

# 转录因子KLF4介导纤溶酶原驱动的骨髓来源单核/巨噬细胞向疤痕相关巨噬细胞的转化

杨琳 杨苑儒 李丽英 常娜\*

(首都医科大学细胞生物学系, 首都医科大学基础-临床联合实验室,  
肝脏保护和再生调节北京市重点实验室, 北京 100069)

**摘要** 疤痕相关巨噬细胞(Scar-associated macrophage, SAM)是肝纤维化的重要参与者, 纤溶酶原(plasminogen, PLG)可驱动巨噬细胞获得SAM表型, 但其分子机制尚不明确。该研究旨在探讨PLG驱动SAM表型转化的机制。分析已发表的正常、肝纤维化小鼠肝非实质细胞的单细胞测序数据, 发现成熟SAM高表达转录因子Krüppel样因子4(Krüppel-like factor 4, KLF4)。分离小鼠原代骨髓来源单核/巨噬细胞, 使用PLG处理以促进SAM转化, 转染特异性siRNA/过表达质粒以敲减/过表达巨噬细胞中的KLF4, 使用流式细胞术和Western blot检测蛋白表达情况, 免疫荧光检测KLF4的亚细胞定位, 实时荧光定量聚合酶链反应(real time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测mRNA表达情况。结果表明在PLG驱动SAM转化过程中, KLF4蛋白水平升高, 且其定位在细胞核中。特异性敲减小鼠巨噬细胞中的KLF4表达能够抑制PLG驱动的SAM转化, SAM标志基因、功能基因的表达, SAM比例及诱导HSC产生细胞外基质的能力均下降; KLF4过表达则上调了SAM标志基因和功能基因的表达。综上所述, KLF4参与了PLG诱导的SAM表型转化。

**关键词** 单细胞测序; 疤痕相关巨噬细胞; 纤溶酶原; Krüppel样因子4

## Transcription Factor KLF4 Mediates the Transformation of Scar-Associated Macrophages Driven by Plasminogen from Bone Marrow-Derived Monocytes/Macrophages

YANG Lin, YANG Yuanru, LI liying, CHANG Na\*

(Department of Cell Biology, Laboratory for Clinical Medicine, Municipal Laboratory for Liver Protection  
and Regulation of Regeneration, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

**Abstract** SAM (scar-associated macrophage) plays an important role in liver fibrogenesis. PLG (plasminogen) drives the transformation of macrophage to SAM, but the underlying mechanism is still unclear. The aim of this study is to explore the mechanism underlying PLG-driven SAM transformation. scRNA-seq (single-cell RNA sequencing) data were analyzed. The results showed that transcriptional factor KLF4 (Krüppel-like factor 4) was highly expressed by SAM. Isolated mouse primary BMDMs (bone marrow-derived monocyte/macrophages) were treated with PLG to induce SAM transformation. Specific siRNA was used to knock down KLF4 expression in BMDMs. The protein expression of genes was studied using flow cytometry and Western blot. Immunofluorescence was employed to study the localization of KLF4. RT-qPCR was used to detect the mRNA expression of genes. The

收稿日期: 2024-07-11 接受日期: 2024-10-10

国家自然科学基金(批准号: 81770603)资助的课题

\*通信作者。Tel: 010-83950469, E-mail: changna@ccmu.edu.cn

Received: July 11, 2024

Accepted: October 10, 2024

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81770603)

\*Corresponding author. Tel: +86-10-83950469, E-mail: changna@ccmu.edu.cn

results showed that PLG triggered the up-regulation and nuclear localization of KLF4. The knockdown of KLF4 expression blocked PLG-driven SAM transformation. The expressions of SAM feature/functional genes, the ratio of SAM, and the ability to induce extracellular matrix production by hepatic stellate cells were decreased. The overexpression of KLF4 increased SAM feature/functional gene expressions. In conclusion, KLF4 plays an important role in PLG-driven SAM transformation.

**Keywords** single-cell RNA sequencing; scar-associated macrophage; plasminogen; Krüppel-like factor 4

肝纤维化是肝脏在慢性炎症、损伤后, 组织修复异常, 导致组织内细胞外基质过度沉积的病理过程, 最终可导致肝硬化和肝癌。巨噬细胞作为固有免疫系统的成员, 是肝纤维化的重要参与者<sup>[1-2]</sup>。正常情况下, 肝巨噬细胞主要由定植于肝脏的库普弗细胞组成; 当肝损伤发生时, 大量骨髓来源单核/巨噬细胞 (bone marrow-derived monocyte/macrophage, BMDM) 被招募至损伤肝脏, 参与炎症及纤维化<sup>[3]</sup>。肝纤维化时, 巨噬细胞通过转化为具有不同基因表达特征的亚群 (如产生促炎因子、导致组织炎症反应的M1型巨噬细胞, 以及产生TGF- $\beta$ 等细胞因子、促进组织修复和纤维化发生的M2型巨噬细胞) 行使不同功能<sup>[4]</sup>。疤痕相关巨噬细胞 (scar-associated macrophage, SAM) 是近几年在肝纤维化病人的肝组织中发现的新巨噬细胞亚群, 在正常人肝组织中含量极低<sup>[5]</sup>。SAM转化自BMDM, 主要定位在纤维化区域周边, 高表达*CD9*、*TREM2*等特征基因, 同时高表达与组织修复、细胞外基质调节、成纤维细胞增殖等功能密切相关的基因<sup>[5-6]</sup>。体外实验表明SAM具有促进肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 活化并产生细胞外基质的作用<sup>[5]</sup>。在非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 中, SAM标志基因表达上调, 并与纤维化标志基因表达呈正相关<sup>[7]</sup>。抑制SAM转化可有效延缓小鼠的肝纤维化进程<sup>[6,8]</sup>。本课题组前期已发表的结果也表明SAM出现在小鼠肝纤维化组织中, 且转化自BMDM; SAM高表达*FN1*、*LOXL2*等功能基因; 纤溶酶原 (plasminogen, PLG) 是SAM表型转化的重要驱动者, 特异性敲减小鼠巨噬细胞的PLG受体表达可有效阻止SAM转化, 减少小鼠肝脏内SAM数量, 并减轻肝纤维化程度<sup>[9]</sup>。但是PLG诱导BMDM转化为SAM的机制尚不明确, 亟待深入研究。本研究利用单细胞测序技术, 结合细胞学实验, 以探讨PLG驱动SAM表型转化的分子机制。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 主要试剂

