

# Colgalt2基因敲除小鼠Kupffer细胞形态及亚型差异

王建文<sup>1</sup>, 张一帆<sup>2</sup>, 李玉凤<sup>1</sup>, 杨琪<sup>2</sup>, 郝晓花<sup>1</sup>, 黄玉波<sup>1</sup>, 魏红山<sup>1,2</sup> (1.首都医科大学附属北京地坛医院, 北京 100015; 2.北京大学地坛医院教学医院 北京大学医学部, 北京 100015)

**摘要:** 目的 从Colgalt2基因敲除小鼠肝脏内分离Kupffer细胞, 并比较其与正常小鼠Kupffer细胞形态分化和亚型分化的差异。方法 采用胶原酶灌注法、percoll密度梯度离心法和免疫磁珠分选法分离纯化Kupffer细胞, 并将分离的Kupffer细胞进行培养, 显微镜下观察其形态的变化和差异。用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)分别刺激Kupffer细胞6小时、12小时和24小时, 检测细胞亚型。结果 分离获得Kupffer细胞数目为 $(4.42 \pm 0.63) \times 10^6$ /鼠肝, 流式细胞仪检测细胞纯度为97.9%。培养后的细胞逐渐延伸为不规则形态, 早期Colgalt2基因敲除小鼠Kupffer细胞形态分化相比正常小鼠有延迟, 后期两者无显著差异。在未刺激状态下, Colgalt2<sup>-/-</sup>小鼠M1型Kupffer细胞的比例小于Colgalt2<sup>+/+</sup>小鼠, Colgalt2<sup>-/-</sup>小鼠M2a型Kupffer细胞所占比例较高; LPS刺激6小时后, Colgalt2<sup>-/-</sup>小鼠M2a型所占比例高于Colgalt2<sup>+/+</sup>小鼠; LPS刺激12小时后, Colgalt2<sup>-/-</sup>小鼠M2a型和M2c型Kupffer细胞所占比例小于Colgalt2<sup>-/-</sup>小鼠; LPS刺激24小时后, Colgalt2<sup>-/-</sup>小鼠M2c型细胞所占比例高于Colgalt2<sup>+/+</sup>小鼠。结论 应用胶原酶灌注法、percoll密度梯度离心法、免疫磁珠分选法可以获得纯度较高的小鼠肝脏Kupffer细胞, 为后期的细胞实验奠定基础。Colgalt2基因的敲除会影响小鼠Kupffer细胞的形态分化和亚型分化。

**关键词:** Colgalt2; 基因敲除; Kupffer细胞; 细胞形态; 细胞亚型

## Differences of morphology and subtypes of Kupffer cells in Colgalt2 knockout mice

WANG Jian-wen<sup>1</sup>, ZHANG Yi-fan<sup>2</sup>, LI Yu-feng<sup>1</sup>, YANG Qi<sup>2</sup>, HAO Xiao-hua<sup>1</sup>, HUANG Yu-bo<sup>1</sup>, WEI Hong-shan<sup>1,2</sup> (1.Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 2.Peking University Ditan Teaching Hospital, Peking University Health Science Center, Beijing 100015, China)

