



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110604743 B

(45) 授权公告日 2021.08.17

(21) 申请号 201910666166.X

G01N 33/533 (2006.01)

(22) 申请日 2019.07.23

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 1861191 A, 2006.11.15

申请公布号 CN 110604743 A

CN 102707055 A, 2012.10.03

(43) 申请公布日 2019.12.24

CN 108339015 A, 2018.07.31

(73) 专利权人 四川大学

EP 0846266 A1, 1998.06.10

地址 610065 四川省成都市武侯区一环路
南一段24号

刘光本. 中性粒细胞的酶激活作用和氧化杀
菌机理.《国外兽医学. 畜禽疾病》.1986, (第2
期), 第1-4页.

(72) 发明人 徐劲松 曹路扬 赛音贺西格

郭丽萍等. 自身免疫性肝炎患者肝脏巨噬细
胞极化分型研究.《中华内科杂志》.2017, 第56卷
(第10期), 第763-765页.

(74) 专利代理机构 成都虹桥专利事务所(普通
合伙) 51124

王宪焘. 自然凋亡细胞的吞噬识别.《国外医
学. 免疫学分册》.1995, (第3期), 第142-145页.

代理人 黄鑫

雷云洁等. IL-8与自身免疫性肝病的关系.
《临床肝胆病杂志》.2019, 第35卷(第2期), 第
411-413页.

(51) Int. Cl.

C12N 5/0787 (2010.01)

A61K 35/15 (2015.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/576 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

王晓春等. 乙型肝炎患者血清IL-1 β 、IL-6
和IL-8水平检测及意义.《实用预防医学》.2002,
第9卷(第4期),

审查员 顾媛媛

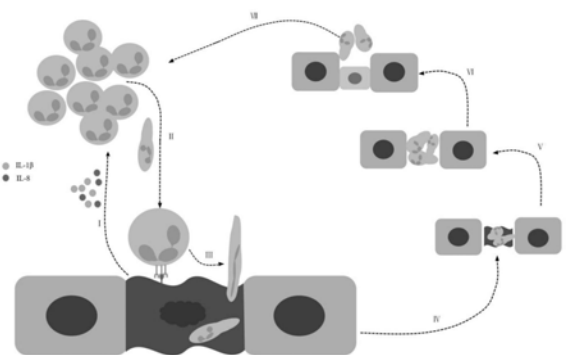
权利要求书1页 说明书17页 附图18页

(54) 发明名称

中性粒细胞在制备治疗和/或预防自身免疫
性肝炎的药物中的用途

(57) 摘要

本发明涉及中性粒细胞在制备治疗和/或预
防自身免疫性肝炎的药物中的用途,属于医药领
域。本发明一方面提供了中性粒细胞在制备治疗
和/或预防自身免疫性肝炎的药物中的用途,以
及在制备清除凋亡肝细胞的药物中的用途。另一
方面,本发明还提供了自身免疫性肝炎的辅助诊
断试剂盒。本发明的应用能够为临床上诊断和治
疗自身免疫肝炎提供新的选择,有助于缓解自身
免疫肝炎对患者造成的病痛,具有重要的社会效
益和经济效益。



1. 中性粒细胞在制备治疗自身免疫性肝炎的药物中的用途。
2. 如权利要求1所述的用途,其特征是:所述的药物是以中性粒细胞为活性成分,加入药学上可接受的辅料或者辅助性成分制备而成的制剂。
3. 如权利要求2所述的用途,其特征是:所述的制剂为静脉注射剂。
4. 如权利要求1~3任意一项所述的用途,其特征是:所述的中性粒细胞为骨髓中性粒细胞和/或外周血中性粒细胞。

中性粒细胞在制备治疗和/或预防自身免疫性肝炎的药物中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及中性粒细胞在制备治疗和/或预防自身免疫性肝炎的药物中的用途，属于医药领域。

背景技术

[0002] 细胞凋亡是细胞程序性死亡过程，清除老化或受损细胞以维持内部组织稳态。在成年人体内，每天有数千亿个细胞凋亡。这些细胞必须迅速有效处理，使细胞质不外泄或不引起炎症反应。清除凋亡细胞缺陷往往与多种炎症反应及自身免疫疾病相关。普遍认为，凋亡细胞是由专业的吞噬细胞（如巨噬细胞、成熟的树突状细胞）或邻近非专业的吞噬细胞（如上皮细胞、内皮细胞和成纤维细胞）清除。尽管在组织学切片中，凋亡细胞的形态容易被区分，但由于吞噬细胞的高效清除作用，凋亡细胞在正常的人组织切片中很少被观察到。因此，在稳定状态下负责清除凋亡细胞的吞噬细胞种类尚未明确，且不知其是否具有组织特异性。

[0003] 中性粒细胞约占人类白细胞的50%-70%，是血液中占比例最高的白细胞，是机体对抗感染和组织损伤的第一道防线。中性粒细胞是一类终末分化且短寿命的细胞，它们起着负责杀死细菌和抵抗感染的炎性细胞的作用，并不被认为在清除凋亡细胞中发挥主要作用。外周血中性粒细胞募集至感染部位，并在感染部位释放有毒介质（例如，活性氧和蛋白酶），能够杀死细菌，但是对组织也有一定的毒害作用。为了预防炎症，凋亡细胞释放“禁止”信号，例如乳铁蛋白，这一信号会阻止中性粒细胞募集至凋亡部位。

[0004] 自体免疫性疾病（Autoimmune disease，缩写为AID），是人体内的异常的免疫反应攻击了正常细胞。目前已知至少有80种自体免疫性疾病影响人类健康。自身免疫性肝炎是由自身免疫反应介导的慢性肝脏炎症疾病，其临床特征为不同程度的血清转氨酶升高、高 γ -球蛋白血症、自身抗体阳性，组织学特征为以淋巴细胞、浆细胞浸润为主的界面性肝炎，严重病例可快速进展为肝硬化和肝衰竭。因此，对自身免疫性肝炎的早期诊断及治疗方案是现在亟待解决的重要问题。

[0005] 迄今，尚未有关于中性粒细胞吞噬凋亡肝细胞的报道，更未见将中性粒细胞用于治疗自身免疫性肝炎的相关报道。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供中性粒细胞在制备治疗和/或预防自身免疫性肝炎的药物中的用途。

[0007] 本发明提供了中性粒细胞在制备治疗和/或预防自身免疫性肝炎的药物中的用途。

[0008] 本发明提供了中性粒细胞在制备清除凋亡肝细胞的药物中的用途。

[0009] 进一步地，所述的药物是以中性粒细胞为活性成分，加入药学上可接受的辅料或

者辅助性成分制备而成的制剂。

[0010] 进一步地,所述的制剂为静脉注射剂。

[0011] 进一步地,所述的中性粒细胞为骨髓中性粒细胞和/或外周血中性粒细胞。

[0012] 本发明提供了自身免疫性肝炎的辅助诊断试剂盒:含有检测凋亡肝细胞中中性粒细胞数量的试剂。

[0013] 本发明提供了以下试剂在制备自身免疫性肝炎的辅助诊断试剂盒中的用途:所述的试剂是检测凋亡肝细胞中中性粒细胞数量的试剂。

[0014] 本发明提供了自身免疫性肝炎的辅助诊断试剂盒:含有中性粒细胞标记物、凋亡肝细胞标记物、细胞膜标记物和细胞核标记物。

[0015] 进一步地,所述的辅助诊断试剂盒含有中性粒细胞弹性蛋白酶抗体、TUNEL染色剂、E-cadherin抗体和DAPI。

[0016] 对于肝组织样本,用TUNEL标记凋亡细胞、中性粒细胞弹性蛋白酶抗体(NE)特异性标记中性粒细胞、E-cadherin抗体标记细胞膜、DAPI标记细胞核,进行免疫荧光染色,能够观察中性粒细胞对凋亡肝细胞的吞噬情况并统计数量,从而反映自身免疫肝炎病人存在的中性粒细胞吞噬缺陷,为自身免疫肝炎的诊断提供依据。

[0017] 本发明提供了以下试剂在制备自身免疫性肝炎的辅助诊断试剂盒中的用途:所述的试剂含有中性粒细胞标记物、凋亡肝细胞标记物、细胞膜标记物和细胞核标记物。

[0018] 进一步地,所述的试剂含有中性粒细胞弹性蛋白酶抗体、TUNEL染色剂、E-cadherin抗体和DAPI。

[0019] 本发明提供了以下试剂在制备自身免疫性肝炎的辅助诊断试剂盒中的用途:所述的试剂含有检测IL-1 β 和/或IL-8血清水平的试剂。

[0020] 进一步地,所述的辅助诊断试剂盒为Elisa试剂盒。

[0021] 本发明提供了上调IL-1 β 和/或IL-8血清水平的活性成分在制备治疗和/或预防自身免疫性肝炎的药物中的用途。

[0022] 本发明通过实验证明,由凋亡L02细胞分泌的IL-1 β 和IL-8是吸引中性粒细胞和诱导随后的吞噬作用的关键信号,IL-1 β 和IL-8下调可能是自身免疫肝炎诱发因素之一。基于这一实验结果,有可能开展相应的自身免疫肝炎临床诊断方法,常规检测自身免疫肝炎病人的IL-1 β 和IL-8血清水平来判断发病程度,从而及时给予相应的治疗。该方法技术性能稳定、可重复性强、结果可靠、能较快明确自身免疫肝炎的病情,对自身免疫肝炎临床诊断与治疗的发展具有重要意义。此外,以上实验结果还发掘出了自身免疫肝炎新的治疗靶点,为自身免疫肝炎药物的筛选提供了另一有效途径。

[0023] 本发明提供了中性粒细胞除杀死细菌和抵抗感染以外的新用途—清除凋亡肝细胞,并且为自身免疫肝炎患者体内凋亡肝细胞的清除缺陷找到了原因,即自身免疫肝炎病人存在中性粒细胞吞噬凋亡肝细胞的缺陷。基于此,本发明提出了自身免疫肝炎更具有针对性的诊断和治疗方法,有助于缓解自身免疫肝炎对患者造成的病痛,具有重要的社会效益和经济效益。本发明还进一步探索了中性粒细胞清除凋亡肝细胞的关键步骤,对自身免疫疾病的发病机制以及早期诊断和治疗有重要贡献。