主要试剂包括: RPMI 1640培养基 (美国Gibco公司)、Trizol (美国Sigma公司)、SYBR Green PCR Master Mix (美国Applied Biosystems公司)、KLF4单克隆抗体 (华安生物技术有限公司)、Plasminogen、FN1单克隆抗体、LOXL2单克隆抗体 (英国Abcam公司)、APC标记的*CD9*单克隆抗体、FITC标记的*TREM2*单克隆抗体 (美国ThermoFisher公司)、 $\beta$ -actin单克隆抗体及GAPDH单克隆抗体 (美国Cell Signaling公司)。

### 1.2 小鼠原代BMDM的分离培养

使用颈椎脱臼法处死20 g雄性ICR小鼠, 无菌分离股骨、胫骨和腓骨。使用1 mL注射器吸取含10% (体积分数) 胎牛血清、1% (体积分数) 青/链霉素的RPMI 1640完全培养基, 将骨髓内容物冲至50 mL离心管中。使用70  $\mu$ m滤网过滤后, 1 200 r/min、4  $^{\circ}$ C离心5 min。使用含有10% L929条件培养基的RPMI 1640完全培养基重悬细胞, 并置于37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中培养6~7天即可得到发育成熟的小鼠原代BMDM。

所用实验动物由首都医科大学实验动物中心提供, 实验动物的饲养和处死符合动物保护原则, 本实验已由首都医科大学动物实验及实验动物福利委员会批准 (批准号: AEEI-2019-049)。

### 1.3 人HSC细胞系LX-2培养

LX-2细胞使用含有10%、1%青/链霉素的DMEM完全培养基, 并置于37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中培养。当细胞汇合度达到90%时传代, 取处于对数生长期的细胞进行实验。

### 1.4 RNA的提取和实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-qPCR)

细胞总RNA的提取采用Trizol法, 按照产品说明书操作。定量后取1  $\mu$ g RNA进行反转录。取适量

表1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

| 基因<br>Gene    | 序列(5'→3')<br>Sequence (5'→3')                                    |
|---------------|------------------------------------------------------------------|
| 18S rRNA      | F: GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT<br>R: CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG   |
| <i>Cd9</i>    | F: ATG CCG GTC AAA GGA GGT AG<br>R: GCC ATA GTC CAA TAG CAA GCA  |
| <i>Trem2</i>  | F: CTG GAA CCG TCA CCA TCA CTC<br>R: CGA AAC TCG ATG ACT CCT CGG |
| <i>Fnl</i>    | F: ATG TGG ACC CCT CCT GAT AGT<br>R: GCC CAG TGA TTT CAG CAA AGG |
| <i>Loxl2</i>  | F: GGC GCT TCC AGA CAG AGT<br>R: GAG GCA GGA GCC AAA ATG         |
| <i>ACTA2</i>  | F: CCC TGA AGT ACC CGA TAG AAC A<br>R: GGC AAC ACG AAG CTC ATT G |
| <i>COL1A1</i> | F: AGG TCC CCC TGG AAA GAA<br>R: AAT CCT CGA GCA CCC TGA         |
| <i>COL3A1</i> | F: AGC TGG AAA GAG TGG TGA CAG<br>R: CCT TGA GGA CCA GGA GCA C   |

cDNA原液进行qPCR检测,使用的引物序列见表1所示。qPCR程序为95 °C预变性10 min,随后按照95 °C 15 s, 60 °C 1 min的程序循环40次。检测结果用18S rRNA进行校正,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量。

### 1.5 Western blot

使用RIPA裂解液提取细胞总蛋白。定量后取50 μg待测样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳并采用湿转法将蛋白质转印到PVDF膜上。取出电转后的PVDF膜,使用含有5%脱脂奶粉的TBS缓冲液于室温封闭1 h。结束后分别加入KLF4单克隆抗体(1:1 000)、FN1单克隆抗体(1:5 000)、LOXL2单克隆抗体(1:1 000)、GAPDH单克隆抗体(1:5 000)或β-actin单克隆抗体(1:5 000)于4 °C孵育过夜,并加入相应二抗(1:10 000)于室温避光孵育1 h。使用Odyssey红外荧光扫描成像系统扫描条带图像,并利用配套软件进行条带的光密度分析,使用GAPDH或β-actin对目的条带的表达量进行校正。

### 1.6 流式细胞术

使用0.25%胰蛋白酶消化1 min、收集细胞,并制备成单细胞悬液。按照每 $1 \times 10^6$ 个细胞加入1 μL抗体的比例分别加入APC-CD9抗体、FITC-TREM2抗体,或同型对照抗体,4 °C避光孵育30 min。洗去未结合抗体后上机检测。

