

文章编号 1006-8147(2022)03-0260-06

论 著

# CD24 通过调节肝内 Ly6C<sup>lo</sup> 巨噬细胞亚群中 PDGF-B 的分泌抑制肝纤维化进程

靳悦, 汪河, 李明威, 张学军

(天津医科大学基础医学院免疫学系, 天津 300070)

**摘要** 目的:探讨 CD24 分子在胆总管结扎(BDL)诱导的小鼠胆汁淤积型肝纤维化中对肝内 Ly6C<sup>lo</sup> 巨噬细胞亚群的调节以及分泌 PDGF-B 的影响。方法:建立小鼠胆总管结扎诱导的肝纤维化模型,将野生型(WT)与 CD24 基因敲除(CD24<sup>-/-</sup>)雌性小鼠随机分为造模组(BDL)与假手术组(Sham),每组 5 只,造模组进行胆总管结扎,假手术组与造模组手术处理相同但不结扎胆总管。术后 7 d 应用 HE 和天狼星红(Sirius Red)染色分析小鼠肝组织病理变化和肝纤维化程度,定量-PCR(Q-PCR)和 Western 印迹检测肝内  $\alpha$ -SMA 等纤维化因子的表达,流式细胞术分析 CD24 分子在肝内巨噬细胞亚群中的表达,共培养实验检测肝内星状细胞中纤维化因子的变化。结果:两种基因背景小鼠的假手术组无病理表现,在造模组中,CD24<sup>-/-</sup>小鼠与 WT 小鼠相比肝纤维化明显加重,表现为肝汇管区炎性细胞浸润增多, $\alpha$ -SMA 等肝纤维化标志物的表达升高。流式分析结果显示,CD24 分子在肝内 Ly6C<sup>lo</sup> 巨噬细胞亚群上高表达,在造模组中,CD24<sup>-/-</sup>鼠造模后肝内 Ly6C<sup>lo</sup> 巨噬细胞亚群比例[(65.05±0.250)%]高于 WT 鼠[(52.55±2.950)%],差异有统计学意义( $P<0.05$ )。进一步研究发现:PDGF-B 在肝内 Ly6C<sup>lo</sup> 巨噬细胞亚群高表达,并且在 CD24<sup>-/-</sup>小鼠中的表达明显高于 WT 小鼠,差异有统计学意义( $P<0.0001$ )。结论:CD24 分子可通过调节肝内 Ly6C<sup>lo</sup> 巨噬细胞亚群中 PDGF-B 分泌减缓肝纤维化进程。

**关键词** CD24 分子;肝纤维化;肝内 Ly6C<sup>lo</sup> 巨噬细胞;肝星状细胞;PDGF-B

**中图分类号** R392.1

**文献标志码** A

## CD24 inhibits the liver fibrosis process by regulating the secretion of PDGF-B in hepatic Ly6C<sup>lo</sup> macrophage subset

JIN Yue, WANG He, LI Ming-wei, ZHANG Xue-jun

(Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract Objective:** To investigate the effect of CD24 on Ly6C<sup>lo</sup> macrophage subsets and secretion of PDGF-B in cholestatic liver fibrosis induced by common bile duct ligation (BDL). **Methods:** A mouse model of BDL-induced liver fibrosis was established. Wild type (WT) and CD24 gene knockout (CD24<sup>-/-</sup>) female mice were randomly divided into model (BDL) group and sham group, with 5 mice in each group. The model group was subjected to common bile duct ligation. The sham group was the same surgical treatment as that of model group, but the common bile duct was not ligated. Seven days after operation, the pathological changes of liver tissue and the degree of liver fibrosis were analyzed by HE and Sirius red staining. The expression of fibrosis factors such as  $\alpha$ -SMA were detected by Western blotting and Q-PCR. The expression of CD24 in hepatic macrophages subsets was detected by flow cytometry. Co-culture assay was used to detect the changes of fibrotic factors in hepatic stellate cells. **Results:** There were no pathological manifestations in the sham operation group of mice with two genetic backgrounds. In the model group, the hepatic fibrosis of CD24<sup>-/-</sup> mice was significantly worse than that of WT mice, CD24<sup>-/-</sup> mice had more inflammatory cell infiltration in hepatic portal area, elevated  $\alpha$ -SMA and other markers of hepatic fibrosis expression. Flow cytometry analysis showed that CD24 was highly expressed in Ly6C<sup>lo</sup> macrophage subsets in liver. The proportion of Ly6C<sup>lo</sup> macrophage subsets of CD24<sup>-/-</sup> mice [(65.05±0.250)%] was higher than WT mice [(52.55±2.950)%], and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). Further study found that PDGF-B was highly expressed in Ly6C<sup>lo</sup> macrophage subsets in liver, and the expression in CD24<sup>-/-</sup> mice was significantly higher than WT mice ( $P<0.0001$ ). **Conclusion:** CD24 may alleviate the process of liver fibrosis by regulating the secretion of PDGF-B in hepatic Ly6C<sup>lo</sup> macrophage subset.