附图说明

- [0024] 图1为具体实施方式中中性粒细胞钻噬凋亡肝细胞模式图；
- [0025] 图2为实施例1中中性粒细胞清除人正常肝组织中的凋亡肝细胞图；
- [0026] 图3为实施例1中与凋亡肝细胞相关的嗜中性粒细胞和枯否细胞的细胞计数统计图；
- [0027] 图4为实施例1中中性粒细胞钻噬人正常肝组织中的凋亡肝细胞及3D重建图；
- [0028] 图5为实施例1中用抗Ly-6G和抗E-钙粘蛋白抗体对肝脏切片免疫染色图；
- [0029] 图6为实施例1中中性粒细胞相关凋亡肝细胞的电子显微镜图；
- [0030] 图7为实施例1中正常或AIL疾病人体肝脏样本的CD68染色图；
- [0031] 图8为实施例1中中性粒细胞介导的肿瘤非癌肝组织和血管瘤正常肝组织凋亡细胞清除结果图；
- [0032] 图9为实施例1中用CD68抗体染色标记KCS的正常肝组织图；
- [0033] 图10为实施例1中用CD34抗体染色标记内皮细胞的正常肝组织图；
- [0034] 图11为实施例2中pkh67标记的HL-60细胞在指定时间点与pkh26标记的L02细胞相互作用的荧光图；
- [0035] 图12为实施例2中从正常或AIL疾病患者中分离的中性粒细胞对凋亡L02细胞体外吞噬作用的定量检测结果图；
- [0036] 图13为实施例2中从正常或AIL疾病患者中分离的中性粒细胞对凋亡L02细胞体外吞噬作用图；
- [0037] 图14为实施例2中流式细胞术分析HL-60细胞吞噬非凋亡或凋亡L02细胞结果图；
- [0038] 图15为实施例2中凋亡L02细胞与非凋亡L02细胞吞噬能力对照图；
- [0039] 图16为实施例2中HL60细胞对非凋亡或凋亡L02细胞吞噬过程中胞外DNA、SOD和ROS的分析结果图；
- [0040] 图17为实施例3中活体显微镜下的嗜中性粒细胞钻入凋亡肝细胞的图以及Imaris分析结果图；
- [0041] 图18为实施例3中对照组和中性粒细胞缺失小鼠外周血中性粒细胞计数,以及注射抗体后在指定时间的外周中性粒细胞计数结果图；
- [0042] 图19为实施例3中中性粒细胞缺陷组与对照组小鼠肝脏的H&E和TUNEL染色图以及组织样本中嗜中性粒细胞在凋亡肝细胞中或与之相关的细胞计数结果图；
- [0043] 图20为实施例3的组织样本中巨噬细胞在凋亡肝细胞中或与之相关的细胞计数及凋亡细胞计数结果图；
- [0044] 图21为实施例3中对照组或中性粒细胞缺陷小鼠的抗CD11b抗体染色的肝组织的图和定量检测结果图；
- [0045] 图22为实施例3中对照组或中性粒细胞缺陷小鼠的AST、ALT、ALP/AST比值、DBIL和TBIL的肝功能指标检测结果图；
- [0046] 图23为实施例3的Mrp8cre/DTR小鼠中的中性粒细胞缺陷检测结果图；
- [0047] 图24为实施例3中抗核抗原、平滑肌肌动蛋白、肝肾微粒体和总IgG在对照组和中性粒细胞缺陷小鼠血清中的表达结果图；
- [0048] 图25为实施例3中中性粒细胞缺陷组、ConA诱导AIL模型小鼠组以及对照组小鼠肝

脏的H&E和TUNEL染色图；

[0049] 图26为实施例3中对照组、ConA处理组以及将正常中性粒细胞静脉注射至ConA处理组的血清中自身抗体：抗核抗原、平滑肌肌动蛋白、肝肾微粒体和总IgG的表达结果图；

[0050] 图27为实施例3中HL-60细胞对非凋亡L02细胞的吞噬作用，HL60细胞对凋亡L02细胞的吞噬作用，以及用ConA或Annexin V处理后HL60细胞对凋亡L02细胞的吞噬作用检测结果图；

[0051] 图28为实施例3中用ConA或ConA+PMN处理的小鼠肝组织样品的TUNEL和HE染色图及凋亡肝细胞的细胞计数结果图；

[0052] 图29为实施例4中pkh67标记的HL-60细胞在指定时间点与pkh26标记的HUVEC及HEK293细胞相互作用的荧光图；

[0053] 图30为实施例4中巨噬细胞对凋亡肝细胞的清除作用检测结果图；

[0054] 图31为实施例5中NE特异性标记中性粒细胞迁移至凋亡细胞图；

[0055] 图32为实施例5的人正常肝组织切片中MPO特异性标记中性粒细胞迁移至凋亡细胞图；

[0056] 图33为实施例5中细胞因子IL-1 β 、IL-6、IL-8和IL-12在凋亡L02细胞中的表达结果图；

[0057] 图34为实施例5中细胞因子IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 α 、IL-2、IL-4、IL-10和GM-CSF在凋亡L02细胞中的表达结果图；

[0058] 图35为实施例5中非凋亡L02细胞被HL60细胞吞噬，凋亡L02细胞被未经处理或RNAi敲除各种细胞因子受体的HL60细胞吞噬结果图。

具体实施方式

[0059] 中性粒细胞(PMNs)能够通过吞噬、脱粒作用、释放活性氧簇(ROS)以及形成细胞外杀菌网(NETs)清除入侵的细菌，它们起着负责杀死细菌和抵抗感染的炎性细胞的作用。普遍认为，中性粒细胞不在清除凋亡细胞中发挥主要作用。本发明的发明人在临床病理切片中发现，中性粒细胞吞噬凋亡肝细胞这一现象。发现中性粒细胞除杀死细菌和抵抗感染外的新功能，探索中性粒细胞吞噬凋亡细胞的机制，补充完善中性粒细胞的免疫功能，在清除凋亡细胞、维持组织稳态以及治疗自身免疫疾病方面具有重要意义。

[0060] 本发明发现，中性粒细胞以非炎性浸润的方式，并通过钻噬作用(图1)清除凋亡肝细胞，并从以下五个方面予以证实：1) 人类正常肝组织中中性粒细胞钻噬凋亡肝细胞，自身免疫肝炎病例中的中性粒细胞存在钻噬缺陷；2) 中性粒细胞能够在体外清除凋亡肝细胞；3) 建立自身免疫肝炎小鼠模型，研究中性粒细胞的钻噬作用；4) 中性粒细胞对凋亡肝细胞的钻噬作用具有选择性；5) 研究中性粒细胞清除凋亡肝细胞的机制。

[0061] 下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的，按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

[0062] 实施例1人类正常肝组织中中性粒细胞钻噬凋亡肝细胞，自身免疫肝炎病人存在中性粒细胞钻噬缺陷

[0063] 本实施例主要是对比正常人类肝组织样本及自身免疫肝炎肝组织样本,研究中性粒细胞对凋亡肝细胞的清除作用及自身免疫肝病例的中性粒细胞吞噬缺陷,从而揭示中性粒细胞的新功能-清除凋亡细胞。

[0064] 1、实验设计

[0065] (1) 人类正常肝组织中中性粒细胞吞噬凋亡肝细胞的情况

[0066] 本部分实验从肝癌病人中获取其癌旁非癌肝正常组织,1) 对其进行组织切片,采用HE染色以及TUNEL染色,通过观察核固缩程度并统计中性粒细胞及凋亡细胞的数量;2) 对非癌肝正常组织进行组织切片,用TUNEL标记凋亡细胞、中性粒细胞弹性蛋白酶抗体(NE) 特异性标记中性粒细胞、E-cadherin抗体标记细胞膜、DAPI标记细胞核,进行免疫荧光染色,观察中性粒细胞对凋亡细胞的吞噬情况并统计数量;3) 对非癌肝正常组织进行超薄切片,利用透射电镜观察中性粒细胞对凋亡肝细胞的吞噬作用,进一步阐明中性粒细胞对凋亡肝细胞的清除作用。

[0067] (2) 自身免疫肝炎肝组织中中性粒细胞吞噬凋亡肝细胞的情况

[0068] 本部分实验从自身免疫肝炎病人获取肝组织,进行组织切片,1) 采用HE染色以及TUNEL染色,观察核固缩程度并统计中性粒细胞和凋亡细胞的数量;2) 用TUNEL标记凋亡细胞、中性粒细胞弹性蛋白酶抗体(NE) 特异性标记中性粒细胞、E-cadherin抗体标记细胞膜、DAPI标记细胞核,进行免疫荧光染色,观察中性粒细胞对凋亡细胞的吞噬情况并统计数量。阐明自身免疫肝炎病人存在中性粒细胞吞噬缺陷。

[0069] (3) 在人类正常肝组织中其他细胞对凋亡肝细胞的吞噬情况

[0070] 本部分实验从肝细胞癌病人获取其癌旁非癌肝正常组织,对其进行组织切片,1) 用CD68抗体特异性标记KCs;2) 用CD34抗体染色标记内皮细胞,进行免疫荧光染色,通过观察核固缩程度并统计枯否细胞(Kupffer cell, KCs) 及内皮细胞的数量,揭示中性粒细胞是与吞噬凋亡肝细胞相关的主要细胞。

[0071] 2、实验方法

[0072] (1) 人类正常肝组织中中性粒细胞吞噬凋亡肝细胞的情况

[0073] 石蜡包埋与切片

[0074] 将肝癌病人癌旁非癌肝正常组织样品固定在新制备的4%PFA中,石蜡包埋切片,HE染色与TUNEL染色,奥林巴斯DP80正置荧光显微镜观察凋亡肝细胞核形态的变化、中性粒细胞的多形核形态,并检测肝组织切片中中性粒细胞及凋亡细胞的数量及分布关系。

[0075] 冰冻切片及免疫荧光

[0076] 将肝癌病人癌旁非癌肝正常组织样品进行OCT包埋,冰冻后切片,激光共聚焦显微镜检测凋亡肝细胞(TUNEL标记)、中性粒细胞(NE特异性标记),观察中性粒细胞对凋亡肝细胞的吞噬情况并统计数量。

[0077] 超薄切片

[0078] 获取肝癌病人癌旁非癌肝正常组织样品,用含有的2.5%戊二醛的0.1M二甲胍酸盐缓冲液固定,切片,制成超薄切片,用透射电镜观察凋亡肝细胞核形态的变化、中性粒细胞的多形核形态及中性粒细胞与凋亡肝细胞的分布情况。

[0079] (2) 自身免疫肝炎肝组织中中性粒细胞吞噬凋亡肝细胞的情况

[0080] 石蜡包埋与切片

[0081] 将自身免疫肝炎病人肝组织样品固定在新制备的4%PFA中,石蜡包埋切片,HE染色与TUNEL染色,奥林巴斯DP80正置荧光显微镜观察凋亡肝细胞核形态的变化、中性粒细胞的多形核形态,并检测肝组织切片中中性粒细胞及凋亡细胞的数量及分布关系。

[0082] 冰冻切片及免疫荧光

[0083] 将自身免疫肝炎病人肝组织样品进行OCT包埋,冰冻后切片,激光共聚焦显微镜检测凋亡肝细胞(TUNEL标记)、中性粒细胞(NE特异性标记),观察中性粒细胞对凋亡肝细胞的吞噬情况并统计数量。

[0084] (3)在人类正常肝组织中其他细胞对凋亡肝细胞的吞噬情况冰冻切片及免疫荧光

[0085] 将肝癌病人癌旁非癌肝正常组织样品进行OCT包埋,冰冻后切片,激光共聚焦显微镜分别检测凋亡肝细胞(TUNEL标记)与KCs(CD68抗体特异性标记)、内皮细胞(CD34抗体染色标记),观察KCs与内皮细胞在凋亡肝细胞周围的定位情况并统计数量。

[0086] 3、实验结果

[0087] (1)人类正常肝组织中中性粒细胞吞噬凋亡肝细胞

[0088] 本实验在肝细胞癌病人获取的非癌肝组织中发现,大量中性粒细胞存在于肝脏细胞内,被中性粒细胞占领的肝脏细胞是凋亡的,其染色质固缩(图2)。重要的是,凋亡肝细胞很少在人体内发现,其原因可能是吞噬细胞对凋亡细胞的快速清除作用。在来源于32个肝脏样本的共241个凋亡肝细胞中,每个凋亡肝细胞均被多达22个中性粒细胞填满(图2、图3、图4、图5,图4中E-cadherin为红色标记细胞膜染料,DAPI为蓝色标记细胞核染料)。Ly6G抗体免疫荧光染色(图5,图像显示凋亡肝细胞内有Ly-6G阳性中性粒细胞,其中白色箭头表示分裂的凋亡核),以及电子显微镜(图6,膜变形的凋亡核(AN)由白色箭头表示)确认中性粒细胞位于凋亡肝细胞内部。人肝组织凋亡肝细胞中存在的中性粒细胞(PMN)数量(二维图像取自常规组织切片(5 μ m厚),三维图像取自45 μ m厚的组织切片,用共焦显微镜重建)见下表:

[0089] 表1人肝组织凋亡肝细胞中存在的中性粒细胞(PMN)数量

吞噬阶段		—	二	三
2 D 图 像	凋亡肝细胞 (共241)	37	130	74
	吞噬中性粒细胞 (共1716)	312	913	473
	每个凋亡细胞中的中性粒细胞 (平均值 $\pm$ 方差)	8.4 $\pm$ 4.2	7.2 $\pm$ 3.4	6.4 $\pm$ 3.4
3 D 图 像	凋亡肝细胞 (共60)	28	18	14
	吞噬中性粒细胞 (共820)	406	348	66
	每个凋亡细胞中的中性粒细胞 (平均值 $\pm$ 方差)	14.5 $\pm$ 10.0	19.3 $\pm$ 15.5	4.7 $\pm$ 2.4