### 1.7 免疫荧光

使用4%多聚甲醛在室温下固定细胞15 min后,

使用含0.5% Triton X-100的PBS缓冲液破膜5 min。使用2% BSA于37 °C封闭1 h后,加入KLF4单克隆抗体(1:50)于4 °C孵育过夜,并加入相应二抗(1:100)于37 °C孵育1 h。加入DAPI进行细胞核染色后使用荧光显微镜观察。

### 1.8 单细胞测序数据分析

单细胞测序数据分析所用数据为本课题组前期获得。使用Loupe Browser 7软件分析并获取SAM差异基因,并进行可视化呈现。基因本体论(gene ontology, GO)分析通过<https://metascape.org/gp/index.html>进行。

### 1.9 统计学方法

所有实验数据以均值±标准误(mean±SEM)表示,采用GraphPad Prism 9软件对实验结果进行统计学分析,两组间比较采用Student's *t*检验。多个处理组之间的差异比较首先采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),再采用适当的多重比较方法。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 单细胞测序结果显示KLF4在成熟SAM中高表达

为了探讨SAM表型转化的分子机制,我们首先分析了本课题组前期获得的正常小鼠和肝纤维化小鼠肝非实质细胞的单细胞测序数据<sup>[9]</sup>。我们从

所有肝非实质细胞中挑选了BMDM进行分群分析, 根据基因表达特征, 分别定义了成熟SAM、不成熟SAM及其他BMDM(图1A)。随后, 我们分析了三群细胞的差异基因, 并对成熟SAM的高表达差异基因(以差异倍数 $\geq 1.5$ 、 $P < 0.05$ 为筛选标准)进行GO分析。GO条目按照 $P$ 值进行排序, 在排名前10的GO条目中, “应激反应(response to stress)”反映了细胞内稳态受到干扰后, 细胞在基因表达等各方面状态或活动发生变化的过程。“对外界刺激反应的调节(regulation of response to external stimulus)”反映了细胞对外界刺激的反应。“对化学物的反应(response to chemical)”反映了细胞在化学物质刺激后, 基因表达等各方面状态或活动发生变化的过程。这三个GO条目反映了肝纤维化时, SAM在转化过程中对各种损伤因素的响应。因此, 我们选择这三个GO条目进行分析以探寻SAM表型转化的分子机制(图1B)。对三个条目所包含的差异基因进行交集分析, 共获得 $\beta$ 淀粉样前体蛋白(amyloid beta precursor protein, *App*)、*Cd36*和Krüppel样因子4(Krüppel-like factor 4, *Klf4*)三个基因(图1C)。其中, APP和CD36均为细胞表面受体蛋白; KLF4为转录因子, 具有调节基因表达的功能。为了阐明SAM表型转化的细胞内分子机制, 我们挑选了*Klf4*进行研究。通过分析*Klf4*在小

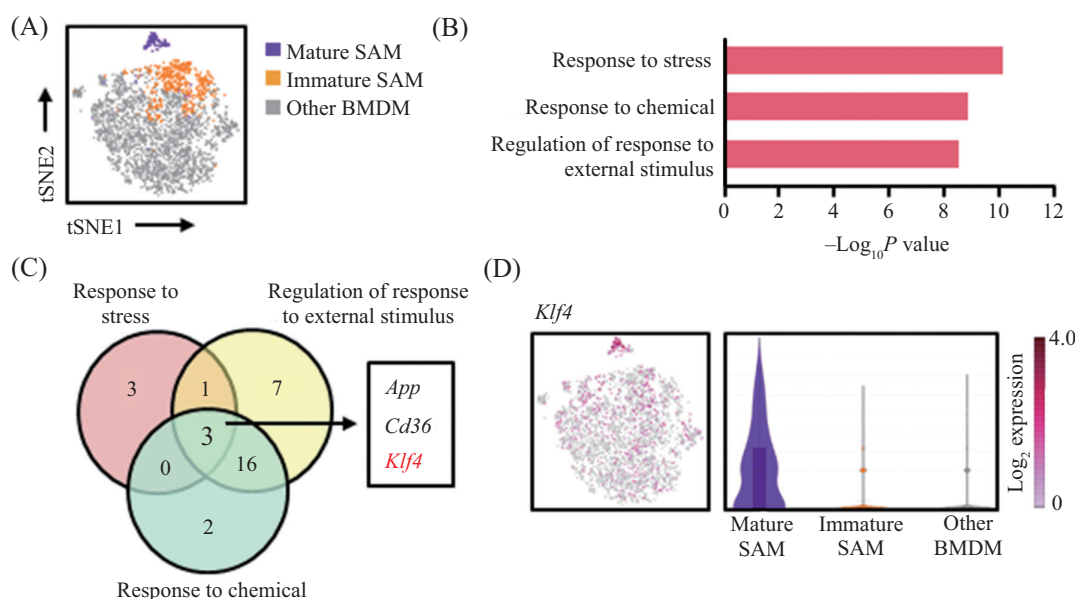
鼠BMDM中的表达情况, 我们发现成熟SAM高表达*Klf4*(图1D)。

## 2.2 PLG促进KLF4蛋白表达

生理状态下, 肝脏是产生PLG的主要场所<sup>[10]</sup>, 且PLG是诱导巨噬细胞向M2型转化的重要因素<sup>[11]</sup>。本课题组已发表的数据也证实, 当肝损伤发生时, BMDM自骨髓经外周循环被招募至损伤区域, 抵达肝脏后受PLG影响, 转化为SAM。为了阐明KLF4在SAM表型转化中的作用, 我们检测了PLG诱导巨噬细胞向SAM转化过程中KLF4的表达变化。我们使用4  $\mu\text{g/L}$  PLG处理小鼠原代BMDM, 并分别于2.5 h、5 h及10 h收集样本。结果表明在使用PLG处理2.5 h后, BMDM中KLF4的蛋白水平显著上升, 并维持至10 h(图2A和图2B)。免疫荧光结果显示在PLG驱动SAM转化过程中, KLF4蛋白定位在细胞核中(图2C)。

