重 (见图 1)。Masson 染色结果显示, KO- 对照组和 WT- 对照组肾脏, 肾小球大小、形态正常, 未观察到蓝色胶原纤维沉积。而单侧输尿管梗阻组小鼠肾脏中均有蓝色胶原纤维沉积, 出现了明显的纤维化。同时, 半定量分析结果显示, 与 WT- 单侧输尿管梗阻组相比, KO- 单侧输尿管梗阻组的肾脏胶原沉积面积增加, 差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 2。

**2.2 肾组织细胞外基质主要成分的表达** I 型胶原蛋白 α1 和纤维连接蛋白是肾纤维化发生的重要特征分子。qRT-PCR 结果表明, 单侧输尿管梗阻术后, 小鼠组织中 I 型胶原蛋白 α1 和纤维连接蛋白 mRNA 表达量均明显升高, 且 KO- 单侧输尿管梗阻组表达量高于 WT- 单侧输尿管梗阻组, 差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。

**2.3 肾间质巨噬细胞浸润情况** 流式结果分析显示, WT- 对照组、KO- 对照组、WT- 单侧输尿管梗阻组、KO- 单侧输尿管梗阻组小鼠肾组织中巨噬细胞平均比例分别为 1.5%, 1.4%, 5.6%, 9.7%。与对照组相比, 单侧输尿管梗阻组肾组织中巨噬细胞增加, KO- 单侧输尿管梗阻组巨噬细胞比例最高, 较 WT- 单侧输尿管梗阻组明显增多, 差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 4。

**2.4 肾组织中炎症相关细胞因子的表达** qRT-PCR 检测炎症因子白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 1β 以及趋化因子 CCL5、MCP-1 的基因水平表达。结果显示, 单侧输尿管梗阻组表达水平较对照组均显著增加。在对照组肾组织中, 白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 1β、CCL5、MCP-1 仅有极少量表达, 而 KO- 单侧输尿管梗阻组白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 1β、CCL5、MCP-1 mRNA 的表达量均高于 WT- 单侧输尿管梗阻组, 差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 5。以上结果显示, 单侧输尿管梗阻术后, KO 小鼠出现了更为严重的炎症反应。

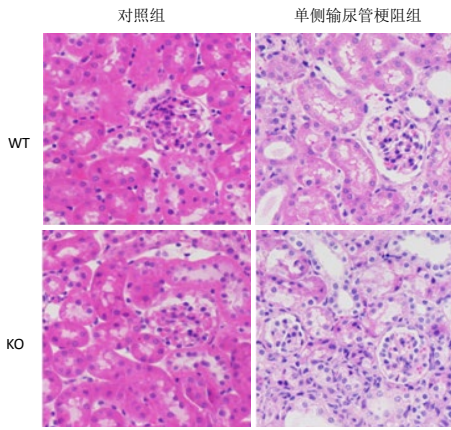
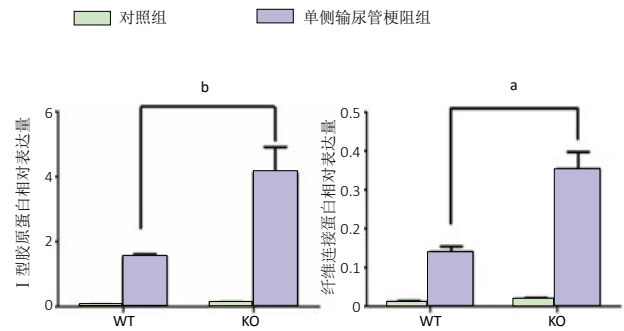


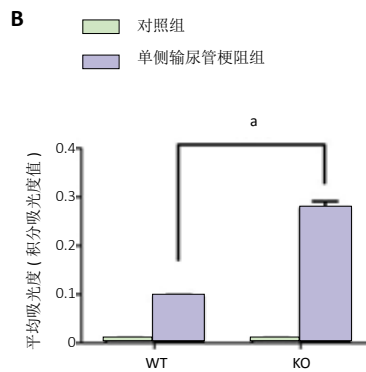
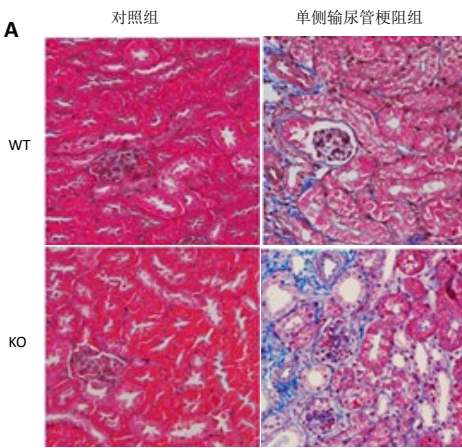
图1 | 小鼠肾脏苏木精-伊红染色结果( $\times 200$ )  
Figure 1 | Hematoxylin-eosin staining of mouse renal tissue ( $\times 200$ )