**Key words** CD24 molecules; liver fibrosis; hepatic Ly6C<sup>lo</sup> macrophages; hepatic stellate cells; PDGF-B

肝纤维化是肝脏损伤后细胞外基质过度沉积与异常分布的修复反应,是各种慢性肝病向肝硬化

发展过程中的关键阶段<sup>[1]</sup>。研究证明肝内巨噬细胞是肝纤维化进程及转归的重要免疫细胞<sup>[2-3]</sup>,单核来源巨噬细胞被招募到受损的肝脏后,可通过分泌转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )等促纤维化因子介导的肝星状细胞活化、分化和增殖,进而促进慢性纤维化进程<sup>[4]</sup>。

基金项目 国家自然科学基金面上项目(31370891);天津市自然科学基金重点项目(18JCZDJC98300)

作者简介 靳悦(1996-),女,硕士在读,研究方向:巨噬细胞与肝纤维化;通信作者:张学军, E-mail: xjzh@tmu.edu.cn。

血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor,PDGF)是一种促进肝星状细胞分裂和增殖的生长因子,分为 PDGF-A、B、C 和 D 4 种不同亚型<sup>[5-6]</sup>,其中 PDGF-B 是促进纤维化和 HSC 增殖的关键细胞因子,它的主要受体 PDGFR- $\beta$  在活化的 HSC 上显著上调<sup>[7-8]</sup>。在近几年的纤维化机制研究中,PDGF 信号通路已被认为是与 HSC 活化和纤维化进展相关的重要通路<sup>[9-10]</sup>。

CD24 是一种糖基磷脂酰肌醇锚定分子<sup>[11]</sup>,由多种免疫细胞表达<sup>[12]</sup>。CD24 也是一种重要的炎症负反馈分子,在肝损伤和抗肿瘤先天免疫反应中发挥重要作用<sup>[13-14]</sup>。本研究利用阻塞性胆汁淤积引起的肝纤维化动物模型探讨了 CD24 分子是否通过调节肝内巨噬细胞分泌 PDGF-B 进而延缓纤维化进程。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验对象及分组 C57BL/6J 小鼠(购自北京斯贝福生物技术有限公司)与 CD24 基因敲除(CD24<sup>-/-</sup>)小鼠在天津医科大学实验动物中心共同饲养。各基因型均采用 6~8 周龄,体重 18~20 g 的雌性小鼠。各基因型均分为造模组与假手术组,每组 5 只,造模组进行胆总管结扎(BDL)诱导小鼠纤维化,假手术组和造模组处理相同但不结扎胆总管,作为对照组,术后饲养于相同的环境,术后 7 d 处死小鼠。

1.1.2 主要试剂和仪器 石蜡切片机购自 leica,Q-PCR 仪 LightCycler96 购自 Roche 公司,Trizol 购自美国 Invitrogen 公司,反转录酶试剂盒购自美国 Promega 公司,SYBR Green 购自 Genstar,Percoll 购自英国 GE Healthcare 公司,IV 型胶原酶购自 Sigma,流式抗体购自美国 eBioscience 公司,Western 印迹抗体购自 SantaCruz。

### 1.2 实验方法

1.2.1 BDL 小鼠模型的构建 手术组按照 4  $\mu$ L/g 腹腔注射 10%水合氯醛溶液进行麻醉,之后刮去腹壁周围绒毛暴露皮肤,消毒后使用手术刀沿腹中线切开腹壁,暴露腹腔,找到胆总管用消毒后的手术

线结扎,最后缝合腹壁。术后小鼠饲养于消毒后的笼子里,置于温暖的环境中。

1.2.2 肝组织的病理染色 冷 PBS 灌注肝脏,取下的肝脏在 10%甲醛溶液中固定至少 24 h,依次进行不同浓度梯度的酒精脱水,浸蜡 6~8 h 后包埋。用石蜡切片机进行 5  $\mu$ m 厚度的切片,60℃烤片 1 h 后进行 HE 和天狼星红染色,其中,苏木素染色 3 min,分化液 30 s,伊红 1 min,天狼星红染色 1 h,染色完成后中性树胶封片,在 Nikon 90i 显微镜下拍照,每张图片选取 5 个视野,用 image J 软件统计阳性区域面积进行比较。

1.2.3 免疫印迹 将液氮速冻的肝组织加入适量裂解液,置于冰上,使用手持组织破碎仪将组织打成匀浆,再经超声破碎仪对组织匀浆进行超声破碎,超声 15 s,停 10 s,循环 3 次。将超声后的样品离心后转移上清至新的 EP 管,加入 Loading buffer 后 5 min,100℃变性。加载等量的蛋白通过 10%SDS-PAGE 分离,然后转移到 PVDF 膜上,300 mA 转膜 2 h,用含 5%BSA 的 TBST 缓冲液封闭 1 h,然后用相应的抗体孵育过夜。用对应的二抗室温孵育 1 h,洗膜 3~5 遍。 $\alpha$ -SMA(1:500), $\beta$ -actin(1:500),辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000),通过化学发光液检测抗体条带。