## 2.3 敲减BMDM中的KLF4表达抑制PLG驱动的SAM表型转化

接下来, 为了探讨KLF4在PLG驱动SAM表型转化中的作用, 我们使用特异性siRNA敲减BMDM中KLF4表达。使用*Klf4* siRNA转染BMDM 24 h后, BMDM中的KLF4表达水平下降, 敲减效率符合实验要求(图3A)。随后, 我们使用4  $\mu\text{g/L}$  PLG处理转

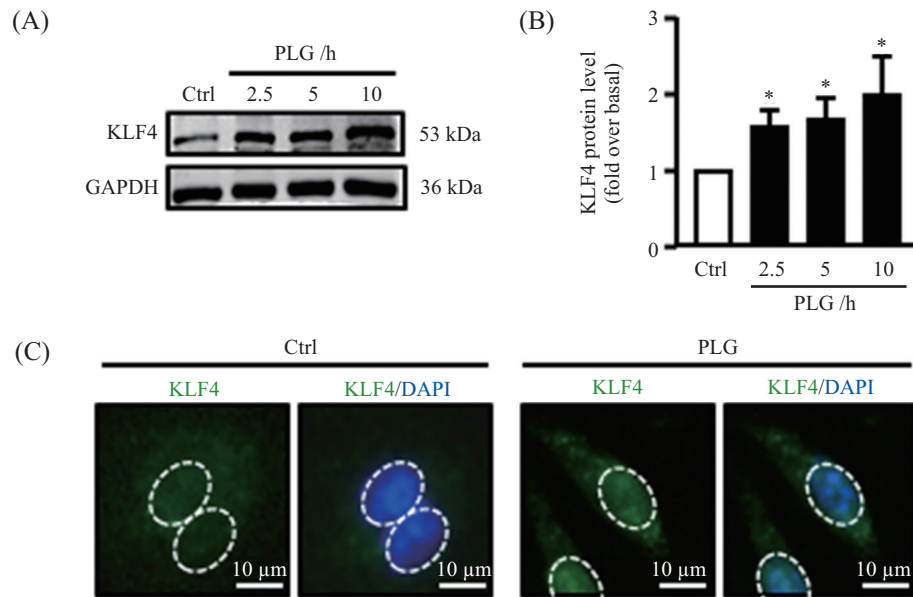


A: tSNE图显示BMDM分群结果。B: 成熟SAM高表达基因的GO分析结果。C: 挑选出的GO条目所包含基因的交集。D: *Klf4*在小鼠BMDM中的表达。

A: tSNE plots showed the clusters of BMDM. B: GO analysis of mature SAM highly expressed genes. C: the gene intersection of selected GO terms. D: the expression of *Klf4* in mouse BMDM.

图1 单细胞测序结果显示SAM高表达*Klf4*

Fig.1 The highly expression of *Klf4* in SAMs analyzed by single-cell RNA sequencing data

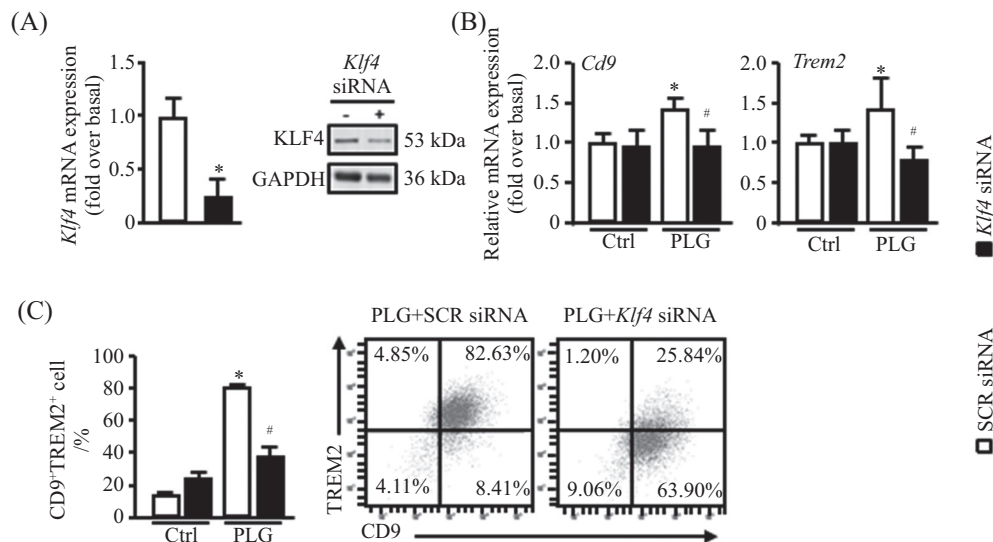


A: 小鼠BMDM中的KLF4蛋白表达情况。B: KLF4蛋白表达定量结果。C: 使用PLG处理BMDM, 5 h后收集细胞并检测BMDM中KLF4的定位。绿色: KLF4, 蓝色: DAPI。\* $P < 0.05$ , 与对照组比较。

A: the protein expression of KLF4. B: the quantify of KLF4 protein level. C: BMDM were treated with PLG for 5 h. The localization of KLF4 was detected in BMDM. Green: KLF4, blue: DAPI. \* $P < 0.05$  compared with the Ctrl group.

