

*Glt25d1*基因通过调节NKT细胞及Treg细胞比例加重Con A诱导的免疫性肝损伤

韦何锐¹, 高美欣², 肖凡^{3,4,5,6}, 魏红山¹ (1.首都医科大学附属北京地坛医院 消化科, 北京 100015; 2.首都医科大学附属北京同仁医院 消化科, 北京 100176; 3.首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所, 新发突发传染病研究北京市重点实验室, 北京 100015; 4.北京市感染性疾病研究中心, 北京 100015; 5.国家传染病医学中心, 首都医科大学附属北京地坛医院, 北京 100015; 6.传染病溯源预警与智能决策全国重点实验室, 北京 100015)

摘要: 目的 探讨胶原 β (1-O)半乳糖基转移酶 [collagen β (1-O) galactosyltransferase 1, COLGALT1/GLT25D1] 基因在刀豆蛋白A (concanavalin A, Con A) 诱导的自身免疫性肝损伤中的作用及可能机制。方法 6~8周雌性野生型 (wild type, WT) 小鼠和 *Glt25d1* 基因敲低杂合子 (*Glt25d1*^{+/-}) 小鼠分别分为2组 (对照组和Con A造模组), 每组中WT小鼠和 *Glt25d1*^{+/-} 小鼠均各有6只。Con A以10 mg/kg体质量的剂量经内眦静脉丛给药。于造模后12 h处死小鼠。留取血浆, 检测血清丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 和天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate transaminase, AST) 水平, 留取肝组织, 用于肝组织病理学评估和肝脏GLT25D1蛋白表达量测定。制备肝脏、脾脏及外周血单细胞悬液, 运用流式细胞术比较两种小鼠的调节性T (regulatory T, Treg) 细胞、自然杀伤T (natural killer T, NKT) 细胞比例, 并比较NKT细胞表面凋亡相关因子配体 (factor related apoptosis ligand, FasL) 表达差异。结果 对照组和Con A造模组中 *Glt25d1*^{+/-} 小鼠肝组织GLT25D1表达量均显著低于WT小鼠 (对照组: 0.342 ± 0.168 vs 1.144 ± 0.169 , $t = 5.841$, $P = 0.004$; Con A造模组: 0.264 ± 0.087 vs 0.964 ± 0.058 , $t = 11.640$, $P = 0.0003$)。经Con A诱导12 h后, *Glt25d1*^{+/-} 小鼠ALT水平显著高于WT小鼠 [(10155.2 ± 4489.5) U/L vs (3078.5 ± 111.0) U/L; $t = -3.522$, $P = 0.024$]。肝组织HE染色显示 *Glt25d1*^{+/-} 小鼠肝板结构破坏更为严重, 肝脏坏死区域更加广泛, 汇管区炎性细胞浸润更加显著。流式细胞术检测显示, Con A造模组中 *Glt25d1*^{+/-} 小鼠脾脏中Treg细胞频数较WT小鼠显著减少 [$(7.849 \pm 1.116)\%$ vs $(9.892 \pm 1.762)\%$; $t = 2.978$, $P = 0.008$], 肝脏NKT细胞频数 [$(9.244 \pm 6.898)\%$ vs $(3.376 \pm 4.794)\%$; $t = -2.253$, $P = 0.037$] 和NKT细胞FasL表达量 [$(29.62 \pm 4.960)\%$ vs $(16.43 \pm 3.964)\%$; $t = -5.027$, $P = 0.001$] 显著高于WT小鼠。结论 *Glt25d1* 基因敲低加重Con A诱导的免疫性肝损伤, 其机制可能与其降低Treg细胞频数、增加NKT细胞频数及增强NKT细胞功能有关。

关键词: *Glt25d1* 基因; 自身免疫性肝炎; 调节性T细胞; 自然杀伤T细胞

Glt25d1 gene aggravates Con A-induced immune liver injury by regulating the ratio of NKT cells and Treg cells

Wei Herui¹, Gao Meixin², Xiao Fan^{3,4,5,6}, Wei Hongshan¹ (1.Department of Gastroenterology, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 2.Department of Gastroenterology, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100176, China;

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2023.04.007

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82170541); 北京市自然科学基金项目 (7202071)

通讯作者: 魏红山 Email: drwei@ccmu.edu.cn

3. Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 4. Beijing Institute of Infectious Diseases, Beijing 100015, China; 5. National Center for Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 6. National Key Laboratory of Intelligent Tracking and Forecasting for Infectious Diseases, Beijing 100015, China)

