

Colgalt2敲除对刀豆蛋白A诱导的自身免疫性肝炎小鼠CD4 T细胞记忆和归巢的影响

刘燃¹, 魏红山², 叶小慧³, 刘维¹, 张维燕¹ [1.清华大学第一附属医院(北京华信医院) 感染科, 北京 100016; 2.首都医科大学附属北京地坛医院 消化科, 北京 100015; 3.清华大学第一附属医院(北京华信医院) 肾内科, 北京 100016]

摘要: 目的 初步探索糖基转移酶Colgalt2基因敲除对刀豆蛋白A (concanavalin A, Con A) 诱导的自身免疫性肝炎 (autoimmune hepatitis, AIH) 小鼠模型中CD4 T细胞记忆和归巢的影响。方法 随机抽取无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级6~8周的基因敲除 (Colgalt2^{-/-}) 小鼠与野生型Colgalt2^{+/+}小鼠各18只, 建立Con A诱导的AIH小鼠模型。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, 采用HE染色观察肝组织病理变化, 采用体外磁珠分选脾脏CD4⁺T细胞, 采用流式细胞术检测小鼠外周血、脾脏及分选后CD4⁺T细胞亚型比例。结果 与Colgalt2^{+/+}小鼠相比, Con A刺激12 h Colgalt2^{-/-}小鼠血清ALT [(15610 ± 2869) U/L vs (5009 ± 1042) U/L; $t = 3.474$, $P = 0.006$] 和AST [(16080 ± 2631) U/L vs (4453 ± 893.7) U/L; $t = 4.185$, $P = 0.002$] 水平均显著升高。Con A刺激12 h Colgalt2^{-/-}小鼠肝损伤分级显著高于Colgalt2^{+/+}小鼠 [(3.17 ± 0.17) 级 vs (2.17 ± 0.17) 级], 差异有统计学意义 ($t = 4.243$, $P = 0.002$)。Con A刺激12 h Colgalt2^{-/-}小鼠脾脏CD4⁺CD28⁻ [(97.80 ± 0.46) % vs (88.85 ± 3.35) %; $t = 2.650$, $P = 0.024$] 和CD4⁺CD62L⁻ [(97.98 ± 0.46) % vs (88.68 ± 3.38) %; $t = 2.669$, $P = 0.023$] 均显著高于Colgalt2^{+/+}小鼠。体外脾脏实验表明, Con A刺激12 h Colgalt2^{-/-}小鼠CD4⁺CD28⁻ [(94.88 ± 1.20) % vs (82.97 ± 2.70) %; $t = 4.295$, $P = 0.002$] 和CD4⁺CD62L⁻ [(99.95 ± 0.02) % vs (99.24 ± 0.26) %; $t = 2.731$, $P = 0.021$] 均显著高于Colgalt2^{+/+}小鼠。结论 Colgalt2基因敲除使脾脏CD4⁺CD28⁻和CD4⁺CD62L⁻细胞亚群表达上调从而加重Con A诱导的AIH。

关键词: 自身免疫性肝炎; Colgalt2; 刀豆蛋白A; CD4⁺T细胞

Effects of Colgalt2 gene knockout on homing and memory of CD4 T cells in concanavalin A-induced autoimmune hepatitis mice

Liu Ran¹, Wei Hongshan², Ye Xiaohui³, Liu wei¹, Zhang Weiyan¹ [1.Department of Infectious Disease, the First Hospital of Tsinghua University (Beijing Huaxin Hospital), Beijing 100016, China; 2.Department of Gastroenterology, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 3.Department of Nephrology, the First Hospital of Tsinghua University (Beijing Huaxin Hospital), Beijing 100016, China]

Abstract: Objective To investigate the effects of glycosyltransferase Colgalt2 gene knockout on homing and memory of CD4 T cells in concanavalin A (Con A) induced autoimmune

hepatitis (AIH) mice. **Methods** The specific pathogen free (SPF) *Colgalt2*^{-/-} mice (18 cases) and *Colgalt2*^{+/+} (wild type) mice (18 cases) were randomly selected and the mice were 6~8 weeks. The model of AIH induced by Con A was established. Serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels of mice were detected and histopathological change of liver tissue was observed by HE staining. The magnetic bead sorting technique was used to isolate the CD4⁺ T cells of spleen. CD4⁺ subsets in peripheral blood mononuclear cells and splenocytes were analyzed by flow cytometry. **Results** Compared with those of *Colgalt2*^{+/+} mice, the ALT [(15610 ± 2869) U/L vs (5009 ± 1042) U/L; $t = 3.474$, $P = 0.006$] and AST [(16080 ± 2631) U/L vs (4453 ± 893.7) U/L; $t = 4.185$, $P = 0.002$] levels of *Colgalt2*^{-/-} mice increased significantly after Con A administrated for 12 h. The liver injury grade of *Colgalt2*^{-/-} mice was higher than that of *Colgalt2*^{+/+} mice after Con A administrated for 12 h [(3.17 ± 0.17) grade vs (2.17 ± 0.17) grade], the difference was statistically significant ($t = 4.243$, $P = 0.002$). Compared with those of *Colgalt2*^{+/+} mice, the percentage of CD4⁺CD28⁻ [(97.80 ± 0.46)% vs (88.85 ± 3.35)%; $t = 2.650$, $P = 0.024$] and CD4⁺CD62L⁻ [(97.98 ± 0.46)% vs (88.68 ± 3.38)%; $t = 2.669$, $P = 0.023$] increased significantly in *Colgalt2*^{-/-} mice after Con A administrated for 12 h in spleen. *In vitro*, compared with those of *Colgalt2*^{+/+} mice, the percentage of CD4⁺CD28⁻ [(94.88 ± 1.20)% vs (82.97 ± 2.70)%; $t = 4.295$, $P = 0.002$] and CD4⁺CD62L⁻ [(99.95 ± 0.02)% vs (99.24 ± 0.26)%; $t = 2.731$, $P = 0.021$] also increased significantly in *Colgalt2*^{-/-} mice after Con A administrated for 12 h in spleen. **Conclusions** *Colgalt2* gene knockout aggravated Con A induced AIH in mice by increasing the expression of CD4⁺CD28⁻ and CD4⁺CD62L⁻ T subsets in spleen.