图2 PLG促进KLF4蛋白表达

Fig.2 PLG induced the up-regulation of KLF4



A: KLF4 mRNA及蛋白表达情况。B: *Cd9*和*Trem2*的mRNA表达情况。C: 流式细胞术检测SAM(CD9<sup>+</sup>TREM2<sup>+</sup>)比例。\* $P < 0.05$ , 与对照组比较。# $P < 0.05$ , 与SCR siRNA组比较。

A: the mRNA and protein expression of KLF4 were detected. B: the mRNA expression of *Cd9* and *Trem2* were detected. C: flow cytometry was employed to study the proportion of SAM(CD9<sup>+</sup>TREM2<sup>+</sup>) cells in BMDM. \* $P < 0.05$  compared with the Ctrl group. # $P < 0.05$  compared with the SCR siRNA group.

图3 KLF4参与PLG驱动的SAM表型转化

Fig.3 KLF4 was involved in PLG-induced SAM transformation

染 *Klf4* siRNA 或对照 siRNA (scramble siRNA, SCR siRNA) 的 BMDM 5 h, 并检测 SAM 的转化情况。RT-qPCR 结果显示 *Klf4* siRNA 明显抑制了 PLG 诱导的 SAM 标志基因 *Cd9*、*Trem2* 的表达上调 (图 3B)。

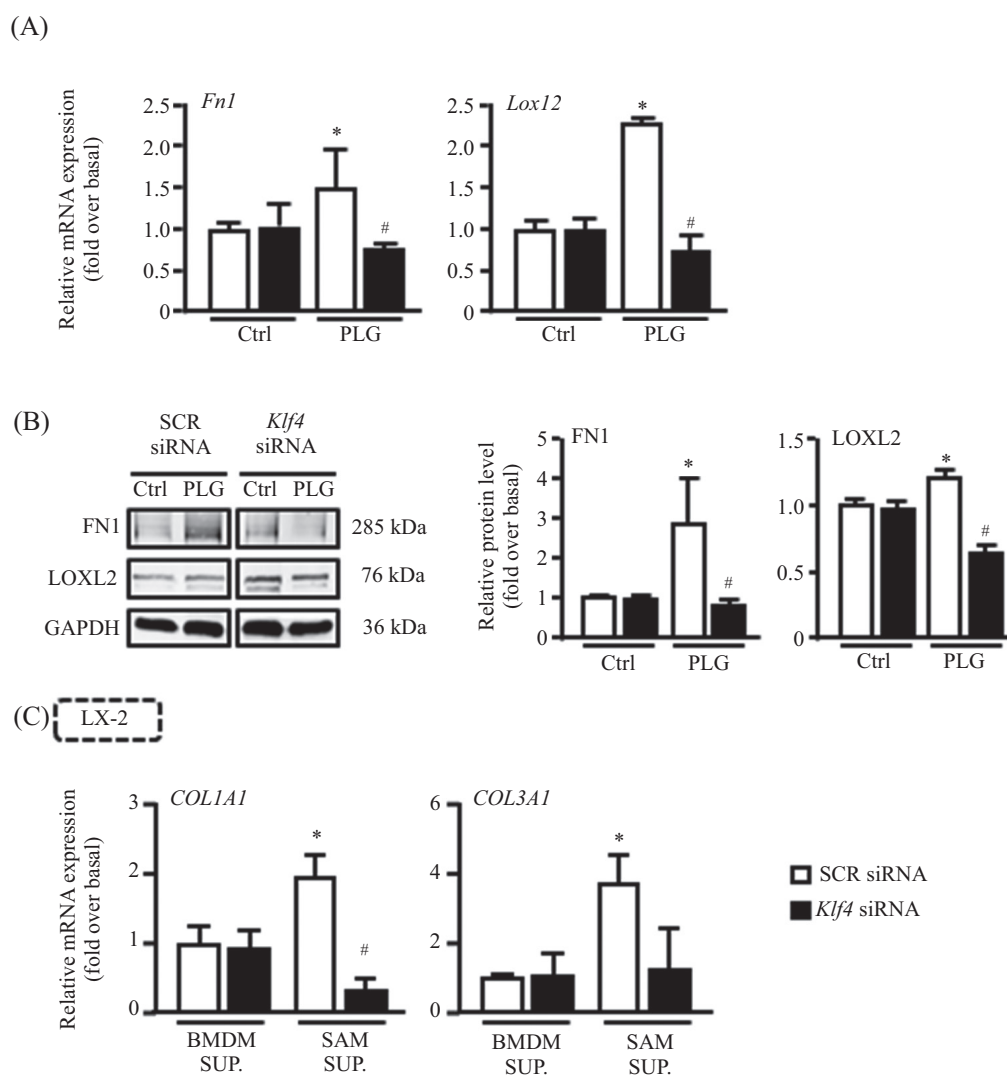
流式细胞术的结果表明在经 PLG 处理后, BMDM 中 SAM(CD9<sup>+</sup>TREM2<sup>+</sup>) 比例由 15% 上升至 80%, 而在 KLF4 敲减后该比例下调至 40% (图 3C)。以上结果表明 KLF4 是 PLG 驱动 SAM 表型转化的重要参与

