

B7-H4 对 Con A 诱导小鼠肝损伤保护作用的实验研究*

肖欢¹, 潘卫民¹, 王超群¹, 陈鸿颜¹, 徐军发²

1. 海南医学院附属医院 核医学科(海口 570102); 2. 广东省医学分子诊断重点实验室(东莞 523808)

【摘要】 目的 探讨 B7-H4 对免疫性损伤肝脏的保护作用及其机制。方法 将 KM 小鼠分为 4 组(每组 15 只):生理盐水组(A 组)、pcDNA3.1-mB7-H4-Fc 组(B 组)、pcDNA3.1 组(C 组)和刀豆球蛋白 A(Con A)组(D 组)。B 组、C 组和 D 组动物均通过尾静脉注射 Con A 25 mg/kg 制备肝损伤模型。在 Con A 注射前 1 d, 分别给予 B 组每只小鼠注射 pcDNA3.1-mB7-H4-Fc 100 μ g 和 C 组每只小鼠注射 pcDNA3.1 100 μ g。并于注射 Con A 后 12 h、24 h 和 48 h, 各组取 5 只小鼠, 摘眼球取血, 分离血清行白介素-4(IL-4)、 γ -干扰素(IFN- γ)、谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)浓度的测定; 引颈处死小鼠后取肝脏, 用于组织病理学检测。结果 小鼠血清 IL-4、IFN- γ 、ALT 和 AST 水平在注射 Con A 后各时点, B、C 和 D 三组较 A 组均有升高($P < 0.05$), 但 B 组较 C 组和 D 组减低, B 组与 C 组间差异有统计学意义($P < 0.01$)。小鼠肝组织切片经 HE 染色, 光学显微镜下可见, B 组小鼠肝脏损伤均比 C 组和 D 组有不同程度的减轻。结论 初步证实了 B7-H4 对 Con A 诱导的肝脏免疫性损伤具有保护作用。B7-H4 可能是通过抑制 IL-4 和 IFN- γ 的产生和/或分泌而发挥对肝脏保护的作用。

【关键词】 B7-H4 Con A-诱导性肝损伤 保护作用 机制

The Protective Effect of B7-H4 on Concanavalin A Induced Hepatic Injury in Mice XIAO Huan¹, PAN Wei-min¹, WANG Chao-qun¹, CHEN Hong-yan¹, XU Jun-fa². 1. Department of Nuclear Medicine, Hainan Medical College Affiliated Hospital, Haikou 570102, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Medical Molecular Diagnostics, Dongguan 523808, China

【Abstract】 Objective To explore the protective effect and its mechanism of B7-H4 on the immuno hepatic injury. Methods The immuno hepatic injury was induced by Concanavalin A (Con A). Sixty KM mice were randomly divided into 4 groups with 15 mice in each group: Group A (saline), Group B (pcDNA3.1-mB7-H4-Fc), Group C (pcDNA3.1), Group D (Con A). One day before the injection of Con A (25 mg/kg), the mice in Group B and Group C received the injection of 100 μ g pcDNA3.1-mB7-H4-Fc and 100 μ g pcDNA3.1 respectively. The blood samples were collected at 12 h, 24 h and 48 h after Con A injection, the levels of ALT, AST, IL-4 and IFN- γ were measured. Five mice in each group were sacrificed at the above 3 time points, the liver tissue were harvested for histopathological detection. Results After Con A injection, the level of ALT in Group B, C, and D were higher than that in Group A. The level of ALT in Group B was lower than that in Group C and D. The significant difference was found between Group B and Group C. The hepatic injury of Group B was less serious than that of Group C and D. Conclusion B7-H4 may have protection on the immune injury of liver induced by Con A.