Abstract: Objective To investigate the role of Collagen β (1-O) galactosyltransferase 1 (COLGALT1/GLT25D1) on concanavalin A (Con A) induced autoimmune liver injury and its potential mechanism. **Methods** 6~8 weeks female wild type (WT) mice and *Glt25d1* gene knockdown heterozygous (*Glt25d1*^{+/-}) mice were randomly divided into two groups (control group and Con A administration group), respectively, six WT and *Glt25d1*^{+/-} mice were included in each group, respectively. Con A was administered via the internal iliac venous plexus at a dose of 10 mg/kg body mass. Mice were sacrificed after Con A challenged for 12 h. Plasma were collected to detect the level of serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate transaminase (AST). Liver tissues were collected to assess the liver histopathology and detect the expression level of GLT25D1 protein. Liver, spleen and peripheral blood single-cell suspension were prepared to compare the percentage of regulatory T (Treg) cells and natural killer T (NKT) cells from different mice, as well as the level of factor related apoptosis ligand (FasL) expressed in NKT cell surface. **Results** In both groups, the expression level of GLT25D1 in liver of *Glt25d1*^{+/-} mice was significantly lower than that in WT mice, respectively (control group: 0.342 ± 0.168 vs 1.144 ± 0.169 , $t = 5.841$, $P = 0.004$; Con A induced group: 0.264 ± 0.087 vs 0.964 ± 0.058 , $t = 11.640$, $P = 0.0003$). After Con A challenged for 12 h, the serum ALT level of *Glt25d1*^{+/-} mice was significantly higher than that of WT mice [(10155.2 ± 4489.5) U/L vs (3078.5 ± 111.0) U/L; $t = -3.522$, $P = 0.024$]. The results of liver tissues after HE staining showed that compared with WT mice, *Glt25d1*^{+/-} mice exhibited more serious liver plate structure damage, more extensive the liver necrosis area and more significant infiltration of inflammatory cells in the portal area. The results of flow cytometry showed that compared with WT mice, the Treg cells in spleen of *Glt25d1*^{+/-} mice in Con A induced group decreased significantly [$(7.849 \pm 1.116)\%$ vs $(9.892 \pm 1.762)\%$; $t = 2.978$, $P = 0.008$], NKT cells [$(9.244 \pm 6.898)\%$ vs $(3.376 \pm 4.794)\%$; $t = -2.253$, $P = 0.037$] and the expression of FasL [$(29.62 \pm 4.960)\%$ vs $(16.43 \pm 3.964)\%$; $t = -5.027$, $P = 0.001$] in liver increased significantly. **Conclusions** *Glt25d1* gene knockdown aggravated Con A-induced immune liver injury, and its mechanism may be related to the decrease of Treg cells frequency, the increased frequency of NKT cells and the enhancement of the NKT cell function.

Key words: *Glt25d1* gene; Autoimmune hepatitis; Regulation T cells; Natural killer T cells

自身免疫性肝炎 (autoimmune hepatitis, AIH) 是一种以好发于女性、波及各个年龄阶段、肝功能异常、高 γ -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^[1]。AIH在全球发病率和患病率逐年增高, 对社会造成巨大的经济负担^[2,3]。虽然目前已制定了AIH的诊疗指南, 但由于其发病机制尚不明确, AIH的早期诊断和后续治疗仍面临极大挑战^[4]。目前普遍认为, 效应细胞与调节性细胞的平衡失常是AIH发病的关键环节^[1,5]。自然杀伤T (natural killer T, NKT) 细胞占肝脏淋巴细胞