者。

## 2.4 KLF4敲减抑制了PLG诱导的SAM功能基因表达

我们进一步检测了SAM功能基因的表达情况。我们选择*FN1*和*LOXL2*作为SAM功能基因的代表。RT-qPCR结果显示PLG明显增加了BMDM中*Fnl*和*Loxl2*的mRNA表达水平,而在KLF4敲减后,*Fnl*和*Loxl2*的mRNA水平下降(图4A)。蛋白表达与mRNA表达一致,在PLG诱导BMDM转化为SAM后, FN1和LOXL2的蛋白水平升高,而*Klf4* siRNA抑制了PLG的作用(图4B)。

此外,我们还检测了SAM培养上清是否影响HSC中细胞外基质的产生。我们分别收集了敲减/未敲减KLF4的BMDM培养上清、SAM培养上清,随后使用这些培养上清处理LX-2,并检测了LX-2中*COL1A1*、*COL3A1*(均为HSC产生的细胞外基质成分)的表达情况。结果发现SAM培养上清处理后,LX-2中*COL1A1*、*COL3A1*表达水平升高,KLF4敲减明显抑制该作用(图4C)。这些结果表明PLG诱导的SAM具有促进HSC产生细胞外基质的功能,而KLF4敲减可阻断该功能,进一步表明了KLF4在PLG诱导的SAM表型转化中的重要作用。

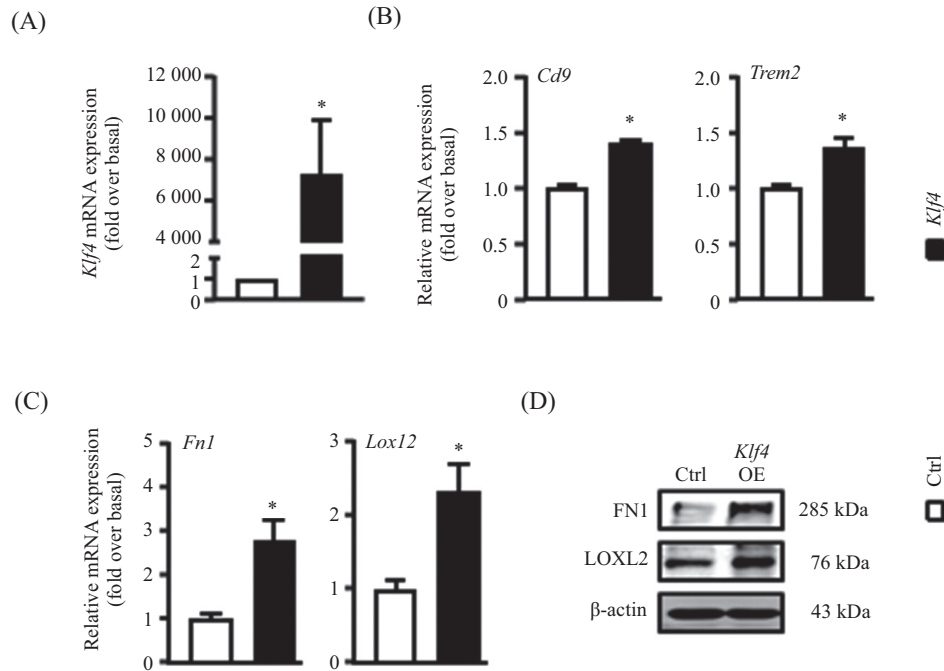


A: *Fnl*和*Loxl2*的mRNA表达情况。B: FN1和LOXL2的蛋白表达情况。C: 收集BMDM或SAM培养上清用于处理LX-2细胞。LX-2细胞中*COL1A1*、*COL3A1*的mRNA表达。\* $P < 0.05$ , 与Ctrl组或BMDM培养上清(BMDM SUP.)组比较。# $P < 0.05$ , 与SCR siRNA组比较。

A: the mRNA expression levels of *Fnl* and *Loxl2* were detected. B: the protein levels of FN1 and LOXL2 were detected by western blot. C: the supernatant of BMDM or SAM was collected, and used to treated LX-2. The expression of *COL1A1* and *COL3A1* were studied in LX-2 cells. \* $P < 0.05$  compared with the Ctrl or BMDM SUP. group. # $P < 0.05$  compared with the SCR siRNA group.

图4 KLF4敲减抑制SAM功能

Fig.4 KLF4 knockdown inhibited the functions of SAM



A: *Klf4*的mRNA表达情况。B: *Cd9*和*Trem2*的mRNA表达情况。C: *Fn1*和*Loxl2*的mRNA表达情况。D: FN1和LOXL2的蛋白表达情况。\* $P < 0.05$ , 与对照组比较。

A: the mRNA expression of *Klf4*. B: the mRNA expression of *Cd9* and *Trem2*. C: the mRNA expression of *Fn1* and *Loxl2*. D: the protein levels of FN1 and LOXL2. \* $P < 0.05$  compared with the Ctrl group.