**Abstract: Objective** To compare the morphological differences between Kupffer cells which were isolated from Colgalt2 gene knockout mice and wild mice in primary culture. **Methods** Kupffer cells were isolated by perfusion of collagenase, density gradient centrifugation and immunomagnetic method. The morphology of the cells were observed by microscope. The subtypes of the Kupffer cells were detected at 6 h, 12 h and 24 h after incubated with lipopolysaccharide (LPS). **Results** The average cell yield per mice liver was  $(4.42 \pm 0.63) \times 10^6$ . The purity of Kupffer cells was 97.9%. The cultured Kupffer cells exhibited irregular shape, in the early stages, the morphology of Kupffer cells isolated from Colgalt2 gene knockout mice exhibited later differentiation than wild mice, but in the later stages, it showed no difference. Under normal circumstances, the proportion of M2a Kupffer cells in Colgalt2<sup>-/-</sup> mice were higher than that in Colgalt2<sup>+/+</sup> mice; the proportion of M2a Kupffer cells in Colgalt2<sup>-/-</sup> mice were significantly higher at 6 hours after incubated with LPS; the proportion of M2a and M2c Kupffer cells in Colgalt2<sup>+/+</sup> mice decreased significantly than those in Colgalt2<sup>-/-</sup> mice after 12 hours. After 24 hours, the M2c subtypes of Kupffer cells in Colgalt2<sup>-/-</sup> mice were significantly higher than those in Colgalt2<sup>+/+</sup> mice. **Conclusions** Higher purity of Kupffer cells were gained by perfusion of collagenase, density gradient centrifugation and immunomagnetic method. The Colgalt2 is involved in the morphology and the differentiation of Kupffer cells.

**Key words:** Colgalt2; Gene knockout; Kupffer cells; Morphology; Subtype

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2016.02.013

基金项目: 国家自然科学基金(No.81271901); 北京市自然科学基金(No.7152073)

通讯作者: 魏红山 Email: drwei@ccmu.edu.cn

Kupffer细胞位于肝窦状间隙内,作为体内最大的巨噬细胞群在肝脏内发挥重要的作用<sup>[1]</sup>,如清除凋亡和衰老的细胞、吞噬途经门静脉的病原物以及递呈抗原等<sup>[2,3]</sup>,Kupffer细胞在肝脏介导的免疫耐受中也发挥着重要的作用。Kupffer细胞可以被不同激活途径活化为不同的细胞亚型,包括M1型、M2a型、M2b型和M2c型,不同的细胞亚型在不同的病理过程中发挥不同的作用<sup>[4]</sup>。细胞的形态分化和亚型分化涉及诸多蛋白质,大部分蛋白质需经过糖基化修饰以进一步调节细胞的各种功能<sup>[5]</sup>。*Colgalt2*是糖基25家族的成员,可以催化胶原分子半乳糖基化修饰活性,在胶原原纤维分子的组装中发挥重要的作用<sup>[6]</sup>,而胶原作为细胞外基质的一种重要的结构蛋白,是细胞外基质重要的组成部分。本实验初步探究糖基化修饰对糖基化基因*Colgalt2*敲除小鼠Kupffer细胞的形态变化和亚型分化的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 雄性C57BL/6小鼠(6~8周)购于北京大学医学部;*Colgalt2*基因敲除小鼠委托南京大学南京生物医药研究院模式生物所制备,且已鉴定为基因敲除小鼠;IV型胶原酶、DNA酶I、蛋白酶E(Sigma,美国);CD115-PE抗体、F4/80-FITC抗体(eBioscience,美国);抗PE磁珠、抗FITC磁珠(Miltenyi,德国);DMEM高糖培养基、胎牛血清(Gibco,美国);Nycodenz分离液(Nycomed Pharma AS,挪威);鼠抗F4/80-eFluor 450抗体、Ly6c-APC eFluor 780抗体、CD86-PE Cyamine7抗体、CD150-APC抗体(eBioscience,美国);CD206-Alexa Fluor 488抗体(Biolegend,美国)。

**1.2 液体的配制** ①前灌注液:含0.25% EGTA的不含钙镁的Hank's平衡盐溶液。②后灌注液:含0.16 mg/ml IV型胶原酶和0.04 mg/ml蛋白酶E的含钙镁的Hank's平衡盐溶液。③酶消化液:含0.08 μg/ml的DNA酶I的后灌注液。④30% Nycodenz用不含钙镁的Hank's平衡盐溶液配制。⑤DMEM完全培养基:含有5%的FBS和0.2%的双抗。