【Key words】 B7-H4 Con A-induced liver injury Protection Mechanism

B7-H4 分子自发现以来一直被公认为是 T 细胞活化一个强有力的负性调控因子^[1]。在机体的免疫应答过程中, B7-H4 分子为免疫细胞的激活提供了刺激信号。活化的 T 细胞^[2-8]产生以白介素-4 (IL-4)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和 γ -干扰素 (IFN- γ) 为主的细胞因子, 而其中的 IL-2、TNF- α 、IFN- γ 等细胞因子介导的肝细胞免疫性损伤正是病毒性肝炎的重要致病机制。B7-H4 能否通过抑制 IL-4、TNF- α 、IFN- γ 等细胞因子而减弱肝细胞的免疫性

损伤呢? 如果答案肯定, 这无疑将给病毒性肝炎的防治提供重要理论的支持和指导意义。为了探讨这个问题, 我们采用刀豆球蛋白 A (Con A) 诱导小鼠肝损伤模型^[9]来模拟人免疫性肝损伤, 观察体内高表达 B7-H4 水平的小鼠接受 Con A 注射后免疫性肝损伤程度是否会减轻。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 主要实验药物及试剂 真核表达质粒^[10] pcDNA3.1-mB7-H4-hIg (广东医学院临床免疫学教

* 海南省卫生厅科研基金项目(琼卫 2010-3)资助

研室赠送), pcDNA3.1(+)(华中科技大学同济医学院免疫学教研室赠送)。Con A(美国 sigma 公司)。IL-4 ELISA 试剂盒和 IFN- γ ELISA 试剂盒(美国 eBioscience 公司)。天门冬氨酸氨基转移酶和丙氨酸氨基转移酶测定试剂盒(上海荣盛生物技术有限公司)。无内毒素质粒大提试剂盒和质粒小量提取试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)等。

1.1.2 实验动物 60 只 KM 小鼠, 8~10 周龄, 雌雄各半, 体质量约(20 \pm 2) g, 整个实验过程自由饮食。由海南医学院动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组 按随机分组原理, 将 60 只 KM 小鼠分为 4 组, 每组 15 只。A 组: 尾静脉注射复方生理盐水; B 组: 尾静脉注射 Con A 和 pcDNA3.1-mB7-H4-Fc; C 组: 尾静脉注射 Con A 和 pcDNA3.1; D 组: 尾静脉注射 Con A(简称 Con A 组)。

1.2.2 质粒的大量提取 将 pcDNA3.1(+)和 pcDNA3.1-mB7-H4-Fc 质粒转染到 DH5 α 宿主菌, 并大量培养, 按去内毒素大提质粒试剂盒说明, 大量提取上述两种质粒。

1.2.3 Con A 诱导肝损伤动物模型的建立 将 Con A 配成浓度为 1 mg/mL, 通过尾静脉注射, 剂量为 25 mg/kg, 体积为体质量的 1/10。B 组、C 组和 D 组动物均注射 Con A 制备肝损伤模型。

1.2.4 各组动物给药及取样方法 A 组注射复方生理盐水 1 mL; B 组在注射 Con A 前 1 d, 每只小鼠

注射表达质粒(pcDNA3.1-mB7-H4-Fc) 100 μ g, C 组在注射 Con A 前 1 d, 每只小鼠注射空载质粒(pcDNA3.1)100 μ g。在注射 Con A 后 8 h、24 h 和 48 h, 各组取 5 只小鼠采样, 摘眼球取血, 分离后的血清冻存于-80 $^{\circ}$ C 备用; 引颈处死, 取肝脏, 置 10% 甲醛溶液(体积分数)固定, 用于组织病理学检测。

1.2.5 小鼠血清 IL-4、IFN- γ 、肝功能测定 参照试剂盒说明书, 血清 IL-4 和 IFN- γ 浓度的测定均使用定量 ELISA 试剂盒, 其中 IL-4 检测灵敏度是 4 pg/mL, IFN- γ 检测灵敏度为 15 pg/mL。血清谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)测定使用全自动生化分析仪完成(海南医学院附属医院检验科生化室)。

