

功能未知基因C6orf120缺失 对大鼠自身免疫性肝炎的影响

宋心成¹, 张健¹, 吴苑妮¹, 张瑞², 张曼卡³, 马慧敏⁴, 李鑫^{1,2} (1.北京大学地坛医院教学医院, 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.航天中心医院 重症医学科, 北京 100049; 4.中国医学科学院北京协和医院, 北京 100730)

摘要: **目的** 探讨功能未知基因C6orf120缺失对大鼠自身免疫性肝炎的影响及机制。**方法** 将16只野生型(wild-type, WT)大鼠和16只C6orf120基因敲除型(C6orf120^{-/-})大鼠分别编号后, 采用单纯随机抽样法分别分为2组, 每组WT大鼠和C6orf120^{-/-}大鼠各8只。其中一组将刀豆蛋白A(concanavalin A, Con A)以35 mg/kg剂量静脉注射, 建立Con A诱导的自身免疫性肝炎大鼠模型, 24 h后与另一组未造模的大鼠同时处死, 检测肝脏血清学生物化学指标[丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)], 采用流式细胞术分析WT和C6orf120^{-/-}大鼠的外周血、肝、脾和肠系膜淋巴结内淋巴细胞中CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg和CD3⁺CD8⁺IL-17A⁺ Th17细胞表达频率的差异。**结果** Con A诱导24 h后, C6orf120^{-/-}大鼠血清ALT、AST水平显著低于WT大鼠[ALT: (184.68 ± 48.39) U/L vs (374.84 ± 45.38) U/L, $t = 8.11$, $P < 0.001$; AST: (513.00 ± 80.40) U/L vs (1256.58 ± 27.77) U/L, $t = 24.72$, $P < 0.001$]。Con A诱导24 h后, C6orf120^{-/-}大鼠外周血、肝脏、脾脏、淋巴结内淋巴细胞中Treg的频率分别为(11.70 ± 1.12)%、(12.27 ± 1.25)%、(11.06 ± 1.02)%、(13.96 ± 0.83)%, WT大鼠分别为(9.75 ± 1.01)%、(8.97 ± 0.19)%、(11.80 ± 1.72)%、(14.08 ± 3.15)%, C6orf120^{-/-}大鼠外周血和肝脏中Treg频率显著高于WT大鼠($t = -3.65$, $P = 0.003$; $t = -6.83$, $P < 0.001$), 脾脏和淋巴结中Treg频率差异无统计学意义(t 值分别为1.05、0.10, P 值分别为0.313、0.921)。Con A诱导24 h后, C6orf120^{-/-}大鼠外周血、肝脏、脾脏、淋巴结内淋巴细胞中Th17细胞的频率分别为(0.52 ± 0.08)%、(4.12 ± 0.77)%、(0.78 ± 0.06)%、(0.84 ± 0.04)%, WT大鼠分别为(0.49 ± 0.05)%、(7.74 ± 0.49)%、(1.18 ± 0.06)%、(1.35 ± 0.22)%, C6orf120^{-/-}大鼠和WT大鼠外周血中Th17细胞频率差异无统计学意义($t = -1.06$, $P = 0.309$), C6orf120^{-/-}大鼠肝脏、脾脏、淋巴结内淋巴细胞中Th17细胞频率显著低于WT大鼠(t 值分别为11.22、12.75、6.52, P 均 < 0.001)。**结论** Con A诱导后, C6orf120^{-/-}大鼠外周血和肝脏内淋巴细胞中Treg频率显著上调, 肝脏、脾脏和淋巴结内淋巴细胞中Th17频率显著下调, 提示C6orf120基因缺失对Con A诱导的大鼠免疫性肝损伤有保护作用, 可能与C6orf120基因对Treg和Th17细胞间平衡稳态的免疫调节作用有关。

关键词: C6orf120; 自身免疫性肝炎; Treg; Th17细胞

Effects of deletion of unknown function gene C6orf120 on the autoimmune hepatitis of rats

SONG Xin-cheng¹, ZHANG Jian¹, WU Yuan-ni¹, ZHANG Rui², ZHANG Man-ka³, MA Hui-min⁴, LI Xin^{1,2} (1. 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. Intensive Care Unit, Aerospace Central Hospital, Beijing 100049, China; 4. Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of deletion of unknown function gene C6orf120 on the autoimmune hepatitis of rats and the underlying mechanism. **Methods** Wild type (WT) rats and C6orf120

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2019.04.006

基金项目: “十三五”国家科技重大专项(2017ZX10205501-001-002); 北京市中医药科技发展资金项目(JJ2015-72); 北京市医院管理局临床医学发展专项经费资助(ZYLX201707)

通讯作者: 李鑫 Email: leixin@sina.com

knocked-out (C6orf120^{-/-}) rats were numbered and divided into 2 groups by simple random sampling method, respectively, 8 WT rats and 8 C6orf120^{-/-} rats were allocated into each group. Autoimmune hepatitis model was established with Con A 35 mg/kg intravenous injection in rats of one group, which were sacrificed at 24 h after Con A challenging. And the other group were sacrificed at the same time. The severity of liver injury in rats was evaluated by serological examination including serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). The frequency changes of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells and CD3⁺CD8⁺IL-17A⁺ Th17 cells in peripheral blood mononuclear cells, intrahepatic lymphocytes, splenocytes and lymph nodes of WT rats and C6orf120^{-/-} rats during the course of liver injury were analyzed by flow cytometry, respectively.