## 1.3 Kupffer细胞的分离纯化

**1.3.1 肝脏灌注与消化** 0.8%的戊巴比妥钠麻醉小鼠,腹部皮肤酒精消毒,剪开小鼠腹部,暴露小鼠门静脉。头皮针穿刺小鼠门静脉,先将40 ml前灌注液匀速灌注,当肝脏隆起时,剪断小鼠下腔静脉,待肝脏完全变白且下腔静脉无明显血液流出时,慢速灌注20 ml后灌注液,待肝脏出现裂状间隙时,去

除胆囊,取下肝脏。Hank's平衡盐溶液冲洗肝脏,用剪刀剪碎肝脏,加入酶消化液,恒温振荡器37℃、220 rpm/min振荡消化10分钟,加入20%的FBS终止消化,200目滤网过滤。

**1.3.2 分离Kupffer细胞** 将细胞悬液30×g离心5分钟,沉淀肝实质细胞,取上清液,500×g离心10分钟沉淀肝非实质细胞,弃上清,加入1 ml DMEM完全培养基和3 ml 30%的Nycodenz,将混悬液转入15 ml离心管中,上层铺5 ml不含钙镁的Hank's平衡盐溶液,500×g离心15分钟,取两层中间的细胞层,用DMEM完全培养基清洗1遍。

**1.3.3 免疫磁珠分选Kupffer细胞** 按照产品说明书步骤进行。

**1.3.4 流式细胞仪鉴定** 取一定量的细胞悬液上机检测。

**1.3.5 细胞培养及拍照** 将细胞用DMEM完全培养基稀释至一定浓度,置于培养瓶内培养,并于0天、7天、14天、21天时在显微镜下观察细胞的形态并拍照记录。

**1.4 Kupffer细胞的亚型鉴定** 将分离提取的*Colgalt2*<sup>-/-</sup>小鼠和*Colgalt2*<sup>+/+</sup>小鼠Kupffer细胞分别分为2组,即对照组(无LPS刺激)和Kupffer细胞+LPS(2 μg/ml)组。用胰酶消化获取不同时间点的细胞,加入抗体孵育10分钟后上机检测,其中M1型为F4/80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>,M2a型为F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>cd150<sup>-</sup>,M2b型为F4/80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>,M2c型为F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>cd150<sup>+</sup>。

**1.5 统计学方法** 采用Graphpad Prism 5.01软件进行统计数据分析,数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用t检验,以 $P < 0.05$ 为各组小鼠细胞亚型的差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Kupffer细胞的得率和纯度** 免疫磁珠分选Kupffer细胞后,得率为 $(4.42 \pm 0.63) \times 10^6$ /鼠肝,经流式细胞仪检测后细胞纯度为97.9%,如图1。

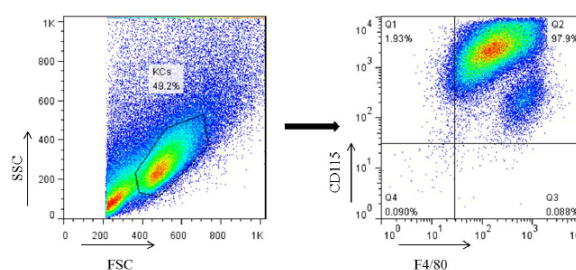


图1 流式细胞仪检测分选Kupffer细胞

**2.2 Kupffer细胞的形态变化与差异** 刚分选的Kupffer在显微镜下呈圆形,细胞折光率较高,边缘不光滑,体积小于肝细胞。培养4小时后,细胞完全贴壁。培养7天后,从*Colgalt2*基因敲除小鼠和正常小鼠中分离的Kupffer细胞均有细胞伸展为长梭型,且部分有伪足伸出,但与*Colgalt2*<sup>+/+</sup>小鼠相比,*Colgalt2*<sup>-/-</sup>小鼠Kupffer细胞形态分化的程度较低。培养14天后,延展为长梭型以及伸出伪足的细胞数量和程度显著升高,但是*Colgalt2*<sup>-/-</sup>小鼠Kupffer细胞形态分化的程度仍然较低。培养21天后,细胞呈相互连接片状式生长,且*Colgalt2*<sup>-/-</sup>小鼠与正常小鼠Kupffer细胞形态分化无显著差异,如图2。

