

# 小鼠肾缺血再灌注损伤与自噬相关的差异表达基因分析及其靶基因网络构建

谢隆宇, 钟毅, 刘磊, 闵洁煜, 安丽\*

贵州医科大学附属医院麻醉科, 贵州贵阳 550004

[中图分类号] R692 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.1921.2025.0918

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 谢隆宇, 钟毅, 刘磊, 等. 小鼠肾缺血再灌注损伤与自噬相关的差异表达基因分析及其靶基因网络构建[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(12): 1567-1576.

[收稿日期] 2024-11-23 [录用日期] 2025-06-11 [上线日期] 2025-09-18

**[摘要]** **目的** 筛选肾缺血再灌注损伤中自噬相关的枢纽基因并分析其生物学功能, 以探究其发病机制。**方法** 将12只小鼠随机分为对照组与缺血再灌注组( $n=6$ ); 取两组小鼠肾组织进行转录组测序, 测序数据经质量控制过滤后筛选两组间的差异表达基因(DEGs), 将其与自噬相关基因(ATG)取交集得到自噬相关DEGs(ATG-DEGs), 再通过Cytoscape中4种算法筛选排名靠前的ATG-DEGs作为枢纽基因, 对后者进行单基因富集分析(GSEA)。从美国基因表达综合(GEO)数据库下载小鼠肾缺血再灌注损伤相关的两个基因表达数据集, 行单细胞RNA-seq分析, 分析在单细胞水平上的关键基因, 并进行免疫浸润分析。采用qRT-PCR检测小鼠枢纽基因的表达水平。**结果** 两组小鼠的DEGs 672个, 基因本体分析(GO)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)富集分析结果提示DEGs可能与自噬相关, 共获取6个枢纽基因, 即吞噬细胞糖蛋白-1(*Cd44*)、整联蛋白 $\alpha$ M(*Itgam*)、整联蛋白 $\alpha$ X(*Itgax*)、激酶插入域受体(*Kdr*)、分泌型磷蛋白1(*SPP1*)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(*GAPDH*)均与氧化应激、炎症反应、凋亡通路、免疫反应等信号通路有关。基于GEO数据库下载的小鼠RIRI相关数据, 在单细胞转录组中, 缺血再灌注组2个枢纽基因(*Cd44*、*Itgam*)在中性粒细胞、巨噬细胞、成纤维细胞中高表达高于对照组( $P<0.05$ ), 且*Cd44*<sup>+</sup>的中性粒细胞和*Itgam*<sup>+</sup>的巨噬细胞有着更活跃的细胞通信; 免疫浸润结果显示, *Cd44*和*Itgam*在缺血再灌注组中性粒细胞和巨噬细胞相关性高于对照组。qRT-PCR检测结果显示, 缺血再灌注组小鼠*Cd44*、*Itgam*基因表达水平明显高于对照组( $P<0.05$ )。**结论** *Cd44*和*Itgam*是小鼠肾缺血再灌注损伤中自噬相关的枢纽基因, 可能成为肾缺血再灌注损伤防治的新标志物。

**[关键词]** 肾缺血再灌注损伤; 生物信息学; 枢纽基因; 吞噬细胞糖蛋白-1; 整联蛋白 $\alpha$ M

## Analysis of autophagy-related differentially expressed genes in murine renal ischemia-reperfusion injury and network construction of target genes

Xie Long-Yu, Zhong Yi, Liu Lei, Min Jie-Yu, An Li\*

Department of Anesthesiology, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China

\*Corresponding author, E-mail: al12341009@163.com

This work was supported by the Project for the Growth of Young Scientific and Technological Talents in Regular Higher Education Institutions of Guizhou Province (QJHKYZ2022234), and the Key Laboratory Fund of Guizhou Medical University (2024fy003)

**[Abstract]** **Objective** To screen autophagy-related hub genes in renal ischemia-reperfusion injury (RIRI) and analyze their biological functions to investigate the pathogenesis of RIRI. **Methods** Twelve ICR mice were randomly assigned to control group and RIRI group ( $n=6$  per group). Renal tissues from both groups were subjected to transcriptome sequencing. After quality control filtering, differentially expressed genes (DEGs) between the two groups were identified. The intersection of these DEGs with autophagy-related genes (ATGs) yielded autophagy-related DEGs (ATG-DEGs). Hub genes were selected as the top-ranked ATG-

**[基金项目]** 贵州省普通高等学校青年科技人才成长项目(黔教合KY字[2022]234号); 贵州医科大学校级重点实验室基金([2024]fy003)

**[作者简介]** 谢隆宇, 硕士研究生, 主要从事肾缺血再灌注损伤方面的研究

**[通信作者]** 安丽, E-mail: al12341009@163.com

DEGs using four algorithms in Cytohubba. Gene set enrichment analysis (GSEA) was performed for the hub genes. Two murine RIRI-related gene expression datasets were downloaded from the Gene Expression Omnibus (GEO) database for single-cell RNA-seq analysis to identify key genes at the single-cell level, followed by immune infiltration analysis. Finally, the expression levels of hub genes in mice were detected using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results** A total of 672 DEGs were identified between the two groups. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses suggested that these DEGs might be associated with autophagy. Six hub genes were identified: phagocytic glycoprotein-1 (*Cd44*), integrin subunit alpha M (*Itgam*), integrin subunit alpha X (*Itgax*), kinase insert domain receptor (*Kdr*), secreted phosphoprotein 1 (*SPP1*), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*). These genes were involved in signaling pathways related to oxidative stress, inflammatory response, apoptosis, and immune response. Based on the murine RIRI-related data downloaded from the GEO database, single-cell transcriptome analysis revealed that two hub genes (*Cd44* and *Itgam*) were highly expressed in neutrophils, macrophages, and fibroblasts in RIRI group compared with control group ( $P < 0.05$ ).  $Cd44^+$  neutrophils and  $Itgam^+$  macrophages exhibited more active cell communication. Immune infiltration results showed the correlations of *Cd44* and *Itgam* with neutrophils and macrophages were higher in RIRI group than those in control group. qRT-PCR results confirmed that the expression levels of *Cd44* and *Itgam* were significantly higher in RIRI group than those in control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** *Cd44* and *Itgam* are autophagy-related hub genes in murine RIRI and may serve as novel biomarkers for the prevention and treatment of RIRI.