图注: KO- 单侧输尿管梗阻组小鼠肾组织水肿及炎性细胞浸润较WT- 单侧输尿管梗阻组更严重。WT: C57BL/6 野生型小鼠; KO: COLM  $1^{-/-}$  小鼠



图注: <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; <sup>b</sup> $P < 0.01$ . WT: C57BL/6 野生型小鼠; KO: COLM  $1^{-/-}$  小鼠

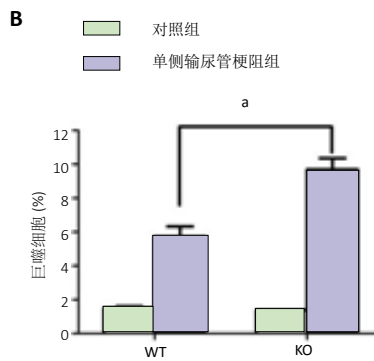
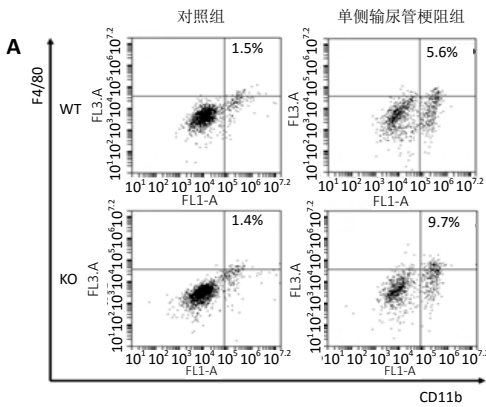
图3 | 各组小鼠肾脏 I 型胶原蛋白  $\alpha 1$  和纤维连接蛋白 mRNA 表达  
Figure 3 | The mRNA expression of type I collagen  $\alpha 1$  and fibronectin in mouse renal tissue



图注: 图 A 为各组肾组织 Masson 染色结果( $\times 200$ ); B 为半定量分析结果, <sup>a</sup> $P < 0.001$ . WT: C57BL/6 野生型小鼠; KO: COLM  $1^{-/-}$  小鼠

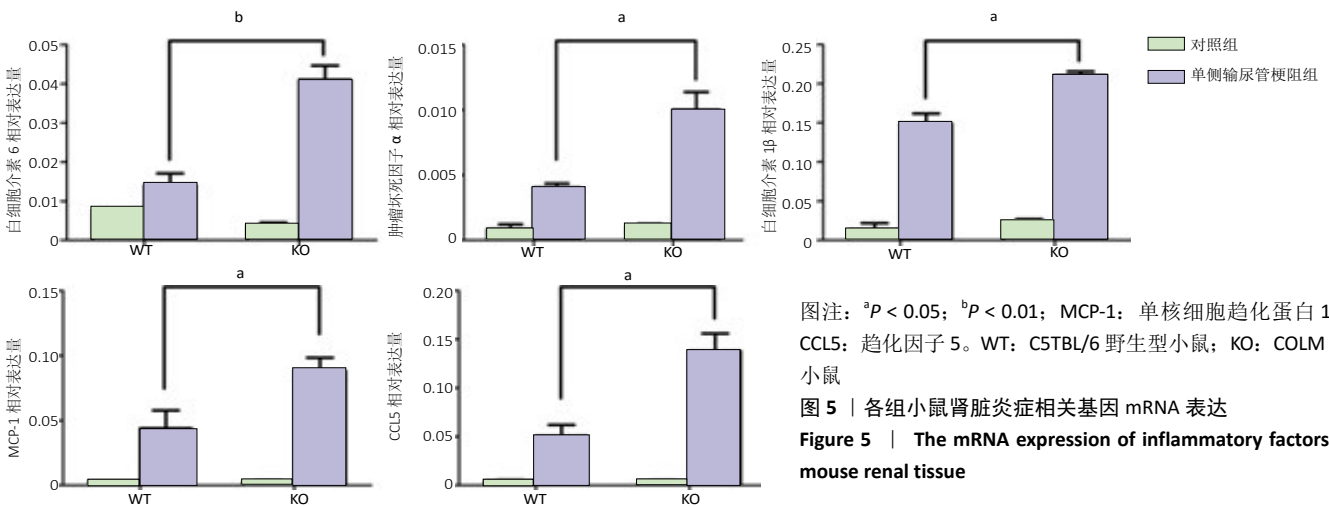
图2 | 小鼠肾脏 Masson 染色结果及其半定量分析

Figure 2 | Masson staining of mouse renal tissue and semi-quantitative analysis of collagen expression



