

# *Glt25d1*基因敲低对刀豆蛋白A诱导的自身免疫性肝炎小鼠巨噬细胞和中性粒细胞的影响

高美欣<sup>1</sup>, 何玲玲<sup>2</sup>, 叶小慧<sup>1</sup>, 杨君茹<sup>2</sup>, 李佳<sup>2</sup>, 张曼卡<sup>3</sup>, 张健<sup>3</sup>, 肖凡<sup>4</sup>, 魏红山<sup>1,2</sup> (1.北京大学地坛医院教学医院 消化科, 北京 100015; 2.首都医科大学附属北京地坛医院 消化科, 北京 100015; 3.北京大学地坛医院教学医院 中西医结合中心, 北京 100015; 4.首都医科大学附属北京地坛医院 传染病学研究所, 北京 100015)

**摘要:** 目的 研究*Glt25d1*基因在刀豆蛋白A (concanavalin A, Con A) 诱导的自身免疫性肝炎中的作用及其对巨噬细胞和中性粒细胞的影响。方法 随机抽取6~8周无特定病原体雌性*Glt25d1*<sup>+/+</sup>小鼠及与其同窝出生的野生型 (wild type, WT) 小鼠, 体质量 (20±2) g, 分为WT对照组、*Glt25d1*<sup>+/+</sup>对照组、WT造模组和*Glt25d1*<sup>+/+</sup>造模组, 每组8只。造模组通过内眦静脉注射Con A, 剂量为10 mg/kg, 对照组给予相同剂量生理盐水注射。造模12 h后处死小鼠。检测小鼠血浆中丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 和天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 水平, 观察肝组织病理。采用流式细胞术检测小鼠外周血、脾脏和肝脏中巨噬细胞和中性粒细胞的比例。采用定量逆转录PCR (quantitative reverse transcriptase-mediated PCR, qRT-PCR) 检测肝脏中单核-巨噬细胞趋化蛋白-1 (monocyte/macrophage chemotaxis protein I, MCP- I)、巨噬细胞炎性蛋白1α (macrophage inflammatory protein I α, MIP- I α)、巨噬细胞炎性蛋白2 (macrophage inflammatory protein II, MIP- II) 及淋巴细胞抗原6G (lymphocyte antigen 6 complex locus G, Ly6G) 等mRNA的相对表达量。结果 WT对照组和*Glt25d1*<sup>+/+</sup>对照组小鼠ALT [(52.00±18.19) U/L vs (45.00±6.85) U/L]和AST [(168.17±21.33) U/L vs (276.17±83.37) U/L]水平差异无统计学意义 (*t*值分别为0.360、1.255, *P*值分别为0.7263、0.2589)。Con A造模12 h后, WT造模组小鼠ALT和AST水平分别为 (3089.67±663.92) U/L、(3099.50±519.15) U/L, *Glt25d1*<sup>+/+</sup>造模组小鼠ALT和AST水平分别 (11565.17±1381.38) U/L、(10875.17±1558.68) U/L, 均显著高于未造模组 (*P*均<0.05), *Glt25d1*<sup>+/+</sup>造模组小鼠ALT和AST水平均显著高于WT造模组 (*t*值分别为5.530、4.733, *P*值分别为0.0003、0.0032)。肝组织HE染色示: WT对照组和*Glt25d1*<sup>+/+</sup>对照组小鼠肝组织未见明显损伤, Con A诱导12 h后, 与WT Con A造模组小鼠相比, *Glt25d1*<sup>+/+</sup>造模组小鼠肝脏坏死面积更广、汇管区炎性细胞浸润更显著。*Glt25d1*<sup>+/+</sup>对照组小鼠脾脏中巨噬细胞比例显著高于WT对照组 [(5.04±0.32)% vs (3.48±0.31)%], 差异有统计学意义 (*t*=2.954, *P*=0.0131), 外周血 [(0.26±0.09)% vs (0.63±0.16)%]和肝脏 [(1.58±0.11)% vs (2.83±0.43)%]中差异无统计学意义 (*t*值分别为1.456、1.626, *P*值分别为0.1733、0.1351)。Con A诱导12 h后, 与WT造模组相比, *Glt25d1*<sup>+/+</sup>造模组小鼠外周血中巨噬细胞比例显著降低 [(0.12±0.21)% vs (0.43±0.10)%], *t*=2.955, *P*=0.0144, 肝脏中巨噬细胞比例显著升高 [(8.34±0.30)% vs (1.03±0.53)%], *t*=6.992, *P*=0.0002, 脾脏中巨噬细胞比例无显著差异 [(3.98±0.39)% vs (3.82±0.21)%], *t*=0.372, *P*=0.7173。与WT对照组小鼠相比, *Glt25d1*<sup>+/+</sup>对照组小鼠脾脏中中性粒细胞比例显著升高 [(5.20±0.76)% vs (2.46±0.35)%], *t*=3.836, *P*=0.0028, 外周血 [(0.67±0.26)% vs (1.96±0.77)%]和肝脏 [(3.68±1.33)% vs (3.76±1.12)%]中中性粒细胞比例无显著差异 (*t*值分别为1.078、0.039, *P*值分别为0.3040、0.9698)。Con A诱

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2020.01.007

基金项目: 首都临床特色应用研究 (Z181100001718084); 北京市医院管理中心消化内科学科协同发展中心专项 (XXZ0404); 北京市自然科学基金 (7152073); 国家自然科学基金 (81271901)