**[Key words]** renal ischemia-reperfusion injury; bioinformatics analysis; hub genes; phagocytic glycoprotein-1; integrin subunit alpha M

肾缺血再灌注损伤 (renal ischemia-reperfusion injury, RIRI) 是急性肾损伤、肾移植手术及心肺复苏术后常关注的病理过程<sup>[1]</sup>, 如何减轻缺血再灌注损伤 (ischemia-reperfusion injury, IRI) 是临床关注的焦点。RIRI 病理过程复杂, 涉及多种生物学途径, 其具体机制尚未阐明。一般认为, 炎症反应、氧化损伤和内皮功能障碍是 RIRI 的常见原因<sup>[2]</sup>。故 RIRI 防治相关研究侧重于清除活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、减轻炎症或促进细胞存活和再生、细胞治疗、药物治疗和缺血预处理等<sup>[3-4]</sup>。

自噬 (autophagy) 是一种高度保守的细胞过程, 指细胞通过形成双层膜结构的自噬体, 将部分胞质和细胞内需要降解的细胞器、蛋白质等成分包裹起来, 与溶酶体融合形成自噬溶酶体从而降解内容物, 以实现细胞本身的代谢需求以及促进某些细胞器的更新<sup>[5-6]</sup>。有研究报道, RIRI 可激活自噬, 适度的自噬可降解细胞内异常的蛋白质及细胞器, 防止有害物质积累, 对细胞生存起保护作用; 但过度的自噬则会损伤细胞器, 使其转化为自噬性细胞死亡<sup>[7]</sup>。目前, RIRI 患者肾组织自噬的决定因素及相关基因的探索已成为热点。本研究对 RIRI 模型小鼠和正常对照小鼠进行转录组测序, 并进行生物信息学分析, 以探寻 RIRI 与自噬相互作用的病理学机制及自噬途径中的特定靶基因, 旨在为 RIRI 防治的相关研究提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 RNA 数据处理和数据集采集

#### 1.1.1 RIRI 小鼠模型构建 12 只 6~8 周龄 ICR 小鼠

采用随机数表法分为对照组与缺血再灌注组, 每组 6 只。缺血再灌注组小鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (60 mg/kg) 麻醉, 备皮固定, 70% 乙醇常规消毒皮肤, 取腹正中切口上至剑突, 下至耻骨联合上缘, 暴露双侧肾; 结扎右侧肾蒂, 切除右肾。腹腔内给予肝素, 致全身肝素化。稳定数分钟后迅速分离出左肾蒂, 无创动脉夹持续夹闭左侧肾蒂造成肾缺血, 肾颜色由鲜红色逐渐转为暗紫色, 提示夹闭成功。暂时关闭切口, 无菌凡士林纱布覆盖创面, 防止水分丧失。持续夹闭相应时间后松开动脉夹, 恢复血流, 肾颜色由暗紫色逐渐恢复为鲜红色, 提示再灌注处理成功, 逐层缝合腹壁。皮下注射生理盐水 0.4 ml, 以补充术中丢失水分。对照组小鼠与缺血再灌注组同样进行麻醉、切除右肾及分离左侧肾脏和肾蒂的操作, 但不进行夹闭。待小鼠清醒后放回鼠笼, 自由进食和水。本研究获贵州医科大学实验动物伦理委员会审批 (2403451)。

**1.1.2 转录组 RNA 数据处理与 HE 染色** 24 h 后提取两组小鼠肾组织样本中的 RNA, 并按照试剂盒说明书要求采用层析柱法进一步分离和纯化。使用 Qubit 2.0 Fluorometer 进行初步定量, 随后使用 Agilent 2100 生物芯片分析系统对文库的插入片段 (insert size) 进行检测, 采用美国 Illumina Novaseq 6000 测序平台对文库进行测序, 并生成 150 bp 双端序列; 采用 FastQC (v0.11.9) 质控软件进行过滤, 去除低质量的序列后获得待分析数据。采用 RNA 序列比对软件 HISAT2 (v2.0.5) 进行参考基因组比对, 并计算基因表达量 (FPKM), 通过 FeatureCounts (1.5.0-p3) 获得每个基因的序列计数值。

摘取小鼠肾脏后,于肾门处沿矢状面剖开,取部分肾组织置于4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液中固定24 h。经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后,以4  $\mu\text{m}$ 厚度连续切片。样品脱水脱亲和后进行HE染色。在光学显微镜(Eclipse Ci-L,日本尼康公司)下观察载玻片,并采集图像。

此外,从美国基因表达综合(Gene Expression Omnibus, GEO)数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中以“小鼠肾缺血再灌注损伤”为关键词检索高通量数据,下载获得GSE39548<sup>[8]</sup>数据集(筛选正常小鼠肾脏样本与RIRI小鼠样本各4例)、GSE161201<sup>[9]</sup>单细胞数据集(包含正常小鼠肾脏样本和再灌注6、24 h的RIRI小鼠样本各1例)。此外,从GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)中获得3244个鼠源相关的自噬基因(ATGs)。

**1.2 差异表达基因(DEGs)的筛选和功能富集分析** 对缺血再灌注组和对照组样品进行主成分分析(PCA),以评估每个样品的生物学重复是否一致;再采用R软件(v4.3.3)中的DESeq2包进行基因差异表达分析,阈值为 $|\log_2$ 差异倍数(FC)|>1和 $P<0.05$ ,获取DEGs;利用“clusterProfiler”软件包通过基因本体分析(GO)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)富集分析对DEGs进行功能分析,过滤标准为 $P<0.05$ 。

**1.3 自噬相关差异表达基因(ATG-DEGs)的鉴定和蛋白互作网络(PPI)的建立** 进一步鉴定与RIRI相关的ATGs,对DEGs和3244个ATGs取交集;从STRING(<http://string-db.org>)在线数据库获取PPI网络<sup>[10]</sup>,并通过Cytoscape软件(v3.10.1)中的Cytohubba进行4种算法计算以识别关键的PPI网络模块,再将4种算法[最大团中心性算法(MNC)、最大领域成分算法(MCC)、度中心线算法(Degree)、应力中心性算法(Stress)]得到的基因取交集,重叠的基因认为枢纽基因。

**1.4 小鼠RIRI中自噬相关枢纽基因的转录因子(transcription factor, TF)预测** 将枢纽基因作为输入数据,使用NetworkAnalyst数据库<sup>[11]</sup>预测相互作用的TF因子,构建枢纽基因-转录因子(hub gene-TF)相互作用的基因调控网络。

**1.5 小鼠RIRI中自噬相关枢纽基因的基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analyses, GSEA)** 在GSE39548数据集的缺血再灌注组中进行单基因GSEA分析。GSEA是一种计算方法,用于分析特定基因集在两种生物状态之间是否具有统计学差异,通常用于估计表达数据集中通路和生物过程的变化。根据枢纽基因的中位表达水平分为高表达组与低表达组,用基因集“m2.cp.v2023.2.Mm.entrez.gmt”进行分析,以确定其密切相关通路。

**1.6 单细胞转录组数据的收集与预处理** 小鼠单细胞数据集GSE161201包含正常肾样本、肾缺血再灌注6 h和肾缺血再灌注24 h的RIRI样本各1例<sup>[9]</sup>。使用Seurat R和Harmony R软件包处理和整合单细胞转录组数据。使用自定义标准对数据进行过滤(保留基因数目在200~4000,线粒体基因比例<30%的细胞),应用NormalizeData对数据进行归一化。

**1.7 小鼠RIRI中自噬相关枢纽基因数据的降维、聚类、可视化和细胞类型识别** 在R软件中,使用Seurat对scRNA-seq进行降维聚类和可视化,使用FindVariableFeatures函数选择2000个高变基因作为特征值。对单细胞样品进行PCA分析,选取前10个主成分(PC)使用FindNeighbors、FindClusters和RunTSNE分析。然后利用cellmarker数据库和已有研究取得的标记基因进行不同细胞簇的手动细胞注释。