[0091] (2)自身免疫肝炎病人的中性粒细胞吞噬缺陷

[0092] 自身免疫疾病通常与凋亡细胞清除障碍相关。为了确定自身免疫肝炎病人是否存在中性粒细胞缺陷,对诊断患有AIL疾病的患者的活检样本进行了检查,将人类正常肝组织与自身免疫肝炎病人组织进行HE染色与TUNEL染色或免疫荧光,与对照组正常人群相反,总共22个AIL患者样本中含有未被中性粒细胞吞噬或侵袭的凋亡肝细胞,有更多与巨噬细胞相关的凋亡细胞存在(图5)。由于AIL患者外周血中性粒细胞数量处于正常范围,因此推测:来自AIL疾病患者的中性粒细胞可能存在吞噬能力缺陷。与正常中性粒细胞组对照,来自于AIL患者的中性粒细胞对凋亡L02细胞吞噬能力明显下降(图7、图8,图7中绿色箭头表示巨噬细胞,黑色箭头表示凋亡体,白色箭头表示中性粒细胞;图8中Tune1标记凋亡细胞为绿

色,NE标记中性粒细胞为紫色,E-cad标记细胞膜为红色,DAPI标记细胞核为蓝色)。

[0093] (3) 其他免疫细胞与凋亡肝细胞无明显关联

[0094] KCs是驻留肝脏的单核细胞来源的吞噬细胞,其作用被认为是清除凋亡细胞。利用CD68抗体特异性标记KCs,进行免疫荧光染色,几乎没有KCs侵袭或吞噬凋亡肝细胞(图3、图9)。此外,几乎没有内皮细胞(CD34抗体染色标记)环绕或吞噬凋亡肝细胞(图10)。

[0095] 实施例2体外中性粒细胞对凋亡肝细胞的清除作用

[0096] 本部分研究主要在体外观察中性粒细胞对凋亡肝细胞及其他细胞的吞噬作用,以及中性粒细胞在吞噬过程中细胞内容物外泄情况,从而揭示中性粒细胞对凋亡肝脏细胞的清除作用是通过钻噬作用实现的。

[0097] 1、实验设计

[0098] (1) 在细胞水平研究中性粒细胞对凋亡肝细胞的钻噬作用

[0099] 在本部分体外实验研究中将利用课题组已经建立的人PMN细胞系HL-60、人肝脏细胞L02、HL-60-GFP、L02-Tomato。利用嘌呤霉素或TGF- β 诱导人肝脏细胞L02,1) 用红色膜染料(PKH-26)对L02进行染色,用绿色膜染料(PKH-67)对分化的HL60进行染色。将分化的HL60分别加入正常的L02及凋亡的L02;2) 将分化的HL-60-GFP分别加入正常的L02-Tomato及凋亡的L02-Tomato,利用共聚焦显微镜观察分化的HL60对凋亡的L02细胞的吞噬情况,阐明中性粒细胞是通过钻噬作用对凋亡肝细胞进行清除。

[0100] 从C57BL/6小鼠骨髓中分离小鼠多形核中性粒细胞(PMN),利用嘌呤霉素或TGF- β 诱导人肝脏细胞L02,用红色膜染料(PKH-26)对L02进行染色,用绿色膜染料(PKH-67)对PMN进行染色。将PMN分别加入正常的L02及凋亡的L02,利用共聚焦显微镜观察PMN对凋亡的L02细胞的吞噬情况,阐明小鼠中性粒细胞是通过钻噬作用对凋亡肝细胞进行清除。

[0101] 从正常人及自身免疫肝病人中获取血液样本,分离中性粒细胞,用绿色膜染料(PKH-67)对其进行染色;利用嘌呤霉素或TGF- β 诱导人肝脏细胞L02凋亡,用红色膜染料(PKH-26)对L02进行染色。将中性粒细胞加入凋亡的L02,利用共聚焦显微镜实时拍摄中性粒细胞对凋亡L02的钻噬作用,阐明人中性粒细胞是通过钻噬作用对凋亡肝细胞进行清除,以及进一步说明自身免疫肝炎病人存在中性粒细胞钻噬缺陷。

[0102] (2) 特异性凋亡标志物标记研究中性粒细胞对凋亡肝细胞的吞噬作用

[0103] 本部分实验使用分化的HL60细胞,人肝脏细胞L02。利用嘌呤霉素或TGF- β 诱导人肝脏细胞L02凋亡,用一种pH敏感性染料-PHrodo对分化的HL60细胞进行染色,用绿色膜染料(PKH-67)对L02进行染色。将分化的HL60细胞加入正常的L02与凋亡的L02,通过流式细胞仪分析PHrodo染料与PKH-67染料双阳性部分,进一步量化中性粒细胞对凋亡L02的钻噬作用。

[0104] (3) 中性粒细胞钻噬过程中细胞内容物外泄情况

[0105] 本部分实验使用分化的HL60细胞,人肝脏细胞L02。利用嘌呤霉素或TGF- β 诱导人肝脏细胞L02凋亡,将分化的HL60细胞加入正常的L02与凋亡的L02共培养30min-1h,取其共培养上清,利用检测dsDNA、SOD,ROS的释放状况,阐明中性粒细胞钻噬过程中无内容物外泄,进一步证明中性粒细胞是通过钻噬作用对凋亡肝细胞进行清除。

[0106] 2、实验方法

[0107] (1) 在细胞水平研究中性粒细胞对凋亡肝细胞的钻噬作用

[0108] 诱导细胞凋亡

[0109] 用2.5μg/ml嘌呤霉素处理12h或5ng/ml TGF-β处理18h诱导L02凋亡。

[0110] 小鼠骨髓PMN的提取

[0111] 对小鼠实施安乐死,取出股骨和胫骨,用HBSS加0.1%BSA冲洗,然后将细胞离心并重悬于HBSS中,在通过40μm过滤器过滤后,将3mL HBSS中的细胞加到预先制备的梯度溶液(顶部3mL的Nycoprep、底部3mL的72%Percoll)上。将样品在室温下以2,400rpm离心20分钟,收集中间层并在HBSS中洗涤一次。加入无菌蒸馏水除去红细胞,收集细胞并重悬于HBSS或培养基中。

[0112] 人外周血中性粒细胞的提取

[0113] 用外周血中性粒细胞提取试剂盒提取,加入无菌蒸馏水除去红细胞,收集细胞并重悬于HBSS或培养基中。

[0114] 体外钻噬实验

[0115] 1) 膜染色

[0116] 将L02用红色膜染料(PKH-26)染色,将提取的中性粒细胞、小鼠PMN或HL-60用绿色膜染料(PKH-67)进行染色后加入凋亡的细胞中,用共聚焦显微镜观察中性粒细胞钻入凋亡细胞的情况并对钻入中性粒细胞进行计数。

[0117] 2) 构建细胞系

[0118] 本课题组中前期工作中已经采用慢病毒表达载体pLVX-IRES-ZsGreen1、pLVX-IRES-tdTomato建立了稳定的HL-60-GFP与L02-Tomato细胞。将分化的HL-60-GFP加入凋亡的L02中,用共聚焦显微镜观察中性粒细胞钻入凋亡细胞的情况并对钻入中性粒细胞进行计数。

[0119] (2) 特异性凋亡标志物标记研究中性粒细胞对凋亡肝细胞的吞噬作用

[0120] 流式技术分析

[0121] 用2.5μg/ml嘌呤霉素处理12h或5ng/ml TGF-β处理18h诱导L02凋亡,凋亡的L02用PHrodo-red进行染色,HL-60用绿色膜染料(PKH-67)进行染色后加入凋亡的L02细胞中37℃孵育1h,用流式细胞分析仪定量钻噬作用。

[0122] (3) 中性粒细胞钻噬过程中细胞内容物外泄情况

[0123] ROS检测

[0124] 用2.5μg/ml嘌呤霉素处理12h或5ng/ml TGF-β处理18h诱导L02凋亡,将HL-60加入凋亡的L02中37℃孵育30min-1h,用MitoSOXTM试剂盒检测线粒体ROS的产生。

[0125] dsDNA检测

[0126] 用2.5μg/ml嘌呤霉素处理12h或5ng/ml TGF-β处理18h诱导L02凋亡,将HL-60加入凋亡的L02中37℃孵育30min-1h,用Quant-iTTMPicoGreenTM dsDNA分析试剂盒检测dsDNA的产生。

[0127] SOD检测

[0128] 用2.5μg/ml嘌呤霉素处理12h或5ng/ml TGF-β处理18h诱导L02凋亡,将HL-60加入凋亡的L02中37℃孵育30min-1h,超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒检测SOD的产生。

[0129] 3、实验结果

[0130] (1) 中性粒细胞对凋亡肝细胞的钻噬作用

[0131] 为了研究中性粒细胞介导对活细胞的吞噬,本实验利用嘌呤霉素或TGF- β 诱导人肝细胞L02凋亡,之后加入人PMN细胞系HL-60,用红色膜染料(PKH-26)对L02进行染色,用绿色膜染料(PKH-67)对HL60进行染色。绿色标记的HL60对正常L02细胞无反应(图11)。然而,当L02细胞凋亡时,绿色标记的HL60细胞或是极化并侵袭死细胞或是环绕并一点点啃咬死细胞(图11)。

[0132] 由于AIL患者外周血中性粒细胞数量处于正常范围,推测来自AIL疾病患者的中性粒细胞可能存在吞噬能力缺陷。与正常中性粒细胞组对照,来自于AIL患者的中性粒细胞对凋亡L02细胞吞噬能力明显下降(图12)。正常人中性粒细胞钻入凋亡L02中开始钻噬,而AIL疾病中性粒细胞对于凋亡L02细胞无任何反应(图13)。以上数据证实了,在人类AIL疾病样本中存在缺陷型中性粒细胞介导凋亡肝细胞清除缺陷。

[0133] (2) 量化钻噬凋亡肝细胞的中性粒细胞数量

[0134] 对钻入凋亡L02的中性粒细胞计数或利用PHrodo(一种pH敏感性染料)染色流式技术来量化钻噬,发现HL-60吞噬凋亡肝细胞的数量远大于对正常非凋亡肝细胞钻噬数量(图14、图15,图14中pkh67为绿色标记)。

[0135] (3) 中性粒细胞钻噬过程中无细胞内容物外泄

[0136] 对胞外DNA水平、SOD、ROS进行检测发现,在HL60吞噬凋亡L02细胞过程中,几乎无细胞质或DNA泄露(图16)。

[0137] 实施例3建立自身免疫肝炎小鼠模型,在体内研究中性粒细胞的钻噬作用

[0138] 前期研究已在人自身免疫肝脏疾病(AIL)中观察到中性粒细胞缺陷介导的凋亡细胞清除缺陷,这一缺陷会引起炎症反应并导致自身抗原的产生。本部分研究1) 在小鼠自身免疫肝炎模型中,中性粒细胞的钻噬作用;2) 在小鼠中敲除中性粒细胞后凋亡细胞清除缺陷的程度;3) 恢复中性粒细胞后凋亡细胞清除情况及AIL疾病症状缓解情况。阐明中性粒细胞清除凋亡细胞,维持组织稳态。

[0139] 1、实验设计

[0140] (1) 单/双光子活体显微成像系统在生理条件下研究中性粒细胞对凋亡肝细胞的钻噬作用

[0141] 本部分研究使用课题组已有的C57BL/6小鼠,将小鼠麻醉后,静脉注射抗-Ly6G 1A8 FITC、抗-F4/80PE和AnnexinV,利用单/双光子活体显微成像系统观察生理条件下中性粒细胞对凋亡肝细胞的钻噬作用,用Imaris对细胞内颗粒进行分析,利用3D重构进一步证明中性粒细胞通过钻噬作用来清除凋亡的肝细胞。