1.2.6 小鼠肝脏组织学检查 肝脏组织切片, 由海南医学院病理教研室完成, 切片厚 5 μ m, HE 染色。光学显微镜下进行组织学检测。

1.2.7 统计学方法 计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。各组间的比较采用析因设计的方差分析。 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 小鼠肝功能的检测结果

在 Con A 注射后各时间点, B、C 和 D 三组小鼠血清 ALT 水平较正常水平均升高($P<0.01$), B 组 ALT 值低于 C 组和 D 组($P<0.01$)。各时点 B、C 和 D 组小鼠血清 AST 水平较 A 组均有升高, 但 B 组 AST 值低于 C 组和 D 组($P<0.05$)。见表 1。

2.2 细胞因子的检测结果

表 1 各组小鼠注射 Con A 后不同时间血清 ALT 和 AST 浓度(U/L, $\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Table 1 Concentration of serum ALT and AST of mice at different time after ConA injection (U/L, $\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Group	ALT			AST		
	8 h	24 h	48 h	8 h	24 h	48 h
A	112.1 \pm 11.1	112.1 \pm 11.1	112.1 \pm 11.1	85.2 \pm 12.1	85.2 \pm 12.1	85.2 \pm 12.1
B	343.1 \pm 34.6 ^{#*}	283.5 \pm 18.3 ^{#*}	202.5 \pm 22.6 ^{#*}	189.7 \pm 24.1 Δ *	172.9 \pm 10.1 Δ *	156.5 \pm 9.5 Δ *
C	565.2 \pm 45.6*	413.8 \pm 24.9*	356.2 \pm 25.3*	268.2 \pm 15.6*	223.8 \pm 14.9*	196.2 \pm 11.3*
D	545.9 \pm 52.1*	373.3 \pm 19.8*	338.2 \pm 12.5*	283.6 \pm 18.7*	213.4 \pm 15.8*	208.2 \pm 10.5*

Δ $P<0.05$, # $P<0.01$, vs. Group C and Group D; * $P<0.01$, vs. Group A

结果见表 2。在 Con A 注射后不同时间点, B、C 和 D 三组小鼠血清 IL-4 水平较 A 组均升高($P<0.01$), 但 B 组 IL-4 值低于 C 组和 D 组($P<0.05$); B、C 和 D 三组小鼠血清 IFN- γ 水平较 A 组均有升高, 但 B 组 IFN- γ 值低于 C 组和 D 组($P<0.05$)。