Key words: Autoimmune hepatitis; *Colgalt2*; Concanavalin A; CD4⁺ T cell

自身免疫性肝炎 (autoimmune hepatitis, AIH) 是一种免疫介导的炎症性疾病, 组织学特征是以淋巴细胞和浆细胞浸润为主的界面性肝炎^[1]。AIH病因尚不明确, 后期可出现肝硬化、腹水、肝细胞癌及肝衰竭等并发症, 甚至引起死亡^[2]。目前认为, T细胞尤其是CD4⁺T细胞介导的免疫应答和免疫失衡在AIH中发挥重要作用^[3]。AIH可诱导肝内CD4⁺T细胞浸润, 导致肝组织损伤^[4]。*Colgalt1* (GLT25D1) 和*Colgalt2* (GLT25D2) 半乳糖基转移酶基因可编码Hyl特异性半乳糖基转移酶, 在内质网中启动胶原糖基化^[5,6]。*Colgalt2*作为*Colgalt1*的同源基因, 可促进胶原蛋白成熟。而胶原蛋白是各种组织和器官细胞外基质的重要组成部分, 主要存在于结缔组织中, 调节细胞附着、迁移、增殖和分化等多种生物学过程^[7]。*Colgalt2*通过编码一种启动胶原翻译后糖基化的酶, 成为骨关节炎的易感靶点^[8], 其在卵巢癌中也过度表达^[9]。前期研究表明*Colgalt2*基因在肝组织表达, 其不仅影响肝纤维化小鼠模型中肝细胞的再生及凋亡^[10], 同时还影响肝脏Kupffer细胞的形态及亚型^[11]。最近研究证实, *Colgalt2*介导的糖基化也可调节肝损伤模型中CD4⁺T细胞亚群的活化和增殖^[12]。但*Colgalt2*对CD4⁺T淋巴细胞的记忆和归巢是否也存

在影响尚未明确。因此, 本文就*Colgalt2*基因敲除对Con A诱导的AIH小鼠CD4⁺T淋巴细胞记忆和归巢的影响进行初步研究。

1 资料与方法

1.1 实验动物 6~8周龄雄性小鼠, 野生型 (*Colgalt2*^{+/+}) C57BL/6J小鼠购自中国医学科学院动物研究所; *Colgalt2*^{-/-}小鼠饲养于北京大学医学部实验动物中心, 动物许可证号SCXK (京) 2011-0012。所有的动物都饲养于无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级动物室。

1.2 实验试剂 Con A粉末购自美国Sigma公司。流式荧光抗体CD4 APC、CD8 Percp-cy5.5、CD28 FITC、CD62L PE购自美国eBioscience公司。Luminex试剂盒购自美国BD公司。

1.3 实验方法

1.3.1 建立小鼠AIH模型 随机抽取基因敲除*Colgalt2*^{-/-}小鼠与野生型*Colgalt2*^{+/+}小鼠各18只。将Con A储液加无菌1 × PBS磷酸盐缓冲液稀释为5 mg/ml的Con A工作液, 以10 mg/kg剂量采用内眦静脉注射, 建立小鼠Con A诱导的AIH模型。模型建立无Con A刺激 (对照组, 0 h) 及Con A刺激12 h和24 h组, 每组各6只, 分别于0 h、12 h、24 h处死小鼠, 取小鼠血

液、肝脏和脾脏组织。

1.3.2 肝脏生物化学指标的检测 在Con A诱导AIH模型建立过程中,对0 h、12 h、24 h每组Colgalt2^{+/+}和Colgalt2^{-/-}小鼠各6只均进行眼球摘除取血。离心后利用Olympus AU 2700全自动生化分析仪酶法测定Colgalt2^{+/+}和Colgalt2^{-/-}小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,由首都医科大学附属北京地坛医院检验科协助,严格按照标准操作规程完成。

1.3.3 肝组织HE染色 肝组织于中性甲醛固定液中固定;经脱水、固定进行常规石蜡包埋,连续切片5 μm,裱片并烤干;用二甲苯脱蜡并经过水化;苏木素染色,酒精分化,氨水返蓝,清水冲洗,1%伊红染色;再经过分化、脱水至透明;封片。在显微镜下观察各时间点切片肝脏病理情况。根据修定Scheuer方案行肝损伤分级量化评分^[13]。

1.3.4 体外磁珠分选CD4⁺T淋巴细胞 取Colgalt2^{-/-}与Colgalt2^{+/+}小鼠脾脏研磨、清洗、过滤后,获得CD4⁺T细胞10⁸个,加入900 μl 1 × PBEB 和100 μl CD4 MicroBeads(按每10⁷细胞加入90 μl 1 × PBEB 和10 μl CD4 MicroBeads)混匀,避光孵育15 min,定容。两次过柱分选CD4⁺T淋巴细胞,用于细胞表型分析。

1.3.5 细胞表型分析 将外周血、脾脏组织制备成单细胞悬液和免疫磁珠分选的CD4⁺T细胞,按每管300 μl分管;每管染1 μl CD4 APC抗体、1 μl CD8 Percp-cy5.5抗体、1 μl CD28 FITC抗体、1 μl CD62L PE抗体,4 °C避光染色15 min;PBS清洗后用流式