Results After Con A challenged for 24 h, the serum levels of ALT and AST of C6orf120^{-/-} rats were significantly lower than those of WT rats [ALT: (184.68 ± 48.39) U/L vs (374.84 ± 45.38) U/L, $t = 8.11$, $P < 0.001$; AST: (513.00 ± 80.40) U/L vs (1256.58 ± 27.77) U/L, $t = 24.72$, $P < 0.001$]. After Con A challenged for 24 h, the frequencies of Treg cells in peripheral blood mononuclear cells, intrahepatic lymphocytes, splenocytes and lymph nodes in C6orf120^{-/-} rats were (11.70 ± 1.12)%, (12.27 ± 1.25)%, (11.06 ± 1.02)% and (13.96 ± 0.83)%, respectively, which were (9.75 ± 1.01)%, (8.97 ± 0.19)%, (11.80 ± 1.72)% and (14.08 ± 3.15)% of WT rats, respectively. The frequencies of Treg cells in peripheral blood and intrahepatic lymphocytes of C6orf120^{-/-} rats were significantly higher than those of WT rats ($t = -3.65$, $P = 0.003$; $t = -6.83$, $P < 0.001$), there were no significant difference in the frequencies of Treg cells in the splenocytes and lymph nodes ($t = 1.05$, 0.10 ; $P = 0.313$, 0.921). After Con A challenged for 24 h, the frequencies of Th17 cells in peripheral blood mononuclear cells, intrahepatic lymphocytes, splenocytes and lymph nodes in C6orf120^{-/-} rats were (0.52 ± 0.08)%, (4.12 ± 0.77)%, (0.78 ± 0.06)% and (0.84 ± 0.04)%, respectively, which were (0.49 ± 0.05)%, (7.74 ± 0.49)%, (1.18 ± 0.06)% and (1.35 ± 0.22)% of WT rats, respectively. The frequencies of Th17 cells in peripheral blood between C6orf120^{-/-} and WT rats ($t = -1.06$, $P = 0.309$), the frequencies of Th17 cells in the intrahepatic lymphocytes, splenocytes and lymph nodes of C6orf120^{-/-} rats were significantly lower than those of WT rats were not significantly different ($t = 11.22$, 12.75 , 6.52 ; all $P < 0.001$).

Conclusions After Con A induction, and the frequencies of Treg cells in peripheral blood and lymph nodes of C6orf120^{-/-} rats were significantly up-regulated, and the frequencies of Th17 cells in intrahepatic lymphocytes, splenocytes and lymph nodes were significantly down-regulated. The results indicated that C6orf120 gene deletion may protect against experimental autoimmune hepatitis induced by Con A, which may be related to the immunoregulatory effect of gene C6orf120 deletion on the balance of Treg and Th17 cells.

Key words: C6orf120; Autoimmune hepatitis; Regulatory T cell; Th17 cells

自身免疫性肝炎 (autoimmune hepatitis, AIH) 是一种病因未明的肝实质性疾病, 可表现为急性或慢性的临床进程, 好发于中青年女性, 其主要临床特征为血清转氨酶升高、高免疫球蛋白G和 (或) γ 球蛋白血症、自身抗体阳性, 肝组织学表现为汇管区大量淋巴细胞浆细胞浸润、界面性肝炎、玫瑰花结样改变及肝细胞穿入现象等典型特征^[1]。该病的病因与发病机制尚未明确, 目前认为, 由基因和环境共同作用导致的自身免疫耐受失衡在AIH的发生发展中具有重要作用, 其中肝脏抗原特异性调节性T淋巴细胞和效应细胞的平衡失调可能是重要原因^[2]。近年来, 调节性T细胞 (regulatory T cell, Treg) 与辅助性T (T helper, Th) 17细胞间的失衡成为阐明AIH发病机制的研究热点。Treg与Th17细胞均在AIH的发生发展中起着重要作用^[3]。Treg数量减少或功能受损是AIH的重要发病机制^[4]。白细

胞介素 (interleukin, IL) -23/IL-17轴是诱导产生自身免疫疾病的重要通路^[5], 而Treg与Th17细胞间的相互作用可能参与了AIH的发病过程^[6]。因此, 纠正Treg与Th17细胞的平衡失调可能作为一种有前景的治疗手段。

C6orf120基因是编码N-糖基化蛋白的功能未知基因。有研究表明, 该基因在肝脏中表达水平较高, 且能在一定程度上诱导CD4⁺T细胞的凋亡^[7]。研究表明, C6orf120基因缺失可促进大鼠AIH模型中CD4⁺T细胞的增殖, 对刀豆蛋白A (concanavalin A, Con A) 诱导的AIH有保护作用, 其机制可能与上调的Treg频率及下调的相关促炎性细胞因子有关^[8,9]。因此, C6orf120基因可能在AIH的发生发展中发挥免疫调节的重要作用。基因敲除技术是研究基因功能最直接有效的方法, 本研究借助野生型 (wild type, WT) 大鼠与C6orf120基因敲除型

大鼠,通过Con A诱导的实验性自身免疫性肝炎模型,初步探索基因C6orf120对Treg和Th17细胞间平衡稳态的免疫调节作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 本研究的实验动物为6~8周龄的雄性SD大鼠,其中WT大鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司,杂合子(C6orf120^{+/-})大鼠由苏州赛业生物科技有限公司制备,经繁殖后得到纯合子(C6orf120^{-/-})大鼠。所有大鼠饲养于北京大学医学部实验动物中心。饲养条件为无特殊病原体级环境,温度(21±2)℃,相对湿度(50±15)%,5只/笼,12h昼夜循环,自由饮食、饮水,玉米芯垫料及饲料、饮用水均经过高温高压消毒灭菌处理。