[0142] (2) 建立中性粒细胞缺陷小鼠模型,研究中性粒细胞缺陷介导凋亡肝细胞清除缺陷

[0143] 本部分研究采用两种方式进行中性粒细胞敲除:1) 采用腹腔注射抗小鼠Ly6G 1A8抗体耗竭中性粒细胞;2) 采用遗传中性粒细胞消融,表达白喉毒素受体(DTR)的Rosa26iDTR小鼠在Mrp8⁻Cre遗传背景上繁殖。在表达MRP的细胞(主要是粒细胞)中的Cre表达将仅在MRP表达细胞中激活DTR表达。用白喉毒素处理Rosa26iDTR/Mrp8⁻Cre小鼠和C57BL/6小鼠以诱导Mrp8⁺细胞耗竭。利用上述中性粒细胞缺陷小鼠模型,将小鼠麻醉后,1) 取C57BL/6鼠与模型鼠的血清,利用Elisa试剂盒检测抗核抗原(anti-ANA),平滑肌肌动蛋白(anti- α -SMA),肝肾微粒体(anti-LKM)和总IgG抗体(total anti-IgG)表达情况;2) 取C57BL/6鼠与

模型鼠的肝脏组织进行组织切片,采用HE染色及TUNEL染色,观察小鼠肝细胞凋亡情况以及统计与凋亡细胞相关的中性粒细胞数量;3)取C57BL/6小鼠与模型鼠的肝脏组织进行组织切片,利用CD11b及DAPI进行免疫荧光染色,观察小鼠肝脏组织中的巨噬细胞炎症浸润情况;4)取C57BL/6鼠与模型鼠血液,进行肝功能生化检测,分析中性粒细胞缺陷小鼠肝功能损伤情况。阐明中性粒细胞缺陷介导凋亡肝细胞清除缺陷,诱导自身免疫肝炎的发生。

[0144] (3) 建立自身免疫肝脏疾病(AIL)模型,研究体内中性粒细胞的吞噬作用

[0145] 本部分研究分别采用刀豆蛋白(ConA)、Fas1、 α -Galcer等药物干预构建AIL模型。将小鼠麻醉后,1)取C57BL/6鼠与模型鼠的血清,利用Elisa试剂盒检测抗核抗原,平滑肌肌动蛋白,肝肾微粒体和总IgG抗体表达情况,验证模型构建成功;2)取C57BL/6鼠与模型鼠的肝脏组织进行组织切片,采用HE染色及TUNEL染色,观察小鼠肝细胞凋亡情况以及统计与凋亡细胞相关的中性粒细胞数量;3)取C57BL/6鼠与模型鼠的肝脏组织进行冰冻切片,用Cas3特异性标记凋亡细胞、中性粒细胞弹性蛋白酶抗体(NE)特异性标记中性粒细胞、E-cadherin抗体标记细胞膜、DAPI标记细胞核、CD11b特异性标记炎症细胞,进行免疫荧光染色,观察中性粒细胞对凋亡细胞的吞噬情况并统计数量,分析炎症浸润情况。阐明自身免疫肝脏疾病存在中性粒细胞缺陷,以及中性粒细胞缺陷介导凋亡肝细胞清除缺陷。

[0146] (4) 恢复自身免疫肝脏疾病模型中的中性粒细胞,研究中性粒细胞在AIL疾病中的作用

[0147] 本部分研究取C57BL/6小鼠骨髓中性粒细胞,对自身免疫肝脏疾病(AIL)模型小鼠进行静脉注射(Rescue),1)取Rescue小鼠的血清,利用Elisa试剂盒检测抗核抗原,平滑肌肌动蛋白,肝肾微粒体和总IgG抗体表达情况;2)取Rescue小鼠的肝脏组织进行组织切片,采用HE染色及TUNEL染色,观察小鼠肝细胞凋亡情况以及统计与凋亡细胞相关的中性粒细胞数量。阐明自身免疫肝炎能通过恢复中性粒细胞数目而降低疾病指标及凋亡细胞数量。

[0148] 2、实验方法

[0149] (1) 单/双光子活体显微成像系统在生理条件下研究中性粒细胞对凋亡肝细胞的吞噬作用

[0150] 活体显微成像

[0151] 在成像前1小时将小鼠麻醉,把新制备的抗Ly6G 1A8 FITC抗体,抗F4/80PE抗体和AnnexinV静脉注射到小鼠中。成像前再次麻醉小鼠,对小鼠进行中线剖腹手术,将皮肤中的所有血管进行烧灼,随后切割肝脏和横膈膜之间的镰状韧带,暴露肝脏右叶。用单/双光子活体显微成像系统观察凋亡细胞(Annexin V,蓝色),Kupffer细胞(抗-F4/80,红色)和中性粒细胞(抗Ly-6G 1A8,绿色),分析中性粒细胞钻入凋亡肝细胞的情况,利用Imaris对胞内颗粒进行分析,利用3D模拟重建。

[0152] (2) 建立中性粒细胞缺陷小鼠模型,研究中性粒细胞缺陷介导凋亡肝细胞清除缺陷

[0153] 抗体清除小鼠PMN

[0154] 用500 μ g抗小鼠Ly6G抗体(1A8 clone)或阴性对照抗体(2A3 clone)腹腔注射,每48h注射一次,连续一个月。

[0155] 遗传背景下的小鼠PMN清除

[0156] 将表达白喉毒素受体(DTR)的Rosa26i⁻DTR小鼠在Mrp8⁻Cre遗传背景上繁殖。在表

达MRP的细胞(主要是粒细胞)中的Cre表达将仅在MRP表达细胞中激活DTR表达。在3个月时,用白喉毒素(DT,20ng/每天,持续3天)处理Rosa26iDTR/Mrp8-Cre小鼠和C57BL/6小鼠以诱导Mrp8⁺细胞清除。

[0157] Elisa检测自身抗原

[0158] 将小鼠麻醉后,取小鼠外周血并分离血清,利用Elisa试剂盒检测抗核抗原(anti-ANA),平滑肌肌动蛋白(anti- α -SMA),肝肾微粒体(anti-LKM)和总IgG抗体(total anti-IgG)。

[0159] 石蜡包埋与切片

[0160] 将小鼠麻醉后,取中性粒细胞缺陷小鼠与C57BL/6小鼠肝脏样品固定在新制备的4%PFA中,石蜡包埋切片,HE染色与TUNEL染色,奥林巴斯DP80正置荧光显微镜观察凋亡肝细胞核形态的变化、中性粒细胞的多形核形态,并检测肝组织切片中中性粒细胞及凋亡细胞的数量及分布关系。

[0161] 冰冻切片及免疫荧光

[0162] 将小鼠麻醉后,取中性粒细胞缺陷小鼠与C57BL/6小鼠肝脏样品进行OCT包埋,冰冻后切片,激光共聚焦显微镜分别检测炎性细胞(CD11b标记)与细胞核(DAPI标记),观察观察小鼠肝脏组织中的巨噬细胞炎性浸润情况。

[0163] 肝功能生化检测

[0164] 将小鼠麻醉后,取小鼠外周血,将样品送到生物技术公司进行肝功能生化检测,分析中性粒细胞缺陷小鼠肝功能损伤情况。

[0165] (3)建立自身免疫肝脏疾病(AIL)模型,研究体内中性粒细胞的吞噬作用刀豆蛋白(ConA)诱导小鼠自身免疫肝脏疾病(AIL)模型

[0166] 将小鼠麻醉后,给小鼠静脉内注射伴刀豆球蛋白A(ConA,20mg/kg),8小时后进行后续实验。

[0167] Fas1诱导小鼠自身免疫肝脏疾病(AIL)模型

[0168] 将小鼠麻醉后,静脉注射0.25mg/kg可溶性fas1,一周后取肝进行后续实验。 α -Galcer诱导小鼠自身免疫肝脏疾病(AIL)模型

[0169] 将 α -Galcer以终浓度0.2mg/ml溶解于含有0.5%Tween20的PBS中,置于玻璃管中超声至完全溶解。将小鼠麻醉后,腹腔注射 α -Galcer,2 μ g/只。10天后取肝,进行后续实验。

[0170] Elisa检测自身抗原

[0171] 将小鼠麻醉后,取前述模型小鼠与C57BL/6小鼠外周血并分离血清,利用Elisa试剂盒检测抗核抗原(anti-ANA),平滑肌肌动蛋白(anti- α -SMA),肝肾微粒体(anti-LKM)和总IgG(total anti-IgG),分析药物干预构建AIL模型是否成功。

[0172] 石蜡包埋与切片

[0173] 将小鼠麻醉后,取前述模型小鼠与C57BL/6小鼠肝脏样品固定在新制备的4%PFA中,石蜡包埋切片,HE染色与TUNEL染色,奥林巴斯DP80正置荧光显微镜观察小鼠肝细胞凋亡情况以及统计与凋亡细胞相关的中性粒细胞数量。

[0174] 冰冻切片及免疫荧光

[0175] 将肝癌病人癌旁非癌肝正常组织样品进行OCT包埋,冰冻后切片,激光共聚焦显微镜检测凋亡肝细胞(Cas3特异性标记标记)、中性粒细胞(NE特异性标记)、炎性细胞(CD11b

特异性标记),观察中性粒细胞对凋亡肝细胞的吞噬情况并统计数量,分析炎症浸润情况。

[0176] (4)恢复自身免疫肝脏疾病模型中的中性粒细胞,研究中性粒细胞在AIL疾病中的作用

[0177] 恢复AIL疾病小鼠中的中性粒细胞

[0178] 按照前述方法取C57BL/6小鼠骨髓PMN,将模型小鼠麻醉后把PMN (2×10^6 /只) 内眦静脉注射入自身免疫肝脏疾病(AIL)模型小鼠中。

[0179] Elisa检测自身抗原

[0180] 静脉注射PMN 12h后,将小鼠麻醉,取小鼠外周血并分离血清,利用Elisa试剂盒检测抗核抗原(anti-ANA),平滑肌肌动蛋白(anti- α -SMA),肝肾微粒体(anti-LKM)和总IgG抗体(total anti-IgG)。

[0181] 石蜡包埋与切片

[0182] 静脉注射PMN 12h后,将小鼠麻醉,取小鼠肝脏样品固定在新制备的4%PFA中,石蜡包埋切片,HE染色与TUNEL染色,奥林巴斯DP80正置荧光显微镜观察小鼠肝细胞凋亡情况以及统计与凋亡细胞相关的中性粒细胞数量。

[0183] 3、实验结果

[0184] (1)在生理条件下中性粒细胞对凋亡肝细胞有吞噬作用

[0185] 利用双光子显微镜(图17,其中,中性粒细胞用静脉注射抗Ly6G抗体(绿色)标记,KCs用抗F4/80抗体(红色)标记,凋亡细胞用膜联蛋白V(蓝色)标记),Ly6G抗体免疫荧光染色(图5),以及电子显微镜(图6)确认中性粒细胞位于凋亡肝细胞内部。3D重建图像明确显示了凋亡肝细胞中的中性粒细胞。

[0186] (2)中性粒细胞缺陷小鼠模型中,中性粒细胞缺陷介导凋亡肝细胞清除缺陷

[0187] 对利用抗体或遗传方式敲除中性粒细胞是否影响对凋亡肝细胞的清除进行检测。抗体敲除可使中性粒细胞敲除率达90%以上(图18)。本实验分析了中性粒细胞敲除以及对对照组小鼠的肝脏样本,对其进行HE染色。与人类肝脏样本相似,对照组小鼠凋亡肝细胞被中性粒细胞占据并吞噬(图19,其中,黑色箭头表示凋亡体,白色箭头表示中性粒细胞,绿色箭头表示巨噬细胞)。中性粒细胞敲除后,凋亡细胞不在与中性粒细胞相关(图20)。然而,本实验发现在中性粒细胞敲除样本中,巨噬细胞与凋亡肝细胞相关(图20),这说明了在缺失中性粒细胞的情况下,巨噬细胞发挥其代偿作用,吞噬凋亡肝细胞。与对照组相比,中性粒细胞敲除样本中凋亡肝细胞所占比例明显增加(图20)。因此,在小鼠肝脏中,中性粒细胞敲除影响凋亡细胞的清除。