细胞分析仪(BD公司)进行检测。采用Flowjo 7.6软件分析数据。

1.4 统计学处理 采用SPSS 26.0软件进行统计分析,ALT、AST、肝损伤量化评分及T细胞亚群百分比均为正态分布的计量资料,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用方差分析,两两比较采用LSD- t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠肝功能及肝组织病理 与Colgalt2^{+/+}小鼠相比,Con A刺激12 h Colgalt2^{-/-}小鼠血清ALT和AST水平均显著升高(P 均 < 0.05)。HE染色表明无Con A刺激(对照组,0 h)组Colgalt2^{+/+}与Colgalt2^{-/-}小鼠肝组织未见明显损伤。与Colgalt2^{+/+}小鼠相比,Con A刺激12 h和24 h Colgalt2^{-/-}小鼠肝小叶损伤面积更广泛,肝细胞损伤更明显,肝板塌陷更严重,汇管区炎症细胞浸润更显著。Con A刺激12 h Colgalt2^{-/-}小鼠肝损伤分级显著高于Colgalt2^{+/+}小鼠($t = 4.243, P = 0.002$)。见表1、图1、表2。

2.2 Colgalt2^{+/+}与Colgalt2^{-/-}小鼠外周血、脾脏CD4⁺细胞表型 Colgalt2^{+/+}与Colgalt2^{-/-}小鼠外周血CD4⁺淋巴细胞亚型CD28⁺、CD62L⁺差异均无统计学意义(P 均 > 0.05),见表3。与Colgalt2^{+/+}小鼠相比,无Con A刺激组(对照组,0 h)Colgalt2^{-/-}小鼠脾脏CD4⁺CD28⁺显著高于Colgalt2^{+/+}小鼠,而CD4⁺CD28⁻和CD4⁺CD62L⁻显著低于Colgalt2^{+/+}小鼠(P 均 < 0.05)。Con A刺激12 h,Colgalt2^{-/-}小鼠CD4⁺CD28⁺和CD4⁺CD62L⁺显著低于Colgalt2^{+/+}小鼠,而CD4⁺CD28⁻和CD4⁺CD62L⁻显著高于Colgalt2^{+/+}小鼠

表1 无Con A组、Con A 12 h组和Con A 24 h组Colgalt2^{+/+}与Colgalt2^{-/-}小鼠血清ALT和AST水平($\bar{x} \pm s$, U/L)

| 组别 | ALT | | | | AST | | | |
|-------------|-------------------------|-------------------------|-------|-------|-------------------------|-------------------------|-------|-------|
| | Colgalt2 ^{+/+} | Colgalt2 ^{-/-} | t 值 | P 值 | Colgalt2 ^{+/+} | Colgalt2 ^{-/-} | t 值 | P 值 |
| 无Con A组 | 46.17 ± 4.41 | 74.83 ± 16.05 | 1.722 | 0.116 | 164.7 ± 14.7 | 216.5 ± 12.97 | 2.644 | 0.025 |
| Con A 12 h组 | 5009 ± 1042 | 15610 ± 2869 | 3.474 | 0.006 | 4453 ± 893.7 | 16080 ± 2631 | 4.185 | 0.002 |
| Con A 24 h组 | 8362 ± 1545 | 7527 ± 1702 | 0.363 | 0.724 | 6492 ± 1213 | 8154 ± 1719 | 0.790 | 0.448 |
| F 值 | 81.667 | 101.667 | - | - | 3.666 | 21.606 | - | - |
| P 值 | < 0.001 | < 0.001 | - | - | 0.020 | < 0.001 | - | - |
| t_1 值 | 4.753 | 5.423 | - | - | 4.820 | 6.040 | - | - |
| P_1 值 | 0.030 | 0.017 | - | - | 0.029 | 0.011 | - | - |
| t_2 值 | 5.375 | 4.374 | - | - | 5.239 | 4.634 | - | - |
| P_2 值 | 0.018 | 0.042 | - | - | 0.020 | 0.034 | - | - |
| t_3 值 | 2.000 | 2.682 | - | - | 1.447 | 3.063 | - | - |
| P_3 值 | 0.475 | 0.235 | - | - | 0.753 | 0.157 | - | - |

注: t_1 、 P_1 为无Con A组和Con A 12 h组相比, t_2 、 P_2 为无Con A组和Con A 24 h组相比, t_3 、 P_3 为Con A 12 h组和Con A 24 h组相比;“-”为无相关数据。

($P < 0.05$)。Con A刺激24 h, *Colgalt2*^{-/-}小鼠CD4⁺CD62L⁺显著低于*Colgalt2*^{+/+}小鼠 ($t = 2.332$, $P = 0.042$)。见表4。

2.3 *Colgalt2*^{+/+}与*Colgalt2*^{-/-}小鼠体外脾脏CD4T细胞表型 体外脾脏实验表明无Con A 刺激组 (对照组, 0 h) *Colgalt2*^{-/-}小鼠CD4⁺CD62L⁺显著

表2 无Con A组、Con A 12 h组和Con A 24 h组*Colgalt2*^{+/+}与*Colgalt2*^{-/-}小鼠肝损伤 Scheuer 分级 ($\bar{x} \pm s$, 级)

| 组别 | <i>Colgalt2</i> ^{+/+} | <i>Colgalt2</i> ^{-/-} | <i>t</i> 值 | <i>P</i> 值 |
|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------|------------|
| 无Con A组 | 0 | 0 | - | - |
| Con A 12 h组 | 2.17 ± 0.17 | 3.17 ± 0.17 | 4.243 | 0.002 |
| Con A 24 h组 | 3.68 ± 0.21 | 3.83 ± 0.17 | 0.620 | 0.549 |
| <i>F</i> 值 | 81.660 | 101.670 | - | - |
| <i>P</i> 值 | < 0.001 | < 0.001 | - | - |
| <i>t</i> ₁ 值 | 13.000 | 19.000 | - | - |
| <i>P</i> ₁ 值 | 0.0003 | < 0.001 | - | - |
| <i>t</i> ₂ 值 | 17.390 | 23.000 | - | - |
| <i>P</i> ₂ 值 | < 0.001 | < 0.001 | - | - |
| <i>t</i> ₃ 值 | 4.390 | 3.162 | - | - |
| <i>P</i> ₃ 值 | 0.042 | 0.141 | - | - |

