功能未知基因C6orf120缺失对自身免疫性肝炎大鼠CD4$^+$T细胞活化的影响

张曼卡[1], 马慧敏[2], 张健[1], 叶小慧[3], 何玲玲[4], 杨君茹[4], 李鑫[1,2]（1.北京大学地坛医院教学医院 中西医结合中心，北京 100015；2.首都医科大学附属北京地坛医院 中西医结合中心，北京 100015；3.北京大学地坛医院教学医院 传染病研究所，北京 100015；4.首都医科大学附属北京地坛医院 传染病研究所，北京 100015）

摘要：目的 研究C6orf120基因缺失对自身免疫性肝炎大鼠CD4$^+$ T细胞活化的影响。**方法** 将野生型大鼠与C6orf120基因敲除大鼠分别随机分为5组，每组8只，以30 mg/kg刀豆蛋白A静脉注射诱导自身免疫性肝炎模型。于造模前后0小时、12小时、24小时、48小时和72小时处死大鼠，称量计算免疫器官指数，利用流式细胞术分析比较两种大鼠脾脏、外周血以及肝内淋巴细胞中CD4$^+$ T细胞活化的差异，并比较外周血CD4$^+$/CD8$^+$ T细胞比值的差异。**结果** C6orf120基因敲除大鼠胸腺指数显著减小（F = 20.868，P ＜ 0.001）。C6orf120基因敲除大鼠在刀豆蛋白A诱导12小时以及24小时后脾脏CD4$^+$ T细胞活化增多（t值分别为3.538、2.547，P值分别为0.003、0.023）；同时，外周血以及肝内淋巴细胞CD4$^+$ T细胞活化增多（F值分别为33.801、55.015，P ＜ 0.001）。此外，C6orf120基因敲除后CD4$^+$/CD8$^+$显著上调（F = 55.989，P ＜ 0.001）。**结论** 本研究提示C6orf120基因缺失会促进自身免疫性肝炎大鼠CD4$^+$ T细胞的增殖。

关键词：C6orf120；自身免疫性肝炎；CD4$^+$ T细胞；刀豆蛋白A

Effects of deletion of unknown function gene C6orf120 on the activation of CD4$^+$ T cells in rats with autoimmune hepatitis

ZHANG Man-ka[1], MA Hui-min[2], ZHANG Jian[1], YE Xiao-hui[3], HE Ling-ling[4], YANG Jun-ru[4], LI Xin[1,2]

(1.Department of Center of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Peking University Ditan Teaching Hospital, Beijing 100015, China; 2.Department of Center of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 3.Department of Institute of Infectious Disease, Peking University Ditan Teaching Hospital, Beijing 100015, China. 4.Department of Institute of Infectious Disease, Beijing Ditan Teaching Hospital, Peking University Health Science Center, Beijing 100015, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of deletion of unknown function gene C6orf120 on the activation of CD4$^+$ T cells in autoimmune hepatitis rats. **Methods** Wild type and C6orf120 knockout rates were randomly divided into 5 groups, 8 rats in each group. Rates were given Con A 30 mg/kg by intravenous injection to establish autoimmune hepatitis model and sacrificed at 0 h, 12 h, 24 h, 48 h and 72 h before and after Con A challenging. The organs were weighed to calculate the index of immune organs. The CD4$^+$ T cell activation in splenocytes, peripheral blood mononuclear cells and intrahepatic lymphocytes were analyzed by flow cytometry. Meanwhile, the ratio of CD4$^+$/CD8$^+$ cells in peripheral blood mononuclear cells was evaluated. **Results** The thymus index of C6orf120 knockout rats decreased significantly (F = 20.868，P ＜ 0.001). C6orf120 deficiency increased CD4$^+$ T cell activation in splenocytes in 12 h and 24 h (t = 3.538, 2.547; P = 0.003, 0.023). Meanwhile, C6orf120 deficiency increased CD4$^+$ T cell activation in peripheral blood and intrahepatic lymphocytes (F = 33.801, 55.015; P ＜ 0.001). In addition, C6orf120 deficiency significantly

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2017.04.008

基金项目：十二五国家科技重大专项（2014ZX10005002-002）；国家中医药行业科研专项（201507005）；北京市中医药科技发展资金项目（JJ2015-72）

通讯作者：李鑫 Email: leaxin@sina.com

upregulated the $CD4^+/CD8^+$ ratio ($F = 55.989$, $P < 0.001$). **Conclusion** C6orf120 deficiency can upregulate the activation of $CD4^+$ T cells in autoimmune hepatitis rats.