[0188] (3)在中性粒细胞缺陷小鼠模型中,肝脏组织有明显的炎症反应且肝功能损伤

[0189] 与未处理对照组相比,在中性粒细胞敲除鼠肝脏中发现明显的炎症反应(图21,绿色为抗CD11b抗体染色)以及肝功能的损伤(天冬氨酸氨基转移酶和丙氨酸氨基转移酶活性增加,总胆红素和直接胆红素水平升高)(图22)。在MRP8Cre/DTR基因敲除小鼠中有相同结果(图23,其中,图23A-图23C显示Mrp8cre/DTR小鼠及C57BL/6小鼠外周血中的中性粒细胞(图23A)、淋巴细胞(图23B)和单核细胞(图23C)的计数;图23D-图23E显示Mrp8cre/DTR小鼠及C57BL/6小鼠中天冬氨酸转氨酶(AST,D)、丙氨酸转氨酶(ALT,E)的肝功能分析结果;图23F-图23H显示Mrp8cre/DTR小鼠及C57BL/6小鼠肝样本中嗜中性粒细胞(F)和巨噬细胞(G)的细胞计数或与凋亡肝细胞(H)相关的细胞计数)。

[0190] (4) 中性粒细胞缺陷小鼠的自身抗体累积

[0191] 自身免疫疾病通常与凋亡细胞清除障碍相关。本实验的目的是确定缺陷型中性粒细胞介导凋亡细胞清除是否与AIL疾病相关。与对照组相比,检测到了16只中性粒细胞敲除小鼠中有6只小鼠自身抗体(即抗核抗原,平滑肌肌动蛋白,肝肾微粒体和总IgG抗体)增加约2-3倍(图24)。因此,中性粒细胞敲除不仅影响凋亡肝细胞清除,还导致自身抗体的产生,这说明了在AIL疾病中,缺失中性粒细胞介导清除凋亡细胞缺陷。

[0192] (5) 自身免疫肝脏疾病(AIL)模型小鼠体内中性粒细胞存在钻噬作用

[0193] 用刀豆蛋白处理小鼠会引起小鼠急性肝损伤,本实验利用刀豆蛋白进行药物干预模拟人类的AIL疾病。刀豆蛋白处理后,肝脏中的凋亡肝细胞数量明显增加(图20、图25,图25中黑色箭头表示凋亡体,白色箭头表示中性粒细胞,绿色箭头表示巨噬细胞),自身抗体表达增加(图26),与此同时,与凋亡细胞相关的中性粒细胞的显著减少(图19、图25)。体外吞噬作用分析表明刀豆蛋白明显抑制了中性粒细胞介导的凋亡肝细胞的清除(图27)。

[0194] 脂质磷脂酰丝氨酸(PtdSer)是凋亡清除的“吃我”信号。本实验发现利用AnnexinV覆盖PtdSer会影响中性粒细胞介导的凋亡肝细胞清除(图27),这表明,钻入的中性粒细胞可识别基于肝细胞膜内部的PtdSer。

[0195] (6) 恢复自身免疫肝脏疾病模型中的中性粒细胞,中性粒细胞清除凋亡肝细胞

[0196] 为了研究刀豆蛋白所引起的表型能否通过恢复中性粒细胞数目而得到缓和。本实验对ConA模型小鼠静脉注射正常中性粒细胞,恢复了中性粒细胞对凋亡肝细胞的清除作用(图28,其中黑色箭头表示凋亡体,白色箭头表示中性粒细胞,绿色箭头表示巨噬细胞)并降低刀豆蛋白处理小鼠体内自身抗体水平(图26),上述表明刀豆蛋白所引起表型有所缓和。

[0197] 实施例4中性粒细胞对凋亡肝细胞的钻噬作用具有选择性

[0198] 前期研究发现中性粒细胞通过钻噬作用来清除凋亡的肝脏细胞。本部分研究主要观察中性粒细胞吞噬其他非肝脏细胞的情况以及其他免疫细胞对凋亡肝脏细胞的吞噬情况,阐明中性粒细胞对凋亡肝细胞的钻噬具有选择性。

[0199] 1、实验设计

[0200] (1) 细胞水平上研究中性粒细胞对凋亡肝细胞的钻噬选择性

[0201] 本部分实验使用课题组已经建立的人PMN细胞系HL-60、HL-60-GFP、巨噬细胞RAW264.7、RAW264.7-GFP、人肝脏细胞L02、L02-Tomato、内皮细胞HUVEC、HUVEC-Tomato、上皮细胞HEK293、HEK293-Tomato、心肌细胞HCM、HCM-Tomato、胰岛β细胞、胰岛β细胞-Tomato。本实验1) 利用嘌呤霉素或TGF-β诱导人肝脏细胞L02、内皮细胞HUVEC、上皮细胞HEK293、心肌细胞HCM、胰岛β细胞凋亡,分别用红色膜染料(PKH-26)对L02、HUVEC、HEK293、HCM、胰岛β细胞进行染色,用绿色膜染料(PKH-67)对分化的HL60进行染色,将分化的HL60分别加入正常的L02及凋亡的L02、HUVEC、HEK293、HCM、胰岛β细胞,利用共聚焦显微镜观察分化的HL60对凋亡的L02、HUVEC、HEK293、HCM、胰岛β细胞的吞噬情况;2) 利用嘌呤霉素或TGF-β诱导人肝脏细胞L02-Tomato、内皮细胞HUVEC-Tomato、上皮细胞HEK293-Tomato、心肌细胞HCM-Tomato、胰岛β细胞-Tomato凋亡,将分化的HL60-GFP分别加入正常的L02-Tomato及凋亡的L02-Tomato、HUVEC-Tomato、HEK293-Tomato、HCM-Tomato、胰岛β细胞-Tomato,利用共聚焦显微镜观察分化的HL60对凋亡的L02、HUVEC、HEK293、HCM、胰岛β细胞的吞噬情况;3) 嘌呤霉素或TGF-β诱导人肝脏细胞L02凋亡,用红色膜染料(PKH-26)对L02进行染色,用绿色膜染料

(PKH-67)对RAW264.7进行染色,将RAW264.7加入正常的L02及凋亡的L02,利用共聚焦显微镜观察RAW264.7对凋亡的L02的吞噬情况;4) 嘌呤霉素或TGF- β 诱导人肝脏细胞L02-Tomato凋亡,将RAW264.7-GFP加入正常的L02-Tomato及凋亡的L02-Tomato,利用共聚焦显微镜观察RAW264.7对凋亡的L02的吞噬情况。阐明中性粒细胞对凋亡肝细胞的钻噬作用具有选择性。

[0202] (2) 分子水平上研究中性粒细胞对凋亡肝细胞的钻噬选择性

[0203] 本部分实验1) 取正常人与自身免疫肝炎病人血样,采用基因芯片检测其总RNA表达情况;2) 利用嘌呤霉素或TGF- β 诱导人肝脏细胞L02凋亡,将正常L02与凋亡L02进行基因芯片检测,分析其总RNA表达情况;3) 利用嘌呤霉素或TGF- β 诱导人肝脏细胞L02、内皮细胞HUVEC、上皮细胞HEK293、心肌细胞HCM、胰岛 β 细胞凋亡,提取正常L02、HUVEC、HEK293、HCM、胰岛 β 细胞与凋亡L02、HUVEC、HEK293、HCM、胰岛 β 细胞的cDNA,对E-CAD、E-selectin、L-selectin、Pecam、P-selectin、ICAM1、IL-1 β 、IL-8、INTA2、INTA6、INTB1、INTB4、P-CAD等基因进行荧光定量PCR,对比两组实验,观察基因表达变化情况。阐明中性粒细胞对凋亡肝细胞的钻噬选择性。

[0204] 2、实验方法

[0205] (1) 细胞水平上研究中性粒细胞对凋亡肝细胞的钻噬选择性

[0206] 体外钻噬实验

[0207] 1) 膜染色

[0208] 利用嘌呤霉素或TGF- β 诱导人肝脏细胞L02、内皮细胞HUVEC、上皮细胞HEK293、心肌细胞HCM、胰岛 β 细胞凋亡后,用红色膜染料(PKH-26)对其进行染色,将HL-60或巨噬细胞RAW264.7用绿色膜染料(PKH-67)进行染色后分别加入凋亡的细胞中,用共聚焦显微镜观察中性粒细胞或巨噬细胞钻入凋亡细胞的情况并对钻入中性粒细胞进行计数。

[0209] 2) 构建细胞系

[0210] 本课题组前期工作中已经采用慢病毒表达载体pLVX-IRES-ZsGreen1、pLVX-IRES-tdTomato建立了稳定的HL-60-GFP、RAW264.7-GFP、L02-Tomato、HUVEC-Tomato、HEK293-Tomato、HCM-Tomato、胰岛 β 细胞-Tomato。将分化的HL-60-GFP或RAW264.7-GFP分别加入凋亡的L02-Tomato、HUVEC-Tomato、HEK293-Tomato、HCM-Tomato、胰岛 β 细胞-Tomato中,用共聚焦显微镜观察中性粒细胞或巨噬细胞钻入凋亡细胞的情况并对钻入中性粒细胞进行计数。

[0211] (2) 分子水平上研究中性粒细胞对凋亡肝细胞的钻噬选择性

[0212] 基因芯片检测

[0213] 取正常人与自身免疫肝炎病人血样,采用基因芯片检测其总RNA表达情况;利用嘌呤霉素或TGF- β 诱导人肝脏细胞L02凋亡,将正常L02与凋亡L02进行基因芯片检测,分析其总RNA表达情况。

[0214] 荧光定量PCR

[0215] 提取正常L02、HUVEC、HEK293、HCM、胰岛 β 细胞与凋亡L02、HUVEC、HEK293、HCM、胰岛 β 细胞的cDNA,对E-CAD、E-selectin、L-selectin、Pecam、P-selectin、ICAM1、IL-1 β 、IL-8、INTA2、INTA6、INTB1、INTB4、P-CAD等基因进行荧光定量PCR,对比两组实验,观察基因表达变化情况。

[0216] 3、实验结果

[0217] 为了探究HL-60是否吞噬其他凋亡细胞,对HL-60对凋亡内皮细胞HUVEC和凋亡上皮细胞HEK293的吞噬能力进行检测。与对照组相比,并未发现HL-60对这些细胞的吞噬作用(图14、图29),说明中性粒细胞对凋亡肝细胞的吞噬具有选择性。重要的是,本实验利用人外周血中性粒细胞或小鼠骨髓中性粒细胞得到了相同的结果(图30,分别显示:正常小鼠与中性粒细胞缺陷小鼠肝脏切片,F4\80-红色,NE-绿色,DAPI-蓝色;人正常肝组织切片(左)与自身免疫肝炎病人肝组织切片(右);小鼠中性粒细胞、HL-60和巨噬细胞对凋亡L02细胞的吞噬作用的定量检测结果)。通过对比HL-60和巨噬细胞RAW264.7对凋亡肝细胞的吞噬能力,发现RAW细胞对凋亡L02细胞吞噬能力远低于HL-60(图30),这一结果与中性粒细胞在介导凋亡肝细胞清除中发挥主要作用一致。

[0218] 实施例5中性粒细胞清除凋亡肝细胞的主要机制

[0219] 前期研究发现中性粒细胞通过钻噬作用来清除凋亡肝细胞,保持了凋亡细胞的完整性。本部分实验旨在确认中性粒细胞响应细胞因子及趋化因子进行非炎性浸润迁移至凋亡细胞处,通过钻噬作用进一步清除作用凋亡细胞。阐明中性粒细胞迁移至凋亡部位的信号通路以及中粒细胞通过钻噬作用清除凋亡细胞的主要机制,揭示中性粒细胞的新功能-凋亡细胞清除对自身免疫病的发病机制和治疗有重要作用。