图注: A 为流式细胞术检测各组巨噬细胞比例; B 为各组巨噬细胞百分比情况, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . WT: C57BL/6 野生型小鼠; KO: COLM  $1^{-/-}$  小鼠

图4 | 各组小鼠肾脏巨噬细胞群比例  
Figure 4 | The proportion of macrophages in mouse renal tissue



图注: <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; MCP-1: 单核细胞趋化蛋白 1; CCL5: 趋化因子 5. WT: C57BL/6 野生型小鼠; KO: COLM  $1^{-/-}$  小鼠

图5 | 各组小鼠肾脏炎症相关基因 mRNA 表达  
Figure 5 | The mRNA expression of inflammatory factors in mouse renal tissue

### 3 讨论 Discussion

随着研究的深入, GOLM1 在各种疾病中的作用及机制逐渐被解析。GOLM1 是转化生长因子  $\beta$  作用的靶分子, 可调节 Smad 和非 Smad 信号通路, 是抗肝纤维化、膀胱癌等疾病潜在的治疗靶标<sup>[16, 18-19]</sup>。在神经胶质瘤中, GOLM1 调控 PDGFA/PDGFR $\alpha$  促进 AKT 的磷酸化<sup>[20]</sup>。GOLM1 还参与 EGFR、mTOR/AKT/PI3K、Wnt/ $\beta$ -catenin 等信号通路的调节, 影响癌细胞的增殖和迁移<sup>[21-23]</sup>。GOLM1 在炎症反应中也发挥着重要的作用。在肝癌细胞系中, 过表达的 GOLM1 可激活先天性免疫信号通路和炎症小体复合物的形成<sup>[17]</sup>; GOLM1 通过激活白细胞介素 4 介导的 JAK-STAT6 通路, 抑制 LPS 介导的核因子  $\kappa$ B 通路来调控巨噬细胞的极化<sup>[24]</sup>。上述信号通路及炎症反应在肾纤维化的发展中也发挥着重要的作用。此次研究发现, GOLM1 在肾纤维化过程中发挥着抗纤维化的作用。

在此次研究中, 通过在 GOLM1 敲除小鼠和野生型小鼠中建立单侧输尿管梗阻模型诱导小鼠肾纤维化, 结果发现, 与野生型小鼠相比, GOLM1 敲除小鼠发展为更为严重的肾纤维化。小鼠肾组织病理染色结果显示, 单侧输尿管梗阻术后, GOLM1 敲除小鼠的肾组织病变程度较野生型小鼠明显加重, 且其肾脏胶原纤维沉积面积也显著增加。GOLM1 缺失后, 小鼠梗阻性肾纤维化加重, 说明 GOLM1 在肾纤维化中具有潜在的抗纤维化作用。

肾纤维化形成的主要特征是细胞外基质的沉积<sup>[25]</sup>。I 型胶原蛋白  $\alpha$ 1 和纤维连接蛋白是细胞外基质的主要成分, 常被用来评估肾纤维化程度<sup>[26]</sup>。为进一步探究 GOLM1 对肾纤维化影响, 实验检测了 I 型胶原蛋白  $\alpha$ 1 和纤维连接蛋白 mRNA 表达量。结果显示, 单侧输尿管梗阻术后, KO 组小鼠肾组织中 I 型胶原蛋白  $\alpha$ 1 和纤维连接蛋白 mRNA 表达量明显比 WT 组高, KO 组小鼠细胞外基质沉积较多。在正常组织中, I 型胶原蛋白  $\alpha$ 1 和纤维连接蛋白可维持肾组织的空间结构, 而肾损伤发生时, I 型胶原蛋白  $\alpha$ 1 和纤维连接蛋白在肾间质堆积, 降解失衡, 引起纤维化<sup>[1, 26-27]</sup>。在此次研究中, GOLM1 的缺乏导致肾组织的细胞外基质沉积增多, 因此推测在肾纤维化进程中, GOLM1 可能通过调控细胞外基质成分的降解平衡来缓解肾纤维化。