Key words: C6orf120; Autoimmune hepatitis; $CD4^+$ T cells; Concanavalin A

自身免疫性肝炎是由自身免疫反应性T细胞介导的慢性进行性肝脏炎症性疾病，临床表现为AST/ALT升高、高γ-球蛋白血症、自身抗体阳性，组织学特征为以淋巴细胞和浆细胞浸润为主的界面性肝炎，严重的自身免疫性肝炎可能会快速进展为肝硬化和暴发性肝衰竭[1]。该病在世界范围内均有发生，在欧美国家发病率相对较高，在我国其病例数呈明显上升趋势。自身免疫性肝炎的免疫调节过程较为复杂，可能由细胞免疫与体液免疫共同介导。淋巴细胞亚群的改变可能在其病程中发挥重要作用[2]。研究发现自身免疫性肝炎患者与健康人群的外周血活化T细胞及其亚群$CD4^+$ T细胞、$CD8^+$ T细胞差异有统计学意义[3]，此外，自身免疫性肝炎患者的调节性T细胞数目下降、功能减弱[4]。T细胞是介导细胞免疫的效应细胞，$CD4^+$ T细胞在肝脏疾病的发生和发展过程中发挥重要作用。$CD4^+$ T细胞与肝脏疾病的相关作用机制尚未完全明确，但随着对$CD4^+$ T细胞与肝脏疾病关系研究的深入，必将为肝脏疾病发病机制的进一步阐明及临床寻找新的诊治策略提供新的依据[5]。

C6orf120是编码N-糖基化蛋白的功能未知基因。本课题组前期研究结果提示该基因具有促进$CD4^+$T细胞凋亡的作用[6]。此外，对肿瘤放射治疗反应差的患者体内C6orf120基因相应蛋白的表达量增多，这一结果提示其蛋白产物与免疫系统有关[7]。根据现有研究结果推测，新基因C6orf120可能具有重要的免疫调节功能。刀豆蛋白A是一种植物凝集素，其可诱导$CD4^+$T细胞介导的自身免疫性肝炎[8,9]。刀豆蛋白A模型是自身免疫性肝炎较常用的模型，刀豆蛋白A主要刺激$CD4^+$T细胞，这在自身免疫性肝炎的病理进程中是非常关键的一步。已有研究表明活化T细胞介导的免疫参与肝损伤模型的建立。本研究借助刀豆蛋白A诱导的自身免疫性肝炎模型，通过比较野生型大鼠与C6or120基因敲除大鼠探究C6orf120基因对免疫系统的调节功能。

1 材料与方法

1.1 *实验动物与主要试剂* 本研究经首都医科大学附属北京地坛医院动物实验伦理委员会批准。选取雄性6～8周龄SD大鼠，野生型大鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司，基因敲除大鼠由苏州赛业生物科技有限公司制备。所有大鼠饲养于无特殊病原体级环境，5只/笼，温度（21 ± 2）℃，相对湿度为55%，12小时昼夜循环，适应环境1周后开始实验。刀豆蛋白A购于sigma公司，贮存于4 ℃。

1.2 *动物分组* 将野生型大鼠与C6orf120基因敲除大鼠分别随机分为5组，每组8只。以刀豆蛋白A 30mg/kg剂量静脉注射。造模前后0小时、12小时、24小时，48小时和72小时以急性大出血法处死大鼠。注射刀豆蛋白A后大鼠禁食不禁水，处死时称量每只大鼠体重，下腔静脉取血，取脾脏、胸腺并称量其重量用于免疫器官指数的计算。

1.3 *免疫器官指数的计算* 处死大鼠前称量大鼠重量，取出胸腺、脾脏，剔除附着组织，用干净纱布吸干血水后准确称重，计算免疫器官指数，公式如下：免疫器官指数（mg/g）= 免疫器官鲜重（mg）/大鼠活体重（g）。

1.4 *流式细胞表型分析* 采用密度梯度离心法分离外周血单个核细胞以及肝内淋巴细胞，对脾脏、外周血与肝内淋巴细胞进行CD4和（或）CD8表型染色，并用流式细胞仪（FACS Calibur，美国BD公司）进行检测。