1.2 主要实验仪器及试剂 FACS Calibur 流式细胞仪(美国BD公司),CO₂细胞培养箱(美国Thermo公司),全自动生化分析仪(日本HITACHI公司)。Con A购自美国sigma公司;抗大鼠CD4 FITC抗体、抗大鼠CD25 PERCP抗体、抗大鼠Foxp3 PE抗体、抗大鼠IL-17A PE抗体、抗大鼠CD3 PerCP抗体、抗大鼠CD8 APC抗体均购自美国eBioscience公司;混合细胞刺激剂购自美国eBioscience公司。

1.3 分组 将16只WT大鼠和16只C6orf120^{-/-}大鼠分别编号后,采用单纯随机抽样法分别分为2组,每组8只WT大鼠和C6orf120^{-/-}大鼠各8只。其中一组将Con A以35 mg/kg的剂量静脉注射,建立Con A诱导的实验性自身免疫性肝炎大鼠模型,24 h后与另一组未造模的大鼠同时处死,大鼠处死前需禁食12 h,留取其外周血、肝脏、脾脏和肠系膜淋巴结以备后续实验。

1.4 生物化学指标的检测 取大鼠下腔静脉血2 ml,离心后留取上层血清,采用HITACHI全自动生化分析仪检测大鼠丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)水平。

1.5 流式细胞表型分析 留取大鼠外周血、肝脏、脾脏和肠系膜淋巴结后,通过Lymphoprep细胞分离液密度梯度离心分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),通过percoll细胞分离液密度梯度离心分离肝内淋巴细胞,通过红细胞裂解液分离研磨后的脾脏内淋巴细胞,通过研磨过滤分离肠系膜淋巴结内淋巴细胞,分别制备成细胞悬液。

1.5.1 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg的流式细胞术检测 对外周血、肝脏、脾脏和肠系膜淋巴结内淋巴细胞悬

液分别进行CD4和CD25表型染色后,继而固定、破膜,再进行Foxp3染色,通过FACS Calibur流式细胞仪检测Treg的频率。WT大鼠和C6orf120^{-/-}大鼠外周血、肝内、脾脏、淋巴结内淋巴细胞中Treg的画门策略见图1。

1.5.2 CD3⁺CD8⁺IL-17A⁺Th17细胞的流式细胞术检测 经制备得到外周血、肝脏、脾脏和肠系膜淋巴结内淋巴细胞悬液后,调节细胞浓度为10⁶~10⁷个/ml,分别定量500 μl接种于24孔板,并分别加入1 μl混合细胞刺激剂,混匀后于5% CO₂, 37℃, 95%潮湿空气的培养箱内静置培养5 h。5 h后进行CD3和CD8表型染色,继而固定、破膜,再进行IL-17A染色后,通过FACS Calibur流式细胞仪检测Th17细胞的频率。对WT大鼠和C6orf120^{-/-}大鼠外周血、肝、脾脏、淋巴结内淋巴细胞中Th17细胞的画门策略如图2所示。

1.6 统计学处理 采用SPSS 24.0软件对实验数据进行统计分析,ALT、AST、Treg和Th17细胞频率均为计量资料,经正态性检验后均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肝脏生物化学指标 未经Con A诱导时,WT大鼠和C6orf120^{-/-}大鼠血清ALT和AST水平差异无统计学意义($t = -1.20, 0.43, P = 0.251, 0.431$)。经Con A诱导24 h后,C6orf120^{-/-}大鼠血清ALT水平和AST水平显著低于WT大鼠,见表1。

2.2 C6orf120基因缺失上调CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg频率 采用流式细胞术分析CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg在CD4⁺T淋巴细胞中的频率,结果显示,在未经Con A诱导时,C6orf120^{-/-}大鼠外周血、肝脏、脾脏、淋巴结内淋巴细胞中Treg的频率分别为(8.41±0.91)%、(12.06±0.86)%、(15.54±1.39)%、(10.75±0.75)%,均显著高于WT大鼠的(4.58±0.87)%、(7.44±0.74)%、(11.55±1.81)%、(7.23±0.77)%,差异有统计学意义(t 值分别为-8.65、-11.50、-4.95、-9.25, P 均<0.001)。Con A诱导24 h后,C6orf120^{-/-}大鼠外周血、肝脏、脾脏、淋巴结内淋巴细胞中Treg的频率分别为(11.70±1.12)%、(12.27±1.25)%、(11.06±1.02)%、(13.96±0.83)%,WT大鼠分别为(9.75±1.01)%、(8.97±0.19)%、(11.80±1.72)%、(14.08±3.15)%,C6orf120^{-/-}大鼠外周血和肝脏中Treg频率显著高于WT大鼠($t = -3.65, P = 0.003; t = -6.83, P < 0.001$),脾脏和淋巴结中Treg频率差异无统计学意义(t 值分别为1.05、0.10, P 值分别为0.313、