肾纤维化的病理过程较复杂, 炎症反应是肾纤维化的发展进程中的关键因素, 主要表现为免疫细胞浸润和炎症递质释放<sup>[28-29]</sup>。实验通过对各组肾组织的巨噬细胞浸润及炎症递质等情况进行检测, 探究 GOLM1 在肾纤维化发生发展中可能存在的调控机制。苏木精-伊红染色结果显示, 单侧输尿管梗阻术后, 与 WT 小鼠肾组织相比, KO 小鼠肾组织炎症细胞浸润明显增加, 该结果表明 GOLM1 敲除后, 梗阻小鼠肾间质炎症细胞分泌增多, 加剧了肾组织炎症反应。在所有致肾纤维化的炎症细胞中, 巨噬细胞是介导肾纤维化炎症反应过程的主要浸润免疫细胞<sup>[30]</sup>, 肾纤维化程度与巨噬细胞的数量密切相关<sup>[31-32]</sup>。因此, 实验使用流式细胞术检测肾纤维化组织中巨噬细胞的浸润情况, 结果显示, 单侧输尿管梗阻术

后第 4 天, 小鼠阻梗侧肾组织中巨噬细胞数量均增加, 这与之前的研究报道一致<sup>[33]</sup>; 此外, 与 WT- 单侧输尿管梗阻组相比, KO 小鼠的肾组织的巨噬细胞浸润比例显著增加。许多学者认为, 巨噬细胞的浸润加剧了肾纤维化, 巨噬细胞的耗竭可减轻纤维化程度<sup>[34-35]</sup>。此次研究中, GOLM1 敲除后, 引起了更多的巨噬细胞在肾脏中募集, 因此推测, GOLM1 可能通过抑制巨噬细胞的浸润, 从而抑制肾纤维化的发生发展。研究表明, 各亚型的巨噬细胞均参与肾纤维化过程, 且不同亚型的巨噬细胞在不同阶段发挥的作用存在差异<sup>[34, 36]</sup>。有研究显示, GOLM1 可抑制巨噬细胞 M1 型极化, 促进 M2 型极化<sup>[24]</sup>。结合此次实验结果, 在肾纤维化的早期, GOLM1 可抑制巨噬细胞浸润, 但 GOLM1 是如何调控巨噬细胞的浸润, 是否通过调控 M1/M2 极化平衡来影响肾纤维化等问题还有待后续进一步研究探讨。

在肾纤维化发展过程中, 白细胞介素 6、肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素  $1\beta$  等炎症因子及 CCL5、MCP-1 等趋化因子炎症递质的释放, 可诱发免疫细胞的浸润, 放大炎症反应<sup>[37]</sup>。在此次研究中, 单侧输尿管梗阻术后, 肾组织中白细胞介素 6、肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素  $1\beta$ 、CCL5、MCP-1 的 mRNA 表达量显著增加。此外, 与 WT- 单侧输尿管梗阻组相比, KO- 单侧输尿管梗阻组肾组织表现出更严重的肾间质炎症反应, 其炎症因子包括白细胞介素 6、肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素  $1\beta$  以及趋化因子 CCL5、MCP-1 的 mRNA 转录水平更高。以上炎症递质均可通过驱动成肌纤维细胞分化和刺激细胞外基质合成, 促进炎症反应, 导致肾组织损伤, 加剧肾纤维化<sup>[38-40]</sup>。这些结果表明, GOLM1 可通过调控炎症细胞因子的表达, 参与炎症反应, 从而调控参与肾纤维化发展过程, 该结果也进一步证实了 GOLM1 在炎症反应中的发挥的重要作用。

在此次研究中, KO- 对照组小鼠在组织病理分析、肾纤维化程度、巨噬细胞浸润以及炎症递质表达等方面与 WT- 对照组相比均无显著差异。这表明 GOLM1 敲除小鼠在正常状态下, 其肾脏组织未出现明显的病理变化。有研究表明, GOLM1 基因 C- 末端截短的小鼠与野生型小鼠相比, 存活率显著降低, 并出现了不同程度的肾脏病变, 包括局灶性节段性肾小球硬化和透明血栓形成<sup>[41]</sup>。然而, 课题组构建的 GOLM1 敲除小鼠与野生型小鼠相比无明显异常<sup>[23]</sup>。该现象有待进一步探究。