注: *t*₁、*P*₁为无Con A组和Con A 12 h组相比, *t*₂、*P*₂为无Con A组和Con A 24 h组相比, *t*₃、*P*₃为Con A 12 h组和Con A 24 h组相比;“-”为无相关数据。

表3 无Con A组、Con A 12 h组和Con A 24 h组*Colgalt2*^{+/+}与*Colgalt2*^{-/-}小鼠外周血CD4⁺淋巴细胞亚型百分比 ($\bar{x} \pm s$, %)

| 组别 | CD4 ⁺ CD28 ⁺ | | | | CD4 ⁺ CD28 ⁻ | | | |
|-------------------------|------------------------------------|--------------------------------|------------|------------|------------------------------------|--------------------------------|------------|------------|
| | <i>Colgalt2</i> ^{+/+} | <i>Colgalt2</i> ^{-/-} | <i>t</i> 值 | <i>P</i> 值 | <i>Colgalt2</i> ^{+/+} | <i>Colgalt2</i> ^{-/-} | <i>t</i> 值 | <i>P</i> 值 |
| 无Con A组 | 3.47 ± 1.04 | 4.78 ± 1.34 | 0.771 | 0.459 | 96.53 ± 1.05 | 95.23 ± 1.34 | 0.764 | 0.462 |
| Con A 12 h组 | 13.05 ± 1.96 | 9.39 ± 1.73 | 1.399 | 0.192 | 86.94 ± 1.95 | 90.60 ± 1.73 | 1.403 | 0.191 |
| Con A 24 h组 | 3.18 ± 0.47 | 5.02 ± 0.80 | 1.995 | 0.074 | 96.84 ± 0.47 | 94.99 ± 0.80 | 2.000 | 0.073 |
| <i>F</i> 值 | 20.055 | 8.997 | - | - | 4.448 | 6.284 | - | - |
| <i>P</i> 值 | < 0.001 | < 0.001 | - | - | 0.009 | 0.001 | - | - |
| <i>t</i> ₁ 值 | 8.151 | 3.927 | - | - | 0.634 | 0.558 | - | - |
| <i>P</i> ₁ 值 | < 0.001 | 0.008 | - | - | 0.990 | 0.995 | - | - |
| <i>t</i> ₂ 值 | 0.246 | 0.212 | - | - | 1.904 | 3.630 | - | - |
| <i>P</i> ₂ 值 | > 0.999 | > 0.999 | - | - | 0.378 | 0.015 | - | - |
| <i>t</i> ₃ 值 | 8.397 | 0.715 | - | - | 2.538 | 3.072 | - | - |
| <i>P</i> ₃ 值 | < 0.001 | 0.021 | - | - | 0.128 | 0.046 | - | - |

| 组别 | CD4 ⁺ CD62L ⁺ | | | | CD4 ⁺ CD62L ⁻ | | | |
|-------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|------------|------------|-------------------------------------|--------------------------------|------------|------------|
| | <i>Colgalt2</i> ^{+/+} | <i>Colgalt2</i> ^{-/-} | <i>t</i> 值 | <i>P</i> 值 | <i>Colgalt2</i> ^{+/+} | <i>Colgalt2</i> ^{-/-} | <i>t</i> 值 | <i>P</i> 值 |
| 无Con A组 | 3.63 ± 1.40 | 1.39 ± 0.36 | 1.551 | 0.152 | 99.34 ± 1.41 | 98.62 ± 0.35 | 1.549 | 0.152 |
| Con A 12 h组 | 2.70 ± 0.40 | 2.21 ± 0.61 | 0.664 | 0.522 | 97.30 ± 0.39 | 97.79 ± 0.62 | 0.668 | 0.519 |
| Con A 24 h组 | 6.44 ± 1.63 | 6.75 ± 2.05 | 0.117 | 0.910 | 93.57 ± 1.63 | 93.262 ± 2.06 | 0.119 | 0.908 |
| <i>F</i> 值 | 0.780 | 0.987 | - | - | 0.069 | 1.600 | - | - |
| <i>P</i> 值 | 0.512 | 0.408 | - | - | 0.976 | 0.204 | - | - |
| <i>t</i> ₁ 值 | 1.116 | 0.538 | - | - | 0.570 | 1.003 | - | - |
| <i>P</i> ₁ 值 | 0.863 | 0.996 | - | - | 0.995 | 0.933 | - | - |
| <i>t</i> ₂ 值 | 0.036 | 0.028 | - | - | 1.004 | 2.282 | - | - |
| <i>P</i> ₂ 值 | 0.995 | > 0.999 | - | - | 0.932 | 0.359 | - | - |
| <i>t</i> ₃ 值 | 1.152 | 0.560 | - | - | 2.351 | 2.151 | - | - |
| <i>P</i> ₃ 值 | 0.846 | 0.997 | - | - | 0.334 | 0.410 | - | - |

注: *t*₁、*P*₁为无Con A组和Con A 12 h组相比, *t*₂、*P*₂为无Con A组和Con A 24 h组相比, *t*₃、*P*₃为Con A 12 h组和Con A 24 h组相比;“-”为无相关数据。

低于 *Colgalt2*^{+/+} 小鼠, 而 CD4⁺CD62L⁻ 显著高于 *Colgalt2*^{+/+} 小鼠 (P 均 < 0.05)。Con A 刺激 12 h 组和 24 h 组 *Colgalt2*^{-/-} 小鼠 CD4⁺CD28⁺、CD4⁺CD62L⁺ 均显著低于 *Colgalt2*^{+/+} 小鼠, 而 CD4⁺CD28⁻ 和 CD4⁺CD62L⁻ 均显著高于 *Colgalt2*^{+/+} 小鼠 (P 均 < 0.05)。见表 5。