图5 KLF4过表达促进SAM表型转化

Fig.5 KLF4 overexpression promoted the transformation of SAM

## 2.5 KLF4过表达促进SAM表型转化

最后,我们向BMDM中转染了KLF4过表达质粒,24 h后收集细胞。在检测转染效率合格(图5A)后,我们分别检测了SAM标志基因(*Cd9*、*Trem2*)及功能基因(*Fn1*、*Loxl2*)的表达情况。结果显示KLF4过表达后,SAM标志基因及功能基因的mRNA水平均明显上调(图5B和图5C);且FN1和LOXL2的蛋白水平升高(图5D)。以上结果进一步表明KLF4是SAM表型转化的关键参与者。

## 3 讨论

在本研究中,我们利用单细胞测序数据分析发现转录因子KLF4高表达于成熟SAM中。体外实验表明在PLG驱动BMDM转化为SAM的过程中,KLF4蛋白表达水平升高,且其定位在细胞核中。特异性敲减小鼠原代BMDM中的KLF4表达后,PLG诱导的SAM标志基因和功能基因的表达上调被抑制,BMDM转化为SAM的比例显著下降,SAM诱导HSC产生细胞外基质的功能受阻;而过表达KLF4则上调了SAM标志基因和功能基因的表达。这表明KLF4是SAM表型转化的重要参与者。

在本研究中,我们首先通过单细胞测序数据分析得到三个可能参与SAM表型转化的基因(*App*、*Cd36*及*Klf4*)。在前期研究中,我们已经证实PLG的膜受体Plg-R<sub>KT</sub>参与了SAM的表型转化<sup>[9]</sup>。在此,我们主要关注细胞内发生的事件,以期阐明PLG诱导SAM表型转化的分子机制。因此我们选择了转录因子KLF4进行进一步研究。KLF4是进化保守的锌指转录因子家族成员,在多种组织、细胞中表达,是调控细胞分化的关键因子,也是炎症、肿瘤等各种病理过程的重要参与者<sup>[12]</sup>。KLF4是导致体细胞去分化为诱导多能干细胞的四个核心转录因子之一<sup>[13]</sup>。在血管炎症中,雌激素通过KLF4诱导血管平滑肌细胞转分化为巨噬细胞样细胞<sup>[14]</sup>。此外,KLF4在M2型巨噬细胞中被强烈诱导,在M1型巨噬细胞中的表达水平则显著下降;通过与STAT6协作,KLF4促进了M2相关基因的表达并抑制了炎症因子的产生<sup>[15]</sup>。在矽肺中,维生素D通过KLF4诱导巨噬细胞转化为M2表型,以减轻损伤组织中的炎症反应<sup>[16]</sup>。低剂量地西他滨同样通过KLF4促进原发性免疫性血小板减少症患者的巨噬细胞向M2型转化<sup>[17]</sup>。但一项关于类风湿性关节炎的研究显示KLF4过表达的巨噬

细胞获得了M1表型, 通过产生更多炎症因子进一步加重软骨细胞损伤和凋亡, 促进关节滑膜组织的损伤和炎症反应<sup>[18]</sup>。本研究中, 我们发现KLF4是巨噬细胞向SAM转化的关键因子。

KLF4以多种方式参与了组织纤维化过程。在缺血再灌注导致慢性肾脏病和纤维化的过程中, KLF4通过激活转录因子YAP的活性导致病情恶化<sup>[19]</sup>。在肺纤维化中, KLF4发挥了双向作用, 一方面参与TGF- $\beta$ 信号通路诱导的肺肌成纤维细胞活化, 导致肺纤维化的加剧<sup>[20]</sup>; 另一方面抑制成纤维细胞增殖、胶原合成, 减缓肺纤维化进程<sup>[21]</sup>。此外, 敲减KLF4可抑制胰腺星形细胞的活化, 减轻慢性胰腺炎导致的纤维化<sup>[22]</sup>。我们的结果表明KLF4可以影响巨噬细胞向SAM表型的转化, 提示KLF4参与组织纤维化的新机制。

*FNI*是纤连蛋白的编码基因, 其表达在组织发生纤维化时显著上调, 其过度沉积被认为是纤维化发生的标志之一<sup>[23]</sup>。作为细胞外基质的重要组成部分, FN有助于胶原等其他细胞外基质成分的沉积, 导致组织结构的破坏和纤维化的加重<sup>[24-25]</sup>。通过与细胞表面的整合素结合, FN促进成纤维细胞向产生细胞外基质的肌成纤维细胞分化<sup>[26]</sup>, 调节免疫细胞的分化和黏附<sup>[27]</sup>。LOXL2是胶原产生过程中的重要蛋白质修饰酶, 负责催化胶原蛋白与其他细胞外基质蛋白形成共价交联, 提高细胞外基质的硬度<sup>[28]</sup>。在肝纤维化过程中, LOXL2表达水平明显上调, 促进胶原交联成网络并阻止细胞外基质降解<sup>[29]</sup>。我们前期已发表的结果证实了相较于其他巨噬细胞, SAM高表达*FNI*和*LOXL2*<sup>[9]</sup>, 提示了SAM促纤维化发生的机制, 因此在本研究中, 我们选择二者作为SAM的代表性功能基因。

综上所述, 我们的结果表明了转录因子KLF4是介导巨噬细胞转化为SAM表型的关键因子, 阐明了SAM表型转化的分子机制, 为肝纤维化新疗法的开发提供了更多的理论支持和潜在靶点。