通讯作者: 魏红山 Email: drwei@ccmu.edu.cn

导12 h后,与WT造模组小鼠相比,*Glt25d1*<sup>+/+</sup>造模组小鼠外周血中性粒细胞比例显著降低[(1.37 ± 0.22)% vs (14.40 ± 2.72)%,  $t = 4.782$ ,  $P = 0.0088$ ],肝脏中巨噬细胞比例显著升高[(8.08 ± 1.93)% vs (1.64 ± 0.71)%,  $t = 3.788$ ,  $P = 0.0043$ ],脾脏中差异无统计学意义[(5.81 ± 0.84)% vs (5.96 ± 0.42)%,  $t = 0.176$ ,  $P = 0.8621$ ]。WT对照组小鼠MCP- I、MIP- I  $\alpha$ 、MIP- II及Ly6G mRNA相对表达量分别为0.66 ± 0.31、1.08 ± 0.23、1.04 ± 0.17、1.05 ± 0.19,*Glt25d1*<sup>+/+</sup>对照组小鼠上述指标分别为0.60 ± 0.13、1.56 ± 0.11、0.77 ± 0.07、0.92 ± 0.16,差异均无统计学意义( $P$ 均> 0.05)。WT造模组小鼠MCP- I、MIP- I  $\alpha$ 、MIP- II及Ly6G mRNA相对表达量分别为1.29 ± 0.41、1.11 ± 0.18、1.16 ± 0.19、0.90 ± 0.20,*Glt25d1*<sup>+/+</sup>造模组小鼠上述指标分别为2.51 ± 0.26、4.72 ± 0.45、2.62 ± 0.36、2.36 ± 0.59,*Glt25d1*<sup>+/+</sup>造模组均显著高于WT造模组,差异有统计学意义( $P$ 均< 0.05)。结论 *Glt25d1*基因敲低可加重小鼠Con A诱导的自身免疫性肝炎,降低外周血巨噬细胞和中性粒细胞比例,升高肝脏中巨噬细胞和中性粒细胞比例,并诱导肝脏细胞因子如MCP- I、MIP- I  $\alpha$ 、MIP- II及Ly6G转录水平升高。

关键词: *Glt25d1*; 自身免疫性肝炎; 巨噬细胞; 中性粒细胞

### Effects of *Glt25d1* gene knockdown on macrophages and neutrophils of mice with autoimmune hepatitis induced by concanavalin A

Gao Meixin<sup>1</sup>, He Lingling<sup>2</sup>, Ye Xiaohui<sup>1</sup>, Yang Junru<sup>2</sup>, Li Jia<sup>2</sup>, Zhang Manka<sup>3</sup>, Zhang Jian<sup>3</sup>, Xiao Fan<sup>4</sup>, Wei Hongshan<sup>1,2</sup> (1. Department of Gastroenterology, Peking University Ditan Teaching Hospital, Beijing 100015, China; 2. Department of Gastroenterology, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 3. Department of Center of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Peking University Ditan Teaching Hospital, Beijing 100015, China; 4. Department of Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China.)

**Abstract: Objective** To investigate the role of *Glt25d1* in concanavalin A (Con A) induced autoimmune hepatitis, and its effects on macrophages and neutrophils in this progression. **Methods** The specific pathogen free *Glt25d1*<sup>+/+</sup> mice and wild type (WT) mice born in the same litter were randomly selected, the mice were all female and 6~8 weeks, the body mass were (20 ± 2) g. The mice were divided into WT control group, *Glt25d1*<sup>+/+</sup> control group, WT Con A administration group and *Glt25d1*<sup>+/+</sup> Con A administration group, 8 mice in each group. Mice in administered group were given Con A via the internal iliac venous plexus with a dose of 10 mg/kg body mass, while mice in control group were injected with the same dose of saline. Mice were sacrificed after Con A challenged for 12 h. The levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were detected and the liver histopathology were observed. Flow cytometry were used to detect the percentage of macrophages and neutrophils in blood, spleen and liver single-cell suspension of mice. Quantitative reverse transcriptase-mediated PCR (qRT-PCR) were used to detect the relative expression of monocyte/macrophage chemotaxis protein I (MCP- I), macrophage inflammatory protein I  $\alpha$  (MIP- I  $\alpha$ ), macrophage inflammatory protein II (MIP- II) and lymphocyte antigen 6 complex locus G (Ly6G) mRNA. **Results** There were no statistically significant differences of ALT [(52.00 ± 18.19) U/L vs (45.00 ± 6.85) U/L] and AST [(52.00 ± 18.19) U/L vs (45.00 ± 6.85) U/L] in mice between WT control group and *Glt25d1*<sup>+/+</sup> control group ( $t = 0.360$ , 1.255,  $P = 0.7263$ , 0.2589). After Con A administrated for 12 h, the ALT and AST levels of mice in WT Con A administration group were (3089.67 ± 663.92) U/L and (3099.50 ± 519.15) U/L, respectively, and in *Glt25d1*<sup>+/+</sup> Con A administration group were (11565.17 ± 1381.38) U/L and (10875.17 ± 1558.68) U/L, respectively, the levels of ALT and AST were significantly higher than those in control group (all  $P < 0.05$ ). In addition, the ALT and AST levels of *Glt25d1*<sup>+/+</sup> Con A administration group were significantly increased compared with those in WT Con A administration group ( $t = 5.530$ , 4.733;  $P = 0.0003$ , 0.0032). HE staining showed that there was no significant liver injury of mice in both of WT control group and *Glt25d1*<sup>+/+</sup> control group. After Con A administrated for 12 h, compared with mice of WT Con A administration group, liver pathological section of mice in *Glt25d1*<sup>+/+</sup> Con A administration group had wider area of necrosis and showed more significant infiltration of inflammatory cells in the portal area. The percentage of macrophage in spleen of mice in *Glt25d1*<sup>+/+</sup> control group were significantly higher than that in