0.921), 见图3。

2.3 C6orf120 基因缺失下调 CD3⁺CD8⁺IL-17A⁺Th17 细胞频率 采用流式细胞术分析 CD3⁺CD8⁺IL-17A⁺Th17 细胞在 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞中的频率, 结果显示, 在未经 Con A 诱导时, C6orf120^{-/-} 大鼠外周血、肝脏、脾脏、淋巴结内淋巴细胞中 Th17 细胞频率分别为 (0.38 ± 0.08) %、(2.83 ± 0.62) %、(0.69 ± 0.13) %、(0.63 ± 0.09) %, WT 大鼠的分别为 (0.42 ± 0.06) %、(2.68 ± 0.76) %、(0.83 ±

0.15) %、(0.57 ± 0.08) %, 差异均无统计学意义 (*t* 值分别为 1.32、-0.42、2.01、-1.40, *P* 值分别为 0.208、0.678、0.063、0.185)。Con A 诱导 24 h 后, C6orf120^{-/-} 大鼠外周血、肝脏、脾脏、淋巴结内淋巴细胞中 Th17 细胞频率分别为 (0.52 ± 0.08) %、(4.12 ± 0.77) %、(0.78 ± 0.06) %、(0.84 ± 0.04) %, WT 大鼠分别为 (0.49 ± 0.05) %、(7.74 ± 0.49) %、(1.18 ± 0.06) %、(1.35 ± 0.22) %, C6orf120^{-/-} 大鼠和 WT 大鼠外周血中 Th17 细胞频率差异无统计