**1.8 小鼠RIRI中自噬相关枢纽基因的细胞通信和拟时序分析** 使用R包CellChat([www.cellchat.org](http://www.cellchat.org))进行细胞间通信分析,在缺血再灌注组中根据吞噬细胞糖蛋白-1(phagocytic glycoprotein-1, Cd44)在中性粒细胞和整联蛋白 $\alpha\text{M}$ (integrin subunit alpha M, Itgam)在巨噬细胞是否表达分为Cd44<sup>+</sup>N(Cd44在中性粒细胞表达)、Cd44<sup>-</sup>N(Cd44在中性粒细胞不表达)和Itgam<sup>+</sup>M(Itgam在巨噬细胞表达)、Itgam<sup>-</sup>M(Itgam在巨噬细胞不表达),并用Seurat包进行拟时序分析。

**1.9 小鼠RIRI中自噬相关枢纽基因的免疫细胞浸润分析** 在R软件中,使用mMCP-counter包来推断对照组和缺血再灌注组中各样本及枢纽基因与13种免疫细胞的相关性,应用Corrplot软件包绘制相关热图,可视化13种免疫细胞浸润的相关性。进一步利用ggplot2软件包可视化枢纽基因与免疫细胞的相关性。

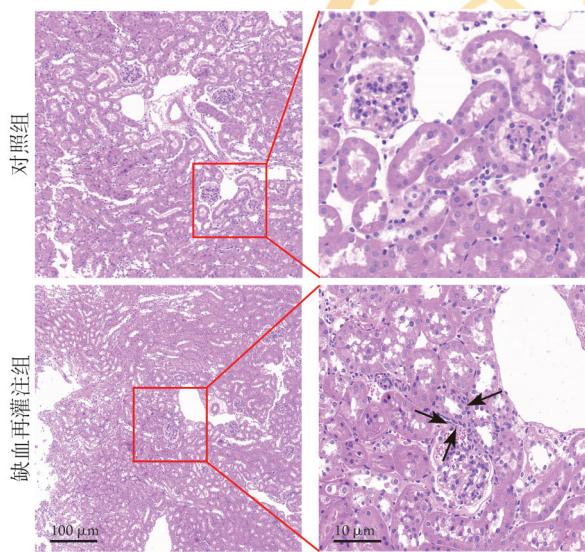
**1.10 qRT-PCR检测小鼠RIRI中自噬相关枢纽基因的表达水平** 取对照组与缺血再灌注组小鼠适量肾组织,加入研磨珠和RNA提取液,用冷冻研磨仪充分研磨,提取总RNA并测定其浓度,按照反转录试剂盒说明书合成cDNA后进行qRT-PCR,应用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法对基因进行相对定量分析。引物序列(由上海生工生物科技有限公司合成):Cd44,上游5'-ACTTTGCTCTTTGTCAGTTGAG-3',下游5'-TTTCTCCACATGGAATACACCTG-3';Itgam,上游5'-CCATGACCTTCAAGAGAATG-3',下游5'-ACCGGCTTGTGCTGTGTA GT-3';甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(GAPDH),上游5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3',下游5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATCG-3'。PCR条件:95℃预变性30 s,95℃变性3 s,60℃退火延伸20 s;共40个循环。

**1.11 统计学处理** 采用R软件4.3.3版本进行统计

分析和生物信息学分析。计量资料使用 D'Agostino-Pearson 正态性检验法检测数据分布的正态性,若数据符合正态分布以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间均数比较采用独立样本  $t$  检验;计量资料不符合正态分布则以  $M(Q_1, Q_3)$  表示,采用 Wilcoxon 检验并采用贝叶斯方法来控制错误发现率。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 RIRI 小鼠肾组织病理学变化** RIRI 模型建立成功 24 h 后, HE 染色结果显示,对照组小鼠肾组织结构清晰完整,肾小管细胞排列整齐,细胞核位于中央无明显异常;缺血再灌注组小鼠肾组织紊乱,小管细胞排列不规则,细胞核位置偏移增多,核仁欠清晰,间质水肿,可见炎性细胞浸润(图 1)。



缺血再灌注组箭头示肾组织间质水肿,细胞核偏位

图 1 两组间小鼠肾组织病理变化对比(HE 染色)

Fig. 1 Comparison of pathological changes in renal tissues between two groups of mice (HE staining)

**2.2 RIRI 模型小鼠 DEGs 的鉴定和功能富集分析** 小鼠转录组 RNA 序列的 PCA 结果显示,两组小鼠肾组织样本之间界限清晰,组内样本模型聚类结果提示两组样本重复性较好;通过 DESeq2 包筛选出满足  $|\log_2FC| > 1$  且  $P < 0.05$  的 DEGs 672 个,其中上调基因 327 个,下调基因 345 个(附图 1, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.1921.2025.0918FJ>)。GO 富集分析显示,生物进程(BP)包括白细胞游走、趋化、免疫反应介导的免疫球蛋白的产生、细胞基质的黏附等,分子功能(MF)包括细胞外基质、肽酶调节活性、整合素结合、糖胺聚糖结合、免疫球蛋白受体结合、细胞因子受体配体结合等,细胞组分(CC)包括细胞外基质、顶端质膜、细胞黏附受体复合物等;KEGG 富集分析显示,主要通路包括细胞黏附分子、

细胞因子配体受体的相互作用、自噬等(附图 2, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.1921.2025.0918FJ>)。

**2.3 RIRI 模型小鼠自噬相关枢纽基因的选择及 PPI 网络的构建** 将上述 672 个 DEGs 与 3270 个 ATGs 取交集,得到 79 个交叉基因;再将其输入 STRING 数据库,并导入 Cytoscape 软件,采用 Cytohubba 中 4 种算法继续进行枢纽基因的筛选;将 4 种算法得到的基因取交集得到 6 个枢纽基因: *Cd44*、*Itgam*、激酶插入域受体(*Kdr*)、分泌型磷蛋白 1(*SPP1*)、整联蛋白  $\alpha X$ (*Itgax*)、*GAPDH*(附图 1, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.1921.2025.0918FJ>)。

**2.4 Gene-TF 预测结果** 预测上述 6 个枢纽基因与 TF 相互作用网络,结果显示, *Foxc1* 是 *Cd44* 与 *Kdr* 间的调控因子; *Foxa1*、*Serbf2* 是 *Kdr* 与 *Itgam* 间的调控因子; *Serbf2*、*Stat3* 是 *Kdr* 与 *GAPDH* 间的调控因子; *Cebpb*、*Jun* 是 *GAPDH* 与 *Itgax* 间的调控因子; *Nfkb1* 是 *GAPDH* 与 *Spp1* 间的调控因子等。这些网络中的调控因子可能成为 RIRI 的潜在治疗靶点(附图 1, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.1921.2025.0918FJ>)。