WT control group  $[(5.04 \pm 0.32)\% \text{ vs } (3.48 \pm 0.31)\%]$ , the difference was statistically significant ( $t = 2.954, P = 0.0131$ ). There were no statistically significant differences of macrophage percentage in peripheral blood  $[(0.26 \pm 0.09)\% \text{ vs } (0.63 \pm 0.16)\%]$  and liver  $[(1.58 \pm 0.11)\% \text{ vs } (2.83 \pm 0.43)\%]$  between *Glt25d1*<sup>+/-</sup> control group and WT control group ( $t = 1.456, 1.626; P = 0.1733, 0.1351$ ). After Con A administrated for 12 h, in comparison with WT Con A administration group, the percentage of macrophage in *Glt25d1*<sup>+/-</sup> Con A administration group decreased significantly in peripheral blood  $[(0.12 \pm 0.21)\% \text{ vs } (0.43 \pm 0.10)\%]; t = 2.955, P = 0.0144]$  and increased in liver  $[(8.34 \pm 0.30)\% \text{ vs } (1.03 \pm 0.53)\%]; t = 6.992, P = 0.0002]$ , and there was no significant difference in spleen  $[(3.98 \pm 0.39)\% \text{ vs } (3.82 \pm 0.21)\%]; t = 0.372, P = 0.7173]$ . Compared with WT control group, the percentage of neutrophil of spleen in *Glt25d1*<sup>+/-</sup> control group increased significantly  $[(5.20 \pm 0.76)\% \text{ vs } (2.46 \pm 0.35)\%]; t = 3.836, P = 0.0028]$ , while there were no significant differences in peripheral blood  $[(0.67 \pm 0.26)\% \text{ vs } (1.96 \pm 0.77)\%]$  and liver  $[(3.68 \pm 1.33)\% \text{ vs } (3.76 \pm 1.12)\%]; t = 1.078, 0.039, P = 0.3040, 0.9698]$ . After Con A administrated for 12 h, in comparison with WT Con A administration group, the percentage of neutrophil in peripheral blood of *Glt25d1*<sup>+/-</sup> Con A administration group decreased significantly  $[(1.37 \pm 0.22)\% \text{ vs } (14.40 \pm 2.72)\%]; t = 4.782, P = 0.0088]$ , and in liver increased significantly  $[(8.08 \pm 1.93)\% \text{ vs } (1.64 \pm 0.71)\%]; t = 3.788, P = 0.0043]$ , there was no statistical difference of neutrophil in spleen  $[(5.81 \pm 0.84)\% \text{ vs } (5.96 \pm 0.42)\%]; t = 0.176, P = 0.8621]$ . The relative expression of MCP- I, MIP- I  $\alpha$ , MIP- II and Ly6G mRNA in WT control group were  $0.66 \pm 0.31, 1.08 \pm 0.23, 1.04 \pm 0.17$  and  $1.05 \pm 0.19$ , respectively, and in *Glt25d1*<sup>+/-</sup> control group were  $0.60 \pm 0.13, 1.56 \pm 0.11, 0.77 \pm 0.07$  and  $0.92 \pm 0.16$ , respectively, the differences were not statistically significant (all  $P > 0.05$ ). The relative expression of MCP- I, MIP- I  $\alpha$ , MIP- II and Ly6G mRNA in WT control group were  $1.29 \pm 0.41, 1.11 \pm 0.18, 1.16 \pm 0.19$  and  $0.90 \pm 0.20$ , respectively, and in *Glt25d1*<sup>+/-</sup> control group were  $2.51 \pm 0.26, 4.72 \pm 0.45, 2.62 \pm 0.36$  and  $2.36 \pm 0.59$  in *Glt25d1*<sup>+/-</sup> Con A administration group, respectively. The above indicators in *Glt25d1*<sup>+/-</sup> Con A administration group were higher than those in WT Con A administration group, the differences were statistically significant (all  $P < 0.05$ ). **Conclusions** *Glt25d1* gene-knockdown aggravated Con A-induced autoimmune hepatitis in mice. Deficiency of *Glt25d1* reduced the proportion of macrophages and neutrophils in peripheral blood, while increased the proportion of macrophages and neutrophils in liver, and also induced the increasing transcription levels of MCP- I, MIP- I  $\alpha$ , MIP- II, and Ly6G mRNA.

**Key words:** *Glt25d1*; Autoimmune hepatitis; Macrophages; Neutrophils

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是一种以肝功能异常、高 $\gamma$ -球蛋白血症、循环中存在自身抗体、肝组织学表现为界面性肝炎、对免疫抑制剂治疗应答为特征的慢性肝脏炎症性疾病,多发于女性<sup>[1,2]</sup>。虽然目前已有关于AIH的诊断指南,但由于发病机制尚未明确,AIH的早期诊断和后续治疗面临极大挑战<sup>[3]</sup>。机体固有免疫反应和适应性免疫反应可调控自身免疫性肝炎的发生发展并影响疾病预后<sup>[3-5]</sup>。巨噬细胞和中性粒细胞作为机体固有免疫的重要组成成分,在自身免疫性肝炎的发生发展中发挥重要作用。国内外大量研究表明,在AIH的疾病进程中,巨噬细胞和中性粒细胞能够在各种细胞因子和趋化因子的作用下迁移趋化至肝脏损伤部位<sup>[3]</sup>,适量的巨噬细胞和中性粒细胞能够保护肝细胞不受损伤,然而持续活化和累积的巨噬细胞和中性粒细胞能够直接或间接加重肝脏免疫性炎症反应<sup>[6-8]</sup>,引起肝细胞坏死和凋亡。因此,研究AIH中

巨噬细胞和中性粒细胞的数量、分布及功能是阐释AIH发病机制的重要方向。

细胞的正常发育和分化受细胞外基质的精细调控,细胞外基质的变化必然影响细胞的发育和功能<sup>[9-11]</sup>。胶原是细胞外基质最丰富的成分之一,其异常糖基化可影响胶原的合成和分泌,进而影响细胞外基质各成分的比例及组装<sup>[12]</sup>。*Glt25d1*和*Glt25d2*是一种胶原糖基转移酶,前胶原 $\alpha$ 链在内质网中经历翻译后修饰时,*Glt25d1*和*Glt25d2*可将半乳糖或葡萄糖半乳糖双糖连接到胶原的羟赖氨酸残基上,从而完成了胶原的糖基化修饰<sup>[13,14]</sup>。有研究表明,*Glt25d2*糖基因缺陷可影响自身免疫性肝损伤中CD4细胞的发育、活化和分化<sup>[15]</sup>。*Glt25d1*在免疫性肝功能损伤中的作用尚缺乏研究。鉴于巨噬细胞和中性粒细胞在机体损伤中具有重要作用,本文就*Glt25d1*基因敲低对刀豆蛋白A(concanavalin A, Con A)诱导的自身免疫性肝