表 4 无 Con A 组、Con A 12 h 组和 Con A 24 h 组 *Colgalt2*^{+/+} 与 *Colgalt2*^{-/-} 小鼠脾脏 CD4⁺ 淋巴细胞亚型百分比 ($\bar{x} \pm s$, %)

| 组别 | CD4 ⁺ CD28 ⁺ | | | | CD4 ⁺ CD28 ⁻ | | | |
|--------------|------------------------------------|--------------------------------|-------|-------|------------------------------------|--------------------------------|-------|-------|
| | <i>Colgalt2</i> ^{+/+} | <i>Colgalt2</i> ^{-/-} | t 值 | P 值 | <i>Colgalt2</i> ^{+/+} | <i>Colgalt2</i> ^{-/-} | t 值 | P 值 |
| 无 Con A 组 | 0.48 \pm 0.10 | 1.45 \pm 0.40 | 2.381 | 0.039 | 99.51 \pm 0.10 | 98.54 \pm 0.39 | 2.378 | 0.039 |
| Con A 12 h 组 | 11.16 \pm 3.35 | 2.21 \pm 0.45 | 2.649 | 0.024 | 88.85 \pm 3.35 | 97.80 \pm 0.46 | 2.650 | 0.024 |
| Con A 24 h 组 | 0.67 \pm 0.13 | 1.23 \pm 0.31 | 1.660 | 0.128 | 99.34 \pm 0.13 | 99.78 \pm 0.32 | 1.594 | 0.141 |
| F 值 | 19.624 | 0.297 | - | - | 19.611 | 0.299 | - | - |
| P 值 | < 0.001 | 0.828 | - | - | < 0.001 | 0.826 | - | - |
| t_1 值 | 7.064 | 0.498 | - | - | 7.076 | 0.494 | - | - |
| P_1 值 | < 0.001 | 0.997 | - | - | < 0.001 | 0.997 | - | - |
| t_2 值 | 0.130 | 0.164 | - | - | 0.114 | 0.157 | - | - |
| P_2 值 | > 0.999 | 0.999 | - | - | > 0.999 | > 0.999 | - | - |
| t_3 值 | 6.933 | 0.645 | - | - | 6.962 | 0.651 | - | - |
| P_3 值 | < 0.001 | 0.989 | - | - | < 0.001 | 0.989 | - | - |

| 组别 | CD4 ⁺ CD62L ⁺ | | | | CD4 ⁺ CD62L ⁻ | | | |
|--------------|-------------------------------------|--------------------------------|-------|-------|-------------------------------------|--------------------------------|-------|-------|
| | <i>Colgalt2</i> ^{+/+} | <i>Colgalt2</i> ^{-/-} | t 值 | P 值 | <i>Colgalt2</i> ^{+/+} | <i>Colgalt2</i> ^{-/-} | t 值 | P 值 |
| 无 Con A 组 | 0.14 \pm 0.06 | 0.14 \pm 0.06 | 0.069 | 0.947 | 99.40 \pm 0.07 | 98.43 \pm 0.42 | 2.267 | 0.047 |
| Con A 12 h 组 | 0.32 \pm 0.07 | 0.10 \pm 0.03 | 2.279 | 0.020 | 88.68 \pm 3.38 | 97.98 \pm 0.46 | 2.669 | 0.023 |
| Con A 24 h 组 | 0.22 \pm 0.06 | 0.08 \pm 0.02 | 2.332 | 0.042 | 99.23 \pm 0.15 | 98.72 \pm 0.33 | 1.411 | 0.189 |
| F 值 | 8.291 | 1.512 | - | - | 19.557 | 0.301 | - | - |
| P 值 | < 0.001 | 0.226 | - | - | < 0.001 | 0.825 | - | - |
| t_1 值 | 2.499 | 0.650 | - | - | 7.049 | 0.428 | - | - |
| P_1 值 | 0.139 | 0.989 | - | - | < 0.001 | 0.998 | - | - |
| t_2 值 | 1.155 | 0.849 | - | - | 0.110 | 0.186 | - | - |
| P_2 值 | 0.844 | 0.958 | - | - | > 0.999 | > 0.999 | - | - |
| t_3 值 | 1.344 | 0.198 | - | - | 6.939 | 0.414 | - | - |
| P_3 值 | 0.736 | > 0.999 | - | - | < 0.001 | 0.992 | - | - |

注: t_1 、 P_1 为无 Con A 组和 Con A 12 h 组相比, t_2 、 P_2 为无 Con A 组和 Con A 24 h 组相比, t_3 、 P_3 为 Con A 12 h 组和 Con A 24 h 组相比;“-”为无相关数据。

表 5 无 Con A 组、Con A 12 h 组和 Con A 24 h 组 *Colgalt2*^{+/+} 与 *Colgalt2*^{-/-} 小鼠体外脾脏 CD4⁺ 细胞亚群百分比 ($\bar{x} \pm s$, %)