**2.5 小鼠 RIRI 中自噬相关枢纽基因的单基因 GSEA 分析** 由于上述 6 个枢纽基因在 RIRI 中的作用尚不明确,故利用单基因 GSEA 预测其潜在通路。结果显示,高表达的枢纽基因与 RIRI 过程中的氧化应激、炎症反应、凋亡通路和免疫反应通路的激活有关,如 MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、核因子  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) 信号通路、免疫系统中的信号因子等。这些通路都在高表达组中富集,提示枢纽基因可能通过促进这些通路发挥作用(附图 3, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.1921.2025.0918FJ>)。

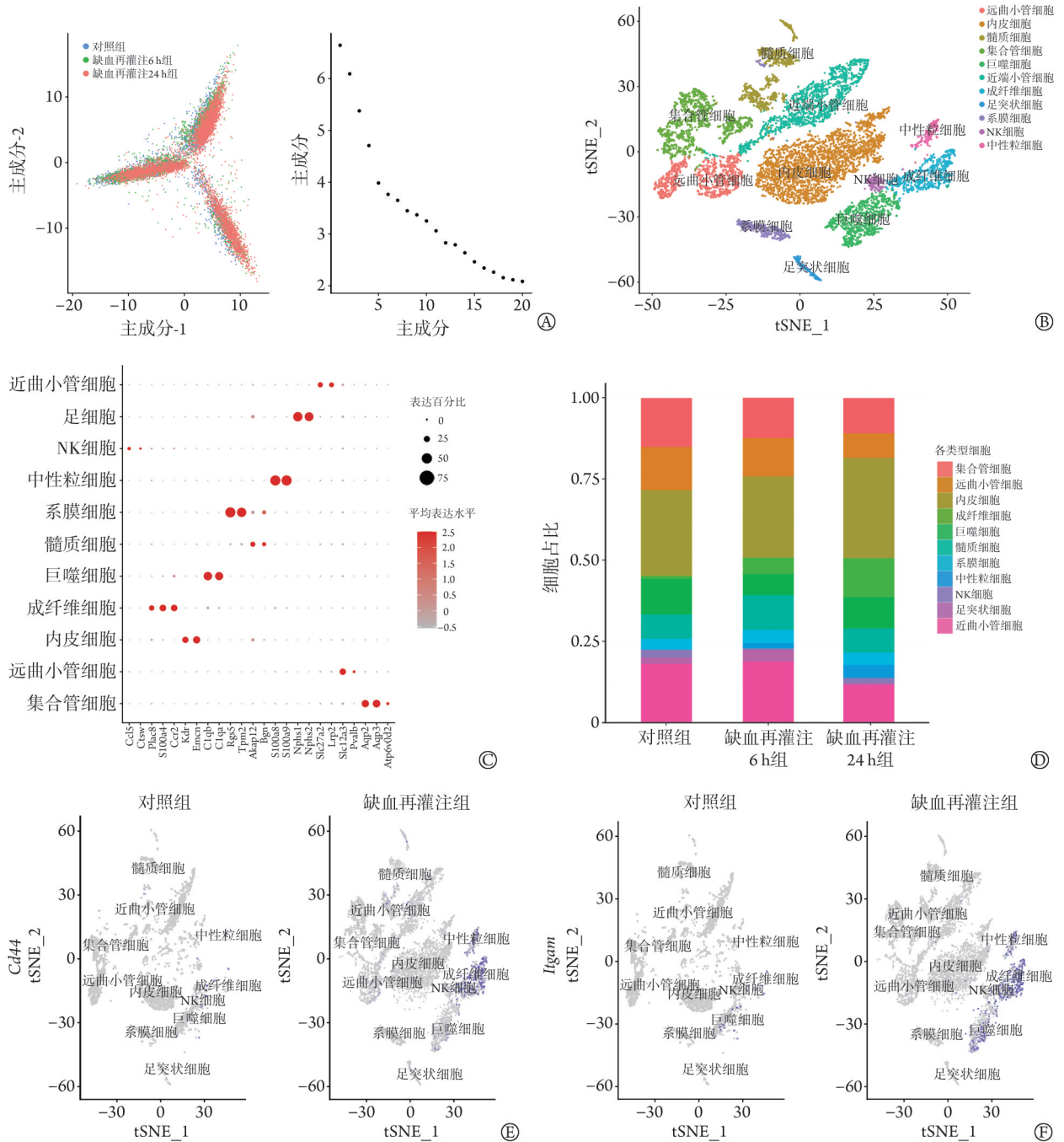
**2.6 *Cd44*、*Itgam* 基因的细胞景观** 对 GSE161201 数据集的单细胞数据进行严格的质量控制,通过设置基因表达量阈值 200~4000,线粒体基因比例  $< 30\%$ ,去除可能检测到的双细胞和衰老细胞,确保单细胞数据的准确性,共获得 11 156 个质量合格的单细胞。对这些细胞的 PCA 分析结果显示 3 个样本间良好的批次效果消除,选择前 10 个主成分用于后续分析,旨在最大程度地纳入细胞异质性(图 2A);为进一步降低 scRNA-seq 数据的维度,使用“t-SNE”算法对 11 156 个细胞进行聚类,分为 19 个不同的细胞簇。根据已有文献报道和 CellMarker 数据库的细胞特异性标志基因,这 19 个细胞簇的主要细胞类型包括远曲小管细胞、内皮细胞、髓质细胞、集合管细胞、巨噬细胞、近曲小管细胞、成纤维细胞、足细胞、系膜细胞、NK 细胞、中性粒细胞。计算并通过热图可视化每种细胞类型的细胞比例,以表征已知的 11 种

细胞谱系在3组中的分布(图2B—C)。细胞比例图显示,随着再灌注时间的增加,远曲小管细胞、近曲小管细胞、内皮细胞、集合管细胞、系膜细胞的比例降低,而巨噬细胞、NK细胞、纤维母细胞的比例增高(图2D)。

**2.7 *Cd44*、*Itgam* 基因的细胞定位** 采用GSE161201单细胞数据,对枢纽基因*Cd44*、*Itgam*的定位分析结果显示,相对于对照组,缺血再灌注组小鼠中,

*Cd44* 在成纤维细胞和中性粒细胞中呈现高表达, *Itgam* 在巨噬细胞、成纤维细胞和中性粒细胞中呈现高表达(图2E—F)。

**2.8 *Cd44*、*Itgam* 基因的细胞通信** 采用GSE161201单细胞数据,使用R语言程序包CellChat绘制不同细胞间的通信网络,并展示*Cd44*与*Itgam*在不同细胞中的表达情况(图3A)。细胞通信结果显示, *Cd44*<sup>+</sup>中性粒细胞与其他簇存在广泛的通信网络(图3B—C),



Cd44. 吞噬细胞糖蛋白-1; Itgam. 整联蛋白 $\alpha$ M; A—C. 单细胞数据集主成分分析(PCA)图以及来自对照组和肾缺血再灌注6h组、24h组1156个细胞的tSNE图; D. 三组中各种细胞所占比例热图; E—F. *Cd44*和*Itgam*表达分布tSNE图