综上所述, 研究结果表明, GOLM1 敲除后加剧了单侧输尿管梗阻小鼠的肾纤维化。在肾纤维化过程中, GOLM1 对肾脏具有一定的保护作用, 其作用机制可能与抑制巨噬细胞浸润及炎症递质的释放有关, 但具体的作用机制仍待深入探究。

**作者贡献:** 研究设计为第一作者和通讯作者, 实施为全体作者, 第一作者成文, 通讯作者审核。

**经费支持:** 该文章接受了“国家自然科学基金项目 (31670913)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验方案经上海交通大学动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

[1] HUMPHREYS BD. Mechanisms of renal fibrosis. *Annu Rev Physiol.* 2018;80:309-326.

[2] WEBSTER AC, NAGLER EV, MORTON RL, et al. Chronic kidney disease. *Lancet.* 2017;389(10075):1238-1252.

[3] ROMAGNANI P, REMUZZI G, GLASSOCK R, et al. Chronic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17088.

[4] RUIZ-ORTEGA M, RAYEGO-MATEOS S, LAMAS S, et al. Targeting the progression of chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2020;16:269-288.

[5] NOGUEIRA A, PIRES MJ, OLIVEIRA PA. Pathophysiological mechanisms of renal fibrosis: a review of animal models and therapeutic strategies. *In Vivo.* 2017;31(1):1-22.

[6] CHEVALIER RL, FORBES MS, THORNHILL BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney International.* 2009;75(11):1145-1152.

[7] KLADNEY RD, BULLA GA, GUO L, et al. GP73, a novel Golgi-localized protein upregulated by viral infection. *Gene.* 2000;249(1-2):53-65.

[8] JIANG K, LI W, ZHANG Q, et al. GP73 N-glycosylation at Asn144 reduces hepatocellular carcinoma cell motility and invasiveness. *Oncotarget.* 2016;7(17):23530-23541.

[9] HU L, YAO W, WANG F, et al. GP73 is upregulated by Hepatitis C Virus (HCV) infection and enhances HCV secretion. *PLoS ONE.* 2014;9(3):e90553.

[10] YANG L, LUO P, SONG Q, et al. DNMT1/miR-200a/GOLM1 signaling pathway regulates lung adenocarcinoma cells proliferation. *Biomed Pharmacother.* 2018;99:839-847.

[11] ALLAM MA, ELTIBY DM, NASSAR Y, et al. Studying the value of golgi protein 73 as a serum marker in hepatocellular carcinoma versus alfa feto protein. *Nature and Science.* 2016;14(1):126-129.

[12] KOJIMA S, ENOKIDA H, YOSHINO H, et al. The tumor-suppressive microRNA-143/145 cluster inhibits cell migration and invasion by targeting GOLM1 in prostate cancer. *J Hum Genet.* 2014;59(2):78-87.

[13] YANG S, ZENG C, FANG X, et al. Hepatitis B virus upregulates GP73 expression by activating the HIF-2 $\alpha$  signaling pathway. *Oncol Lett.* 2018; 15(4):5264-5270.

[14] YE Q, ZHU W, ZHANG J, et al. GOLM1 modulates EGFR/RTK cell-surface recycling to drive hepatocellular carcinoma metastasis. *Cancer Cell.* 2016;30:444-458.

[15] LIU Y, ZHANG X, ZHOU S, et al. Knockdown of Golgi phosphoprotein 73 blocks the trafficking of matrix metalloproteinase-2 in hepatocellular carcinoma cells and inhibits cell invasion. *J Cell Mol Med.* 2019;23(4): 2399-2409.

[16] YANG X, WEI C, LIU N, et al. GP73, a novel TGF- $\beta$  target gene, provides selective regulation on Smad and non-Smad signaling pathways. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2019;1866(4):588-597.

[17] ZHANG X, ZHU C, WANG T, et al. GP73 represses host innate immune response to promote virus replication by facilitating MAVS and TRAF6 degradation. *PLoS Pathogens.* 2017;13(4):e1006321.

[18] LIU Y, LIEWEN H, MARKULY M, et al. A review of GOLPH2, an oncogenic protein and novel therapeutic options for GOLPH2 driven tumours. *J Translat Sci.* 2019;6:1-4.