[0220] 1、实验设计

[0221] (1) 研究中心粒细胞迁移至凋亡肝细胞的信号通路

[0222] 本部分研究1)从自身免疫肝炎病人及肝癌病人癌旁非癌肝正常组织中获取肝组织样品,对其进行组织切片,用Cas 3抗体特异性标记凋亡细胞、MPO抗体特异性标记中性粒细胞、DAPI标记细胞核,进行免疫荧光染色,观察中性粒细胞响应凋亡信号进行迁移的情况;2)取正常人及自身免疫肝炎病人外周血,采用基因芯片检测其总RNA表达情况;3)根据基因芯片检测结果,用嘌呤霉素或TGF- β 诱导人肝脏细胞L02凋亡,采用Elisa检测凋亡L02细胞与正常L02细胞中IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-12、GM-CSF、IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 α 、IL-2、IL-4以及IL-10的表达变化情况;4)利用嘌呤霉素或TGF- β 诱导人肝脏细胞L02凋亡,提取正常L02与凋亡L02的cDNA,对E-CAD、E-selectin、L-selectin、Pecam、P-selectin、ICAM1、IL-1 β 、IL-8、INTA2、INTA6、INTB1、INTB4、P-CAD等基因进行荧光定量PCR,对比两组实验,观察基因表达变化情况,筛选吸引中性粒细胞迁移至凋亡肝细胞的信号。

[0223] (2) 中性粒细胞通过非炎性浸润迁移至凋亡肝细胞处

[0224] 本部分研究从自身免疫肝炎病人及肝癌病人癌旁非癌肝正常组织中获取肝组织样品,对其进行组织切片,1)采用HE染色,观察炎性浸润情况;2)利用CD11b抗体特异性标记炎性细胞、CD45RA抗体特异性标记淋巴细胞、MPO抗体特异性标记中性粒细胞、E-cadherin抗体标记细胞膜、DAPI标记细胞核,进行免疫荧光染色,观察炎性浸润情况。阐明中性粒细胞通过非炎性浸润迁移至凋亡肝细胞处。

[0225] (3) IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-12、E-CAD、E-selectin、L-selectin、Pecam、P-selectin、ICAM1缺陷细胞对中性粒细胞钻噬凋亡肝细胞的影响

[0226] 在本部分体外实验研究中将利用课题组已经建立的人PMN细胞系HL-60、IL-1 $\beta^{-/-}$ HL-60、IL-6 $^{-/-}$ HL-60、IL-8 $^{-/-}$ HL-60、IL-12 $^{-/-}$ HL-60、SELE $^{-/-}$ HL-60、SELP $^{-/-}$ HL-60、SELL $^{-/-}$ HL-60、CDH1 $^{-/-}$ HL-60、CDH3 $^{-/-}$ HL-60、PECAM $^{-/-}$ HL-60、ICAM1 $^{-/-}$ HL-60细胞,用嘌呤霉素或TGF- β 诱

导人肝脏细胞L02凋亡,1)用红色膜染料(PKH-26)对L02进行染色,用绿色膜染料(PKH-67)对HL-60、IL-1 β ^{-/-}HL-60、IL-6^{-/-}HL-60、IL-8^{-/-}HL-60、IL-12^{-/-}HL-60、SELE^{-/-}HL-60、SELP^{-/-}HL-60、SELL^{-/-}HL-60、CDH1^{-/-}HL-60、CDH3^{-/-}HL-60、PECAM^{-/-}HL-60、ICAM1^{-/-}HL-60细胞进行染色。将以上HL-60细胞与凋亡L02及正常L02共培养,利用共聚焦显微镜观察并比较HL60对凋亡的L02细胞的吞噬情况;2)用pH敏感性染料-PHrodo对HL-60、IL-1 β ^{-/-}HL-60、IL-6^{-/-}HL-60、IL-8^{-/-}HL-60、IL-12^{-/-}HL-60、SELE^{-/-}HL-60、SELP^{-/-}HL-60、SELL^{-/-}HL-60、CDH1^{-/-}HL-60、CDH3^{-/-}HL-60、PECAM^{-/-}HL-60、ICAM1^{-/-}HL-60细胞进行染色,用绿色膜染料(PKH-67)对L02进行染色。将HL-60、IL-1 β ^{-/-}HL-60、IL-6^{-/-}HL-60、IL-8^{-/-}HL-60、IL-12^{-/-}HL-60、SELE^{-/-}HL-60、SELP^{-/-}HL-60、SELL^{-/-}HL-60、CDH1^{-/-}HL-60、CDH3^{-/-}HL-60、PECAM^{-/-}HL-60、ICAM1^{-/-}HL-60细胞分别加入正常的L02及凋亡的L02,通过流式技术分析PHrodo染料与PKH-67染料重叠部分,进一步量化中性粒细胞对凋亡L02的吞噬作用。阐明由凋亡L02细胞分泌的IL-1 β 和IL-8是吸引中性粒细胞和诱导随后的吞噬作用的关键信号。

[0227] 2、实验方法

[0228] (1) 中性粒细胞迁移至凋亡肝细胞的信号通路

[0229] 冰冻切片及免疫荧光

[0230] 将肝癌病人癌旁非癌肝正常组织样品与自身免疫肝炎肝脏组织样品进行OCT包埋,冰冻后切片,激光共聚焦显微镜检测凋亡细胞(Cas3特异性标记)、中性粒细胞(MPO特异性标记)、细胞核(DAPI标记),观察中性粒细胞响应凋亡信号进行迁移的情况。

[0231] 基因芯片检测

[0232] 取正常人及自身免疫肝炎病人外周血,采用基因芯片检测其总RNA表达情况。

[0233] ELisa细胞因子筛选

[0234] 用嘌呤霉素或TGF- β 诱导人肝脏细胞L02凋亡,用人类多种炎症细胞因子Elisa分析试剂盒检测凋亡L02细胞与正常L02细胞中IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-12、GM-CSF、IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 α 、IL-2、IL-4以及IL-10的表达变化情况。

[0235] 荧光定量PCR

[0236] 提取正常L02与凋亡L02的cDNA,对E-CAD、E-selectin、L-selectin、Pecam、P-selectin、ICAM1、IL-1 β 、IL-8、INTA2、INTA6、INTB1、INTB4、P-CAD等基因进行荧光定量PCR,对比两组实验,观察基因表达变化情况,筛选吸引中性粒细胞迁移至凋亡肝细胞的信号。

[0237] (2) 中性粒细胞通过非炎性浸润迁移至凋亡肝细胞处

[0238] 石蜡包埋与切片

[0239] 将肝癌病人癌旁非癌肝正常组织样品与自身免疫肝炎肝脏组织样品固定在新制备的4%PFA中,石蜡包埋切片,HE染色与TUNEL染色,奥林巴斯DP80正置荧光显微镜观察中性粒细胞炎性浸润情况。

[0240] 冰冻切片及免疫荧光

[0241] 将肝癌病人癌旁非癌肝正常组织样品与自身免疫肝炎肝脏组织样品进行OCT包埋,冰冻后切片,激光共聚焦显微镜分别检测炎性细胞(CD11b标记)、淋巴细胞(CD45RA抗体特异性标记)、中性粒细胞(MPO抗体特异性标记)、细胞膜(E-cad特异性标记)、细胞核(DAPI标记),观察观察人类肝脏组织中的巨噬细胞炎性浸润情况。

[0242] (3) IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-12缺陷细胞对中性粒细胞吞噬凋亡肝细胞的影响构建

细胞系

[0243] 本课题组中前期工作中已经建立HL-60、IL-1 β ^{-/-}HL-60、IL-6^{-/-}HL-60、IL-8^{-/-}HL-60、IL-12^{-/-}HL-60、SELE^{-/-}HL-60、SELP^{-/-}HL-60、SELL^{-/-}HL-60、CDH1^{-/-}HL-60、CDH3^{-/-}HL-60、PECAM^{-/-}HL-60、ICAM1^{-/-}HL-60细胞系。

[0244] 膜染色

[0245] 利用嘌呤霉素或TGF- β 诱导人肝脏细胞L02凋亡,将凋亡的L02用红色膜染料(PKH-26)染色,将HL-60、IL-1 β ^{-/-}HL-60、IL-6^{-/-}HL-60、IL-8^{-/-}HL-60、IL-12^{-/-}HL-60、SELE^{-/-}HL-60、SELP^{-/-}HL-60、SELL^{-/-}HL-60、CDH1^{-/-}HL-60、CDH3^{-/-}HL-60、PECAM^{-/-}HL-60、ICAM1^{-/-}HL-60用绿色膜染料(PKH-67)进行染色后分别加入凋亡的L02中,用共聚焦显微镜观察不同基因沉默的HL60对凋亡的L02细胞的吞噬情况。

[0246] 流式技术分析

[0247] 用2.5 μ g/ml嘌呤霉素处理12h或5ng/ml TGF- β 处理18h诱导L02凋亡,凋亡的L02用Phrodo-red进行染色,HL-60、IL-1 β ^{-/-}HL-60、IL-6^{-/-}HL-60、IL-8^{-/-}HL-60、IL-12^{-/-}HL-60、SELE^{-/-}HL-60、SELP^{-/-}HL-60、SELL^{-/-}HL-60、CDH1^{-/-}HL-60、CDH3^{-/-}HL-60、PECAM^{-/-}HL-60、ICAM1^{-/-}HL-60用绿色膜染料(PKH-67)进行染色后分别加入凋亡的L02细胞中37 $^{\circ}$ C孵育1h,用流式细胞分析仪定量吞噬作用。

[0248] 3、实验结果

[0249] 本实验发现中性粒细胞迁移至凋亡细胞处(图31、图32,图31中左图显示人正常肝组织切片,右图显示自身免疫肝炎病人肝组织切片,NE-红色,E-Cad-紫色,Tunel-绿色,DAPI-蓝色;图32中MPO-红色,Tunel-绿色,DAPI-蓝色)。为了确认吸引中性粒细胞迁移至凋亡肝细胞的信号,对L02凋亡前后细胞因子以及趋化因子进行了筛选。凋亡L02细胞IL-1 β 、IL-6、IL-8以及IL-12表达显著上调(图33)。相反,GM-CSF,IFN- γ ,TNF- α ,IL-1 α ,IL-2,IL-4,以及IL-10无明显变化(图34)。

[0250] 为了明确这些上调细胞因子的作用,敲低HL60的IL-1 β 、IL-6、IL-8以及IL-12受体,检测其吞噬能力。敲低IL-1 β 受体,HL60丧失对凋亡L02吞噬能力;敲低IL-8受体,吞噬效率降低40%;调低其他细胞因子受体对HL-60吞噬能力无明显影响(图35)。因此,由凋亡L02细胞分泌的IL-1 β 和IL-8是吸引中性粒细胞和诱导随后的吞噬作用的关键信号。

[0251] 以上实验结果表明,由凋亡L02细胞分泌的IL-1 β 和IL-8是吸引中性粒细胞和诱导随后的吞噬作用的关键信号,IL-1 β 和IL-8下调可能是自身免疫肝炎诱发因素之一。