图2 小鼠肾缺血再灌注损伤与自噬相关枢纽基因*Cd44*和*Itgam*的细胞景观和细胞分布

Fig.2 Cell landscape and cell distribution of hub genes *Cd44* and *Itgam* related to autophagy in renal ischemia-reperfusion injury of mouse

且接收信号较显著,如SPP1、C-C基序趋化因子配体(CCL)、C-X-C基序趋化因子配体(CXCL)通路;巨噬细胞与Cd44<sup>+</sup>中性粒细胞在SPP1-Cd44、CXCL2-C-X-C基序趋化因子受体2(CXCR2)的配受体通路中转导较与Cd44<sup>+</sup>中性粒细胞更活跃;并且Cd44<sup>+</sup>中性粒细胞在SPP1信号通路中与其他细胞间互作更紧密(图3D)。对中性粒细胞的拟时序分析找到了其发育轨迹(图3E)。同样,Itgam<sup>+</sup>中性粒细胞与其他细胞间信号互作更紧密,中性粒细胞与Itgam<sup>+</sup>巨噬细胞在CXCL2-CXCR2配体受体通路中转导较与Itgam<sup>+</sup>巨噬细胞更活跃(图4A-E)。

**2.9 Cd44、Itgam 基因的免疫浸润分析** 采用mMCP-counter包分析GSE161201单细胞数据集中缺血再灌注组与对照组的免疫浸润差异和免疫细胞间的相关性。结果显示,缺血再灌注组中巨噬细胞、粒细胞、肥大细胞的浸润丰度高于对照组(图4F-G)。在枢纽基因与免疫细胞相关性热图中,Cd44与内皮细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞相关性更强,Itgam与内皮细胞、巨噬细胞、粒细胞相关性更强(图4H)。创建一个热图来描述免疫细胞之间的相关性,免疫浸润分析结果显示,枢纽基因Cd44和Itgam与巨噬细胞、粒细胞、内皮细胞间有明显联系(图4I)。

**2.10 Cd44、Itgam 在小鼠缺血再灌注组织中的表达水平** GSE39548数据集中的qRT-PCR检测结果显示,与对照组比较,缺血再灌注组Cd44、Itgam表达水平明显增高( $P<0.05$ ,图5A);qRT-PCR检测结果显示,与对照组比较,缺血再灌注组小鼠Cd44、Itgam表达水平明显增高( $P<0.05$ ,图5B)。

### 3 讨论

RIRI是肾缺血再灌注后进一步引起肾组织损伤的复杂病理生理现象,在肾移植术、肾部分切除术和休克复苏中较为多见,是影响肾功能恢复的主要原因之一<sup>[12-13]</sup>。在临床上,RIRI仍缺乏有效治疗措施,所以,探索RIRI病理过程中的自噬相关枢纽基因及生物学功能,有助于深入了解其分子机制,寻找新的诊断和治疗标志物。

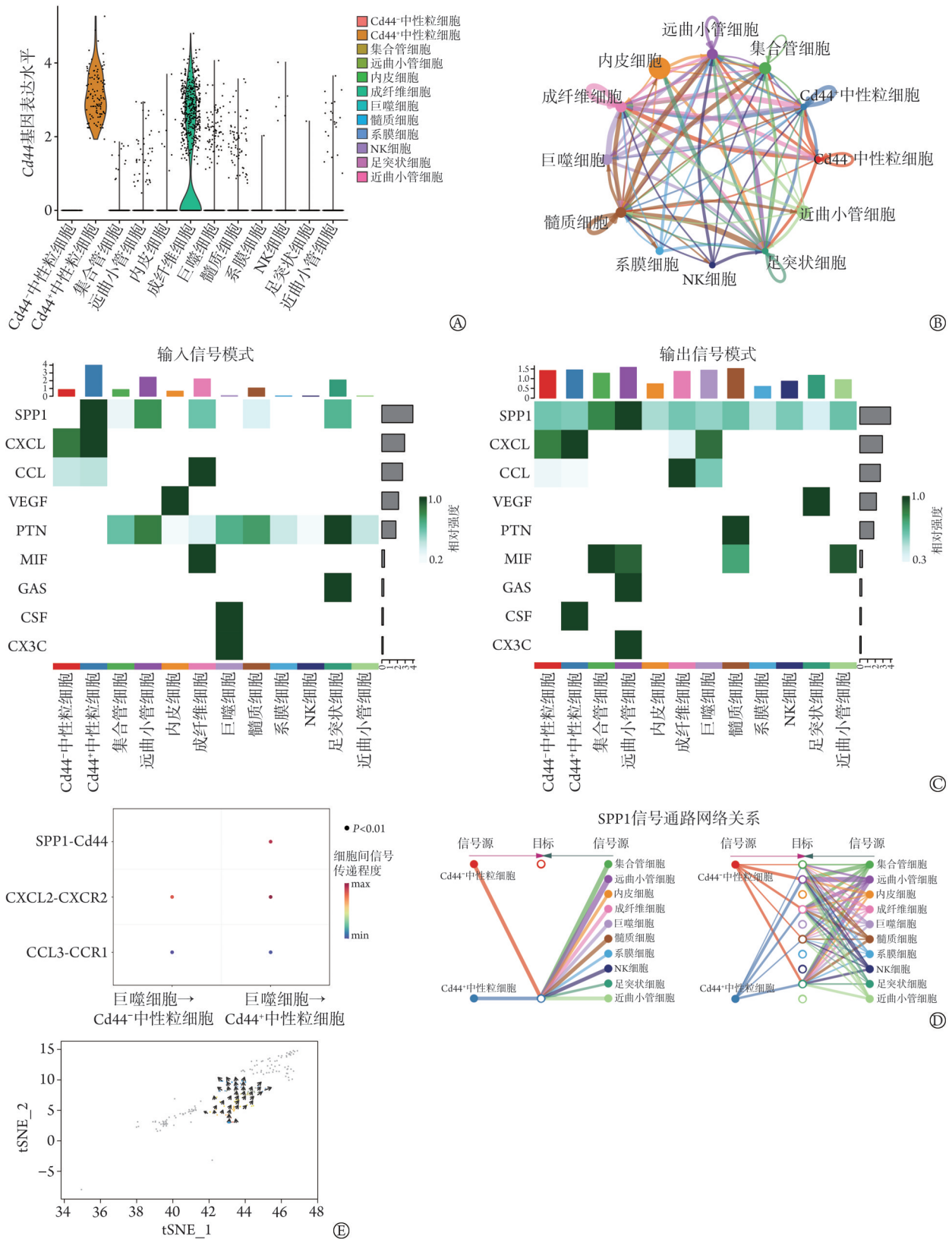
本研究GO富集分析结果显示,缺血再灌注组的DEGs多与白细胞游走、趋化和免疫反应介导的免疫球蛋白产生,以及细胞基质的黏附相关;KEGG富集分析结果显示,DEGs与细胞黏附分子、细胞因子配体受体的相互作用,以及肌肉细胞骨架、谷胱甘肽代谢等通路相关。据此推测,RIRI相关的DEGs与自噬有相关性,本研究在筛选的79个RIRI和自噬相关基因中,通过Cytoscape的4种算法找到了排名靠前的6个枢纽基因(Cd44、Itgam、Itgax、Kdr、