1.5 *统计学处理* 采用SPSS 22.0软件对实验数据进行统计分析，所有数据采用$\bar{x} \pm s$表示，各组数据间比较采用方差分析和t检验。以$P < 0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *大鼠免疫器官指数* 经刀豆蛋白A刺激后，野生型大鼠脾脏指数为5.538 ± 0.197，C6orf120基因敲除大鼠脾脏指数为5.995 ± 0.191，差异无统计学意义（$F = 2.770$，$P = 0.101$）（图1A）；野生型大鼠胸腺指数为2.504 ± 0.078，C6orf120基因敲除大鼠胸腺指数为2.010 ± 0.075，基因敲除大鼠胸腺指数显著低于野生型大鼠（$F = 20.868$，$P < 0.001$）（图1B）。

2.2 *大鼠活化$CD4^+$ T细胞水平* C6orf120基因敲除大鼠在刀豆蛋白A诱导12小时后脾脏活化$CD4^+$ T细胞比例为18.65 ± 0.437，野生型大鼠脾脏活化$CD4^+$T细胞比例为14.93 ± 0.958，差异有统计学意义（$t = 3.538$，$P = 0.003$）；C6orf120基因敲除大鼠在刀豆蛋白A诱导24小时后脾脏活化$CD4^+$ T细胞比例为17.74 ± 1.070，野生型大鼠脾脏活化$CD4^+$ T细胞比例为12.83 ± 0.602，基因敲除后活化$CD4^+$ T细胞比例显著上调（t =

2.547，$P = 0.023$）（图2A）。基因敲除大鼠外周血活化的CD4$^+$ T细胞比例为39.639 ± 1.130，野生型大鼠外周血活化的CD4$^+$ T细胞比例为30.396 ± 1.117，差异有统计学意义（$F = 33.801$，$P < 0.001$）（图2B）。基因敲除大鼠肝内淋巴细胞活化的CD4$^+$ T细胞比例为23.917 ± 0.748，野生型大鼠肝内淋巴细胞活化的CD4$^+$ T细胞比例为16.199 ± 0.723，差异有统计学意义（$F = 55.015$，$P < 0.001$）（图2C）。

2.3 大鼠CD4$^+$/CD8$^+$比值 野生型大鼠的CD4$^+$/CD8$^+$比值为1.681 ± 0.083，C6orf120基因敲除大鼠CD4$^+$/CD8$^+$比值为2.548 ± 0.081，差异有统计学意义（$F = 55.989$，$P < 0.001$），见图3。

3 讨论

胸腺与脾脏是机体重要的免疫器官，脾脏是免疫细胞定居的场所，也是免疫应答的场所，其结构正常与否会直接影响到机体的免疫功能[10]。脾脏指数和胸腺指数可作为评估药物对免疫器官抑制作用的基础指标，可在一定程度上反映机体免疫功能的强弱[11]。胸腺的主要功能是产生T淋巴细胞和分泌