总数的20%~35%, 是肝脏效应细胞的重要成分^[6-8]。NKT细胞通过上调凋亡相关因子配体 (factor related apoptosis ligand, FasL) 的表达, 与靶细胞表面的凋亡相关因子 (factor related apoptosis, Fas) 结合, 发挥细胞毒性作用, 诱导靶细胞凋亡, 从而加重肝脏炎症^[9]。经典的调节性T (regulatory T, Treg) 细胞 (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺细胞) 抑制免疫细胞的增殖和活化, 在抑制炎症反应、维持免疫耐受、防止自身免疫性疾病中发挥重要作用^[10-12]。因此, 研究AIH中NKT细胞和Treg细胞的发育、活化及分化是阐释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^[13,14]。胶原是细胞外基质最丰富的成分之一,其异常糖基化将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^[15,16]。胶原 β (1-O)半乳糖基转移酶1 [collagen β (1-O) galactosyltransferase 1, COLGALT1/GLT25D1] 是一种胶原糖基转移酶,前胶原 α 链在内质网中经翻译后修饰时, GLT25D1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^[17,18]。本研究旨在探讨*Glt25d1*基因缺失在刀豆蛋白A (concanavalin A, Con A) 诱导的AIH中的作用及其对淋巴细胞亚群发育和分化的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 *Glt25d1*基因敲低杂合子小鼠由南京大学模式生物所提供,基因敲低方法与既往研究相同^[19-21]。小鼠饲养于首都医科大学实验动物中心。环境温度维持在 $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$,湿度维持在 $(50 \pm 15)\%$ 。持续规律地给予12 h照明/12 h黑暗的昼夜循环。小鼠自由饮食和饮水。

1.2 实验试剂 Con A粉末购自美国Sigma公司。GAPDH一抗购自美国Cell Signaling Technology公司。GLT25D1一抗购自美国Proteintech公司。肝脏转氨酶检测试剂盒购自四川maccura生物化学公司。CD4-FITC抗体、CD25-PE抗体、Foxp3-APC抗体、NK1.1-FITC抗体、CD3-PE抗体、FasL-PerCPcy5.5抗体以及破膜液均购自美国TONBO公司。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠AIH模型的建立与干预 随机抽取6~8周雌性*Glt25d1*基因敲低(*Glt25d1*^{+/-})杂合子小鼠与同窝出生的野生型(wild type, WT)小鼠,体质量 (18 ± 2) g,每种基因型小鼠分别随机分为2组,即对照组和Con A造模组。每组中WT小鼠和*Glt25d1*^{+/-}小鼠均各6只。造模组通过内眦静脉注射给予Con A (10 mg/kg体质量),对照组给予相同剂量的生理盐水。造模12 h后取材。小鼠麻醉后摘眼球取血,留取血浆进行丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(aspartate transaminase, AST)水平检测。留取肝脏尾状叶迅速置于4%多聚甲醛,备用于苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色。留取外周血、脾脏及剩余肝脏用于后续的流式细胞术进行表型分析。

1.3.2 血浆ALT和AST水平测定 Con A造模12 h后取材,摘眼球取血,采用台式冷冻多用途离心机(MEGAFUGE 1.0R,赛默飞世尔科技有限

公司), 3000 r/min离心15 min (有效离心半径15 cm), 吸取上层血浆进行检测。检测方法严格按照试剂盒说明进行。

1.3.3 肝组织HE染色 Con A造模12 h后取材,留取肝脏尾状叶浸泡于4%的多聚甲醛中,经脱水及石蜡包埋后,切片机连续切片,厚度为4 μm 。之后用载玻片捞片,70 $^\circ\text{C}$ 烤片1~2 h后进行HE染色。于光学显微镜下观察肝板结构,观察肝小叶及汇管区炎性浸润和坏死情况。

1.3.4 流式细胞术表型分析 Con A造模12 h后取材,留取外周血、脾脏和肝脏组织并制备其单细胞悬液用于流式细胞术表型分析。肝脏间质细胞利用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,每个组织分2组。第1组用于Treg细胞染色:每管加入1 μl CD4-FITC抗体,0.5 μl CD25-PE抗体,4 $^\circ\text{C}$ 避光染色15 min; PBS清洗后加入1 ml破膜液,4 $^\circ\text{C}$ 避光40 min后清洗,随即加入1 μl Foxp3-APC抗体,染色30 min, PBS清洗后上机检测;第2组用于NKT细胞及表面FasL染色:每管加入1 μl NK1.1-FITC抗体,0.5 μl CD3-PE抗体,1 μl FasL-PerCPcy5.5抗体,4 $^\circ\text{C}$ 避光染色15 min, PBS清洗后上机检测。数据采用flowjo7.6软件分析。

1.3.5 蛋白质印迹(Western blot)实验 提取小鼠肝脏组织蛋白质样品,蛋白质上样量为60~80 μg ,应用SDS-PAGE凝胶进行电泳,通过湿转法转印至PVDF膜,5%脱脂牛奶室温孵育1 h,后孵育一抗, GAPDH一抗按照1:5000稀释, GLT25D1一抗按照1:1000稀释,4 $^\circ\text{C}$ 过夜,次日回收一抗,辣根过氧化物酶标记的二抗(稀释比为1:5000)室温孵育1 h,最后利用化学发光法进行显影。利用Image J 1.54d软件对Western blot所得图片中目的蛋白条带进行灰度值分析。