2.3 肝脏受损情况

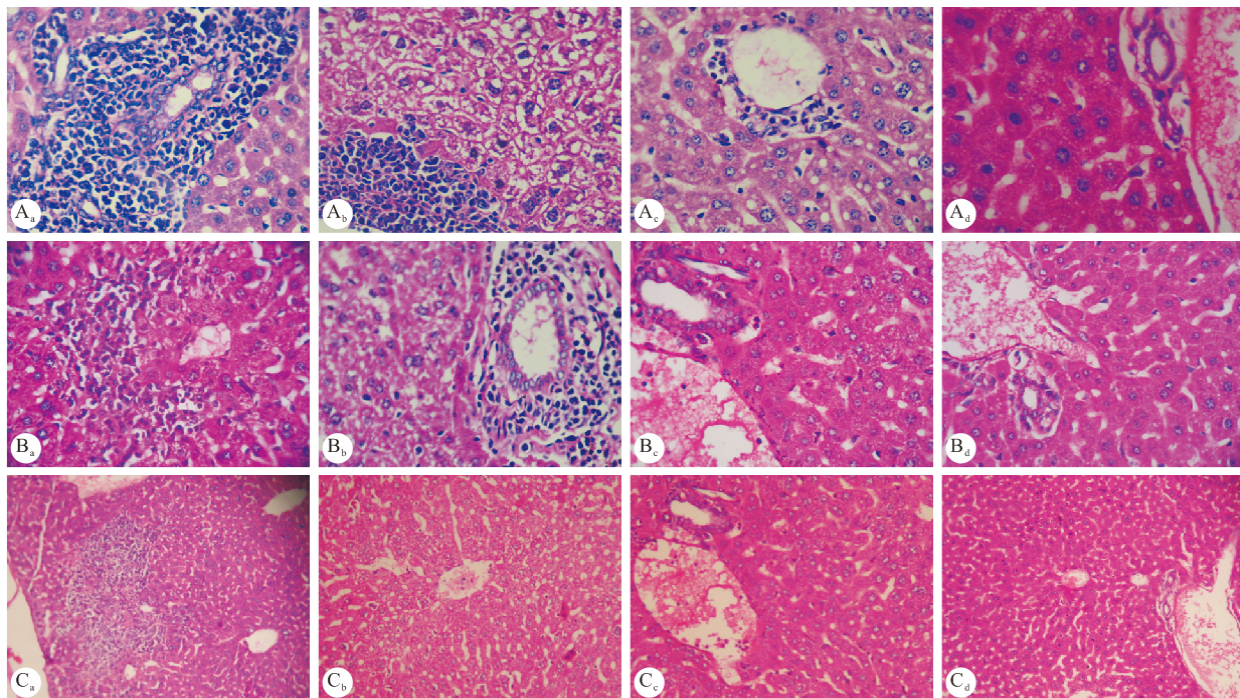
在光学显微镜下可见(附图): B 组小鼠肝脏损伤均比 C 组和 D 组有不同程度的减轻。在注射

Con A 8 h、24 h 和 48 h 后, B 组、C 组和 D 组小鼠肝细胞出现了不同程度的变性改变和肝窦内见红细胞淤积。D 和 C 组小鼠肝中央静脉和门静脉区见多叶核粒细胞伴有胞核破损、胞浆出现囊性或空泡样改变以及大量淋巴细胞浸润。相比之下, B 组的小鼠肝细胞的损伤较轻, 肝脏内未见坏死区, 汇管区仅见少量细胞胞浆出现了空泡样改变, 但胞核完整, 以及少量淋巴细胞浸润。

表 2 各组小鼠注射 ConA 不同时间血清 IL-4 和 IFN- γ 水平 (pg/mL, $\bar{x} \pm s, n=5$)Table 2 Concentration of serum IL-4 and IFN- γ of mice at different time after ConA injection (pg/mL, $\bar{x} \pm s, n=5$)

Group	IL-4			IFN- γ		
	8 h	24 h	48 h	8 h	24 h	48 h
A	52.1 \pm 6.1	52.1 \pm 6.1	52.1 \pm 6.1	575.2 \pm 62.1	575.2 \pm 62.1	575.2 \pm 62.1
B	197.2 \pm 14.6 ^{#,*}	155.7 \pm 15.3 ^{#,*}	99.5 \pm 12.6 ^{#,*}	2140.7 \pm 204.1 ^{#,*}	1872.9 \pm 170.1 ^{#,*}	1556.5 \pm 149.5 ^{#,*}
C	354.2 \pm 25.6 [*]	241.8 \pm 24.9 [*]	176.2 \pm 25.3 [*]	3268.2 \pm 185.6 [*]	3013.8 \pm 194.9 [*]	2196.2 \pm 151.3 [*]
D	375.9 \pm 32.1 [*]	223.3 \pm 23.4 [*]	189.2 \pm 22.5 [*]	3183.6 \pm 108.7 [*]	2813.4 \pm 115.8 [*]	2008.2 \pm 110.5 [*]