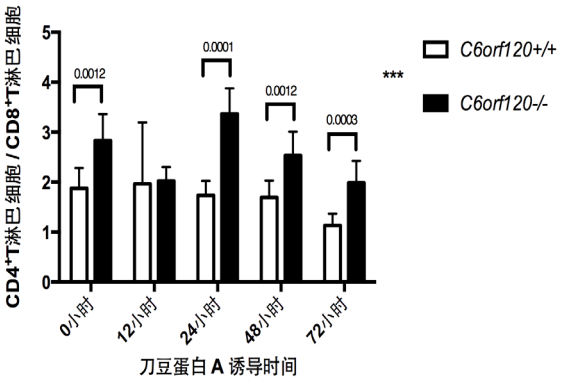

图 3 外周血 CD4$^+$/CD8$^+$ T 淋巴细胞比值

注：每组至少 6 只大鼠，***$P \leqslant 0.001$

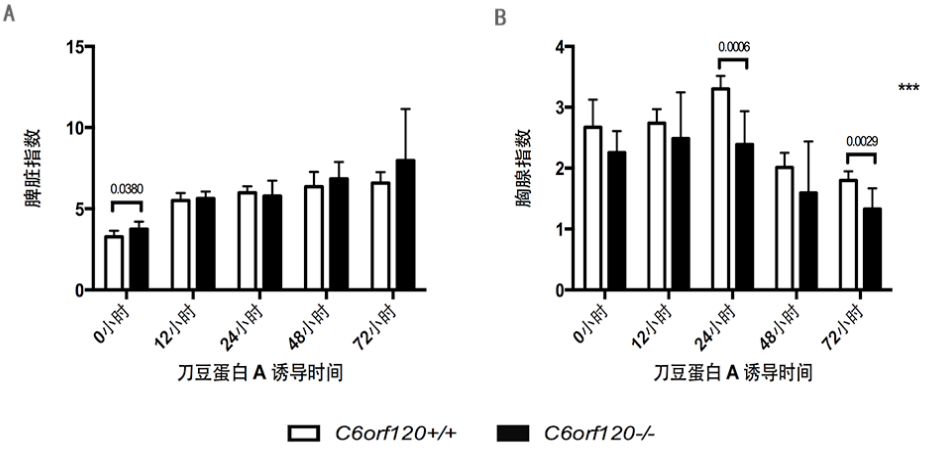

图 1 大鼠免疫器官指数

注：A 脾脏指数，B 胸腺指数；每组至少 6 只大鼠，图中数值代表组间 t 检验的 P 值，***$P \leqslant 0.001$

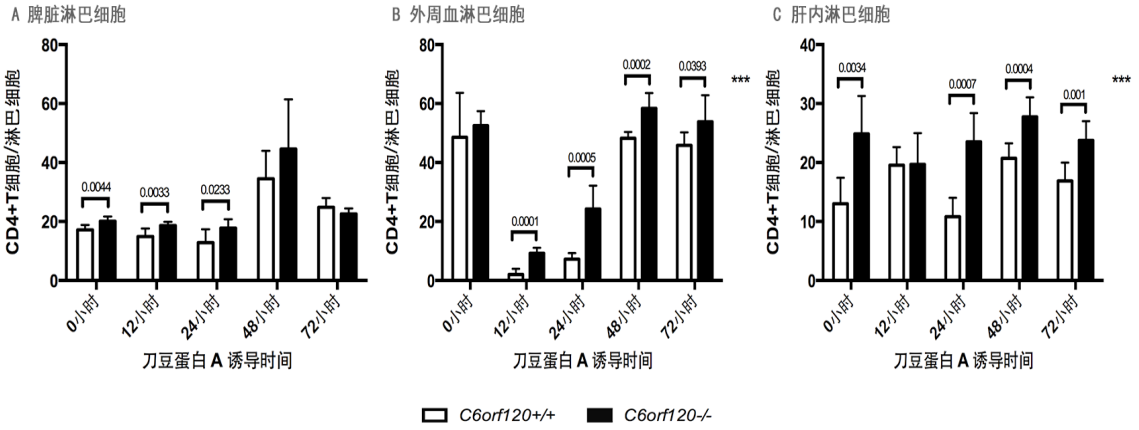

图 2 大鼠活化 CD4$^+$ T 淋巴细胞水平

注：A 脾脏中活化的 CD4$^+$ T 淋巴细胞（每组至少 6 只大鼠）；B 外周血中活化的 CD4$^+$ T 淋巴细胞（每组至少 6 只大鼠）；C 肝内淋巴细胞中活化的 CD4$^+$ T 淋巴细胞（每组至少 4 只大鼠）；***$P \leqslant 0.001$

胸腺素，参与细胞免疫；脾脏中有丰富的淋巴细胞和巨噬细胞，但B淋巴细胞比例较大，与体液免疫关系更为密切，脾脏重量与其功能以及免疫细胞数量有关。本研究通过观察脾脏、胸腺重要指征之一的胸腺指数与脾脏指数来反映大鼠免疫功能的状态，结果显示C6orf120基因敲除大鼠胸腺指数显著降低，提示C6orf120基因缺失可能会影响大鼠的免疫功能状态。

研究证实，$CD4^+$ T淋巴细胞的数量和（或）功能异常可引起炎症反应并诱导多种自身免疫性疾病的发生。初始$CD4^+$ T淋巴细胞在体内被不同抗原刺激、激活，通过激活细胞毒T细胞及巨噬细胞介导细胞免疫效应[12,13]。肝脏是机体重要的免疫器官，细胞免疫尤其是$CD4^+$ T细胞及其亚群的变化参与一些肝脏疾病的发病过程。$CD4^+$ T细胞在自身免疫性肝病发病过程中的作用是目前研究的热点。本研究观察到C6orf120基因敲除会使大鼠活化的$CD4^+$ T细胞比例显著上调，提示该基因对$CD4^+$ T细胞的活化乃至细胞免疫有重要的调控作用。