SPP1、GAPDH);单基因GSEA富集分析结果显示,这6个枢纽基因与炎症、氧化应激、免疫反应等信号通路有关。单细胞测序分析结果显示,随肾缺血再灌注时间增加,Cd44、Itgam基因的表达增高,且Cd44、Itgam基因在缺血再灌注组中性粒细胞、巨噬细胞、成纤维细胞的表达明显高于对照组。由此推测,肾缺血再灌注中,Cd44、Itgam基因表达增加可能与免疫有关;通过免疫细胞浸润分析发现,缺血再灌注组巨噬细胞、粒细胞、肥大细胞浸润丰度均高于对照组,且Cd44与内皮细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞的相关性较强,Itgam与内皮细胞、巨噬细胞、粒细胞的相关性较强。本研究整合多组学进行分析,初步验证了Cd44、Itgam两个自噬相关基因在RIRI中的作用。

Cd44作为重要的细胞表面跨膜糖蛋白基因,可在细胞黏附、迁移、信号转导和免疫调节等方面发挥关键作用,与多种疾病的发生和发展密切相关,具有广泛的组织分布,包括在白细胞(如中性粒细胞)、上皮细胞和内皮细胞表达<sup>[12-15]</sup>。有研究报道,在肾缺血再灌注过程中,Cd44可能通过介导炎症反应、细胞迁移和增殖等过程,参与肾组织的损伤和修复<sup>[16-17]</sup>;并且可通过调节血浆外泌体摄取进一步增强FGFR2信号转导,促进梗死灶中的血管生成<sup>[18-19]</sup>。当Cd44在M2型巨噬细胞中高表达时,可通过增强自噬清除凋亡细胞碎片,促进抗炎微环境来保护缺血器官<sup>[20]</sup>。然而,Cd44的过度表达可抑制自噬,导致细胞衰老和功能障碍;这种抑制作用可能通过影响自噬相关蛋白的表达和活性来实现<sup>[21]</sup>。

Itgam基因也被称为CD11b、巨噬细胞分化抗原-1(Mac-1),主要表达于单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等免疫细胞<sup>[22]</sup>。当肾脏发生缺血再灌注时,局部微环境发生变化,吸引这些免疫细胞向损伤部位迁移并活化。CD11b介导的细胞黏附和迁移是免疫细胞在损伤部位发挥作用的前提<sup>[23]</sup>。有研究显示,CD11b缺乏时可通过调节巨噬细胞的极化来减轻缺血再灌注损伤造成的急性肾损伤<sup>[24-25]</sup>。目前尚无直接证据表明Itgam基因直接调控自噬过程,但笔者推测,Itgam基因编码的CD11b受体可能通过影响免疫细胞的功能和活化状态,间接影响自噬的激活和程度。

为进一步阐明Cd44和Itgam介导RIRI病理过程可能的作用机制,本研究对其进行了单基因GSEA富集分析,结果显示,炎症、氧化应激、免疫反应相关通路(如MAPK、PI3k-Akt、NF- $\kappa$ B、TOLL样受体和免疫反应中细胞因子信号通路)的激活与Cd44和Itgam的高表达有关,这些通路已被证实参与自噬和RIRI<sup>[26-29]</sup>。在缺血再灌注过程中,受损的细胞可释



Cd44. 吞噬细胞糖蛋白-1; SPP1. 分泌型磷蛋白1; CXCL. C-X-C基序趋化因子配体; CCL. C-C基序趋化因子配体; VEGF. 血管内皮生长因子配体; PTN. 多效生长因子配体; MIF. 巨噬细胞迁移抑制因子配体; GAS. 生长停滞特异蛋白配体; CSF. 集落刺激因子配体; CX3C. C-X-3C基序趋化因子; CXCR2. C-X-C基序趋化因子受体2; CCR1. 趋化因子C-C-基元受体1; A. Cd44在不同细胞表达量的小提琴图; B. 不同细胞间的细胞通信; C. 接收和传出的信号通路热图; D. 巨噬细胞与Cd44<sup>+</sup>/Cd44<sup>+</sup>中性粒细胞间的信号传导和SPP1信号通路网络图; E. 中性粒细胞的细胞轨迹

图3 小鼠肾缺血再灌注损伤与自噬相关枢纽基因Cd44的基因定位和细胞通信

Fig.3 Gene mapping and cell communication of hub genes Cd44 related to autophagy in renal ischemia-reperfusion injury of mouse