1.2.4 定量-PCR 将液氮速冻后的肝组织加入 1 mL Trizol 裂解,培养皿中的细胞加入 600  $\mu$ L Trizol 裂解,异丙醇沉淀法提取 RNA,用分光光度计测定 RNA 浓度后,每个样品取 1~2  $\mu$ g,用反转录试剂盒(Promega)进行反转录。将得到的 cDNA 进行 10 倍稀释,按照 cDNA 4.5  $\mu$ L,引物 0.5  $\mu$ L,SYBR Green 5  $\mu$ L 的体系使用 LightCycler96 运行程序。具体的程序为:预变性:95℃,300 s;设置 50 个循环:变性:95℃,15 s;退火:60℃,30 s;延伸:72℃,30 s;溶解:95℃,10 s,65℃,60 s,97℃,1 s;冷却:37℃,30 s。以 Actin 基因为内参,用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 计算结果,所有用到的引物序列见表 1。反转录后的样品加入 SYBR Green 嵌合荧光染料并使用 LightCycler96 进行 Q-PCR 检验。

表 1 定量-PCR 所用引物序列

Tab 1 Primer sequence used for Q-PCR

基因名称	上游(5'→3')	下游(5'→3')	产物大小(bp)
$\alpha$ -SMA	ACTACTGCCGAGCGTGAGAT	AAGGTAGACAGCGAAGCCAG	452
Col1 $\alpha$ 1	GAAACCCGAGGTATGATTGA	GACCAGGAGGACCAGGAAGT	275
Timp-1	CTTGGTTCCTGGCGTACT	ACCTGATCCGTCCACAAACAG	150
PDGF-A	CAGGACGGTCATTTACGAGATA	CAATTTTGGCTTCTCTGACA	199
PDGF-B	TGCTGCACAGAGACTCCGTA	GATGAGCTTTCCAACGACTC	91
PDGF-C	ACATTTGATGAGAGATTTGGGCT	CAGCGTCCTAAAACACTTCCAT	104
PDGF-D	TACAGTTGCACTCCAGGAAT	CTTCCAGTTGACAGTTCCGCA	135
PDGFR- $\alpha$	GGCAGGCACATTTACATCTATG	CATCCTCTTCCACGATGACTAA	91
PDGFR- $\beta$	CAAGAAGCGGCCATGAATCAG	CGGCCCTAGTGAGTTGTTGT	114

注:以上引物均由上海生工生物工程有限公司合成; $\alpha$ -SMA: $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白;Col1 $\alpha$ 1:I 型胶原  $\alpha$ 1;Timp-1:基质金属蛋白酶组织抑制剂-1;PDGF(R):血小板衍生生长因子(受体)

**1.2.5 制备肝内巨噬细胞与星状细胞** 肝组织依次灌注 EGTA 溶液、链酶蛋白酶溶液和Ⅳ型胶原酶溶液,将肝脏在消化液中剪碎,37℃、160 r/min 消化 15 min,将消化好的肝脏通过 70  $\mu$ m 的筛网过滤,4℃、500 $\times$ g,3 min,多次离心去除肝细胞。4℃、500 $\times$ g,8 min 离心 2 遍弃上清,用 1 $\times$ PBS 与预先配置的 Percoll 原液混合成 50%和 25%的 Percoll,用 25%Percoll 重悬细胞后缓慢滴加到 50%Percoll 上,2 000 r/min,制动 0 离心 30 min,取 Percoll 中间层细胞即为肝内巨噬细胞。将滤过的单细胞悬液 4℃、580 $\times$ g,离心 10 min,弃上清到 10 mL,加 120  $\mu$ L DNase I 重悬,补 GBSS/B 至 50 mL,4℃、580 $\times$ g,离心 10 min,弃上清至 10 mL 加 120  $\mu$ L DNase I,将细胞悬液平均分到两个 15 mL 管中,加 GBSS/B 至 8 mL,再加入 4 mL Nycodenz,混匀后在细胞悬液上加 1.5 mL GBSS/B,制动 0,1 380 $\times$ g,4℃,离心 17 min,取白膜层即为肝星状细胞。

**1.2.6 制备肝非实质细胞(NPCs)悬液** 步骤同提取肝内巨噬细胞,弃上清留底部沉淀后,将 10 $\times$ PBS 与预先配置的 Percoll 原液混合成 30%Percoll 并重悬细胞,450 $\times$ g,20 min 离心留下最底层细胞,冷 ACK 进行红细胞裂解,裂解完成后洗两遍重悬计数。

**1.2.7 流式细胞术检测** 制备肝非实质细胞悬液后,每管取  $1 \times 10^6$  个细胞,用 CD16/32 抗体 4℃封闭 15 min,之后再进行细胞表面染色 30 min。所用抗体如下: Apc-cy7 Anti-mouse CD45、FITC Anti-mouse Ly6G、Percep-cy5.5 Anti-mouse CD11b、APC Anti-mouse F4/80、PE-cy7 Anti-mouse Ly6C、PE Anti-mouse CD24。使用 BD FACS Canto II 流式分析仪进行检测。Flowjo 10.6.2 软件对实验结果进行分析。