功能损伤小鼠巨噬细胞和中性粒细胞在免疫组织中分布的影响进行探讨。

## 1 资料与方法

1.1 实验动物 *Glt25dl* 基因敲低 (*Glt25dl*<sup>+/−</sup>) 小鼠由南京大学模式生物所提供, 基因敲低方法参考相关文献<sup>[16]</sup>。小鼠饲养于北京大学医学部实验动物中心无特定病原体动物室, 环境温度 (22 ± 2) °C, 湿度 (50 ± 15) %, 持续规律地给予 12 h 照明 /12 h 黑暗的昼夜循环, 小鼠自由饮食、饮水。

1.2 实验试剂 Con A 粉末购自美国 Sigma 公司。CD11b-PerCPcy5.5 抗体、Gr1-PE 抗体、F4/80-APC 抗体购自美国 TONBO 公司。TRIgene 总 RNA 提取试剂盒购自美国 GenStar 公司。逆转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司。聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) TaqMix 酶购自美国 Promega 公司。

## 1.3 实验方法

1.3.1 小鼠免疫性肝炎模型的建立与干预 随机抽取 6~8 周雌性 *Glt25dl*<sup>+/−</sup> 小鼠及与其同窝出生的野生型 (wild type, WT) 小鼠, 体质量 (20 ± 2) g, 分为 WT 对照组、*Glt25dl*<sup>+/−</sup> 对照组、WT 造模组、*Glt25dl*<sup>+/−</sup> 造模组, 每组 8 只小鼠。造模组通过内眦静脉注射 Con A, 剂量为 10 mg/kg, 对照组给予相同剂量生理盐水注射。造模 12 h 后, 麻醉小鼠, 摘眼球取血法取血, 然后处死小鼠, 留取脾脏及肝脏组织。

1.3.2 肝脏生物化学指标的检测 通过 Olympus AU 2700 全自动生化分析仪, 采用速率法检测小鼠血浆丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 和天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 水平。

1.3.3 肝组织 HE 染色 将留取的肝左叶置于 4% 多聚甲醛中固定, 于首都医科大学附属北京地坛医院病理科进行切片及 HE 染色, 切片厚度为 4 μm。

1.3.4 表型分析 将留取的外周血、脾脏和肝脏组织制备成单细胞悬液, 采用流式细胞术进行表型分析。肝脏间质细胞通过 40% Percoll 与 80% Percoll 密度梯度离心法获得。将制备好的单细胞悬液按 150 μl/管置于流式管中, 每管加入 1 μl CD11b-PerCPcy5.5 抗体, 0.5 μl Gr1-PE 抗体, 1 μl F4/80-APC 抗体, 4 °C 避光染色 15 min, PBS 清洗后上机检测。数据用 flowjo 7.6 软件分析。

1.3.5 肝组织总 RNA 提取及定量逆转录 PCR (quantitative reverse transcriptase-mediated PCR, qRT-PCR) 采用 Trizol 总 RNA 提取试剂法提取肝组织 RNA,

经逆转录后于 -80 °C 保存。qRT-PCR 体系及反应条件严格按照 Promega 厂家说明书进行。使用 ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 仪检测, 得到 Ct 值。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH), 通过 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算单核巨噬细胞趋化蛋白 1 (monocyte/macrophage chemotaxis protein I, MCP-I)、巨噬细胞炎性蛋白 I α (macrophage inflammatory protein I α, MIP-I α)、巨噬细胞炎性蛋白 2 (macrophage inflammatory protein II, MIP-II) 及淋巴细胞抗原 6 (lymphocyte antigen 6 complex locus G, Ly6G) mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

1.4 统计学处理 所有数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。ALT、AST、巨噬细胞比例、中性粒细胞比例以及肝脏细胞因子 mRNA 相对表达量等计量资料均符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 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 Con A 造模前后 WT 小鼠和 *Glt25dl*<sup>+/−</sup> 小鼠肝功能及肝组织病理 WT 对照组与 *Glt25dl*<sup>+/−</sup> 对照组小鼠 ALT 和 AST 水平差异无统计学意义 (*t* 值分别为 0.360、1.255, *P* 值分别为 0.7263、0.2589)。Con A 造模 12 h 后, 造模组小鼠 ALT 和 AST 水平均显著高于未造模组 (*P* 均 < 0.05), *Glt25dl*<sup>+/−</sup> 造模组小鼠 ALT 和 AST 水平均显著高于 WT 造模组 (*t* 值分别为 5.530、4.733, *P* 值分别为 0.0003、0.0032), 见表 2。肝组织 HE 染色示: WT 对照组和 *Glt25dl*<sup>+/−</sup> 对照组小鼠肝组织未见明显损伤, Con A 诱导 12 h 后, 与 WT Con A 造模组小鼠相比, *Glt25dl*<sup>+/−</sup> 造模组小鼠肝脏坏死面积更广、汇管区炎性细胞浸润更显著, 见图 1。

表 1 PCR 反应体系引物序列

引物名称	引物序列
GAPDH	上游引物: 5'-TGGCCTTCCGTGTTCTCTAC-3' 下游引物: 5'-GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA-3'
MCP-I	上游引物: 5'-GTCTGTGCTGACCCCAAGAAG-3' 下游引物: 5'-TGGTTCCGATCCAGGTTTTTA-3'
MIP-I α	上游引物: 5'-CAACGATGAATTGGCGTGGA-3' 下游引物: 5'-TGTACCATGACACTCTGCAAC-3'
MIP-II	上游引物: 5'-CCAACCACAGGCTACAGG-3' 下游引物: 5'-GCGTCACACTCAAGCTCTG-3'
Ly6G	上游引物: 5'-GACTTCCTGCAACACAACCTACC-3' 下游引物: 5'-ACAGCATTACCAGTGAICTCAGT-3'