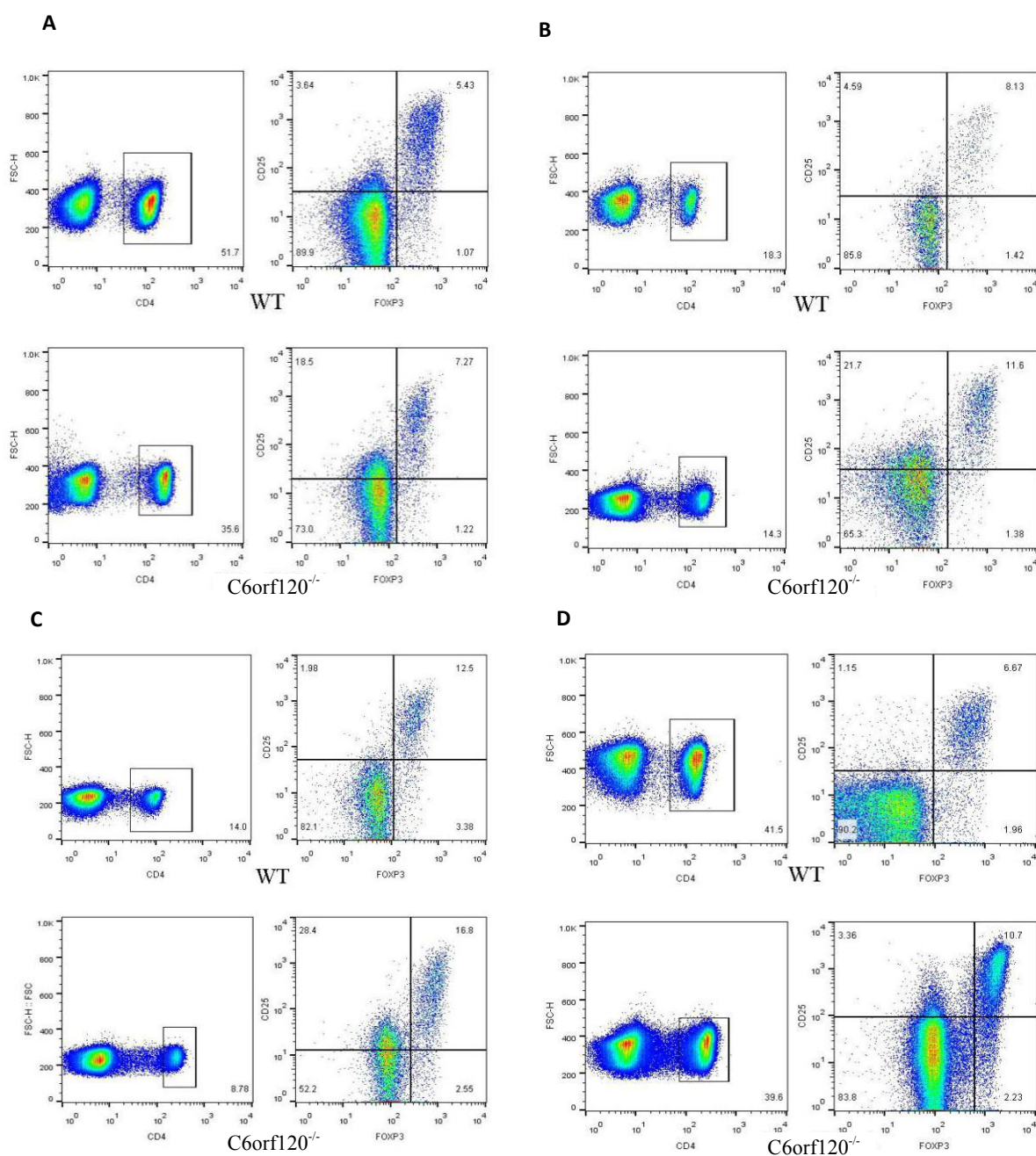


图1 WT大鼠和C6orf120^{-/-}大鼠外周血、肝脏、脾脏、淋巴结内淋巴细胞中Treg细胞画门策略图

注: A为外周血淋巴细胞中Treg频率; B为肝脏内淋巴细胞中Treg频率; C为脾脏内淋巴细胞中Treg频率; D为淋巴结内淋巴细胞中Treg频率

学意义 ($t = -1.06$, $P = 0.309$)，C6orf120^{-/-}大鼠肝脏、脾脏、淋巴结内淋巴细胞中 Th17 细胞频率显

著低于 WT 大鼠 (t 值分别为 11.22、12.75、6.52， P 均 < 0.001)，见图 4。

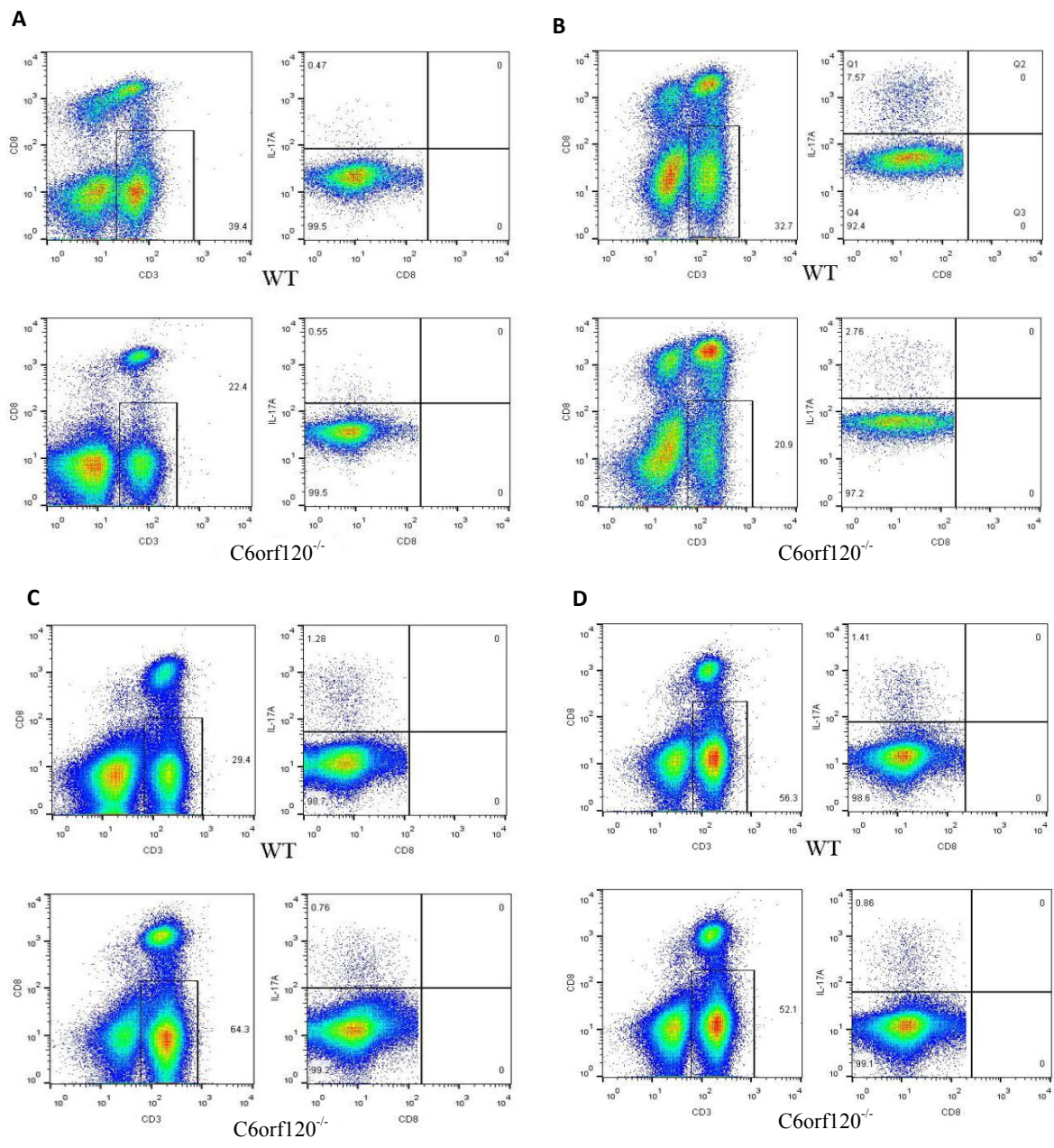
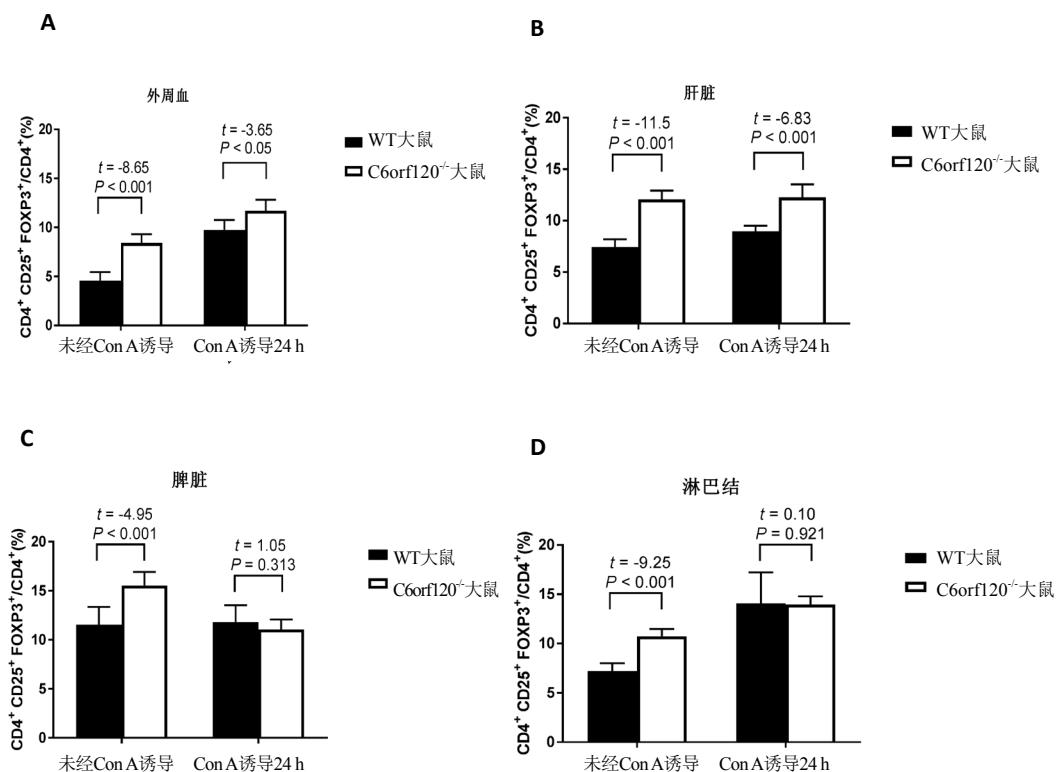