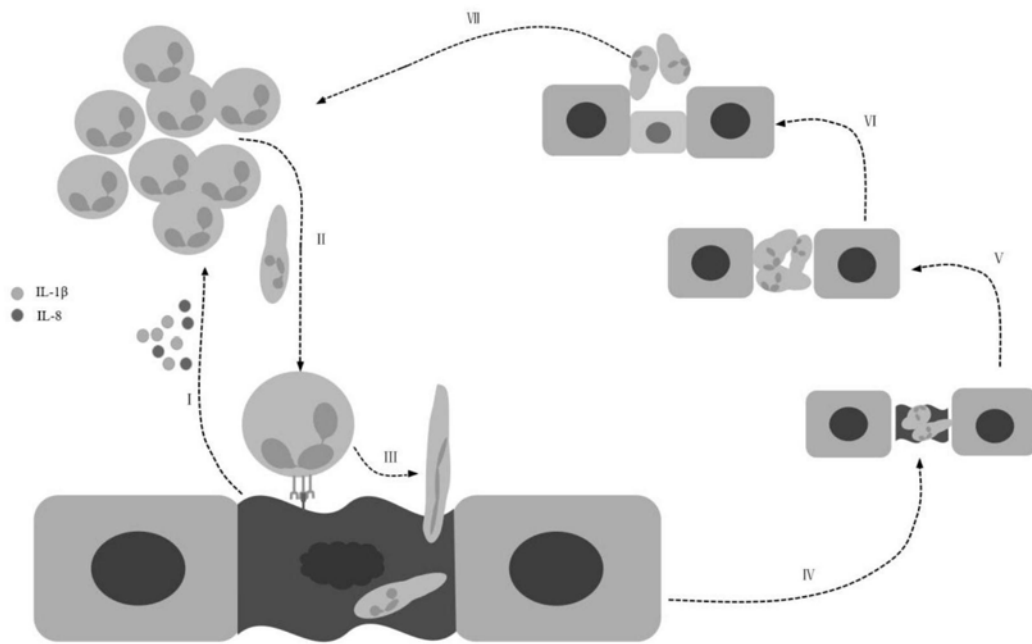


图1

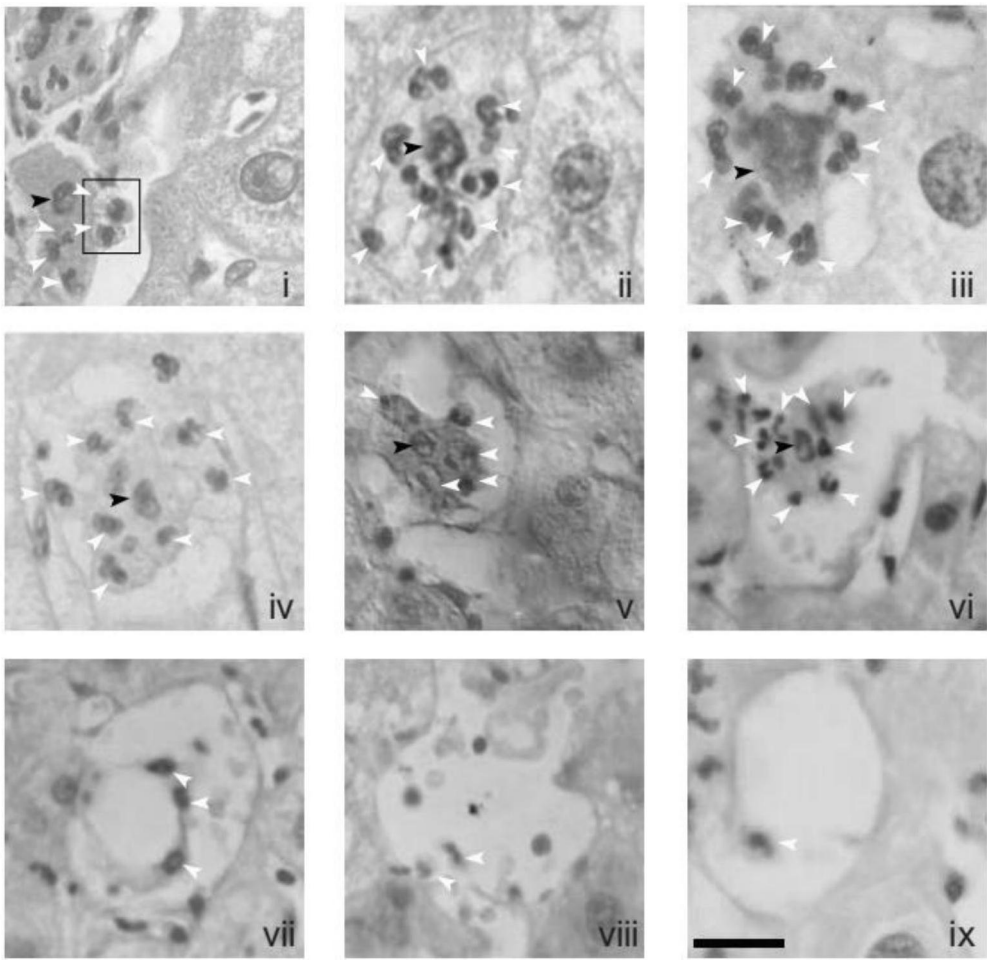


图2

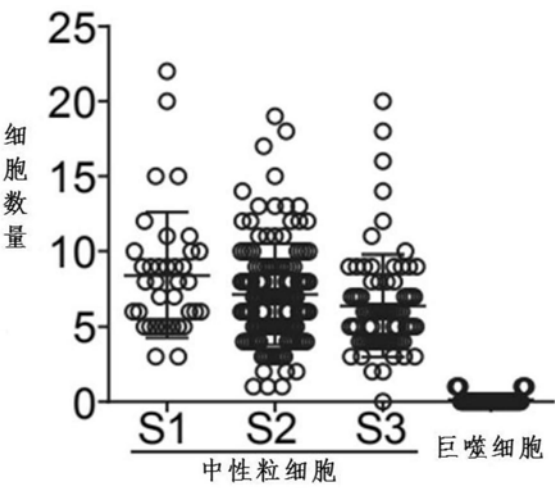


图3

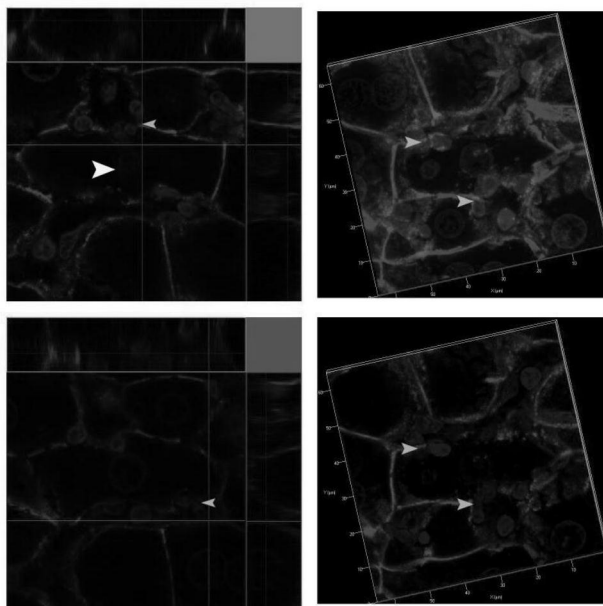
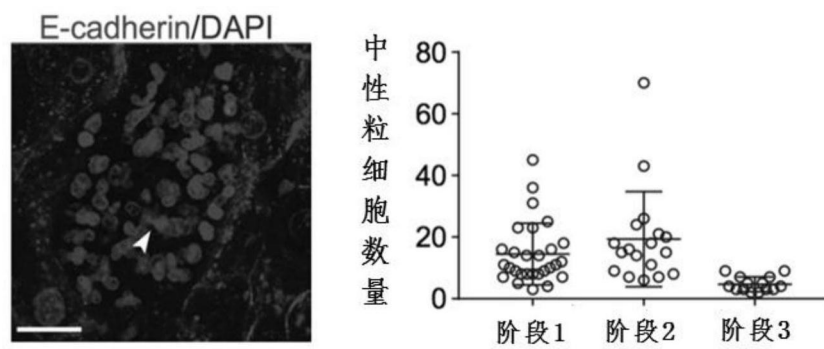