注: GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶, MCP-I 为单核巨噬细胞趋化蛋白 1, MIP-I α 为巨噬细胞炎性蛋白 I α, MIP-II 为巨噬细胞炎性蛋白 2, Ly6G 为淋巴细胞抗原 6

2.2 Con A造模前后各组小鼠外周血、脾脏和肝脏中巨噬细胞比例 *Glt25d1*<sup>+/+</sup>对照组小鼠脾脏中巨噬细胞比例显著高于WT对照组 ( $t = 2.954$ ,  $P = 0.0131$ ), 外周血和肝脏中巨噬细胞比例差异无统计学意义 ( $t$ 值分别为1.456、1.626,  $P$ 值分别为0.1733、0.1351)。Con A造模12 h后, 与WT造模组小鼠相比, *Glt25d1*<sup>+/+</sup>造模组小鼠外周血巨噬细胞比例显著降低 ( $t = 2.955$ ,  $P = 0.0144$ ), 肝脏中巨噬细胞比例显著升高 ( $t = 6.992$ ,  $P = 0.0002$ ), 脾脏中巨噬细胞比例差异无统计学意义 ( $t = 0.372$ ,  $P = 0.7173$ )。见表3、图2。

2.3 Con A造模前后各组小鼠外周血、脾脏和肝脏中中性粒细胞比例 与WT对照组小鼠相比, *Glt25d1*<sup>+/+</sup>对照组小鼠脾脏中中性粒细胞比例显著升高 ( $t = 3.836$ ,  $P = 0.0028$ ), 外周血和肝脏中性粒细胞比例差异

无统计学意义 ( $t$ 值分别为1.078、0.039,  $P$ 值分别为0.3040、0.9698)。Con A造模12 h后, 与WT造模组小鼠相比, *Glt25d1*<sup>+/+</sup>造模组小鼠外周血中性粒细胞比例显著降低 ( $t = 4.782$ ,  $P = 0.0088$ ), 肝脏中巨噬细胞比例显著升高 ( $t = 3.788$ ,  $P = 0.0043$ ), 脾脏中巨噬细胞比例差异无统计学意义 ( $t = 0.176$ ,  $P = 0.8621$ ), 见表4。

2.4 Con A造模前后各组小鼠肝组织中MCP-I、MIP I  $\alpha$ 、MIP-II及Ly6G的转录水平 WT对照组与*Glt25d1*<sup>+/+</sup>对照组小鼠肝组织MCP-I、MIP I  $\alpha$ 、MIP-II及Ly6G mRNA相对表达量差异无统计学意义 ( $P$ 均  $> 0.05$ )。Con A造模12 h后, 与WT造模组小鼠相比, *Glt25d1*<sup>+/+</sup>造模组小鼠MCP-I、MIP I  $\alpha$ 、MIP-II及Ly6G mRNA相对表达量均显著升高 ( $P$ 均  $< 0.05$ ), 见表5。

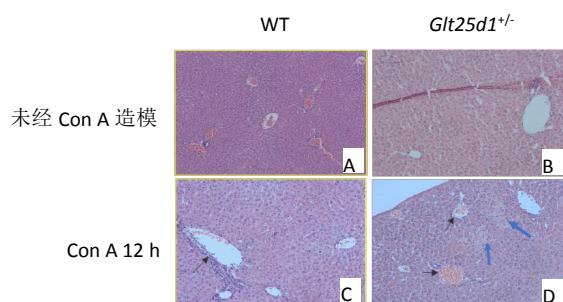


图1 WT小鼠和*Glt25d1*<sup>+/+</sup>小鼠Con A造模前后肝组织病理切片图(HE染色,  $\times 200$ )

注: A为WT对照组, B为*Glt25d1*<sup>+/+</sup>对照组, C为WT造模组, D为*Glt25d1*<sup>+/+</sup>造模组; A、B两组小鼠肝组织未见明显损伤, C、D组小鼠肝脏坏死面积更广、汇管区炎性细胞浸润显著, 其中蓝色箭头表示组织坏死区域, 黑色箭头表示炎性细胞浸润

表2 未经ConA造模及Con A造模12 h后WT小鼠和*Glt25d1*<sup>+/+</sup>小鼠ALT和AST水平 ( $\bar{x} \pm s$ , U/L)

组别	ALT	AST
未经ConA造模		
WT对照组	52.00 $\pm$ 18.19	168.17 $\pm$ 21.33
<i>Glt25d1</i> <sup>+/+</sup> 对照组	45.00 $\pm$ 6.85	276.17 $\pm$ 83.37
$t$ 值	0.360	1.255
$P$ 值	0.7263	0.2589
Con A造模12 h		
WT造模组	3089.67 $\pm$ 663.92 <sup>a</sup>	3099.50 $\pm$ 519.15 <sup>b</sup>
<i>Glt25d1</i> <sup>+/+</sup> 造模组	11565.17 $\pm$ 1381.38 <sup>c</sup>	10875.17 $\pm$ 1558.68 <sup>d</sup>
$t$ 值	5.530	4.733
$P$ 值	0.0003	0.0032