1.4 统计学处理 所有数据采用SPSS 19.0软件统计分析。ALT等符合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,AST等不符合正态分布的计量资料以 $M(p_{25}, p_{75})$ 表示,两组间比较采用Mann-Whitney U 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Con A诱导的免疫性肝损伤小鼠*Glt25d1*基因的变化 为验证基因敲低效果及观察*Glt25d1*基因在Con A诱导的免疫性肝损伤中的变化,运用Western blot技术检测野生型小鼠和*Glt25d1*基因敲低杂合子(*Glt25d1*^{+/-})小鼠肝组织中GLT25D1蛋白水平的表达。结果显示,基因敲低后,无论造模与否,

GLT25D1蛋白表达均较野生型小鼠明显降低，见图1。

2.2 各组小鼠肝损伤程度 对照组中*Glt25d1*^{+/-}小鼠与WT小鼠的血浆肝功能指标水平无显著差异，经Con A诱导12 h后，*Glt25d1*^{+/-}小鼠ALT水平显著高于WT小鼠 [(10155.2 ± 4489.5) U/L vs (3078.5 ± 111.0) U/L; $t = -3.522$, $P = 0.024$]，AST水平差异无统计学意义（中位数：7373.0 U/L vs 4226.0 U/L; $U = 0$, $P = 0.095$ ）。肝组织HE染色表明，经Con A刺激12 h后，WT小鼠和*Glt25d1*^{+/-}小鼠肝脏均有不同程度损伤，*Glt25d1*^{+/-}小鼠肝脏损伤更显著，具体表现为肝板结构破坏更为明显，肝小叶内坏死区域更为广泛，汇管区炎症浸润更为显著（图2）。

2.3 小鼠各组织中Treg细胞的频数差异 对照组中WT小鼠与*Glt25d1*^{+/-}小鼠外周血、脾脏、肝脏中Treg细胞频数差异无统计学意义（ P 均 > 0.05 ）。Con A造模组中*Glt25d1*^{+/-}小鼠脾脏中Treg细胞频数较WT小鼠显著减少（ $t = 2.978$, $P = 0.008$ ），外周血和肝脏中差异无统计学意义（ P 均 < 0.05 ），见表2。

2.4 小鼠各组织中NKT细胞频数及其表面FasL表达差异 对照组中*Glt25d1*^{+/-}小鼠脾脏和肝脏中NKT细胞频数显著低于WT小鼠（ P 均 < 0.05 ）。Con A造模组中，*Glt25d1*^{+/-}小鼠肝脏NKT细胞频数显著高于WT小鼠（ $t = -2.253$, $P = 0.037$ ），外周血和脾脏中NKT细胞频数差异无统计学意义（ P 均 $>$

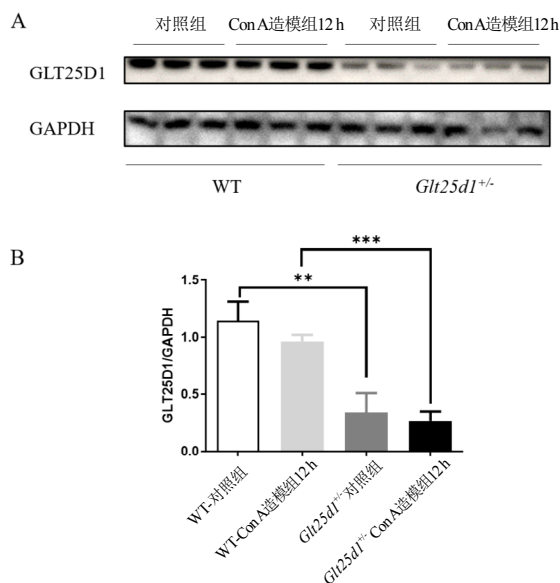


图1 对照组和造模组 WT 小鼠和 *Glt25d1*^{+/-} 小鼠肝脏 GLT25D1 蛋白表达水平

注：A 为 Western Blot 方法检测 WT 小鼠和 *Glt25d1*^{+/-} 小鼠 Con A 造模前后肝脏 GLT25D1 蛋白的表达水平；B 为对 A 图进行灰度分析，对照组 WT 小鼠（ 1.144 ± 0.169 ）与 *Glt25d1*^{+/-} 小鼠（ 0.342 ± 0.168 ）相比， $t = 5.841$, $P = 0.004$ ；Con A 造模组 WT 小鼠（ 0.964 ± 0.058 ）与 *Glt25d1*^{+/-} 小鼠（ 0.264 ± 0.087 ）相比， $t = 11.640$, $P = 0.0003$ ；** 代表 $P < 0.01$ ，*** 代表 $P < 0.001$ 。