## 参考文献 (References)

- [1] LI G, YANG H, ZHANG D, et al. The role of macrophages in fibrosis of chronic kidney disease [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 177: 117079.
- [2] HAMMERICH L, TACKE F. Hepatic inflammatory responses in liver fibrosis [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2023, 20(10): 633-46.
- [3] SHAN Z, JU C. Hepatic macrophages in liver injury [J]. Front Immunol, 2020, 11: 322.
- [4] YANG H, CHENG H, DAI R, et al. Macrophage polarization in tissue fibrosis [J]. PeerJ, 2023, 11: e16092.
- [5] RAMACHANDRAN P, DOBIE R, WILSON-KANAMORI J R, et al. Resolving the fibrotic niche of human liver cirrhosis at single-cell level [J]. Nature, 2019, 575(7783): 512-8.
- [6] FABRE T, BARRON A, CHRISTENSEN S M, et al. Identification of a broadly fibrogenic macrophage subset induced by type 3 inflammation [J]. Sci Immunol, 2023, 8(82): eadd8945.
- [7] XIONG X, KUANG H, ANSARI S, et al. Landscape of intercellular crosstalk in healthy and NASH liver revealed by single-cell secretome gene analysis [J]. Mol Cell, 2019, 75(3): 644-60.
- [8] GADIPUDI L L, RAMAVATH N N, PROVERA A, et al. Annexin A1 treatment prevents the evolution to fibrosis of experimental nonalcoholic steatohepatitis [J]. Clin Sci, 2022, 136(9): 643-56.
- [9] YANG Y, LI W, LIU C, et al. Single-cell RNA seq identifies Plg-R<sub>KT</sub>-PLG as signals inducing phenotypic transformation of scar-associated macrophage in liver fibrosis [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2023, 1869(6): 166754.
- [10] TAKADA A, TAKADA Y. Physiology of plasminogen: with special reference to activation and degradation [J]. Haemostasis, 1988, doi: 10.1159/000215834.
- [11] VAGO J P, Sugimoto M A, LIMA K M, et al. Plasminogen and the plasminogen receptor, Plg-R<sub>KT</sub>, regulate macrophage phenotypic, and functional changes [J]. Front Immunol, 2019, 10: 1458.
- [12] HE Z, HE J, XIE K. KLF4 transcription factor in tumorigenesis [J]. Cell Death Discov, 2023, 9(1): 118.
- [13] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. Cell, 2006, 126(4): 663-76.
- [14] ZHANG R, WANG H, CHENG X, et al. High estrogen induces trans-differentiation of vascular smooth muscle cells to a macrophage-like phenotype resulting in aortic inflammation via inhibiting VHL/HIF1 $\alpha$ /KLF4 axis [J]. Aging, 2024, 16(11): 9876-98.
- [15] LIAO X, SHARMA N, KAPADIA F, et al. Kruppel-like factor 4 regulates macrophage polarization [J]. J Clin Invest, 2011, 121(7): 2736-49.
- [16] YANG Y, WEI S, LI Q, et al. Vitamin D protects silica particles induced lung injury by promoting macrophage polarization in a KLF4-STAT6 manner [J]. J Nutr Biochem, 2022, 110: 109148.
- [17] SHAO X, XU P, JI L, et al. Low-dose decitabine promotes M2 macrophage polarization in patients with primary immune thrombocytopenia via enhancing KLF4 binding to PPAR $\gamma$  promoter [J]. Clin Transl Med, 2023, 13(7): e1344.
- [18] YE Q, LUO F, YAN T. Transcription factor KLF4 regulated STAT1 to promote M1 polarization of macrophages in rheumatoid arthritis [J]. Aging, 2022, 14(14): 5669-80.
- [19] XU D, CHEN P P, ZHENG P Q, et al. KLF4 initiates sustained YAP activation to promote renal fibrosis in mice after ischemia-reperfusion kidney injury [J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42(3): 436-50.
- [20] CHANDRAN R R, XIE Y, GALLARDO-VARA E, et al. Distinct roles of KLF4 in mesenchymal cell subtypes during lung fibrogenesis [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 7179.
- [21] PENKE L R, SPETH J M, HUANG S K, et al. KLF4 is a thera-

- peutically tractable brake on fibroblast activation that promotes resolution of pulmonary fibrosis [J]. *JCI Insight*, 2022, 7(16): e160688.
- [22] ZHAO Y, FENG Y, SUN F, et al. Optimized rAAV8 targeting acinar KLF4 ameliorates fibrosis in chronic pancreatitis via exosomes-enriched let-7s suppressing pancreatic stellate cells activation [J]. *Mol Ther*, 2024, 32(8): 2624-40.
- [23] REN L L, MIAO H, WANG Y N, et al. TGF-beta as a master regulator of aging-associated tissue fibrosis [J]. *Aging Dis*, 2023, 14(5): 1633-50.
- [24] VALIENTE-ALANDI I, POTTER S J, SALVADOR A M, et al. Inhibiting fibronectin attenuates fibrosis and improves cardiac function in a model of heart failure [J]. *Circulation*, 2018, 138(12): 1236-52.
- [25] SOTTILE J, HOCKING D C. Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions [J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(10): 3546-59.
- [26] SERINI G, BOCHATON-PIALLAT M L, ROPRAZ P, et al. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1 [J]. *J Cell Biol*, 1998, 142(3): 873-81.
- [27] BONADIO J D, BASHIRI G, HALLIGAN P, et al. Delivery technologies for therapeutic targeting of fibronectin in autoimmunity and fibrosis applications [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2024, 209: 115303.
- [28] VALLET S D, RICARD-BLUM S. Lysyl oxidases: from enzyme activity to extracellular matrix cross-links [J]. *Essays Biochem*, 2019, 63(3): 349-64.
- [29] CHEN W, YANG A, JIA J, et al. Lysyl oxidase (LOX) family members: rationale and their potential as therapeutic targets for liver fibrosis [J]. *Hepatology*, 2020, 72(2): 729-41.