**1.2.8 巨噬细胞亚群分选** 制备肝非实质细胞悬液后,将悬液转移到无菌流式管中,4℃、500 $\times$ g,离心 5 min,冰上封闭 15 min,再用标记抗体 Apc-cy7 Anti-mouse CD45、FITC Anti-mouse Ly6G、Percep-cy5.5 Anti-mouse CD11b、APC Anti-mouse F4/80、PE-cy7

Anti-mouse Ly6C 染色 30 min,用流式 PBS 洗两遍后用 FACS Aria II 流式分选仪分选巨噬细胞亚群,收集到无菌管中。

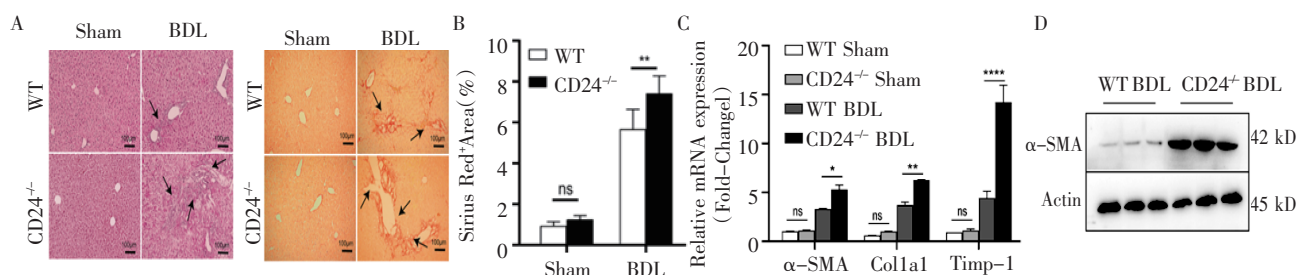
**1.2.9 共培养** 将提取的原代星状细胞种于 6 孔板,于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。将提取的巨噬细胞亚群加入提前架好的 Transwell 培养小室的 6 孔板中,培养条件相同。在原代星状细胞培养两天贴盘稳定后,将 Transwell 小室放置于培养原代星状细胞的 6 孔板上,共培养 3 d,提取 RNA 用于 Q-PCR 检测。

**1.3 统计学处理** 使用 Graphpad Prism8 进行数据汇总、分析、制图,数据服从正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 BDL 诱导的 CD24<sup>-/-</sup>小鼠肝纤维化程度加重** 首先建立了 BDL 诱导的小鼠纤维化模型,HE 结果显示,在造模组中,与 WT 小鼠相比,CD24<sup>-/-</sup>小鼠肝组织炎性细胞浸润增多,汇管区增生更加明显,而假手术组中两种基因型小鼠的肝脏则没有明显病理改变(图 1A)。天狼星红染色结果显示,造模组 CD24<sup>-/-</sup>小鼠的肝纤维化程度更严重( $P < 0.01$ ),而假手术组无明显差别( $P > 0.05$ ,图 1B)。Q-PCR 结果显示,造模组 CD24<sup>-/-</sup>小鼠的肝纤维化指标  $\alpha$ -SMA ( $P < 0.05$ )、Col1 $\alpha$ 1 ( $P < 0.01$ )和 Timp-1 ( $P < 0.000 1$ )与 WT 小鼠相比有显著升高,假手术组无明显差别( $P > 0.05$ ,图 1C)。Western 印迹结果显示,肝纤维化标志物  $\alpha$ -SMA 在 CD24<sup>-/-</sup>小鼠的肝组织中表达明显高于 WT 小鼠(图 1D),上述结果提示,CD24<sup>-/-</sup>小鼠的肝损伤和肝纤维化程度明显加重。

**2.2 CD24<sup>-/-</sup>小鼠肝纤维化加重** 与 WT 小鼠相比,CD24<sup>-/-</sup>小鼠造模后肝脏中定居的巨噬细胞(CD11b<sup>hi</sup>F480<sup>hi</sup>)比例与数量都没有明显差别( $P > 0.05$ ),募集巨噬细胞群(CD11b<sup>hi</sup>F480<sup>int</sup>)比例明



注:A:假手术组和造模组 7 d 后,WT 小鼠和 CD24<sup>-/-</sup>小鼠 HE 染色肝组织病理形态变化(100 $\times$ ,箭头指示汇管区增生与炎性浸润);B:左:天狼星红染色检测肝纤维化程度,右:image J 统计胶原沉积区域面积(100 $\times$ , $n=5$ ,\*\* $P < 0.01$ );C:Q-PCR 检测肝组织纤维化标志物的 mRNA 表达水平,数据代表了两个独立的实验,每组  $n=4$ ( $*P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\*\* $P < 0.000 1$ );D:Western 印迹检测肝纤维化标志物  $\alpha$ -SMA 蛋白表达水平;Sham:假手术组;BDL:胆总管结扎; $\alpha$ -SMA: $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白;Col1 $\alpha$ 1:I 型胶原  $\alpha$ 1;Timp-1:基质金属蛋白酶组织抑制剂-1