T细胞亚群是维持机体细胞免疫功能的主要细胞群，其免疫调节作用主要通过$CD4^+$ T细胞和$CD8^+$T细胞实现[14]，前者发挥免疫辅助功能，后者发挥免疫抑制功能，故CD4/CD8比值可衡量细胞免疫的整体功能，直接反映机体细胞的免疫功能状态[15-18]。CD4/CD8降低一般见于传染性单核细胞增多症、急性巨细胞病毒感染、再生障碍性贫血、骨髓移植恢复期以及肾脏疾病等，艾滋病患者的CD4/CD8比值多＜ 0.5。CD4/CD8比值增高见于移植后发生排异反应、类风湿关节炎和糖尿病等。本研究比较两组大鼠CD4/CD8后发现C6orf120基因敲除大鼠CD4/CD8 T细胞比值上调，进一步印证了C6orf120基因敲除对$CD4^+$ T细胞的影响。

Con A是一种提取自刀豆的植物凝集素，可快速诱导产生肝脏相关酶类和大量T细胞浸润，继而引发肝组织坏死，导致自身免疫性肝炎[20-22]。自身免疫性肝炎是一种慢性、自我延续的炎症性疾病，女性多见，可在任何年龄和任何种族发生，并可能导致肝硬化、肝癌甚至死亡。自身免疫性肝炎患者通常需要多年的免疫抑制治疗[23-25]，但免疫抑制治疗有药物反应不佳及疾病易复发等弊端[26]，因此迫切需要一种新的治疗方式。基因治疗是一种新的治疗手段，临床上已用于多种疾病的治疗[27]。基于本研究中大鼠模型的结果，C6orf120可能会成为自身免疫性肝炎治疗的新靶点。本研究为自身免疫性肝炎的治疗提供了一个新的可行性思路，但仍需通过更进一步的研究探索C6orf120与自身免疫性肝炎间的关系。

本研究还存在许多不足。首先未对$CD4^+$T细胞亚群进行分析，调节性T细胞是新发现的$CD4^+$T细胞亚群，可通过降低抗原提呈细胞的功能来发挥免疫抑制作用，抑制过度兴奋的免疫系统活化，促进免疫耐受[19]，其还能够维持机体免疫平衡。现有研究表明调节性T细胞的缺失及功能下降在自身免疫性肝病的发病中有重要作用。故应进一步探讨两种基因型大鼠调节性T细胞的差异以及对自身免疫性肝炎病理进程的影响。其次，本研究尚未对两种基因型大鼠自身免疫性肝炎的肝损伤程度进行评估，故而无法知晓该基因对自身免疫性肝炎进程的影响。下一步应对大鼠的肝酶水平以及病理损伤程度进行评估。从组织学到形态学上进行肝脏损伤程度分级。最后，尚不知晓该基因影响$CD4^+$T细胞的具体分子生物学机制，还需进一步的实验来证明。

综上所述，本研究提示C6orf120基因缺失会促进自身免疫性肝炎中$CD4^+$ T细胞的增殖，并在一定程度上影响大鼠的免疫功能状态。

参考文献

[1] 刘玲, 赵友云, 郑毅, 等. 抗纤维肌动蛋白抗体对自身免疫性肝炎Ⅰ型的诊断价值[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版),2016,8(3):43-47.

[2] Ferri S, Longhi MS, De Molo C, et al. A multifaceted imbalance of T cells with regulatory function characterizes type 1 autoimmune hepatitis[J]. Hepatology,2010,52(3):999-1007.

[3] Grant CR, Liberal R, Holder BS, et al. Dysfunctional CD39(POS) regulatory T cells and aberrant control of T - helper type 17 cells in autoimmune hepatitis[J]. Hepatology,2014,59(3):1007-1015.

[4] 郭荻. $CD4^+CD25^+FOXP3^+$调节性T细胞在自身免疫性肝炎中的作用研究[D]. 武汉:华中科技大学,2016.

[5] 刘怡敏, 郝礼森. $CD4^+$T细胞与肝脏疾病研究进展[J]. 承德医学院学报,2015,32(6):524-528.

[6] Li X, Qiao Y, Chang LS, et al. Role of C6ORF120, an N-glycosylated protein, is implicated in apoptosis of $CD4^+$ T lymphocytes[J].Chin Med J,2011,124(21):3560-3567.

[7] Lynam-Lennon N, Heavey S, Sommerville G, et al. MicroRNA-17 is downregulated in esophageal adenocarcinoma cancer stem-like cells and promotes a radioresistant phenotype[J]. Oncotarget, 2017,8(7):11400-11413.