图 2 WT 大鼠和 C6orf120^{-/-} 大鼠外周血、肝脏、脾脏、淋巴结内淋巴细胞中 Th17 细胞画门策略图

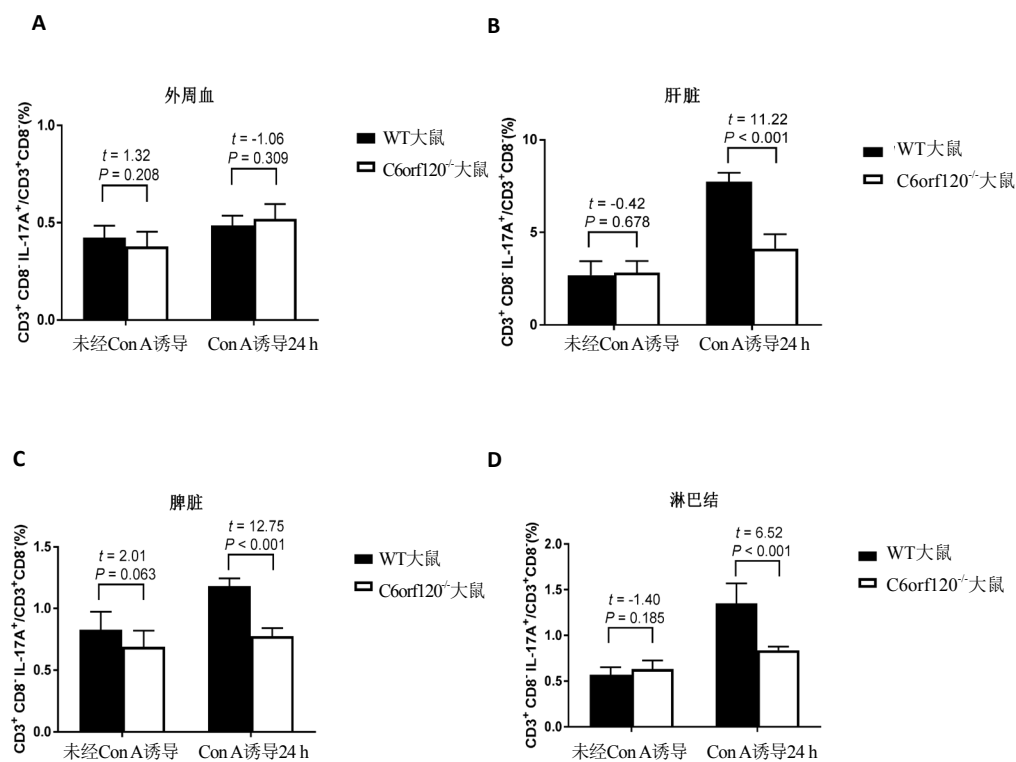
注：A 为外周血淋巴细胞中 Th17 频率；B 为肝脏内淋巴细胞中 Th17 细胞频率；C 为脾脏内淋巴细胞中 Th17 细胞频率；D 为淋巴结内淋巴细胞中 Th17 细胞频率

表 1 WT 大鼠和 C6orf120^{-/-} 大鼠经 Con A 诱导后血清 ALT 和 AST 水平 ($\bar{x} \pm s$, U/L)

组别	ALT		AST	
	未诱导	诱导 24 h	未诱导	诱导 24 h
WT 大鼠	40.06 ± 3.28	374.84 ± 45.38	117.88 ± 12.64	1256.58 ± 27.77
C6orf120 ^{-/-} 大鼠	42.04 ± 3.32	184.68 ± 48.39	111.56 ± 18.05	513.00 ± 80.40
<i>t</i> 值	-1.20	8.11	0.43	24.72
<i>P</i> 值	0.251	< 0.001	0.431	< 0.001