**2.3 Kupffer细胞的亚型变化与差异** 在基线状态下,相比*Colgalt2*<sup>+/+</sup>小鼠,*Colgalt2*<sup>-/-</sup>小鼠M1型Kupffer细胞的比例显著降低( $t = 6.421$ ,  $P = 0.0030$ )。*Colgalt2*<sup>-/-</sup>小鼠M2a型Kupffer细胞的比例显著高于*Colgalt2*<sup>+/+</sup>小鼠( $t = 5.746$ ,  $P = 0.0105$ ),但M2b型和M2c型Kupffer细胞的比例无显著差异( $t$ 值分别为0.9860、0.3540,  $P$ 值分别为0.3799、0.7467)。LPS刺激6小时后,*Colgalt2*<sup>+/+</sup>小鼠和*Colgalt2*<sup>-/-</sup>小鼠M1、M2b、M2c型Kupffer细胞比例无统计学差异( $t$ 值分别为0.6566、0.2967、0.2047,  $P$ 值分别为0.5263、0.7727、0.8419),*Colgalt2*<sup>-/-</sup>小鼠M2a型Kupffer细胞的比例显著高于*Colgalt2*<sup>+/+</sup>小鼠( $t = 2.562$ ,  $P = 0.0335$ )。LPS刺激12小时后,*Colgalt2*<sup>+/+</sup>小鼠和*Colgalt2*<sup>-/-</sup>小鼠M1、M2b型Kupffer细胞比例无统计学差异( $t$ 值分别为0.7046、0.3023,  $P$ 值分别为0.4971、0.7686)。*Colgalt2*<sup>-/-</sup>小鼠M2a、M2c型Kupffer细胞的比例高于*Colgalt2*<sup>+/+</sup>小鼠( $t$ 值分别为3.133、2.600,  $P$ 值分别为0.0166、0.0288)。LPS刺激24小时后,两种基因型小鼠M1、M2a、M2b型Kupffer细胞的比例无统计学差

异( $t$ 值分别为0.4153、1.204、0.4315,  $P$ 值分别为0.6867、0.2631、0.6753),*Colgalt2*<sup>-/-</sup>小鼠M2c型Kupffer细胞的比例高于*Colgalt2*<sup>+/+</sup>小鼠( $t = 2.279$ ,  $P = 0.0486$ ),如图3。

### 3 讨论

Kupffer细胞位于肝窦状间隙内,细胞形状不规则,附着在内皮细胞上,可通过伪足伸入窦周间隙内与其他细胞进行接触,另外Kupffer细胞还可以在血窦内游走<sup>[7,8]</sup>。Kupffer细胞可以与流经门静脉的物质直接接触,因此可以直接吞噬清除来源于门静脉的坏死的细胞碎片和外源性物质等<sup>[9,10]</sup>。细胞的形态变化和迁移由整合蛋白与特定的ECM蛋白结合介导,形成ECM-黏附分子-细胞骨架-细胞核结构系统,这个系统可以感受外界刺激信号的变化,并在基质金属蛋白酶MMP以及整合蛋白 $\beta$ 等的调节下发生形态学改变和细胞迁移等过程<sup>[11]</sup>。有研究证实,O-糖基化修饰和N-糖基化修饰可以通过整合素晚期抗原4(VLA-4)调节HBL-8细胞和H-ALCL细胞纤连蛋白的黏附程度,从而使细胞的黏附和迁移发生改变<sup>[12]</sup>。用O-糖基化抑制剂处理细胞外结构域MUC1黏蛋白后,子宫内膜细胞与细胞外基质I型胶原的黏附增加,证实O-糖基化修饰可以调节细胞之间的黏附作用<sup>[13]</sup>。因此推测,*Colgalt2*基因的敲除使组织细胞外基质与细胞间的黏附增加,导致*Colgalt2*<sup>-/-</sup>小鼠的Kupffer细胞在早期时形态分化程度降低且迁移速率下降。在不同的病理阶段,Kupffer细胞可以分化为不同的细胞亚型<sup>[14]</sup>,如在肝纤维化形成阶段发挥主要作用的是M2c型,在肝纤维化逆转阶段发挥主要作用是M2a型,M2b型主要在肝脏正常的生理情况下发挥作用<sup>[15]</sup>,M1型主要存在于急性炎症期和肝纤维化形成及逆转早期<sup>[16]</sup>。有研究表明,巨噬细胞的极化与胞内信号途径NF- $\kappa$ B的激