| 组别 | CD4 ⁺ CD28 ⁺ | | | | CD4 ⁺ CD28 ⁻ | | | |
|-------------|------------------------------------|--------------------------------|-------|-----------|------------------------------------|--------------------------------|-------|-----------|
| | <i>Colgalt2</i> ^{+/+} | <i>Colgalt2</i> ^{-/-} | t 值 | P 值 | <i>Colgalt2</i> ^{+/+} | <i>Colgalt2</i> ^{-/-} | t 值 | P 值 |
| 无 Con A 组 | 6.62 \pm 1.52 | 5.12 \pm 1.38 | 0.731 | 0.481 | 93.36 \pm 1.52 | 94.48 \pm 1.38 | 0.741 | 0.476 |
| Con A 12h 组 | 17.03 \pm 2.71 | 5.13 \pm 1.19 | 4.278 | 0.002 | 82.97 \pm 2.70 | 94.88 \pm 1.20 | 4.295 | 0.002 |
| Con A 24h 组 | 52.62 \pm 2.07 | 12.87 \pm 0.70 | 18.23 | < 0.001 | 47.36 \pm 2.06 | 87.10 \pm 0.70 | 18.24 | < 0.001 |
| F 值 | 200.701 | 5.723 | - | - | 201.388 | 5.801 | - | - |
| P 值 | < 0.001 | 0.002 | - | - | < 0.001 | 0.002 | - | - |
| t_1 值 | 7.064 | 0.498 | - | - | 4.882 | 0.001 | - | - |
| P_1 值 | 0.0002 | > 0.999 | - | - | 0.0002 | > 0.999 | - | - |
| t_2 值 | 0.130 | 0.146 | - | - | 22.03 | 3.728 | - | - |
| P_2 值 | < 0.001 | 0.005 | - | - | < 0.001 | 0.005 | - | - |
| t_3 值 | 6.934 | 0.645 | - | - | 16.29 | 3.727 | - | - |
| P_3 值 | < 0.001 | 0.005 | - | - | < 0.001 | 0.005 | - | - |

续表 5

| 组别 | CD4 ⁺ CD62L ⁺ | | | | CD4 ⁺ CD62L ⁻ | | | |
|-------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|------------|------------|-------------------------------------|--------------------------------|------------|------------|
| | <i>Colgalt2</i> ^{+/+} | <i>Colgalt2</i> ^{-/-} | <i>t</i> 值 | <i>P</i> 值 | <i>Colgalt2</i> ^{+/+} | <i>Colgalt2</i> ^{-/-} | <i>t</i> 值 | <i>P</i> 值 |
| 无Con A组 | 0.07 ± 0.01 | 0.01 ± 0.002 | 5.873 | 0.0002 | 99.92 ± 0.01 | 99.99 ± 0.01 | 5.514 | 0.0003 |
| Con A 12h组 | 0.53 ± 0.17 | 0.06 ± 0.01 | 2.947 | 0.016 | 99.24 ± 0.26 | 99.95 ± 0.02 | 2.731 | 0.021 |
| Con A 24h组 | 11.06 ± 0.58 | 1.79 ± 0.10 | 15.62 | < 0.001 | 88.92 ± 0.58 | 98.17 ± 0.10 | 15.680 | < 0.001 |
| <i>F</i> 值 | 611.171 | 16.249 | - | - | 559.653 | 15.622 | - | - |
| <i>P</i> 值 | < 0.001 | < 0.001 | - | - | < 0.001 | < 0.001 | - | - |
| <i>t</i> ₁ 值 | 1.420 | 0.172 | - | - | 2.105 | 0.124 | - | - |
| <i>P</i> ₁ 值 | 0.664 | > 0.999 | - | - | 0.225 | > 0.999 | - | - |
| <i>t</i> ₂ 值 | 35.600 | 5.767 | - | - | 34.050 | 5.624 | - | - |
| <i>P</i> ₂ 值 | < 0.001 | < 0.001 | - | - | < 0.001 | < 0.001 | - | - |
| <i>t</i> ₃ 值 | 35.690 | 5.595 | - | - | 31.940 | 5.500 | - | - |
| <i>P</i> ₃ 值 | < 0.001 | < 0.001 | - | - | < 0.001 | < 0.001 | - | - |

注: *t*₁、*P*₁为无Con A组和Con A 12 h组相比, *t*₂、*P*₂为无Con A组和Con A 24 h组相比, *t*₃、*P*₃为Con A 12 h组和Con A 24 h组相比;“-”为无相关数据。

3 讨论

Con A是一种T淋巴细胞激活剂,其诱导的小鼠AIH模型与人类AIH和病毒性肝炎的病理特点及发病机制相似,是目前最好且最成熟的模拟AIH动物模型^[14,15]。Con A模型具有较大的变异性,取决于Con A工作溶液的制备、有效剂量、动物的处理及终点的选择等^[16]。本研究通过Con A诱导AIH小鼠模型,探讨*Colgalt2*基因敲除对Con A诱导AIH小鼠模型中CD4⁺T细胞亚群记忆和归巢的影响。本研究以Con A 10 mg/kg浓度注射,分别在刺激0 h、12 h和24 h处死小鼠,结果表明在Con A诱导的AIH动物模型中,与野生型小鼠相比,Con A刺激12 h *Colgalt2*^{-/-}小鼠肝损伤更重。既往研究证实,O-糖基化修饰缺失可调节T淋巴细胞的活化,促进细胞因子如肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)等释放从而加重Con A诱导的急性肝损伤^[17]。促炎因子表达与肝脏损伤程度具有一定相关性^[15]。*Colgalt2*(GLT25D2)是一种胶原糖基转移酶,存在于肝脏和脾脏中,*Colgalt2*基因缺失可加重Con A诱导的小鼠急性肝损伤^[12],本研究结果与既往研究一致。*Colgalt2*作为一个编码糖基转移酶的基因,是炎症免疫反应的关键,也可通过自噬途径引起肝损伤^[18]。近期研究表明,*Colgalt2*基因缺失也在其他类型肝脏疾病如非酒精性脂肪性肝病中发挥作用^[19]。这提示*Colgalt2*通过不同生物学过程及作用机制影响肝脏疾病,但具体机制还有待进一步探讨。