图3 WT大鼠和C6orf120^{-/-}大鼠外周血、肝脏、脾脏、淋巴结中Treg的频率

注: A为外周血中Treg的频率; B为肝脏内Treg的频率; C为脾脏中Treg的频率; D为淋巴结中Treg的频率

图4 WT大鼠和C6orf120^{-/-}大鼠外周血、肝脏、脾脏、淋巴结中Th17细胞的频率

注: A为外周血中Th17细胞的频率; B为肝脏内Th17细胞的频率; C为脾脏中Th17细胞的频率; D为淋巴结中Th17细胞的频率

3 讨论

刀豆蛋白是一种植物凝集素,主要激活CD4⁺T淋巴细胞亚群,而CD4⁺T淋巴细胞亚群的频数变化是AIH的主要发病机制^[2,10]。目前国内外研究表明,Con A模型是一个典型的T细胞依赖的肝损伤模型,可模拟AIH的病理损伤机制^[9,11-13]。因此,本研究采用Con A诱导的大鼠自身免疫性肝损伤模型来研究AIH的发病机制,以寻求期望的治疗措施。

本研究表明,WT大鼠和C6orf120^{-/-}大鼠血清中ALT和AST水平存在差异,在经Con A诱导24 h后,C6orf120^{-/-}大鼠肝功能损伤程度较轻,提示C6orf120基因可能参与了Con A诱导的大鼠实验性免疫性肝损伤模型的病理过程,C6orf120基因缺失对Con A诱导的大鼠免疫性肝损伤有保护作用。

Treg是一群具有免疫调节功能的CD4⁺T淋巴细胞亚群,能够通过抑制效应性T细胞、B细胞、肥大细胞和树突状细胞及释放转化生长因子-β(transforming growth factor beta, TGF-β)下调机体对外源性或内源性抗原的免疫应答水平,以维持机体的免疫耐受状态^[14]。Treg数量减少或功能受损是AIH发生的重要发病机制^[4]。Longhi等^[15]研究表明,与正常人群相比,AIH患者外周血中Treg数量减少,扩增功能受损,而经治疗达到缓解后,Treg数量又有所上升。本研究中CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg在大鼠各组织CD4⁺T淋巴细胞中的频率差异表明,在经Con A诱导24 h后,C6orf120基因缺失显著上调了大鼠外周血和肝脏内淋巴细胞中Treg的频率,提示C6orf120基因可能参与了Con A诱导的大鼠免疫性肝损伤的病理过程,且是通过上调Treg的表达频率来保护肝脏。

自2005年发现Th17细胞这一明显区别于Th1细胞与Th2细胞的CD4⁺T淋巴细胞亚群以来,就成为了研究热点,因其主要产生IL-17而非γ-干扰素或IL-4细胞,故被称为Th17细胞^[16]。关于诱导分化形成Th17细胞的分子及其效应功能分子已为人们所熟知,如IL-6、IL-17、IL-21、IL-22和IL-23,而维甲酸相关孤儿受体(retinoic acid-related orphan receptor, ROR)γt是调控Th17分化形成的关键转录因子^[17]。IL-23/IL-17轴是诱导产生自身免疫疾病的重要通路,作为主要分泌IL-17的Th17细胞,在自身免疫疾病中发挥不可或缺的作用^[5],参与多种自身免疫性炎症疾病进程^[18-21]。Zhang等^[22]研究表明,与健康人群和慢性乙型肝炎患者相比,AIH患者肝内Th17细胞数量显著增加,转录因子RORγt的

表达水平也显著上调,且与肝功能损伤程度相关,提示Th17细胞可能在AIH发生发展中具有重要作用。本研究中CD3⁺CD8⁻IL-17A⁺Th17细胞在大鼠各组织CD4⁺T淋巴细胞中的频率差异表明,在经Con A诱导24 h后,C6orf120基因的缺失显著下调了大鼠肝脏内、脾脏、淋巴结内淋巴细胞中Th17细胞的频率,进一步证实了C6orf120基因可能参与了Con A诱导的大鼠免疫性肝损伤的病理过程,提示基因C6orf120缺失可能也通过下调Th17细胞的表达频率来保护肝脏。

Treg与Th17细胞的分化途径相互影响,密切相关。在促炎性细胞因子IL-6和IL-21作用下,TGF-β依据其浓度调节从幼稚CD4⁺T细胞向Treg与Th17细胞的分化^[14]。Treg可调节效应性细胞(如Th17细胞)的数量及功能^[4],Grant等^[23]研究表明,AIH患者CD39⁺Treg数量减少和功能受损无法抑制IL-17的产生,同时Treg向Th1或Th17细胞的分化增加。而Longhi等^[24]研究表明,抑制IL-17的产生或Th17的发育能促进CD25⁺细胞分化为抑制功能稳定的Treg。Treg与Th17细胞失衡可能诱发AIH的肝功能损伤并造成持续性肝功能损伤,其机制可能与Treg抑制效应细胞增殖和产生效应细胞因子的功能受损及Treg转化为Th1细胞或Th17细胞有关^[3,6]。本研究表明,与WT大鼠相比,C6orf120^{-/-}大鼠肝功能损伤程度较轻,外周血、肝脏内淋巴细胞中Treg频率显著上调,肝脏、脾脏、淋巴结内淋巴细胞中Th17细胞频率显著下调,提示C6orf120基因可能通过调节Treg和Th17细胞平衡参与AIH的病理过程。