[19] YANG H, LIU G, LIU B, et al. GP73 promotes invasion and metastasis of bladder cancer by regulating the epithelial-mesenchymal transition through the TGF- $\beta$ 1/Smad2 signalling pathway. *J Cell Mol Med.* 2018; 22(3):1650-1665.

[20] XU R, JI J, ZHANG X, et al. PDGFA/PDGFR  $\alpha$ -regulated GOLM1 promotes human glioma progression through activation of AKT. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017;36(1):193.

[21] DING X, DENG G, LIU J, et al. GOLM1 silencing inhibits the proliferation and motility of human glioblastoma cells via the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Brain Res.* 2019;1717:117-126.

[22] YAN G, RU Y, WU K, GOLM1 promotes prostate cancer progression through activating PI3K-AKT-mTOR signaling. *Prostate.* 2018;78(3): 166-177.

[23] LI XM, CAO LL. Identification of GOLM1 as a Positively Regulator of Tumor Metastasis by Regulating MMP13 in Gastric Carcinoma. *Cancer Biomark.* 2019;26(4):421-430.

[24] ZHANG W, KIM H, LV J, et al. Golgi phosphoprotein 2 is a novel regulator of IL-12 production and macrophage polarization. *J Immunol.* 2018;200(4):1480-1488.

[25] LIU Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* 2011;7(12):684-696.

[26] PILLING D, FAN T, HUANG D, et al. Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. *PLoS One.* 2009;4(10):e7475.

[27] DISTLER JHW, GYÖRFI A, RAMANUJAM M, et al. Shared and distinct mechanisms of fibrosis. *Nat Rev Rheumatol.* 2019;15:705-730.

[28] NOGUEIRA A, PORES MJ, OLIVEIRA P. Pathophysiological mechanisms of renal fibrosis: a review of animal models and therapeutic strategies. *In Vivo.* 2017;31(1):1-22.

[29] BLACK LM, LEVER JM, AGARWAL A. Renal Inflammation and Fibrosis: A Double-edged Sword. *J Histochem Cytochem.* 2019;67(9):663-681.

[30] HUEN SC, CANTLEY LG. Macrophages in Renal Injury and Repair. *Annu Rev Physiol.* 2017;79:449-469.

[31] KLUTH DC. Pro-resolution properties of macrophages in renal injury. *Kidney Int.* 2007;72(3):234-236.

[32] HUANG L, WANG AM, HAO Y, et al. Macrophage Depletion Lowered Blood Pressure and Attenuated Hypertensive Renal Injury and Fibrosis. *Front Physiol.* 2018;9:473.

[33] MARTÍNEZ-KLIMOVA E, APARICIO-TREJO OE, TAPIA E, et al. Unilateral ureteral obstruction as a model to investigate fibrosis-attenuating treatments. *Biomolecules.* 2019;9(4):141.

[34] TANG PM, NIKOLIC-PATERSON DJ, LAN H. Macrophages: versatile players in renal inflammation and fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* 2019; 15(3):144-158.

[35] LU H, WU L, LIU L. Quercetin ameliorates kidney injury and fibrosis by modulating M1/M2 macrophage polarization. *Biochem Pharmacol.* 2018;154:203-212.

[36] SATO Y, YANAGITA M. Immune cells and inflammation in AKI to CKD progression. *Am J Physiol Ren Physiol.* 2018;315:F1501-F1512.

[37] LV W, BOOZ GW, WANG Y, et al. Inflammation and renal fibrosis: recent developments on key signaling molecules as potential therapeutic targets. *Eur J Pharmacol.* 2018;820:65-76.

[38] GRANDE MT, PÉREZ-BARRIOCANAL F, LÓPEZ-NOVOA JM. Role of inflammation in túbulo-interstitial damage associated to obstructive nephropathy. *J Inflamm (Lond).* 2010;7:19.

[39] LIANG H, XU F, WEN X, et al. Interleukin-33 signaling contributes to renal fibrosis following ischemia reperfusion. *Eur J Pharmacol.* 2017;812:18-27.

[40] MAEL-AININ M, ABED A, CONWAY SJ, et al. Inhibition of periostin expression protects against the development of renal inflammation and fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(8):1724-1736.

[41] WRIGHT LM, YONG S, PICKEN MM, et al. Decreased survival and hepato-renal pathology in mice with c-terminally truncated GP73 (GOLPH2). *Int J Clin Exp Pathol.* 2009;2(1):34-47.

(责任编辑: WZH, ZN, TXY)