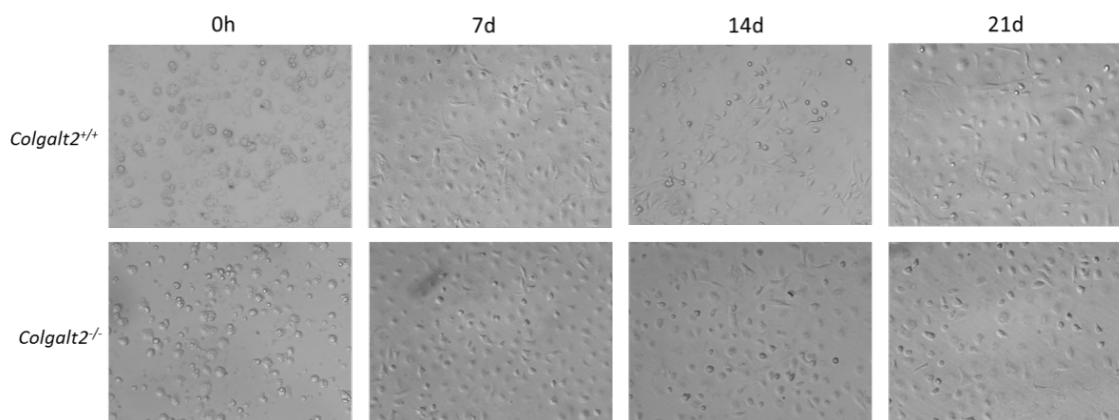


图2 分选后的Kupffer细胞培养0小时、7天、14天和21天后的形态变化( $\times 20$ )