本研究体内脾脏实验中,Con A刺激12 h *Colgalt2*^{-/-}小鼠体内脾脏CD4⁺CD28⁻细胞亚群高于野

生型小鼠。这提示*Colgalt2*基因敲除使Con A诱导的AIH模型中脾脏CD4⁺CD28⁻细胞亚群表达上调。为进一步探索*Colgalt2*基因敲除对小鼠脾脏CD4⁺T淋巴细胞亚群CD28的影响是体内复杂细胞因子网络调控的结果还是对其直接作用,我们进行了体外实验。结果表明,野生型小鼠CD4⁺CD28⁻表达持续降低,*Colgalt2*^{-/-}小鼠CD4⁺CD28⁻表达呈先升高后降低趋势,且Con A刺激12 h和24 h *Colgalt2*^{-/-}小鼠CD4⁺CD28⁻表达均显著高于野生型小鼠。这提示*Colgalt2*基因敲除直接影响Con A诱导的AIH模型中脾脏CD4⁺CD28⁻细胞亚群表达上调。研究发现CD28受体可与T细胞受体连接,这为原始T细胞活化提供了一个关键的第二信号^[20]。缺乏CD28的循环T细胞扩增最初被认为是人类年龄相关免疫变化的标志,CD4⁺CD28⁻T细胞也表现出衰老T细胞的典型表型。然而,在多种慢性炎症性疾病患者中,CD4⁺CD28⁻T细胞在发病机制中发挥作用。CD4⁺CD28⁻T细胞(CD4⁺CD28^{null})作为一种独特的促炎性T细胞,扩增后可产生大量促炎细胞因子如干扰素-γ(interferon-γ, INF-γ)和TNF-α,并具有细胞毒性潜能,在许多炎症性疾病中可能导致组织损伤和疾病进展。CD4⁺CD28⁻T细胞还可表达细胞毒性分子穿孔素和颗粒酶B^[21]。几乎所有CD4⁺CD28⁻T细胞都缺乏共刺激性CD27受体,但过度表达CD27的配体CD70,在调节T细胞活化中发挥作用^[22]。此外,CD4⁺CD28⁻T细胞通过非经典的AMPK-TAB-1信号转导通路表现出p38的固有激活作用,这提示DNA损伤和糖代谢失调可能与CD4⁺CD28⁻T细胞的特征有关^[23]。已有研究表明,CD4⁺T细胞缺乏协同共

刺激因子CD28(即CD4⁺CD28⁻或CD4⁺CD28^{null}), CD4⁺CD28^{null}T细胞在终末期肾脏疾病患者中显著增加^[24]。在一些慢性炎症性疾病和自身免疫性疾病中也存在CD4⁺CD28⁻T细胞亚群,如类风湿性关节炎^[25]、系统性红斑狼疮^[26]和肾病综合征^[27]。本研究表明*Colgalt2*基因敲除小鼠脾脏CD4⁺CD28⁻细胞亚群表达上调,外周血未见明显变化,这提示脾脏CD4⁺CD28⁻T细胞也可能在AIH中发挥作用。而且CD4⁺CD28⁻T细胞在*Colgalt2*^{-/-}小鼠体内、体外中表达均上调,这提示*Colgalt2*基因敲除可能直接促进脾脏CD4⁺CD28⁻T细胞亚群表达,在Con A诱导的AIH中可能发挥促炎作用,从而加重肝损伤,但具体机制尚未明确。

CD62L是淋巴细胞归巢到脾脏、淋巴结等次级淋巴器官的重要分子^[28]。通常,幼稚T细胞在细胞表面表达CD62L,在分化为记忆性T细胞时会失去CD62L表达^[29]。抗原刺激后T淋巴细胞活化增殖,新激活的效应T细胞下调CD62L,阻止再活化T细胞重新进入淋巴器官,使活化T细胞迁移到感染部位。既往研究证实,在小鼠扩张型心肌病模型中,CD4⁺CD62L⁻T细胞作为效应细胞产生INF- γ 和IL-17诱发心肌炎^[30]。本研究脾脏及体外脾脏实验均显示*Colgalt2*^{-/-}小鼠CD4⁺CD62L⁻细胞亚群高于野生型小鼠,这提示*Colgalt2*基因敲除也可能直接影响小鼠脾脏CD4⁺T淋巴细胞亚群CD62L的表达。*Colgalt2*基因敲除可降低脾脏初始CD4⁺T(CD4⁺CD62L⁺)细胞表达,减弱其黏附、归巢能力,增加效应或记忆CD4⁺(CD4⁺CD62L⁻)T细胞的表达。但本研究未对肝脏及淋巴结CD4⁺T细胞亚群及中央记忆或效应记忆CD4⁺T细胞进行分析,且*Colgalt2*通过哪些细胞因子或信号转导通路影响AIH尚需进一步研究。

综上,*Colgalt2*基因敲除使脾脏CD4⁺CD28⁻和CD4⁺CD62L⁻细胞亚群表达上调从而加重Con A诱导的AIH。*Colgalt2*介导的糖基化影响AIH中CD4⁺T淋巴细胞亚群的记忆和归巢,这将为AIH提供新的治疗靶点。