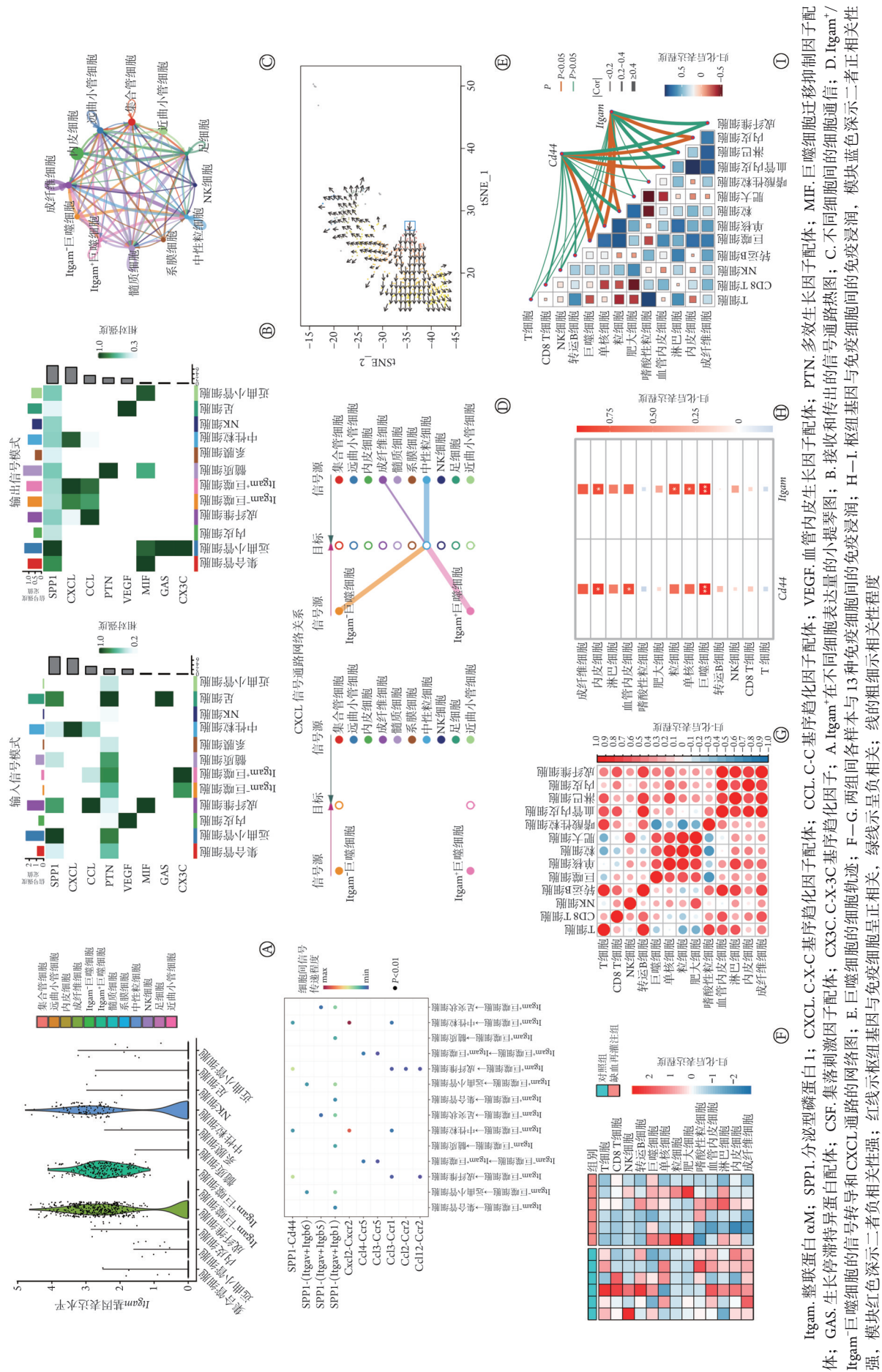
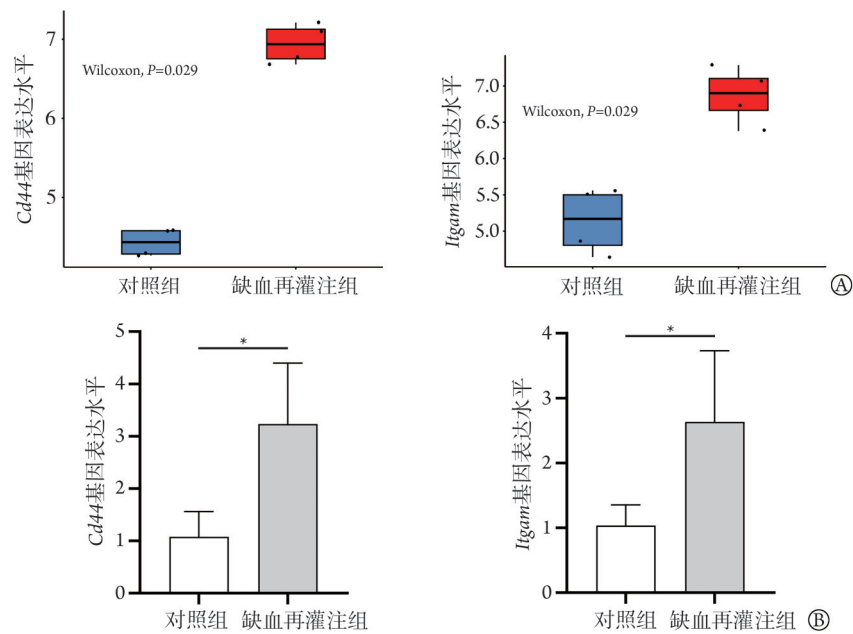


图4 小鼠肾缺血再灌注损伤与自噬相关枢纽基因 *Igam* 的细胞通信和免疫浸润

Fig-4 Cell communication and immune infiltration of hub genes *Igam* related to autophagy in renal ischemia-reperfusion injury of mouse

*Igam*. 整合蛋白  $\alpha M$ ; SPP1. 分泌型磷蛋白 1; CXCL. C-X-C 基序趋化因子配体; CCL. C-C 基序趋化因子配体; VEGF. 血管内皮生长因子配体; PTN. 多效生长因子配体; MIF. 巨噬细胞迁移抑制因子配体; GAS. 生长停滞特异蛋白配体; CSF. 集落刺激因子配体; CX3C. C-X-3-C 基序趋化因子; A. *Igam*<sup>+</sup> 在不同细胞表达量的小提琴图; B. 接收和传出的信号通路热图; C. 不同细胞间的细胞通信; D. *Igam*<sup>+</sup>/*Igam*<sup>-</sup> 巨噬细胞的信号传导和 CXCL 通路的网络图; E. 巨噬细胞的细胞轨迹; F-G. 两组间各样本与 13 种免疫细胞间的免疫浸润; H-I. 枢纽基因与免疫细胞间的免疫浸润, 模块蓝色深示二者正相关性, 模块红色深示二者负相关性; 绿线示枢纽基因与免疫细胞呈正相关, 红线示负相关性; 线的粗细示相关性程度



Cd44. 吞噬细胞糖蛋白-1; Itgam. 整联蛋白  $\alpha$ M; A. GSE39548 数据集中小鼠 Cd44、Itgam 基因表达量; B. 实测两组小鼠 Cd44、Itgam 基因表达量; \* $P<0.05$

图5 小鼠肾缺血再灌注损伤中自噬相关的枢纽基因 Cd44 和 Itgam 的表达情况(qRT-PCR)

Fig.5 Expression of autophagy-related hub genes Cd44 and Itgam in murine renal ischemia-reperfusion injury (qRT-PCR)

放一系列 DAMPs<sup>[30-32]</sup>; 这些 DAMPs 作为内源性危险信号, 能够被模式识别受体如 Toll 样受体识别, 同时通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路来抑制自噬<sup>[33-34]</sup>。过度激活自噬可能导致细胞内过多的细胞器和蛋白质被降解, 从而产生大量的氧化应激产物; 这些产物可激活 MAPK、NF- $\kappa$ B 等信号通路而促进炎症因子的表达和释放<sup>[35-36]</sup>。这些证据提示, 高表达的 Cd44、Itgam 可能加重 RIRI。本研究单细胞分析中的基因定位显示, Cd44 和 Itgam 在缺血再灌注组中性粒细胞、巨噬细胞、成纤维细胞中高表达。枢纽基因在细胞中分布的差异可导致细胞功能改变, 继而通过细胞通信影响其他细胞, 因此, 本研究将表达在中性粒细胞的 Cd44 和表达在巨噬细胞的 Itgam 分成两组(Cd44<sup>+</sup>N、Cd44<sup>-</sup>N)(Itam<sup>+</sup>M、Itgam<sup>-</sup>M)进行细胞通信, 结果显示, 两组肾组织样本中 Cd44 和 Itgam 的表达在中性粒细胞和巨噬细胞上有明显的信号传导差异。最后, 本研究的免疫浸润分析显示, 在 IRI 组, Cd44 和 Itgam 与中性粒细胞、巨噬细胞的相关性高于对照组, 再次验证了 Cd44 与 Itgam 与免疫应答的关系。但本研究尚存在一定的局限性, 如本研究仅基于 RIRI 小鼠模型, 而涉及其他物种则在结果上可能存在一定差异。