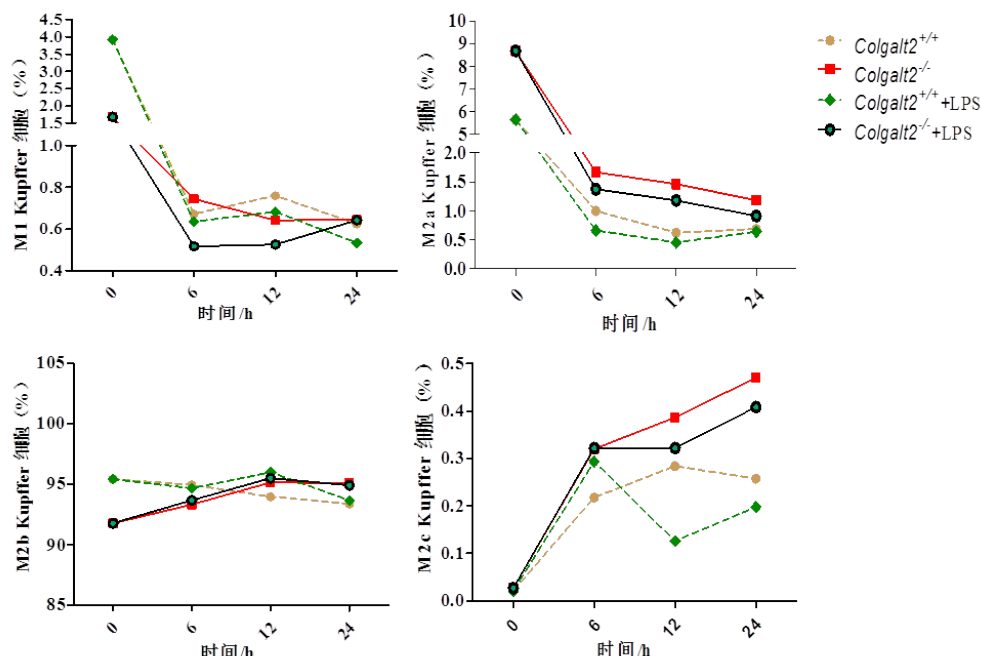


图3 *Colgalt2*<sup>+/+</sup> 小鼠和 *Colgalt2*<sup>-/-</sup> 小鼠 Kupffer 细胞亚型分化的差异

活相关<sup>[17]</sup>。Kupffer细胞的分离主要采取密度梯度离心法<sup>[18,19]</sup>,但获得的细胞纯度较低,通过免疫磁珠分选可以大幅提高细胞的纯度<sup>[20]</sup>,为后续实验的进行奠定基础。*Colgalt2*为O-糖基化修饰基因,可以对胶原分子进行修饰<sup>[21,22]</sup>,而胶原是细胞外基质的必须成分<sup>[23]</sup>,同时细胞亚型的分化也涉及到许多蛋白质,尤其是细胞外基质的胶原蛋白和黏着蛋白等<sup>[24]</sup>,因此,基于*Colgalt2*基因敲除模型可以初步探究O-糖基化修饰对细胞形态变化和亚型分化的影响。本实验发现,敲除*Colgalt2*基因后,在早期阶段,Kupffer细胞的形态分化有所延迟,而在后期阶段,Kupffer细胞的形态分化无显著差异,可能存在其他的O-糖基化修饰基因发生代偿作用;在不同的阶段,两种基因型小鼠均存在不同的细胞亚型,因此,提示该基因可能参与小鼠细胞形态的分化和亚型分化。

#### 参考文献

- [1] Gehring S, Dickson EM, San Martin ME, et al. Kupffer cells abrogate cholestatic liver injury in mice[J]. *Gastroenterology*,2006,130:810-822.
- [2] Yang Y, Harvey SA, Gandhi CR. Kupffer cells are a major source of increased platelet activating factor in the CCl<sub>4</sub>[J]. *J Hepatol*,2003,39:200-207.
- [3] Duwaerts CC, Gehring S, Cheng CW, et al. Contrasting responses of Kupffer cells and inflammatory mononuclear phagocytes to biliary obstruction in a mouse model of cholestatic liver injury[J]. *Liver Int*,2013,33:255-265.
- [4] LIU C, TAO Q, SUN M, et al. Kupffer cells are associated with apoptosis, inflammation and fibrotic effects in hepatic fibrosis in rats[J]. *Lab Invest*,2010,90:1805-1816.
- [5] Naegeli A, Aebi M. Current approaches to engineering N-Linked protein glycosylation in bacteria[J]. *Methods Mol Biol*,2015:3-16.
- [6] Schegg B, Hülsmeier AJ, Rutschmann C, et al. Core glycosylation of collagen is initiated by two beta (1-O) galactosyltransferases[J]. *Mol Cell Biol*,2009,29:943-952.
- [7] ZENG WQ, ZHANG JQ, LI Y, et al. A New Method to Isolate and Culture Rat Kupffer Cells[J]. *Plos One*,2013,8:e70832-e70832.
- [8] Heymann F, Peusquens J, Ludwig-Portugall I, et al. Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by Kupffer cells[J]. *Hepatology*,2015,62:279-291.
- [9] Duwaerts CC, Gehring S, Cheng CW, et al. Contrasting responses of Kupffer cells and inflammatory mononuclear phagocytes to biliary obstruction in a mouse model of cholestatic liver injury[J]. *Liver International*,2013,33:255-265.
- [10] Tsutsui H, Nishiguchi S. Importance of Kupffer cells in the development of acute liver injuries in mice[J]. *Int J Mol Sci*,2014,15:7711-7730.
- [11] Taubenberger AV, Bray LJ, Haller B, et al. 3D extracellular matrix interactions modulate tumour cell growth, invasion and angiogenesis in engineered tumour microenvironments[J]. *Acta Biomater*,2016,36:73-85.
- [12] Suzuki O, Abe M, Hashimoto Y. Sialylation and glycosylation modulate cell adhesion and invasion to extracellular matrix in human malignant lymphoma: Dependency on integrin and the Rho GTPase family[J]. *Int J Oncol*,2015,47:2091-2099.
- [13] Porowska H, Paszkiewicz-Gadek A, Anchim T, et al. Inhibition of the O-glycan elongation limits MUC1 incorporation to cell membrane of human endometrial carcinoma cells[J]. *Int J Mol Med*,2004,13:459-464.