* $P < 0.01$, vs. Group A; # $P < 0.05$, vs. Group C and Group D

附图 Con A 注射 8 h(A)、24 h(B)、48 h(C)后质粒组小鼠肝脏光镜切片。HE $\times 100$ Fig Slice of mice's liver after 8 h (A), 24 h (B), 48 h (C) injected Con A. HE $\times 100$

a: Con A group; b: pcDNA3.1 group; c: pcDNA3.1-mB7-H4-Fc group; d: Normal group

3 讨论

目前对 B7-H4 的研究主要集中在肿瘤方面^[11-14],如卵巢癌和胃癌等,B7-H4 在这些癌症中均高表达。B7-H4 在炎症方面的研究较少,主要集中于类风湿关节炎^[15]和肾病^[16]等自身免疫性疾病,而关于其在自身免疫性肝炎中的表达情况少有相关研究。ConA 诱导的小鼠肝损伤模型^[17]是近年来新发展起来的由淋巴细胞介导的肝损害,该模型的最主要特点是发病迅速,肝脏损害明显;可以很好地模拟人类病毒性肝炎、自身免疫性肝病等疾病。当给予 ConA 剂量为 20 mg/kg,2 h 后肉眼可见肝脏淤血变暗,并逐渐加重,24 h 后可见肝脏几乎完全水肿坏死;光镜下观察可见肝内大量淋巴细胞浸润,在汇管区尤为明显,肝窦内红细胞淤积等。本研究结果显示,在 Con A 注射后,B、C 和 D 三组小鼠血清

ALT 值和 AST 值较正常 A 组升高,B 组 ALT 值和 AST 值低于 C 组和 D 组。各组小鼠肝组织切片后经 HE 染色,B 组小鼠肝脏损伤均比注射 C 组和 D 组有不同程度的减轻。在注射 Con A 后各时点,B 组、C 组和 D 组小鼠肝细胞出现了不同程度的变性改变和肝窦内见红细胞淤积。B 组的小鼠肝细胞的损伤较 C 组和 D 组轻,说明 B7-H4 在 Con A 诱导小鼠肝损伤中,能减轻 Con A 带来的损伤,具有保护作用。

Con A 诱导的肝炎模型中,Th1 型细胞因子和促炎细胞因子起主要损伤作用。TNF- α 和 IFN- γ 是该模型肝脏损伤中最重要的细胞因子;Con A 注射 2 h 后 TNF- α 可达峰值,预先给予抗 TNF- α 抗体,血清 TNF- α 水平降至正常。IFN- γ 上升缓慢,6~8 h 达高峰,较 TNF- α 维持时间长^[17],表明 TNF- α 与 IFN- γ 在体内的产生是相互独立的。IL-

4、IL-5在Con A诱导的肝炎模型中也发挥了重要的作用。Con A注射后,IL-4和IL-5产量增加,主要由NKT细胞分泌产生,这可能是其导致肝脏损伤的一个重要原因;在IL-4、IL-5基因敲除的小鼠或用IL-4、IL-5单抗预处理,都不能导致Con A诱导肝损伤^[18]。这说明IL-4、IL-5在Con A诱导的肝炎模型中也起了非常重要的作用。本研究结果显示,在Con A注射后,B、C和D三组小鼠血清IL-4和IFN- γ 测定结果较A组升高,但B组IL-4和IFN- γ 低于C组和D组。这与文献报道一致,TNF- α 和IFN- γ 是该模型肝脏损伤中最重要的细胞因子^[19];IL-4和IL-5在Con A诱导的肝炎模型中也发挥了重要的作用^[18]。

本课题组采用流体动力学(Hydrodynamics-based procedure)能高效地将表达质粒转移到小鼠肝脏,并且已获得了高水平表达^[20]。本研究结果显示:输注重组真核表达B7-H4质粒,能抑制Con A诱导的小鼠释放IFN- γ 和IL-4细胞因子的数量,减轻肝免疫性损伤;因而,提示B7-H4是通过抑制IFN- γ 和IL-4细胞因子的分泌,下调免疫炎症反应,从而起到保护肝免疫性损伤。本研究扩展了B7-H4对免疫炎症反应调节功能的认识,为B7-H4在病毒性肝炎防治研究中的应用提供了实验依据。但有关B7-H4在免疫性肝损伤中的作用机制尚有待进一步研究。