综上所述, 本研究通过转录组测序和生物信息学分析确定了 RIRI 中自噬相关的枢纽基因, 为 RIRI 的机制研究提供了一定参考, 后续可收集患者的临床样本进一步验证枢纽基因的表达水平与临床表现

的相关性。Cd44 和 Itgam 是 RIRI 和自噬相关的枢纽基因, 有望成为预防和治疗 RIRI 新的标志物。

#### 【参考文献】

- [1] Zhao H, Alam A, Soo AP, et al. Ischemia-reperfusion injury reduces long term renal graft survival: mechanism and beyond[J]. EBioMedicine, 2018, 28: 31-42.
- [2] Fang DYP, Lu B, Hayward S, et al. The role of activin A and B and the benefit of follistatin treatment in renal ischemia-reperfusion injury in mice[J]. Transplant Direct, 2016, 2(7): e87.
- [3] Saat TC, van den Akker EK, IJzermans JNM, et al. Improving the outcome of kidney transplantation by ameliorating renal ischemia reperfusion injury: lost in translation? [J]. J Transl Med, 2016, 14: 20-28.
- [4] Mitchell JR, Verweij M, Brand K, et al. Short-term dietary restriction and fasting precondition against ischemia reperfusion injury in mice[J]. Aging Cell, 2010, 9(1): 40-53.
- [5] Jin S, Wei J, You L, et al. Autophagy regulation and its dual role in blood cancers: a novel target for therapeutic development[J]. Oncol Rep, 2018, 39(6): 2473-2481.
- [6] 黄波, 丁洁, 郭红荣, 等. 缺氧条件下 HIF-1 $\alpha$ /ROS 对肺癌 A549 细胞凋亡和侵袭的作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2023, 49(3): 682-690.
- [7] Ling H, Chen H, Wei M, et al. The effect of autophagy on inflammation cytokines in renal ischemia/reperfusion injury[J]. Inflammation, 2016, 39(1): 347-356.
- [8] Correa-Costa M, Azevedo H, Amano MT, et al. Transcriptome analysis of renal ischemia/reperfusion injury and its modulation by ischemic pre-conditioning or hemin treatment[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e49569.
- [9] Ide S, Kobayashi Y, Ide K, et al. Ferroptotic stress promotes the

- accumulation of pro-inflammatory proximal tubular cells in maladaptive renal repair[J]. *Elife*, 2021, 10: e68603.
- [10] Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, *et al*. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D362-D368.
- [11] Zhou G, Soufan O, Ewald J, *et al*. NetworkAnalyst 3.0: a visual analytics platform for comprehensive gene expression profiling and meta-analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W234-W241.
- [12] Dougherty GJ, Landorp PM, Cooper DL, *et al*. Molecular cloning of CD44R1 and CD44R2, two novel isoforms of the human CD44 lymphocyte "homing" receptor expressed by hemopoietic cells[J]. *J Exp Med*, 1991, 174(1): 1-5.
- [13] Günthert U. CD44: a multitude of isoforms with diverse functions [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1993, 184: 47-63.
- [14] Sreaton GR, Bell MV, Jackson DG, *et al*. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(24): 12160-12164.
- [15] Tölg C, Hofmann M, Herrlich P, *et al*. Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability [J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(5): 1225-1229.
- [16] Kim MS, Lee KH, Lee WM, *et al*. CD44 disruption attenuates murine hepatic ischemia/reperfusion injury [J]. *J Korean Med Sci*, 2011, 26(7): 919-926.
- [17] Zhou X, Chen Q, Guo C, *et al*. CD44 receptor-targeted and reactive oxygen species-responsive H<sub>2</sub>S donor micelles based on hyaluronic acid for the therapy of renal ischemia/reperfusion injury [J]. *ACS Omega*, 2022, 7(46): 42339-42346.
- [18] Chen L, Fu C, Zhang Q, *et al*. The role of CD44 in pathological angiogenesis [J]. *FASEB J*, 2020, 34(10): 13125-13139.
- [19] Zhang Q, Chen L, Huang L, *et al*. CD44 promotes angiogenesis in myocardial infarction through regulating plasma exosome uptake and further enhancing FGFR2 signaling transduction [J]. *Mol Med*, 2022, 28(1): 145.
- [20] Bai RJ, Liu D, Li YS, *et al*. OPN inhibits autophagy through CD44, integrin and the MAPK pathway in osteoarthritic chondrocytes [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 919366.
- [21] Moon HJ, Park S Y, Lee SH, *et al*. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs sensitize CD44-overexpressing cancer cells to Hsp90 inhibitor through autophagy activation [J]. *Oncol Res*, 2019, 27(7): 835.
- [22] Huen SC, Cantley LG. Macrophage-mediated injury and repair after ischemic kidney injury [J]. *Pediatr Nephrol*, 2015, 30(2): 199-209.
- [23] Clements M, Gershenovich M, Chaber C, *et al*. Differential Ly6C expression after renal ischemia-reperfusion identifies unique macrophage populations [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(1): 159-170.
- [24] 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.
- [25] Goto T, Ito Y, Satoh M, *et al*. Activation of iNKT cells facilitates liver repair after hepatic ischemia reperfusion injury through acceleration of macrophage polarization [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 754106.
- [26] 周瑞, 唐志书, 苏洁, 等. 通过调控 PI3K/Akt 通路对过氧化氢诱导的血管内皮细胞凋亡的保护作用研究 [J]. *中药材*, 2022, 45(2): 459 - 463.
- [27] Zhou J, Jiang Y, Chen H, *et al*. Tanshinone I attenuates the malignant biological properties of ovarian cancer by inducing apoptosis and autophagy *via* the inactivation of PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(2): e12739.
- [28] 施诚龙, 陈冲, 高永军, 等. PI3K/Akt/mTOR 信号通路在细胞自噬中作用及机制的研究进展 [J]. *山东医药*, 2021, 61(27): 102-105.
- [29] Tian H, Wu M, Zhou P, *et al*. The long noncoding RNA MALAT1 is increased in renal ischemia reperfusion injury and inhibits hypoxia-induced inflammation [J]. *Ren Fail*, 2018, 40(1): 527-533.
- [30] Eltzschig HK, Bratton DL, Colgan SP. Targeting hypoxia signalling for the treatment of ischaemic and inflammatory diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(11): 852-869.
- [31] van Golen RF, Reiniers MJ, Olthof PB, *et al*. Sterile inflammation in hepatic ischemia/reperfusion injury: present concepts and potential therapeutics [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28(3): 394-400.
- [32] Tang D, Kang R, Coyne CB, *et al*. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity [J]. *Immunol Rev*, 2012, 249(1): 158-175.
- [33] Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(10): 722-737.
- [34] Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity [J]. *Immunity*, 2011, 34(5): 637-650.
- [35] Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(11): 1121-1135.
- [36] Zweier JL. Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1988, 263(3): 1353-1357.

(责任编辑: 蒋铭敏, 郭蕊)