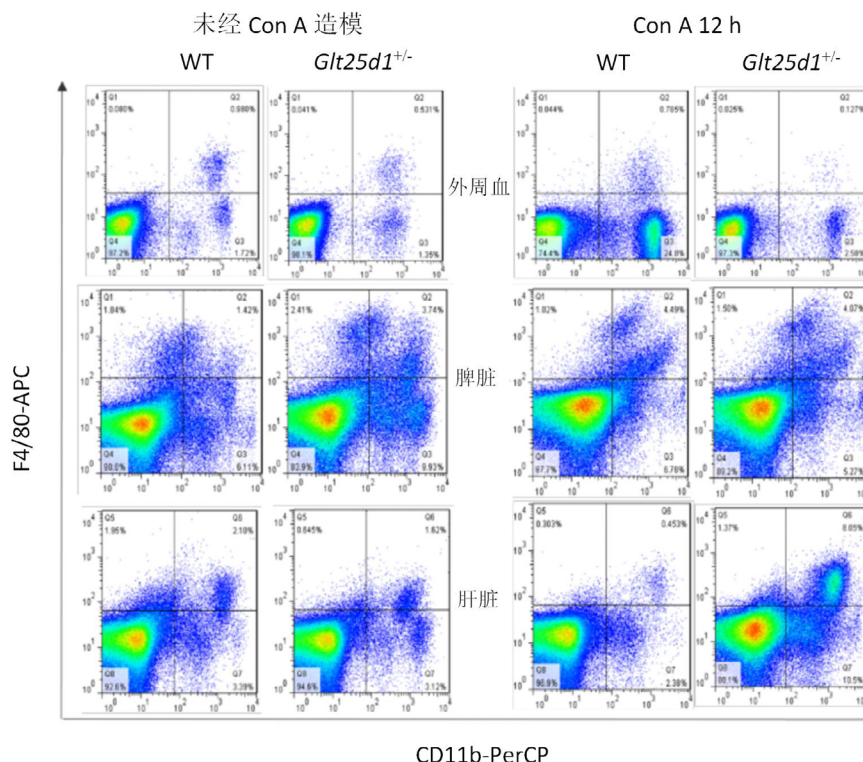
注: 与WT对照组小鼠相比, WT造模组ALT<sup>a</sup> $t = 4.574$ ,  $^aP = 0.0060$ , AST<sup>b</sup> $t = 5.642$ ,  $^bP = 0.0024$ ; 与*Glt25d1*<sup>+/+</sup>对照组小鼠相比, *Glt25d1*<sup>+/+</sup>造模组ALT<sup>c</sup> $t = 8.339$ ,  $^cP = 0.0004$ , AST<sup>d</sup> $t = 6.790$ ,  $^dP = 0.0010$

表3 未经ConA造模及Con A造模12 h后WT小鼠和*Glt25d1*<sup>+/+</sup>小鼠外周血、脾脏和肝脏中巨噬细胞的比例 ( $\bar{x} \pm s$ , %)

组别	外周血	脾脏	肝脏
未经ConA造模			
WT对照组	0.63 $\pm$ 0.16	3.48 $\pm$ 0.31	2.83 $\pm$ 0.43
<i>Glt25d1</i> <sup>+/+</sup> 对照组	0.26 $\pm$ 0.09	5.04 $\pm$ 0.32	1.58 $\pm$ 0.11
$t$ 值	1.456	2.954	1.626
$P$ 值	0.1733	0.0131	0.1351
Con A造模12 h			
WT造模组	0.43 $\pm$ 0.10	3.82 $\pm$ 0.21	1.03 $\pm$ 0.53
<i>Glt25d1</i> <sup>+/+</sup> 造模组	0.12 $\pm$ 0.21	3.98 $\pm$ 0.39	8.34 $\pm$ 0.30
$t$ 值	2.955	0.372	6.992
$P$ 值	0.0144	0.7173	0.0002

表4 未经ConA造模及Con A造模12 h后WT小鼠和*Glt25d1*<sup>+/+</sup>小鼠外周血、脾脏和肝脏中中性粒细胞的比例 ( $\bar{x} \pm s$ , %)

组别	外周血	脾脏	肝脏
未经ConA造模			
WT对照组	1.96 $\pm$ 0.77	2.46 $\pm$ 0.35	3.76 $\pm$ 1.12
<i>Glt25d1</i> <sup>+/+</sup> 对照组	0.67 $\pm$ 0.26	5.20 $\pm$ 0.76	3.68 $\pm$ 1.33
$t$ 值	1.078	3.836	0.039
$P$ 值	0.3040	0.0028	0.9698
Con A造模12 h			
WT造模组	14.40 $\pm$ 2.72	5.96 $\pm$ 0.42	1.64 $\pm$ 0.71
<i>Glt25d1</i> <sup>+/+</sup> 造模组	1.37 $\pm$ 0.22	5.81 $\pm$ 0.84	8.08 $\pm$ 1.93
$t$ 值	4.782	0.176	3.788
$P$ 值	0.0088	0.8621	0.0043

图2 未经 Con A 造模和 Con A 造模后 12 h WT 小鼠和 *Glt25d1*<sup>+/-</sup> 小鼠外周血、脾脏、肝脏中巨噬细胞的流式细胞术分析表5 未经 Con A 造模和 Con A 造模后 12 h WT 小鼠和 *Glt25d1*<sup>+/-</sup> 小鼠肝脏细胞因子 mRNA 相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	MCP- I	MIP- I $\alpha$	MIP- II	Ly6G
未经Con A造模				
WT对照组	0.66 $\pm$ 0.31	1.08 $\pm$ 0.23	1.04 $\pm$ 0.17	1.05 $\pm$ 0.19
<i>Glt25d1</i> <sup>+/-</sup> 对照组	0.60 $\pm$ 0.13	1.56 $\pm$ 0.11	0.77 $\pm$ 0.07	0.92 $\pm$ 0.16
<i>t</i> 值	0.1793	2.132	1.698	0.528
<i>P</i> 值	0.8622	0.0656	0.1279	0.6165
Con A造模12 h				
WT造模组	1.29 $\pm$ 0.41	1.11 $\pm$ 0.18	1.16 $\pm$ 0.19	0.90 $\pm$ 0.20
<i>Glt25d1</i> <sup>+/-</sup> 造模组	2.51 $\pm$ 0.26	4.72 $\pm$ 0.45	2.62 $\pm$ 0.36	2.36 $\pm$ 0.59
<i>t</i> 值	2.506	7.371	3.575	2.365
<i>P</i> 值	0.0311	< 0.001	0.0030	0.0456