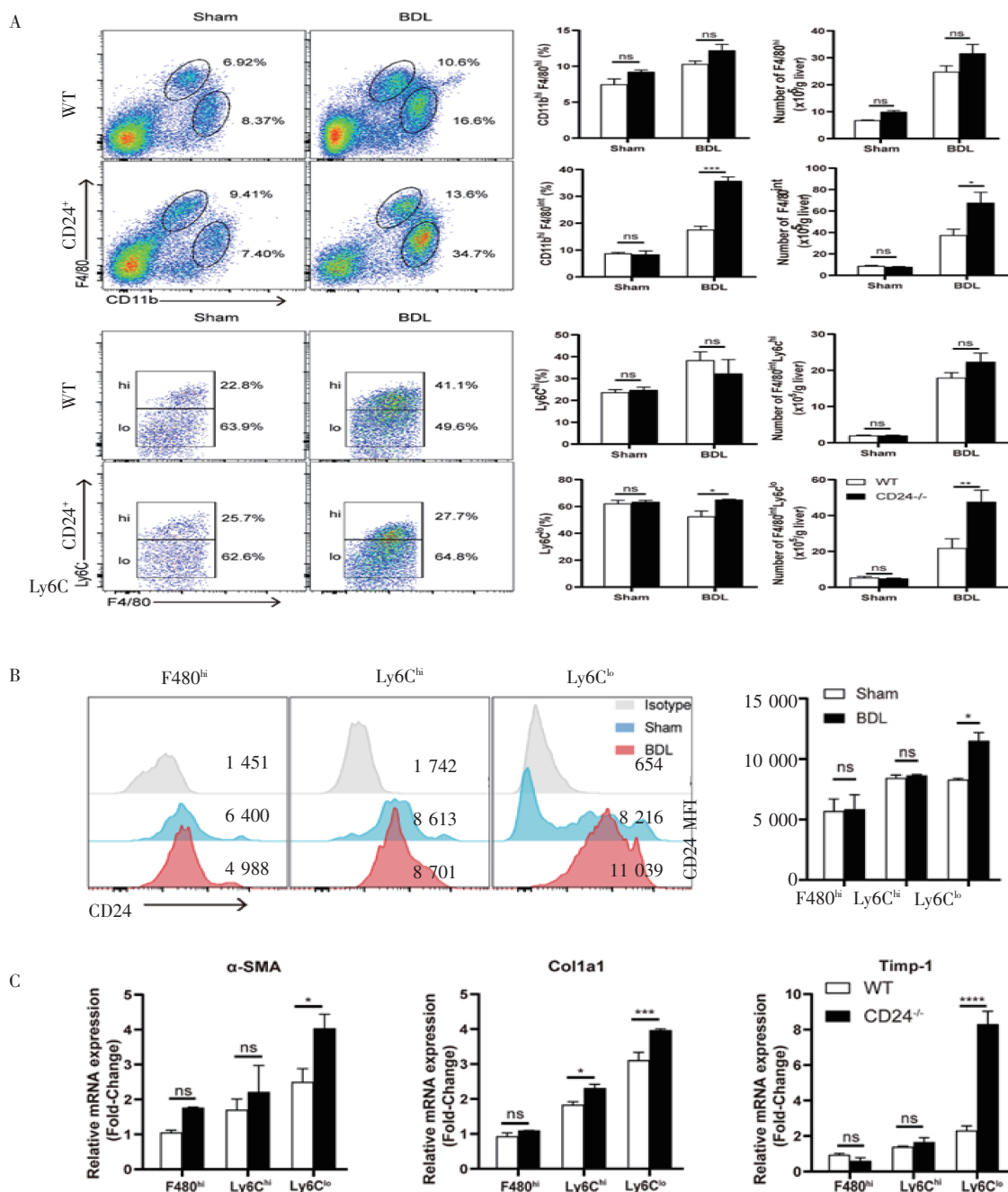
图 1 CD24 基因敲除后 BDL 诱导的小鼠肝纤维化加重

Fig 1 BDL-induced liver fibrosis in mice aggravated after CD24 gene knockout



显增加( $P<0.001$ ),数量也有增加( $P<0.05$ ,图 2A)。进一步分析 Ly6C<sup>hi</sup> 和 Ly6C<sup>lo</sup> 两种肝内募集型巨噬细胞亚群,结果发现 CD24<sup>-/-</sup>小鼠造模后的 Ly6C<sup>lo</sup> 巨噬细胞亚群比例高于 WT 小鼠( $P<0.05$ ),数量也高于 WT 小鼠( $P<0.01$ ),而 Ly6C<sup>hi</sup> 巨噬细胞亚群比例和数量均无明显差异( $P>0.05$ ,图 2A)。分析 CD24 分子在肝内不同的巨噬细胞亚群中的表达发现,

CD24 分子在 Ly6C<sup>lo</sup> 巨噬细胞亚群中高表达且造模前后差异明显( $P<0.05$ ,图 2B)。分选肝内巨噬细胞亚群与提取的原代星状细胞共培养后检测星状细胞的纤维化指标,结果发现,造模后的 CD24<sup>-/-</sup>小鼠肝内 Ly6C<sup>lo</sup> 群巨噬细胞亚群对星状细胞的活化作用较强,纤维化指标表达明显升高(图 2C)。