0.05）。对照组中，与WT小鼠相比，*Glt25d1*^{+/-}小鼠肝脏NKT细胞表达FasL显著降低（ $t = 3.297$, $P = 0.013$ ）；而Con A造模组中，*Glt25d1*^{+/-}小鼠肝脏NKT细胞表达FasL较WT小鼠显著升高（ $t = -5.027$, $P = 0.001$ ）。两组*Glt25d1*^{+/-}小鼠和WT小鼠外周血和脾脏FasL表达差异无统计学意义。见表3、表4。

表1 各组小鼠血浆 ALT 和 AST 水平（U/L）

组别	例数	ALT ($\bar{x} \pm s$)	AST [$M(p_{25}, p_{75})$]
对照组	12		
WT	6	46.3 ± 31.0	164.0 (105.0, 197.0)
<i>Glt25d1</i> ^{+/-}	6	42.1 ± 15.8	131.5 (92.8, 239.8)
统计量值		$t = 0.423$	$U = 250$
P值		0.676	0.816
Con A造模组	12		
WT	6	3078.5 ± 111.0	4226.0 (4000.0, 4451.0)
<i>Glt25d1</i> ^{+/-}	6	10155.2 ± 4489.5	7373.0 (7060.0, 13340.0)
统计量值		$t = -3.522$	$U = 0$
P值		0.024	0.095

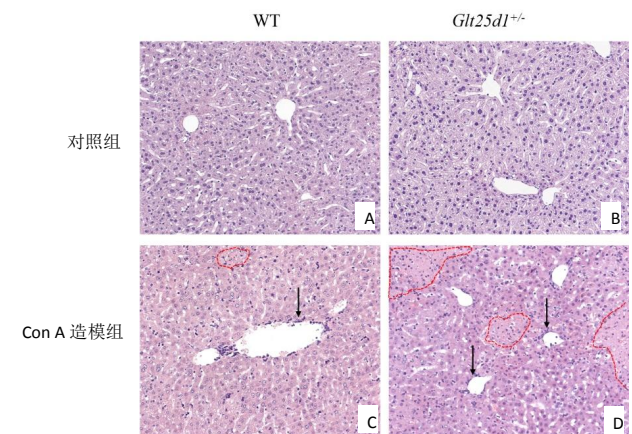


图2 WT 小鼠和 *Glt25d1*^{+/-} 小鼠在 Con A 造模前后肝组织病理（HE 染色，×200）

注：箭头代表炎症细胞浸润；红色虚线圈出部分代表性坏死灶。对照组 WT (A) 和 *Glt25d1*^{+/-} (B) 小鼠肝脏 HE 染色，肝组织结构完整；Con A 造模组 WT (C) 和 *Glt25d1*^{+/-} (D) 小鼠肝脏组织均可见炎症细胞浸润以及坏死区域，尤其以 *Glt25d1*^{+/-} 肝脏最为严重。

表2 各组小鼠外周血、脾脏、肝脏中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 细胞比例（ $\bar{x} \pm s$, %）

组别	例数	外周血	脾脏	肝脏
对照组	12			
WT	6	5.771 ± 0.788	15.77 ± 3.535	2.232 ± 0.534
<i>Glt25d1</i> ^{+/-}	6	5.662 ± 0.604	15.32 ± 0.957	3.125 ± 1.295
t值		0.233	0.240	-1.439
P值		0.821	0.817	0.229
Con A造模组	12			
WT	6	7.076 ± 3.893	9.892 ± 1.762	3.576 ± 0.751
<i>Glt25d1</i> ^{+/-}	6	6.840 ± 2.666	7.849 ± 1.116	3.966 ± 1.479
t值		0.112	2.978	-0.686
P值		0.914	0.008	0.509

表3 各组小鼠外周血、脾脏、肝脏中 CD3⁺NK1.1⁺ NKT 细胞比例 (%)