参考文献

- 王睿,王绮雯,马雄. 自身免疫性肝炎的标准治疗和潜在治疗靶点[J]. 临床肝胆病杂志,2020,36(4):737-742.
- TANAKA A. Autoimmune hepatitis: 2019 Update[J]. Gut Liver,2020,14(4):430-438.
- CARDON A, CONCHON S, RENAND A. Mechanisms of autoimmune hepatitis[J]. Curr Opin Gastroenterol,2021,37(2):79-85.
- ELSAED W M. Amygdalin (vitamin B₁₇) pretreatment attenuates experimentally induced acute autoimmune hepatitis through reduction of CD4⁺ cell infiltration[J]. Ann Anat,2019,224:124-132.
- GUO Y, JI X, LIU J, et al. Effects of exosomes on pre-metastatic niche formation in tumors[J]. Mol Cancer,2019,18(1):39.
- HENNET T. Collagen glycosylation[J]. Curr Opin Struct Biol,2019,56:131-138.
- SCHEGG B, HÜLSMEIER A J, 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.
- KEHAYOVA Y S, WATSON E, WILKINSON J M, et al. Genetic and epigenetic interplay within a *Colgalt2* enhancer associated with osteoarthritis[J]. Arthritis Rheumatol,2021,73(10):1856-1865.
- GUO T, LI B, KANG Y, et al. *Colgalt2* is overexpressed in ovarian cancer and interacts with PLOD3[J]. Clin Transl Med,2021,11(3):e370.
- 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),2015,7(1):26-31.
- 王建文,张一帆,李玉凤,等. *Colgalt2*基因敲除小鼠Kupffer细胞形态及亚型差异[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版),2016,8(2):58-62.
- HAO X, LIU R, ZHANG Y, et al. Glt25d2 knockout directly increases CD25⁺CD69⁺ but decreases CD25⁺CD69⁺ subset proliferation and is involved in concanavalin-induced hepatitis[J]. Cell Physiol Biochem,2018,50(3):1186-1200.
- 中华医学会肝病学分会,中华医学会消化病学分会,中华医学会感染病学分会. 肝纤维化诊断及治疗共识(2019年)[J]. 临床肝胆病杂志,2019,35(10):2163-2172.
- WANG H, FENG X, YAN W, et al. Regulatory T cells in autoimmune hepatitis: unveiling their roles in mouse models and patients[J]. Front Immunol,2020,11:575572.
- CHRISTEN U. Animal models of autoimmune hepatitis[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis,2019,1865(5):970-981.
- 陈浩,郝健亨,徐慧超,等. 刀豆蛋白A注射不同时间后自身免疫性肝炎小鼠肝脏的形态学和功能变化[J]. 山西医药杂志,2019,48(18):2211-2213.
- HAO X, GAO M, HE L, et al. Deficiency of O-linked-glycosylation regulates activation of T cells and aggravates concanavalin A-induced liver injury[J]. Toxicology,2020,433-434:152411.
- ZHANG X, GUO L, ZHANG X, et al. GLT25D2 is critical for inflammatory immune response to promote acetaminophen-induced hepatotoxicity by autophagy pathway[J]. Front Pharmacol,2020,11:01187.
- YANG J, HE L, GAO M, et al. Collagen β (1-O) galactosyltransferase 2 deficiency contributes to lipodystrophy and aggravates NAFLD related to HMW adiponectin in mice[J]. Metabolism,2021,120:154777.
- ESENSTEN J H, HELOU Y A, CHOPRA G, et al. CD28 costimulation: from mechanism to therapy[J]. Immunity,2016,44(5):973-988.
- LEE G H, LEE W W. Unusual CD4⁺CD28⁻T cells and their pathogenic role in chronic inflammatory disorders[J]. Immune Netw,2016,16(6):322-329.
- LEE W W, YANG Z Z, LI G, et al. Unchecked CD70 expression on T cells lowers threshold for T cell activation in rheumatoid arthritis[J]. J Immunol,2007,179(4):2609-2615.
- LANNA A, HENSON S M, ESCORS D, et al. The kinase p38 activated by the metabolic regulator AMPK and scaffold TAB1 drives the senescence of human T cells[J]. Nat Immunol,2014,15(10):965-972.
- SAMPANI E, STANGOU M, DAIKIDOU D V, et al. Influence of end stage renal disease on CD28 expression and T-cell immunity[J]. Nephrology (Carlton),2021,26(2):185-196.

- [25] RIOSERAS B, MORO-GARCÍA M A, GARCÍA-TORRE A, et al. Acquisition of new migratory properties by highly differentiated CD4⁺CD28^{null} T lymphocytes in rheumatoid arthritis disease[J]. J Pers Med, 2021, 11(7):594.
- [26] KOSMACZEWSKA A, CISZAK L, STOSIO M, et al. CD4⁺CD28^{null} T cells are expanded in moderately active systemic lupus erythematosus and secrete pro-inflammatory interferon gamma, depending on the disease activity index[J]. Lupus, 2020, 29(7):705-714.
- [27] INAMDAR N, TOMER S, KALMATH S, et al. Reversal of endothelial dysfunction post-immunosuppressive therapy in adult-onset podocytopathy and primary membranous nephropathy[J]. Atherosclerosis, 2020, 295:38-44.
- [28] WIMMERS F, AARNTZEN E H, SCHREIBELT G, et al. Early predictive value of multifunctional skin-infiltrating lymphocytes in anticancer immunotherapy[J]. Oncoimmunology, 2014, 3(1):e27219.
- [29] ATHO'ILLAH M F, SAFITRI Y D, NUR'AINI F D, et al. Elicited soybean extract attenuates proinflammatory cytokines expression by modulating TLR3/TLR4 activation in high-fat, high-fructose diet mice[J]. J Ayurveda Integr Med, 2021, 12(1):43-51.
- [30] TAJIRI K, IMANAKA-YOSHIDA K, TSUJIMURA Y, et al. A new mouse model of chronic myocarditis induced by recombinant bacille calmette-Guérin expressing a T-cell epitope of cardiac myosin heavy chain- α [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(2):794.
- 收稿日期: 2021-08-26

刘燃, 魏红山, 叶小慧, 等. *Colgalt2*敲除对刀豆蛋白A诱导的自身免疫性肝炎小鼠CD4 T细胞记忆和归巢的影响[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2022, 14(1):42-49.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

声 明

为适应我国信息化建设, 扩大本刊及作者知识信息交流渠道, 本刊已被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》《美国化学文摘数据库(Chemical Abstracts Service)》《中国学术期刊网络出版总库》《中国核心期刊遴选数据库》(万方数据——数字化期刊群)及CNKI中国知网数据库收录, 其作者论文著作权使用费及相关稿酬一次性给付(已在收取发表费时折减和换算为杂志赠阅)。凡作者向本刊提交文章发表之行为即视为同意本刊上述声明。

本刊编辑部