本研究还存在以下不足。首先,尚未对两种基因型大鼠自身免疫性肝炎的肝脏病理学损伤程度进行评估,下一步可对肝组织病理切片进行苏木精-伊红染色,并对肝功能损伤程度进行评分。其次,尚未对诱导Treg与Th17细胞分化的细胞因子及其分泌水平进行分析,后续研究应检测相关细胞因子水平以进一步验证。并且,Treg与Th17细胞频率的变化来自C6orf120基因直接还是间接的影响,是否出现了Treg向Th17细胞的转化,需要进行Treg与Th17细胞相应的过继转移实验来进一步证实。最后,大鼠C6orf120基因被敲除后,是否会发生Treg与Th17细胞代偿性改变,尚未十分明确。

综上,本研究结果提示C6orf120基因缺失对Con A诱导的大鼠免疫性肝损伤有保护作用,其机制可能与C6orf120基因对Treg和Th17细胞间平衡稳态的免疫调节作用有关。

参考文献

- [1] 中华医学会肝病学会, 中华医学会消化病学分会, 中华医学会感染病学分会. 自身免疫性肝炎诊断和治疗共识(2015)[J]. 中华传染病杂志, 2016, 34(4): 193-208.
- [2] Webb GJ, Hirschfield GM, Krawitt EL, et al. Cellular and molecular mechanisms of autoimmune hepatitis[J]. *Annu Rev Pathol*, 2018, 13: 247-292.
- [3] Liberal R, Grant CR, Yuksel M, et al. Regulatory T-cell conditioning endows activated effector T cells with suppressor function in autoimmune hepatitis / autoimmune sclerosing cholangitis[J]. *Hepatology*, 2017, 66(5): 1570-1584.
- [4] Dominguez-Villar M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune disease[J]. *Nat Immunol*, 2018, 19(7): 665-673.
- [5] Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells[J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(9): 888-898.
- [6] Muratori L, Longhi MS. The interplay between regulatory and effector T cells in autoimmune hepatitis: Implications for innovative treatment strategies[J]. *J Autoimmun*, 2013, 46: 74-80.
- [7] 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 (Engl)*, 2011, 124(21): 3560-3567.
- [8] 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.
- [9] Zhang MK, Ma HM, Zhang J, et al. Deletion of the C6orf120 gene with unknown function ameliorates autoimmune hepatitis induced by concanavalin A[J]. *Cell Immunol*, 2018, 331: 9-15.
- [10] Wang HX, Liu M, Weng SY, et al. Immune mechanisms of Concanavalin A model of autoimmune hepatitis[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(2): 119-125.
- [11] Salas JR, Chen BY, Wong A, et al. ¹⁸F-FAC PET selectively images liver-infiltrating CD4 and CD8 T cells in a mouse model of autoimmune hepatitis[J]. *J Nucl Med*, 2018, 59(10): 1616-1623.
- [12] Horst AK, Wegscheid C, Schaefer C, et al. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 controls IL-2-dependent regulatory T-cell induction in immune-mediated hepatitis in mice[J]. *Hepatology*, 2018, 68(1): 200-214.
- [13] 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.
- [14] Mempel TR, Marangoni F. Guidance factors orchestrating regulatory T cell positioning in tissues during development, homeostasis, and response[J]. *Immunol Rev*, 2019, 289(1): 129-141.
- [15] Longhi MS, Ma Y, Bogdanos DP, et al. Impairment of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cells in autoimmune liver disease[J]. *J Hepatol*, 2004, 41(1): 31-37.
- [16] Joseph AM, Monticelli LA, Sonnenberg GF. Metabolic regulation of innate and adaptive lymphocyte effector responses[J]. *Immunol Rev*, 2018, 286(1): 137-147.
- [17] Stockinger B, Omenetti S. The dichotomous nature of T helper 17 cells[J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(9): 535-544.
- [18] Azizi G, Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Th17 cells in immunopathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Int J Rheum Dis*, 2013, 16(3): 243-253.
- [19] 邹婷, 秦爱兰, 冯婷婷, 等. Th17/Treg细胞对自身免疫性肝病的活动性及预后的影响[J]. 广东医学, 2016, 37(9): 1337-1340.
- [20] 吴云忠, 周桂琴, 张亦瑾, 等. 复方甘草酸苷对1型自身免疫性肝炎患者外周血Treg和Th17细胞的影响[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2017, 9(4): 86-89.
- [21] Hirota K, Hashimoto M, Ito Y, et al. Autoimmune Th17 cells induced synovial stromal and innate lymphoid cell secretion of the cytokine GM-CSF to initiate and augment autoimmune arthritis[J]. *Immunity*, 2018, 48(6): 1220-1232.e5.
- [22] Zhang H, Bernuzzi F, Lleo A, et al. Therapeutic potential of IL-17-mediated signaling pathway in autoimmune liver diseases[J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: 436450.
- [23] 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.
- [24] Longhi MS, Liberal R, Holder B, et al. Inhibition of interleukin-17 promotes differentiation of CD25⁺ cells into stable T regulatory cells in patients with autoimmune hepatitis[J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(7): 1526-1535.e6.

收稿日期: 2019-04-22

宋心成, 张健, 吴苑妮, 等. 功能未知基因C6orf120缺失对大鼠自身免疫性肝炎的影响[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2019, 11(4): 42-49.