[8] 谭友文, 吴建成. 刀豆蛋白A诱导急性肝损伤的模型建立[J]. 江苏医药,2009,35(6):702-704.

[9] 郑晨宏, 谢晓华. 刀豆蛋白A诱导肝损伤模型中免疫细胞及因子研究进展[J]. 解放军医学院学报,2016,37(2):191-194.

[10] 刘茜, 刘向国, 武松. 肺气肿肺气虚证模型大鼠胸腺指数、脾脏指数变化的实验研究[J]. 甘肃中医学院学报,2006,23(1):20-22.

[11] 王向涛, 孙桂超, 徐昶儒, 等. 龙葵多糖对荷瘤小鼠脾指数和胸腺指数的影响[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版),2014,30(5):513-516.

[12] 吴丽阳, 李象霖. 自身免疫性肝炎患者CD4+ T细胞及其细胞因子的表达水平及意义[J]. 临床荟萃,2014,29(2):202-203.
[13] 孙君重, 肖文华, 于力. CD4+T淋巴细胞功能研究新进展[J]. 中国实验血液学杂志,2010,18(2):544-548.
[14] Wang P, Kan QC, Yu ZJ, et al. Effects of cefodizime on chemokines of liver tissues in mice with immunological hepatic injury[J]. Chin Med J, 2011,124(5):746-750.
[15] 乔鲁军, 赵卫东, 张戈, 等. 国产头孢地嗪治疗老年肺癌伴急性下呼吸道感染45例疗效观察[J]. 山东医药,2007,47(5):70 -71.
[16] Zhuang JX, Li WG, Qiu L, et al. Inhibitory effects of Cefazolin and Cefodizime on the activity of mushroom tyrosinase[J]. J Enzyme Inhib Med Chem,2009,24(1):251-256.
[17] 丁艳, 尹薇, 何学莲, 等. 儿童过敏性紫癜急性期免疫功能探讨[J]. 中国免疫学杂志,2013,29(5):518-521,525.
[18] 拉宗, 王建霞, 崔倪, 等. 乳腺浸润性导管癌微环境中CD4和CD8阳性T细胞表达与血管新生的关联性分析[J]. 吉林大学学报(医学版),2014,40(5):1069-1073.
[19] Mahnke K, Bedke T, Enk AH. Regulatory conversation be- tween antigen presenting cells and regulatory T cells enhance im- mune suppression[J]. Cell Immunol,2007,250(1-2):1-13.
[20] 李莎, 马丽杰. JAK/STAT信号通路在刀豆蛋白A诱导的自身免疫性肝炎中的作用[J]. 生物化学与生物物理进展,2016,43(12):1139-1145.
[21] 李晓栋, 赵香君, 霍闻钧, 等. 姜黄素对伴刀豆球蛋白A介导的自身免疫性肝炎模型小鼠的防治效果[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版),2010,4(6):734-738.
[22] 邓卫平, 郑红梅, 李胜保, 等. 九味肝泰对刀豆蛋白A诱导的C57BL/6J小鼠急性免疫性肝损伤的干预研究[J]. 中西医结合肝病杂志,2017,27(1):42-44.
[23] Manns MP, Lohse AW, Vergani D. Autoimmune hepatitis--Update 2015[J]. J Hepatol,2015,62(1 Suppl):S100-S111.
[24] Taubert R, Hardtke-Wolenski M, Noyan F, et al. Intrahepatic regulatory T cells in autoimmune hepatitis are associated with treatment response and depleted with current therapies[J]. J Hepatol, 2014,61(5):1106-1114.
[25] Lohse AW, Dienes HP, Kh MZB. Suppression of murine experimental autoimmune hepatitis by T-cell vaccination or immunosuppression[J]. Hepatology,1998,27(6):1536-1543.
[26] Maddrey WC, Combes B. Therapeutic concepts for the management of idiopathic autoimmune chronic hepatitis[C]// Seminars in Liver Disease, Thieme Medical Publishers, Inc. 1991.
[27] 张夏华, 吴广通, 李蓉. 基因治疗现状与前景[J]. 药学实践杂志,2009,27(1):4-10.

收稿日期：2017-07-05

张曼卡, 马慧敏, 张健, 等. 功能未知基因C6orf120缺失对自身免疫性肝炎大鼠CD4+T细胞活化的影响[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版),2017,9(4):49-53.