组别	例数	外周血*	脾脏 ($\bar{x} \pm s$)	肝脏 ($\bar{x} \pm s$)
对照组	12			
WT	6	0.181 ± 0.128	1.732 ± 0.412	30.220 ± 6.406
<i>Glt25d1</i> ^{+/-}	6	0.377 ± 0.163	1.198 ± 0.564	22.800 ± 3.823
<i>t</i> 值		-0.214	2.141	2.591
<i>P</i> 值		0.065	0.043	0.020
Con A造模组	12			
WT	6	0.649 (0.369, 0.897)	1.179 ± 0.376	3.376 ± 4.794
<i>Glt25d1</i> ^{+/-}	6	0.624 (0.394, 1.090)	1.286 ± 0.584	9.244 ± 6.898
统计量值		<i>U</i> = 65	<i>t</i> = -0.433	<i>t</i> = -2.253
<i>P</i> 值		0.887	0.067	0.037

注：* 该列数据符合正态分布的以 $\bar{x} \pm s$ 表示，不符合正态分布的以 *M* (*p*₂₅, *p*₇₅) 表示。

表4 各组小鼠外周血、脾脏、肝脏中 CD3⁺NK1.1⁺ NKT 细胞表面 FasL 比例 ($\bar{x} \pm s$, %)

组别	例数	外周血	脾脏	肝脏
对照组	12			
WT	6	6.138 ± 6.201	4.825 ± 2.563	4.408 ± 0.512
<i>Glt25d1</i> ^{+/-}	6	3.135 ± 4.290	3.953 ± 0.963	3.150 ± 0.604
<i>t</i> 值		0.837	0.641	3.297
<i>P</i> 值		0.427	0.540	0.013
Con A造模组	12			
WT	6	15.600 ± 9.510	9.441 ± 3.862	16.430 ± 3.964
<i>Glt25d1</i> ^{+/-}	6	25.620 ± 17.24	7.561 ± 2.157	29.620 ± 4.960
<i>t</i> 值		-1.626	1.237	-5.027
<i>P</i> 值		0.122	0.233	0.001

3 讨论

存在于细胞外基质中的胶原在免疫反应中发挥重要作用，其通过影响细胞发育、分化以及受体-配体的结合影响免疫细胞的发育、分化和功能^[15]。研究者发现两种胶原糖基转移酶在胶原的翻译后修饰过程中发挥作用，命名为GLT25D1和GLT25D2^[22,23]。研究表明，*Glt25d2*基因缺失可加重Con A诱导的AIH，其机制可能与其影响CD4⁺T细胞的活化和分化有关^[24]。本研究通过制备*Glt25d1*基因敲低小鼠模型发现*Glt25d1*基因敲低可加重Con A诱导的AIH，其机制可能与其降低Treg细胞频数、增加NKT细胞频数、增强NKT细胞的功能有关。

已有文献报道，细胞表面的糖基化修饰影响Treg细胞的发育和功能，不同免疫器官和免疫组织中，Treg细胞的糖基化修饰模式有所区别，且糖基化的不同与Treg细胞的免疫抑制功能相关^[25]。Treg细胞表面N-聚糖越多，其免疫抑制功能越强^[28]。在糖基因*Eogt*基因敲除大鼠模型中也发现糖基化水平影响Treg细胞的增殖和迁移^[19]。在AIH患者中也发现这类人群Treg细胞较正常人群数量减少，功能降低^[26]。本研究表明，在Con A诱导的免疫性肝损伤模型中，*Glt25d1*基因敲低杂合子小鼠Treg细胞增殖