### 3 讨论

Con A诱导的肝功能损伤小鼠模型是研究AIH的经典动物模型。Con A主要通过T细胞表面的聚糖结构结合，促进T细胞增殖而诱发肝功能损伤。同时，Con A还可刺激免疫细胞（如CD4<sup>+</sup> T细胞、自然杀伤性T细胞和巨噬细胞等）分泌大量炎症细胞因子（如 $\gamma$ 干扰素、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 等）而引发肝功能损伤<sup>[16,17]</sup>。正常小鼠经Con A诱导后主要表现为血浆ALT、AST显著升高，肝组织病理表现为界面性肝炎、免疫细胞尤其是T细胞和巨噬细胞显著活化等，其能够很好地模拟AIH的病理特征<sup>[16,17]</sup>。

已有文献表明，体内多种蛋白的糖基化修饰参与机体的免疫反应<sup>[18]</sup>。首先，异常糖基化修饰可暴露新的抗原表位，引起机体的抗原抗体反应<sup>[19]</sup>；其次，T细胞识别受体表面聚糖GnT5缺失将降低T细胞的活化阈值<sup>[20]</sup>；另外，缺乏糖基化修饰的免疫球蛋白G丧失了介导抗体依赖的细胞毒性作用的功能<sup>[21]</sup>。以上研究均提示糖基化修饰广泛参与免疫反应的各个环节，异常糖基化会导致机体免疫功能紊乱。细胞外基质中的胶原可影响细胞的发育、分化以及受体-配体的结合，进而影响免疫细胞的发育、分化和功能<sup>[12]</sup>。而胶原的翻译后修饰受胶原糖基转移酶的



调控。糖基因 *Glt25d1* 和 *Glt25d2* 是进化上高度保守的基因家族, 可通过糖基化修饰作用于胶原, 广泛参与免疫反应的各个环节<sup>[13,14,22,23]</sup>。研究表明, *Glt25d2* 基因缺失可加重 Con A 诱导的 AIH, 其机制可能与影响 CD4<sup>+</sup> T 细胞的活化和分化有关<sup>[15]</sup>。虽然 *Glt25d1* 基因在免疫反应中的作用尚未见报道, 但由于 *Glt25d1* 基因与 *Glt25d2* 基因在功能上的一致性<sup>[13,14,22,23]</sup>, 故假设 *Glt25d1* 也参与了机体的免疫反应, 本研究通过制备 *Glt25d1*<sup>+/-</sup> 小鼠模型, 发现 *Glt25d1* 基因敲低加重了 Con A 诱导的肝功能损伤, 其机制可能与影响 AIH 肝脏中巨噬细胞和中性粒细胞的频数有关, 具体表现为: Con A 造模后, 与 WT 小鼠相比, *Glt25d1*<sup>+/-</sup> 小鼠外周血中巨噬细胞和中性粒细胞百分比显著降低, 而肝脏中巨噬细胞和中性粒细胞百分比显著升高, 且肝脏中巨噬细胞和中性粒细胞相关细胞因子和趋化因子转录水平显著升高。

巨噬细胞在多种肝脏疾病中发挥重要的促炎作用。Tian 等<sup>[24]</sup>研究表明, 在乙型肝炎病毒的垂直传播中, 母体 CD8<sup>+</sup> T 细胞通过巨噬细胞介导子代肝脏慢性炎症反应。另外, 在慢性丙型肝炎病毒感染中, 巨噬细胞是肝脏炎症微环境中的主要细胞成分, 并且活化的单核/巨噬细胞能够激活肝星状细胞, 进而诱导肝纤维化<sup>[25,26]</sup>。Filliol 等<sup>[27]</sup>在脂多糖诱导的肝炎模型中发现, 脂多糖导致的肝功能损伤主要与巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子有关。在 Con A 诱导的 AIH 中, 巨噬细胞也作为重要的炎症细胞介导肝细胞的损伤和凋亡<sup>[28,29]</sup>。

中性粒细胞是白细胞中最丰富的成分, 在机体急性损伤中发挥重要作用。研究表明, 在 Con A 诱导的 AIH 中, 中性粒细胞能在各种趋化因子的作用下迁移趋化至肝损伤部位, 并通过分泌多种细胞因子和趋化因子加重肝脏炎症损伤<sup>[30]</sup>。另有研究表明, 巨噬细胞和中性粒细胞可通过协调作用共同加重机体损伤部位的炎症反应, 中性粒细胞的迁移趋化依赖巨噬细胞分泌的 MIP-2, 利用 MIP-2 抗体阻断后, 中性粒细胞的迁移趋化明显减少<sup>[31]</sup>。

本研究也提示, 在 Con A 诱导的肝损伤中, 肝脏中巨噬细胞和中性粒细胞发挥了重要的促炎作用, *Glt25d1* 基因敲低增加了肝脏中巨噬细胞和中性粒细胞的频数, 从而加重肝损伤。本研究还存在一定局限性。首先, 未能对巨噬细胞的 M1 和 M2 亚型进行区分; 其次, 未能进一步检测巨噬细胞和中性粒细胞的活性和功能; 另外, 巨噬细胞和中性粒细胞迁移趋化的相关细胞因子只局限在 mRNA 水平, 未在蛋白水平进行验证。

综上, 在 Con A 诱导的 AIH 中, *Glt25d1* 基因敲低显著增加了肝脏中巨噬细胞和中性粒细胞的频数, 可能对肝脏免疫性炎症反应有一定促进作用。本研究从糖基化修饰的角度探讨了 AIH 中巨噬细胞和中性粒细胞的变化, 有助于为 AIH 的靶向性治疗提供新的分子基础。