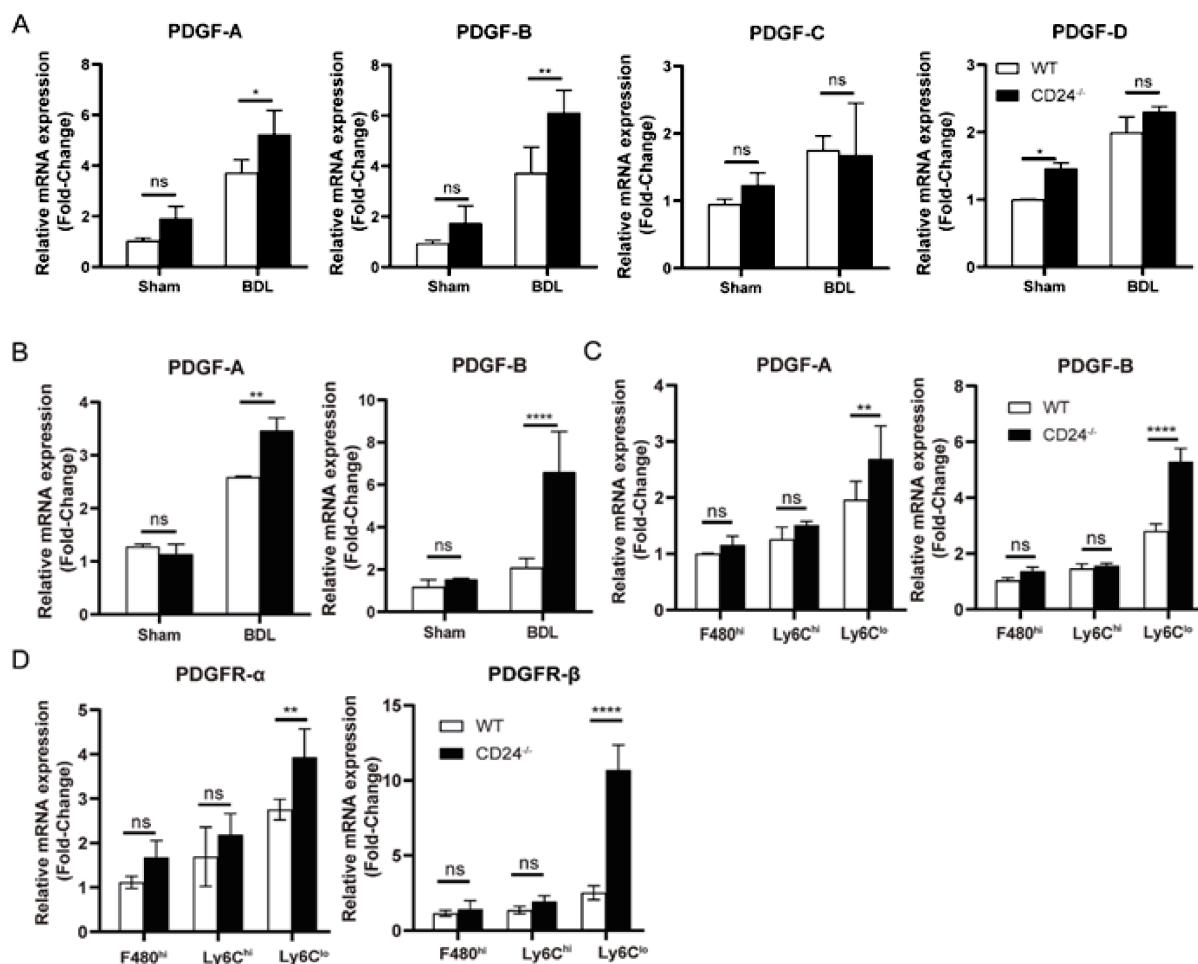
注:A:流式细胞术检测肝内巨噬细胞 CD11b<sup>hi</sup>F4/80<sup>hi</sup> 及 CD11b<sup>hi</sup>F4/80<sup>int</sup> 中 Ly6C<sup>hi</sup> 和 Ly6C<sup>lo</sup> 巨噬细胞比例及细胞绝对数变化(\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ ),数据代表了 2 个独立的实验,每组  $n=5$ ;B:流式细胞术检测 CD11b<sup>hi</sup>F4/80<sup>hi</sup> 和 CD11b<sup>hi</sup>F4/80<sup>int</sup> 中 Ly6C<sup>hi</sup> 和 Ly6C<sup>lo</sup> 巨噬细胞上 CD24 平均荧光强度(MFI)表达变化(\* $P<0.05$ ),数据代表了 2 个独立的实验,每组  $n=5$ ;C:Q-PCR 检测肝内巨噬细胞亚群与星状细胞共培养后纤维化指标 mRNA 表达变化(\* $P<0.05$ ,\*\*\* $P<0.001$ ,\*\*\*\* $P<0.0001$ ),数据代表了两个独立的实验,每组  $n=4$ ;Sham:假手术组;BDL:胆总管结扎;CD11b<sup>hi</sup>:CD11b 高表达;F4/80<sup>hi</sup>:F4/80 高表达;F4/80<sup>int</sup>:F4/80 中表达;Ly6C<sup>hi</sup>:Ly6C 高表达;Ly6C<sup>lo</sup>:Ly6C 低表达;MFI:平均荧光强度; $\alpha$ -SMA: $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白;Col1a1:I 型胶原  $\alpha 1$ ;Timp-1:基质金属蛋白酶组织抑制剂-1