受限，从而导致免疫抑制功能降低，机体炎症损伤持续存在，最终加重疾病病理进程。

近年来，越来越多的研究显示，NKT细胞在免疫性肝损伤中发挥重要的效应细胞功能^[27-29]。NKT细胞作为固有免疫的重要一员，其表面的T细胞受体（T cell receptor, TCR）识别抗原提呈细胞主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex, MHC）I b类糖蛋白CD1d呈递的糖脂类抗原。异常的糖脂类物质对NKT细胞的发育、活化和功能有一定调控作用^[30]。有研究表明，敲除*CD1d*基因限制NKT细胞的发育，将使小鼠免于Con A诱导的严重肝损伤，将正常NKT细胞回输给*CD1d*基因缺陷小鼠后，肝脏炎症明显加重^[31]。NKT细胞根据其功能不同，可分为NKT1、NKT2和NKT17细胞亚型，在自身免疫性疾病中发挥调控炎症反应、连接及调节多种免疫细胞功能的作用^[9,23,32]。既往研究发现，NKT细胞表面的FasL通过与肝细胞表面的Fas蛋白结合发挥细胞毒性作用，触发肝细胞的凋亡通路，导致肝损伤加重^[31,33,34]。有研究表明，通过抑制NKT细胞的活化、细胞毒性作用、细胞因子及趋化因子的释放，可有效缓解Con A诱导的大鼠肝功能损伤^[35]，但对各类适应性免疫细胞的频数及功能未能进一步研究。本研究表明，基线状态下，*Glt25d1*基因敲低杂合子小鼠虽然出现肝脏和脾脏中NKT细胞频数的轻度下降，但并未导致Treg细胞、巨噬细胞以及中性粒细胞等免疫细胞的比例失衡^[21]，同时也未出现肝损伤的特征。而在Con A诱导的自身免疫性肝损伤模型中，*Glt25d1*基因敲低通过增加肝脏NKT细胞的频数、增强NKT的细胞毒性作用及降低肝脏Treg细胞频数，加重肝脏炎症反应，最终导致更为严重的肝损伤。