参 考 文 献

- Sica GL, Choi IH, Zhu G, *et al.* B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. *Immunity*, 2003;18(6):849-861.
- He C, Qiao H, Jiang H, *et al.* The inhibitory role of b7-h4 in antitumor immunity: association with cancer progression and survival. *Clin Dev Immunol*, 2011;20(11):695-704.
- 王辉, 田波, 鲁常青. B7家族PD-L1和B7-1/4的研究进展. *细胞与分子免疫学杂志*, 2013;29(2):216-217.
- Wang X, Hao J, Metzger DL, *et al.* B7-H4 treatment of T cells in inhibits ERK, JNK, p38, and AKT activation. *PLoS One*, 2012;7(1):28-32.
- Zhu G, Augustine MM, Azuma T, *et al.* B7-H4-deficient mice display augmented neutrophil-mediated innate immunity. *Blood*, 2009;113(8):1759-1767.
- Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T cell immunity. *Nature Rev Immunol*, 2004;4(5):336-347.
- Zhang L, Wu H, Lu D, *et al.* The costimulatory molecule B7-H4 promote tumor progression and cell proliferation through translocating into nucleus. *Oncogene*, 2013;32(46):5347-5358.
- 李丽, 胡为民, 王朝丽等. 小鼠B7-H4基因的真核表达及其对淋巴细胞增殖的影响. *中国微生态学杂志*, 2012;24(4):292-297.
- Tiegs C, Hentschel J, Wendel A. T Cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by Concanavalin A. *J Clin Invest*, 1992;90(1):196-203.
- 徐军发, 袁春雷, 杨衡等. 小鼠B7-H4基因克隆及真核表达载体的构建. *细胞与分子免疫学*, 2007;23(7):665-667.
- Zhang LL, Shao SL, Wu Y. Expression of osteopontin and B7-H4 in epithelial ovarian neoplasm and their significance. *Clin J Cancer*, 2010;29(1):25-29.
- Arigami T1, Uenosono Y, Hirata M, *et al.* Expression of B7-H4 in blood of patients with gastric cancer predicts tumor progression and prognosis. *Surg Oncol*, 2010;102(7):748-752.
- Dangaj D, Lanitis E, Zhao A, *et al.* Novel recombinant human B7-H4 antibodies overcome tumoral immune escape to potentiate T-cell antitumor responses. *Cancer Res*, 2013;73(15):4820-4829.
- Sun SQ, Jiang CG, Lin Y, *et al.* Enhanced T cell immunity by B7-H4 downregulation in nonsmall-cell lung cancer cell lines. *J Int Med Res*, 2012;40(2):497-506.
- 郭国宁, 向强, 文亮等. B7-H4在类风湿关节炎组织内的表达及分布研究. *现代免疫学*, 2011;31(2):130-134.
- 俞大亮, 厉小梅, 王喜梅等. 共刺激分子B7-H4在狼疮性肾炎肾组织及血清中的表达. *安徽医学*, 2012;33(7):793-796.
- Kremer M, Hines IN, Milton RJ, *et al.* Favored T helper 1 response in a mouse model of hepatosteatosis is associated with enhanced T cell-mediated hepatitis. *Hepatology*, 2006;44(1):216-227.
- Louis H, Le Moine A, Flamand V, *et al.* Critical role of interleukin 5 and eosinophils in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Gastroenterology*, 2002;122(7):2001-2010.
- Abadi YM, Jeon H, Ohaeqbulam KC, *et al.* Host b7 x promotes pulmonary metastasis of breast cancer. *J Immunol*, 2013;190(7):3806-3814.
- Xu JF, Xiao H, Hu GY, *et al.* Ectopic B7-H4-Ig expression attenuates concanavalin A-induced hepatic injury. *Clin Immunol*, 2010;136(4):30-41.

(2015-03-17收稿, 2015-08-09修回)

编辑 汤洁