图 2 CD24<sup>-/-</sup>小鼠肝纤维化加重可能与 Ly6C<sup>lo</sup> 巨噬细胞亚群相关

Fig 2 The aggravation of liver fibrosis in CD24<sup>-/-</sup> mice was related to Ly6C<sup>lo</sup> macrophages subset

2.3 CD24<sup>+</sup>小鼠纤维化与 Ly6C<sup>lo</sup> 巨噬细胞分泌 PDGF-B 因子有关 在造模组中,与 WT 小鼠相比,CD24<sup>+</sup>小鼠肝组织中 PDGF-A 和 PDGF-B mRNA 表达较高且有显著差异( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),而 PDGF-C 和 PDGF-D 表达低且无差异( $P>0.05$ ,图 3A)。提取肝内巨噬细胞检测发现,Q-PCR 显示 PDGF-A 与 PDGF-B mRNA 在 CD24<sup>+</sup>小鼠造模后的肝内巨噬细胞上表达均有显著升高,其中以 PDGF-B mRNA

表达最为明显( $P<0.01$ , $P<0.0001$ ,图 3B)。进一步分析肝内不同巨噬细胞亚群 PDGF-A 和 PDGF-B mRNA 表达,结果发现,PDGF-B 在 CD24<sup>+</sup>小鼠的 Ly6C<sup>lo</sup> 巨噬细胞亚群上高表达( $P<0.0001$ ,图 3C)。用巨噬细胞上清与肝星状细胞共培养观察星状细胞上 PDGF-B 受体的表达,结果发现,与 CD24<sup>+</sup>小鼠肝内 Ly6C<sup>lo</sup> 巨噬细胞共培养后,肝星状细胞 PDGFR- $\beta$  受体 mRNA 表达量显著上调( $P<0.0001$ ,图 3D)。



注:A:Q-PCR 检测造模前后 PDGF 家族因子在肝组织中的 mRNA 表达变化 (\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ );B:Q-PCR 检测造模前后 PDGF-A 和 PDGF-B 在肝内巨噬细胞中 mRNA 表达变化(\*\* $P<0.01$ ,\*\*\*\* $P<0.0001$ );C:Q-PCR 检测造模前后 PDGF-A 和 PDGF-B 在不同巨噬细胞亚群上 mRNA 表达变化(\*\* $P<0.01$ ,\*\*\*\* $P<0.0001$ );D:Q-PCR 检测共培养后星状细胞上 PDGF 相应受体 mRNA 表达变化(\*\* $P<0.01$ ,\*\*\*\* $P<0.0001$ );以上数据代表了两个独立的实验,每组  $n=4$ ;Sham 组:假手术组;BDL:胆总管结扎;PDGF(R):血小板衍生生长因子(受体);F480<sup>hi</sup>:F480 高表达;Ly6C<sup>hi</sup>:Ly6C 高表达;Ly6C<sup>lo</sup>:Ly6C 低表达

图 3 CD24 小鼠纤维化与 Ly6C<sup>lo</sup> 巨噬细胞分泌 PDGF-B 因子密切相关

Fig 3 CD24 mouse fibrosis closely related to the secretion of PDGF-B factor by Ly6C<sup>lo</sup> macrophages

### 3 讨论

在 BDL 诱导的纤维化中,巨噬细胞与纤维化发展密切相关<sup>[15]</sup>,在不同的巨噬细胞亚群中,单核衍生的 Ly6C 巨噬细胞亚群可在纤维化的不同阶段发挥重要作用<sup>[16-17]</sup>。PDGF-B 被认为是巨噬细胞分泌的促

纤维化因子,可促进星状细胞的增殖分化以控制肝纤维化的发展<sup>[18]</sup>。

在 WT 鼠和 CD24<sup>+</sup>小鼠经过胆总管结扎术造成纤维化后,初步发现 CD24<sup>+</sup>小鼠的纤维化情况较 WT 小鼠严重。在研究机制的过程中发现 CD24<sup>+</sup>造

模小鼠中募集群巨噬细胞显著增多,CD24分子在Ly6C<sup>lo</sup>群巨噬细胞上高表达且在造模前后有明显差异,提示CD24分子可能通过Ly6C<sup>lo</sup>群巨噬细胞来调节肝纤维化。