## 参考文献

- [1] Wang QX, Yan L, Ma X. Autoimmune hepatitis in the Asia-Pacific area[J]. J Clin Transl Hepatol, 2018, 6(1): 48-56.
- [2] Ye T, Wang T, Yang X, et al. Comparison of concanavalin a-induced murine autoimmune hepatitis models[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(3): 1241-1251.
- [3] Heneghan MA, Yeoman AD, Verma S, et al. Autoimmune hepatitis[J]. Lancet, 2013, 382(9902): 1433-1444.
- [4] Szabo G, Mandrekar P, Dolganiuc A. Innate immune response and hepatic inflammation[J]. Semin Liver Dis, 2007, 27(4): 339-350.
- [5] Sokollik C, McLin VA, Vergani D, et al. Juvenile autoimmune hepatitis: a comprehensive review[J]. J Autoimmun, 2018, 95: 69-76.
- [6] Zhang J, Guo L, Liu M, et al. Receptor-interacting protein kinase 3 mediates macrophage/monocyte activation in autoimmune hepatitis and regulates interleukin-6 production[J]. United European Gastroenterol J, 2018, 6(5): 719-728.
- [7] Grønbaek, H, Kreutzfeldt M, Kazankov K, et al. Single-centre experience of the macrophage activation marker soluble (s)CD163-associations with disease activity and treatment response in patients with autoimmune hepatitis[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2016, 44(10): 1062-1070.
- [8] Sellers RS, Clifford CB, Treuting PM, et al. Immunological variation between inbred laboratory mouse strains: points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice[J]. Vet Pathol, 2012, 49(1): 32-43.
- [9] Hallmann R, Zhang X, Di Russo J, et al. The regulation of immune cell trafficking by the extracellular matrix[J]. Curr Opin Cell Biol, 2015, 36: 54-61.
- [10] Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, et al. Extracellular matrix structure[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2016, 97: 4-27.
- [11] Mouw JK, Ou G, Weaver VM. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(12): 771-785.
- [12] Rowley AT, Nagalla RR, Wang SW, et al. Extracellular matrix-based strategies for immunomodulatory biomaterials engineering[J]. Adv Healthc Mater, 2019, 8(8): e1801578.
- [13] Baumann S, Hennet T. Collagen accumulation in osteosarcoma cells lacking GLT25D1 collagen galactosyltransferase[J]. J Biol Chem, 2016, 291(35): 18514-18524.
- [14] Liefhebber JM, Punt S, Spaan WJ, et al. The human collagen beta(1-O) galactosyltransferase, GLT25D1, is a soluble endoplasmic reticulum localized protein[J]. BMC Cell Biol, 2010, 11: 33.
- [15] Hao X, Liu R, Zhang Y, et al. Glt25d2 knockout directly increases CD25<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> but decreases CD25<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> subset proliferation and is involved in concanavalin-induced hepatitis[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 50(3): 1186-1200.

- [16] Jaeckel E, Hardtke-Wolenski M, Fischer K. The benefit of animal models for autoimmune hepatitis[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*,2011,25(6):643-651.
- [17] Zhao X, Ding S, Geng C, et al. Anti-CD200 attenuates concanavalin A induced hepatitis via modulating the imbalance of CD4<sup>+</sup> T lymphocyte differentiation in mice[J]. *Am J Transl Res*,2018,10(12):4202-4209.
- [18] Hennot T. Collagen glycosylation[J]. *Curr Opin Struct Biol*,2019,56:131-138.
- [19] Rabinovich GA, Van KY, Cobb BA. Glycobiology of immune responses[J]. *Ann NY Acad Sci*,2012,1253(1):1-15.
- [20] Rapoport EM, Kurmyshkina OV, Bovin NV. Mammalian galectins: structure, carbohydrate specificity, and functions[J]. *Biochemistry*,2008,73(4):393-405.
- [21] 衣常红, 高春芳. IgG糖基化修饰及其意义研究进展[J]. *中国免疫学杂志*,2010,26(11):1051-1056.
- [22] Perrin-Tricaud C, Rutschmann C, Hennot T. Identification of domains and amino acids essential to the collagen galactosyltransferase activity of GLT25D1[J]. *PLoS One*,2011,6(12):e29390.
- [23] Schegg B, Hulsmeier AJ, Rutschmann C, et al. Core glycosylation of collagen is initiated by two beta(1-O)galactosyltransferases[J]. *Mol Cell Biol*,2009,29(4):943-952.
- [24] Tian Y, Kuo CF, Akbari O, et al. Maternal-derived hepatitis B virus e antigen alters macrophage function in offspring to drive viral persistence after vertical transmission[J]. *Immunity*,2016,44(5):1204-1214.
- [25] Bility MT, Nio K, Li F, et al. Chronic hepatitis C infection-induced liver fibrogenesis is associated with M2 macrophage activation[J]. *Sci Rep*,2016,6(1):39520.
- [26] 麦维利, 陈琦琪, 杨晓宇, 等. 巨噬细胞对小鼠活化肝星状细胞凋亡的影响及机制[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*,2018,10(4):59-65.
- [27] Filliol A, Piquet-Pellorce C, Raguénès-Nicol, et al. RIPK1 protects hepatocytes from Kupffer cells-mediated TNF-induced apoptosis in mouse models of PAMP-induced hepatitis[J]. *J Hepatol*,2017,66(6):1205-1213.
- [28] Jaeckel E, Hardtke-Wolenski M, Fischer K. The benefit of animal models for autoimmune hepatitis[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*,2011,25(6):643-651.
- [29] 杨帆. ConA诱导肝衰竭中肝脏巨噬细胞调控分子机制研究[D]. 杭州:浙江大学,2015.
- [30] Mathews S, Feng D, Maricic, et al. Invariant natural killer T cells contribute to chronic-plus-binge ethanol-mediated liver injury by promoting hepatic neutrophil infiltration[J]. *Cell Mol Immunol*,2016,13(2):206-16.
- [31] Qin CC, Liu YN, Hu Y, et al. Macrophage inflammatory protein-2 as mediator of inflammation in acute liver injury[J]. *World J Gastroenterol*,2017,23(17):3043-3052.

收稿日期: 2019-06-09

高美欣, 何玲玲, 叶小慧, 等. *Glt25d1*基因敲低对刀豆蛋白A诱导的自身免疫性肝炎小鼠巨噬细胞和中性粒细胞的影响[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2020,12(1):36-43.