综上，*Glt25d1*基因敲低可加重Con A诱导的自身免疫性肝损伤，这可能与敲低该基因可降低Treg细胞频数、增加NKT细胞频数和细胞毒性作用导致

的免疫稳态失衡有关。本研究从糖基化修饰的角度探讨了AIH中T细胞的发育和功能,为AIH的靶向治疗提供新的分子基础。

参考文献

- [1] TERZIROLI BERETTA-PICCOLI B, MIELI-VERGANI G, VERGANI D. Autoimmune hepatitis[J]. *Cell Mol Immunol*,2022,19(2):158-176.
- [2] TRIVEDI P J, HIRSCHFIELD G M. Recent advances in clinical practice: epidemiology of autoimmune liver diseases[J]. *Gut*,2021,70(10):1989-2003.
- [3] LAMBA M, NGU J H, STEDMAN C A M. Trends in incidence of autoimmune liver diseases and increasing incidence of autoimmune hepatitis[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*,2021,19(3):573-579.
- [4] 中华医学会肝病学分会. 自身免疫性肝炎诊断和治疗指南(2021)[J]. *临床肝胆病杂志*,2022,38(1):42-49.
- [5] RICHARDSON N, WOOTTON G E, BOZWARD A G, et al. Challenges and opportunities in achieving effective regulatory T cell therapy in autoimmune liver disease[J]. *Semin Immunopathol*, 2022,44(4):461-474.
- [6] CHEN Y, TIAN Z. Innate lymphocytes: pathogenesis and therapeutic targets of liver diseases and cancer[J]. *Cell Mol Immunol*,2021,18(1):57-72.
- [7] GÁLVEZ N M S, BOHMWALD K, PACHECO G A, et al. Type 1 natural killer T cells as key regulators of the immune response to infectious diseases[J]. *Clin Microbiol Rev*,2020,34(2):e00232-20.
- [8] MAAS-BAUER K, LOHMEYER J K, HIRAI T, et al. e. Invariant natural killer T-cell subsets have diverse graft-versus-host-disease-preventing and antitumor effects[J]. *Blood*,2021,138(10):858-870.
- [9] SEDIMBI S K, HAGGLOF T, GARIMELLA M G, et al. Combined proinflammatory cytokine and cognate activation of invariant natural killer T cells enhances anti-DNA antibody responses[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2020,117(16):9054-9063.
- [10] WING J B, TANAKA A, SAKAGUCHI S. Human FOXP3⁺ regulatory T cell heterogeneity and function in autoimmunity and cancer[J]. *Immunity*,2019,50(2):302-316.
- [11] ZHANG R, MIAO J, ZHU P. Regulatory T cell heterogeneity and therapy in autoimmune diseases[J]. *Autoimmun Rev*,2021,20(5):102715.
- [12] OHKURA N, SAKAGUCHI S. Transcriptional and epigenetic basis of Treg cell development and function: its genetic anomalies or variations in autoimmune diseases[J]. *Cell Res*,2020,30(6):465-474.
- [13] NYSTRÖM H. Extracellular matrix proteins in metastases to the liver: composition, function and potential applications[J]. *Semin Cancer Biol*,2021,71:134-142.
- [14] DU H, BARTLESON J M, BUTENKO S, et al. Tuning immunity through tissue mechanotransduction[J]. *Nat Rev Immunol*,2023,23(3):174-188.
- [15] ROWLEY A T, NAGALLA R R, WANG S W, et al. Extracellular matrix-based strategies for immunomodulatory biomaterials engineering[J]. *Adv Healthc Mater*,2019,8(8):e1801578.
- [16] LI R C, WONG M Y, DICHARA A S, et al. Collagen's enigmatic, highly conserved N-glycan has an essential proteostatic function[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2021,118(10):e2026608118.
- [17] LIEFHEBBER J M, PUNT S, SPAAN W J, et al. The human collagen beta(1-O)galactosyltransferase, GLT25D1, is a soluble endoplasmic reticulum localized protein[J]. *BMC Cell Biol*,2010,11:33.
- [18] GEISTER K A, LOPEZ-JIMENEZ A J, HOUGHTALING S, et al. Loss of function of Colgalt1 disrupts collagen post-translational modification and causes musculoskeletal defects[J]. *Dis Model Mech*,2019,12(6):dmm037176.
- [19] HAO X, LI Y, WANG J, et al. Deficient O-GlcNAc glycosylation impairs regulatory T cell differentiation and notch signaling in autoimmune hepatitis[J]. *Front Immunol*,2018,9:2089.
- [20] HE L, YE X, GAO M, et al. Down-regulation of GLT25D1 inhibited collagen secretion and involved in liver fibrogenesis[J]. *Gene*,2020,729:144233.
- [21] 高美欣, 何玲玲, 叶小慧, 等. Gl25d1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.
- [22] PERRIN-TRICAUD C, RUTSCHMANN C, HENNET 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, HULSMEEIER 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.
- [24] HAO X, LIU R, ZHANG Y, et al. Gl25d2 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.
- [25] ALVES I, VICENTE M M, DIAS A M, et al. The role of glycosylation in inflammatory diseases[J]. *Adv Exp Med Biol*,2021,1325:265-283.
- [26] LIANG M, LIWEN Z, YUN Z, et al. The imbalance between Foxp3⁺ Tregs and Th1/Th17/Th22 cells in patients with newly diagnosed autoimmune hepatitis[J]. *J Immunol Res*,2018,2018:3753081.
- [27] MARRERO I, MARICIC I, FELDSTEIN A E, et al. Complex network of NKT cell subsets controls immune homeostasis in liver and gut[J]. *Front Immunol*,2018,9:2082.
- [28] NILSSON J, HORNBERG M, SCHMIDT-CHRISTENSEN A, et al. NKT cells promote both type 1 and type 2 inflammatory responses in a mouse model of liver fibrosis[J]. *Sci Rep*,2020,10(1):21778.
- [29] BURRELLO C, STRATI F, LATTANZI G, et al. IL10 Secretion endows intestinal human iNKT cells with regulatory functions towards pathogenic T lymphocytes[J]. *J Crohns Colitis*,2022,16(9):1461-1474.
- [30] SUTTI S, ALBANO E. Adaptive immunity: an emerging player in the progression of NAFLD[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*,2020,17(2):81-92.
- [31] TAKEDA K, HAYAKAWA Y, VAN KAER L, et al. Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2000,97(10):5498-5503.
- [32] SANTODOMINGO-GARZON T, SWAIN M G. Role of NKT cells in autoimmune liver disease[J]. *Autoimmun Rev*,2011,10(12):793-800.
- [33] HOU X, HAO X, ZHENG M, et al. CD205-TLR9-IL-12 axis contributes to CpG-induced oversensitive liver injury in HBsAg transgenic mice by promoting the interaction of NKT cells with Kupffer cells[J]. *Cell Mol Immunol*,2017,14(8):675-684.
- [34] AL DULAIMI D, KLIBI J, OLIVO PIMENTEL V, et al. Critical contribution of NK group 2 member D expressed on invariant natural killer T cells in concanavalin a-induced liver hepatitis in mice[J]. *Front Immunol*,2018,9:1052.
- [35] WU Y N, ZHANG R, SONG X C, et al. C6orf120 gene knockout in rats mitigates concanavalin A-induced autoimmune hepatitis via regulating NKT cells[J]. *Cell Immunol*,2022,371:104467.

收稿日期: 2022-10-17

韦何锐, 高美欣, 肖凡, 等. *Gl25d1*基因通过调节NKT细胞及Treg细胞比例加重Con A诱导的免疫性肝损伤[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2023,15(4): 33-38.