为了探究巨噬细胞分泌的相关纤维化因子,首先应用Q-PCR检测筛选了与纤维化密切相关的PDGFs家族成员的mRNA表达变化,结果发现,PDGF-A和PDGF-B在CD24<sup>+</sup>小鼠肝纤维化组织中表达显著升高且与WT小鼠有明显差异,PDGF-C和PDGF-D表达低且无明显差异,该结果初步排除PDGF-C和PDGF-D的作用。进一步检测肝内巨噬细胞,结果发现,PDGF-A和PDGF-B在造模后的CD24<sup>+</sup>小鼠肝内巨噬细胞上表达升高,尤其是PDGF-B表达显著升高,因此PDGF-A和PDGF-B与CD24敲除后肝纤维化加重有关。深入分析巨噬细胞亚群发现,PDGF-A和PDGF-B在CD24<sup>+</sup>小鼠Ly6C<sup>lo</sup>巨噬细胞亚群上高表达且与WT小鼠有显著差异,并且PDGF-B的表达差异更大,因此,CD24主要通过Ly6C<sup>lo</sup>巨噬细胞亚群分泌PDGF-B来调节纤维化的发展。巨噬细胞分泌的PDGFs等促纤维化因子是通过调节肝星状细胞表达的相应受体来实现的<sup>[19]</sup>,为了验证上述结果,首先将不同巨噬细胞亚群与星状细胞共培养,检测星状细胞上的相应受体的变化,结果发现,与CD24<sup>+</sup>小鼠来源的Ly6C<sup>lo</sup>巨噬细胞亚群共培养后的星状细胞上PDGFR- $\beta$ 受体表达显著升高,而PDGFR- $\beta$ 是主要与PDGF-B相结合的配体<sup>[20]</sup>,因此,共培养实验进一步验证了PDGF-B是CD24通过Ly6C<sup>lo</sup>巨噬细胞亚群调节纤维化的重要因子。综上所述,CD24分子可通过影响Ly6C<sup>lo</sup>巨噬细胞PDGF-B的分泌来调节纤维化。

#### 参考文献:

- [1] KISSELEVA T, BRENNER D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(3): 151-166.
- [2] TACKE F. Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases[J]. *J Hepatol*, 2017, 66(6): 1300-1312.
- [3] CAMPANA L, IREDALE J P. Regression of liver fibrosis [J]. *Semin Liver Dis*, 2017, 37(1): 1-10.
- [4] TACKE F, ZIMMERMANN H W. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis[J]. *J Hepatol*, 2014, 60(5): 1090-1096.
- [5] WOLLIN L, WEX E, PAUTSCH A, et al. Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Eur Respir J*, 2015, 45(5): 1434-1445.
- [6] KOCABAYOGLU P, LADE A, LEE Y A, et al.  $\beta$ -PDGF receptor expressed by hepatic stellate cells regulates fibrosis in murine liver injury, but not carcinogenesis[J]. *J Hepatol*, 2015, 63(1): 141-147.
- [7] GAO J, WEI B, DE ASSUNCAO T M, et al. Hepatic stellate cell autophagy inhibits extracellular vesicle release to attenuate liver fibrosis[J]. *J Hepatol*, 2020, 73(5): 1144-1154.
- [8] BARTNECK M, WARZECHA K T, TACKE F, et al. Therapeutic targeting of liver inflammation and fibrosis by nanomedicine [J]. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2014, 3(6): 364-376.
- [9] YING H Z, CHEN Q, ZHANG W Y, et al. PDGF signaling pathway in hepatic fibrosis pathogenesis and therapeutics (Review)[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 7879-7889.
- [10] CAO S, YAQOOB U, DAS A, et al. Neuropilin-1 promotes cirrhosis of the rodent and human liver by enhancing PDGF/TGF- $\beta$  signaling in hepatic stellate cells[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120 (7): 2379-2394.
- [11] CHEN G Y, BROWN N K, ZHENG P, et al. Siglec-G/10 in self-nonspecific discrimination of innate and adaptive immunity[J]. *Glycobiology*, 2014, 24(9): 800-806.
- [12] ALTEVOGT P, SAMMAR M, HÜSER L, et al. Novel insights into the function of CD24: a driving force in cancer[J]. *Int J Cancer*, 2021, 148(3): 546-559.
- [13] BARKAL A A, BREWER R E, MARKOVIC M, et al. CD24 signalling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy[J]. *Nature*, 2019, 572(7769): 392-396.
- [14] BAI X F, LI Q, ZHOU Q, et al. CD24 controls expansion and persistence of autoreactive T cells in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *J Exp Med*, 2004, 200(4): 447-458.
- [15] HABIB A, CHOKR D, WAN J, et al. Inhibition of monoacylglycerol lipase, an anti-inflammatory and antifibrogenic strategy in the liver[J]. *Gut*, 2019, 68(3): 522-532.
- [16] SUNY Y, LI X F, MENG X M, et al. Macrophage phenotype in liver injury and repair[J]. *Scand J Immunol*, 2017, 85(3): 166-174.
- [17] WEN Y, LAMBRECHT J, JU C, et al. Hepatic macrophages in liver homeostasis and diseases—diversity, plasticity and therapeutic opportunities[J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(1): 45-56.
- [18] LI X, SHAO S, LI H, et al. Byakangelicin protects against carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in mice[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(15): 8623-8635.
- [19] DISTLER JHW, GYÖRFI A H, RAMANUJAM M, et al. Shared and distinct mechanisms of fibrosis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2019, 15(12): 705-730.
- [20] GUÉRIT E, ARTS F, DACHY G, et al. PDGF receptor mutations in human diseases[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(8): 3867-3881.

(2021-10-21 收稿)