- [14] Svensson - Arvelund J, Ernerudh J. The role of macrophages in promoting and maintaining homeostasis at the fetal-maternal interface[J]. Am J Reprod Immunol,2015,74:100-109.
- [15] Wan J, Benkdane M, Teixeira-Clerc F, et al. M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: a protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease[J]. Hepatology,2014,59:130-142.
- [16] 陈芳艳. 肝纤维化发生发展及逆转过程中kupffer细胞表型的研究[D]. 中国人民解放军军事医学科学院,2013.
- [17] Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene[J]. Science,282,2085-2088.
- [18] Kitani H, Takenouchi T, Sato M, et al. A novel isolation method for macrophage-like cells from mixed primary cultures of adult rat liver cells[J]. J Immunol Methods,2010,360:47-55.
- [19] Cheng CW, Duwaerts CC, Rooijen Nv, et al. NK cells suppress experimental cholestatic liver injury by an interleukin-6-mediated, Kupffer cell-dependent mechanism[J]. J Hepatol,2011,54:746-752.
- [20] 贺蕾, 杨江华, 姚应水, 等. 免疫磁珠法分选小鼠肝脏Kupffer细胞及其特性观察[J]. 皖南医学院学报,2009,28:239-241.
- [21] 魏红山, 李红敏, 任慧, 等. 糖基因GLT2SD2敲除小鼠的制备与基因型鉴定[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2013,27:492-494.
- [22] 王智强, 杨琪, 王建文, 等. 糖基转移酶Colgalt2基因敲除对肝细胞再生过程中增殖和凋亡的作用研究[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版),2015:26-31.
- [23] McLeod O, Dunér P, Samnegård A, et al. Autoantibodies against basement membrane collagen type IV are associated with myocardial infarction[J]. IJC Heart & Vasculature,2015,6:42-47.
- [24] LIU X, CHEN N, LIN S, et al. Synthesized peptide 710-725 from HCV subtype 1a E2 glycoprotein blocks HCV infection through competitive binding of CD81[J]. Int J Mol Med,2015,30:194-201.

收稿日期: 2016-03-04

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 《中国医学前沿杂志(电子版)》征稿启事

《中国医学前沿杂志(电子版)》创刊于2008年9月,是国家卫生和计划生育委员会主管、人民卫生出版社主办的集光盘、纸版导读、网络、手机报、微信、微博等多位一体的国家级电子期刊,现为月刊,国内统一刊号:CN 11-9298/R,国际标准刊号:ISSN 1674-7372,全国公开发行,邮发代号:82-136,光盘定价:20元/期,2013年9月加入中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)。

《中国医学前沿杂志(电子版)》已被万方、知网等数据库全文收录,2013年扩展影响因子为1.586,在全国129种医药卫生总论类期刊中排名第1;2013年核心影响因子为0.796,在全国47种医学综合类期刊中排名第7。

《中国医学前沿杂志(电子版)》常设栏目有院士论坛、述评、专题笔谈、专家论坛、论著、中国循证指南共识、国际循证指南共识、病例报告、百家讲坛(视频)、会议纪要等

征稿栏目: 论著

征稿方向: 医学各学科

投稿方式: [www.yixueqianyan.cn](http://www.yixueqianyan.cn)