图4

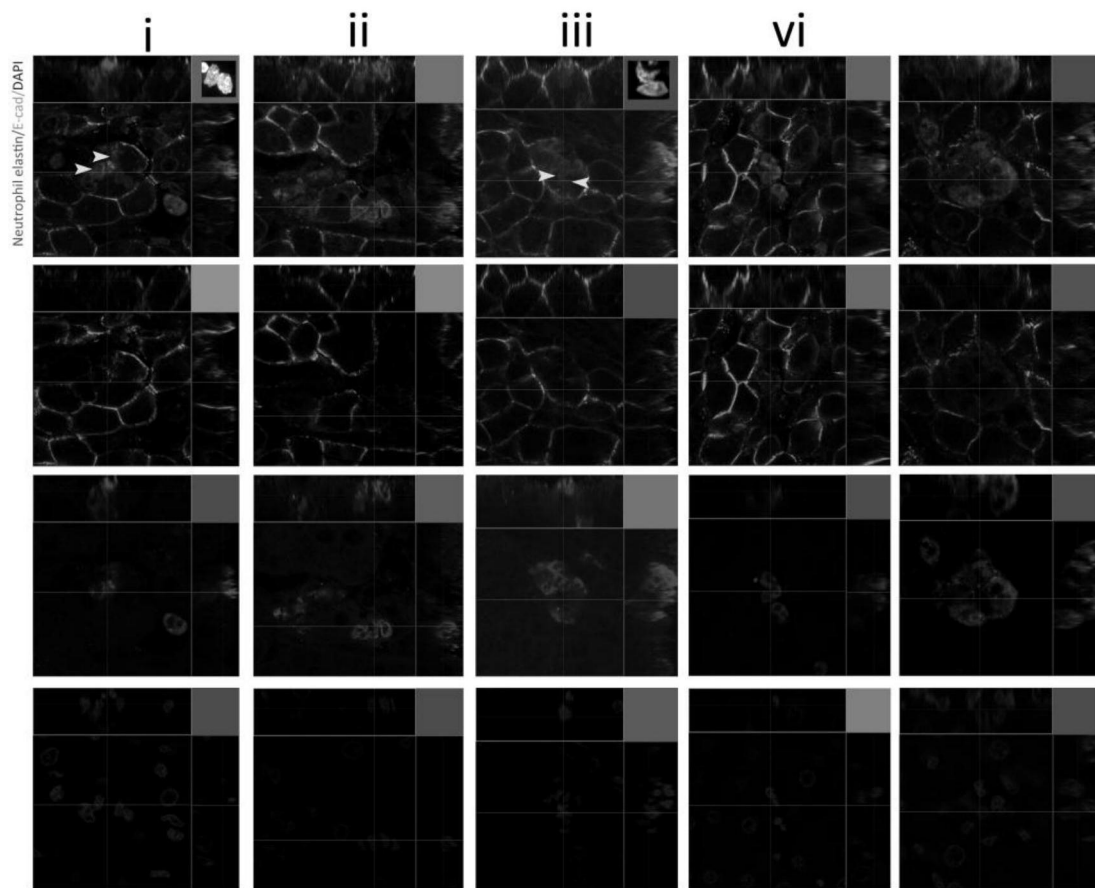


图5

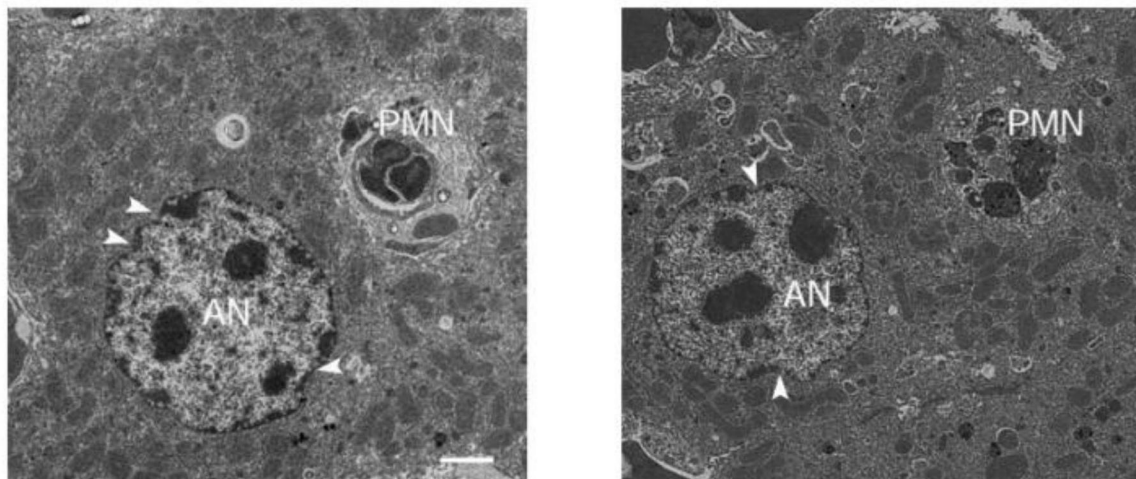


图6

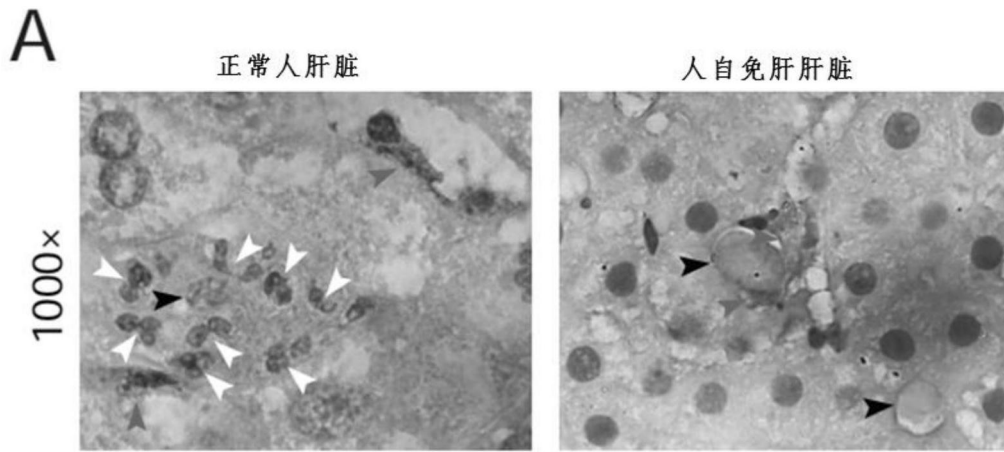


图7

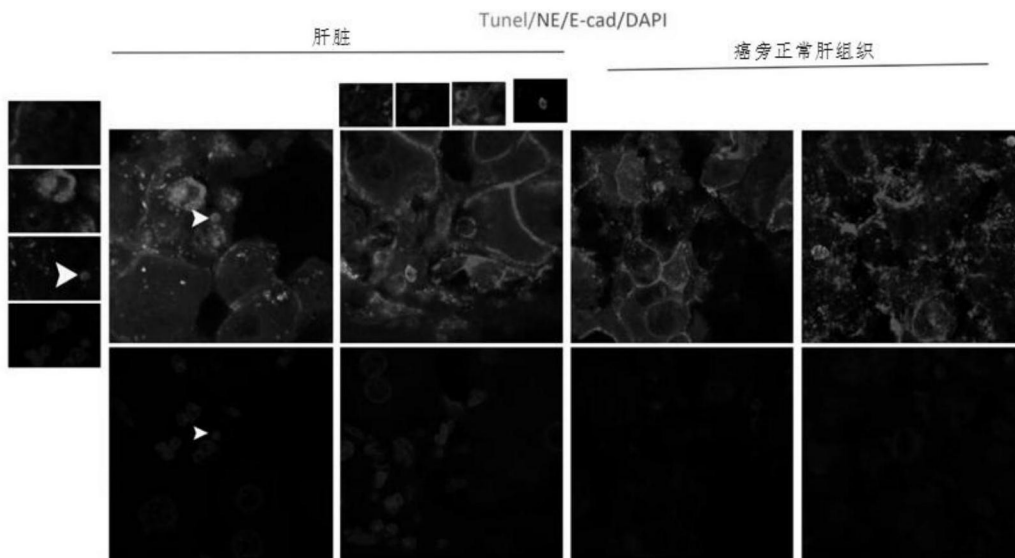


图8

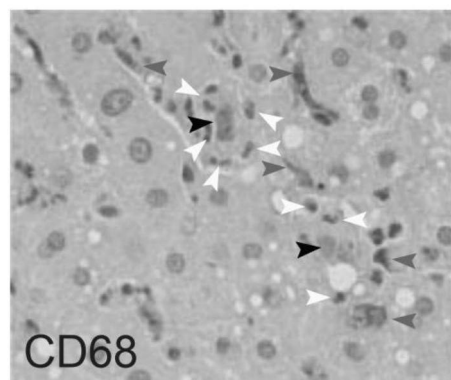


图9

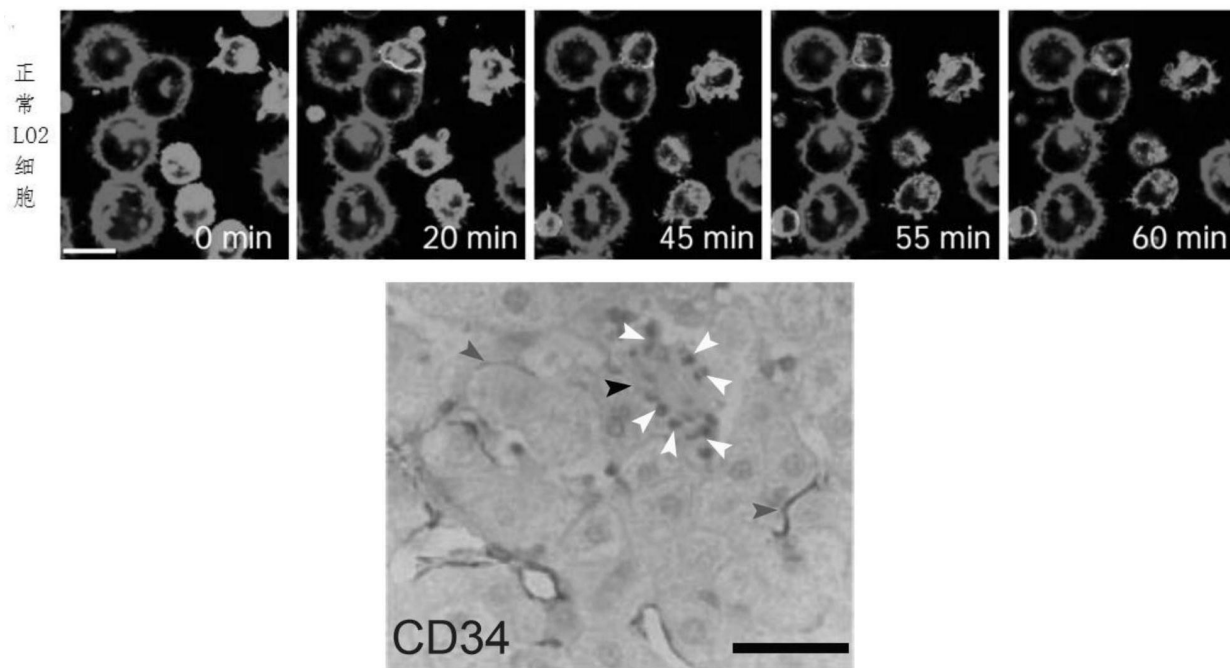


图10

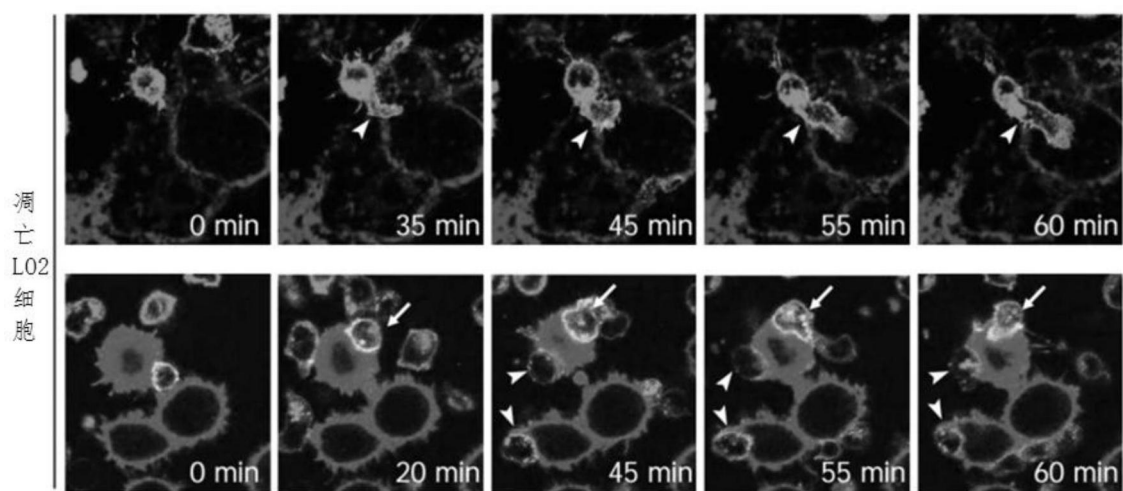


图11

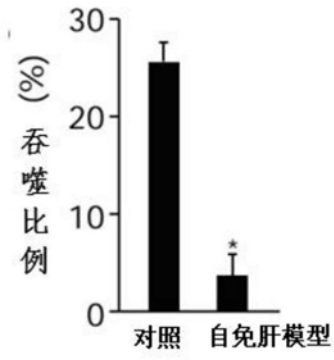


图12

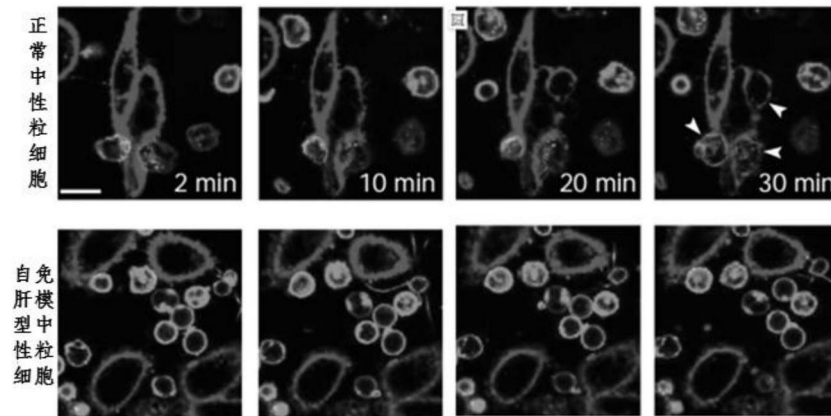


图13

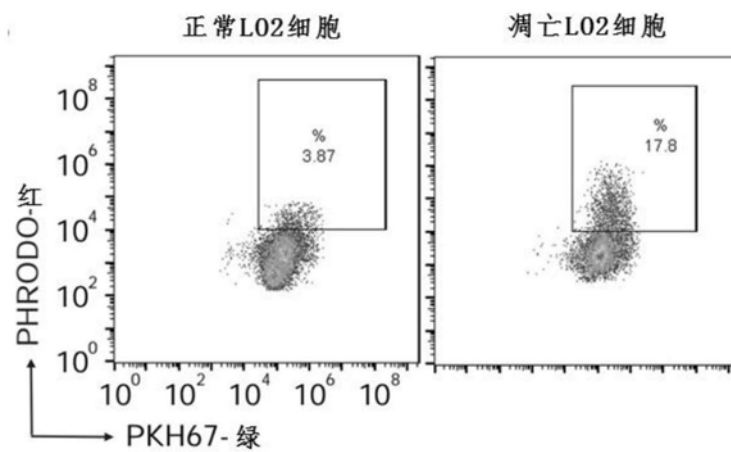


图14

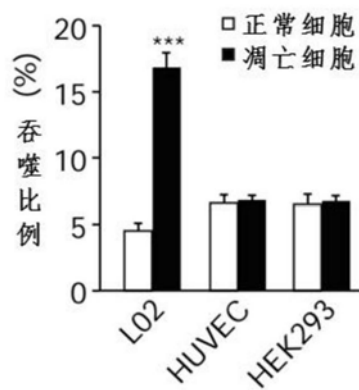


图15

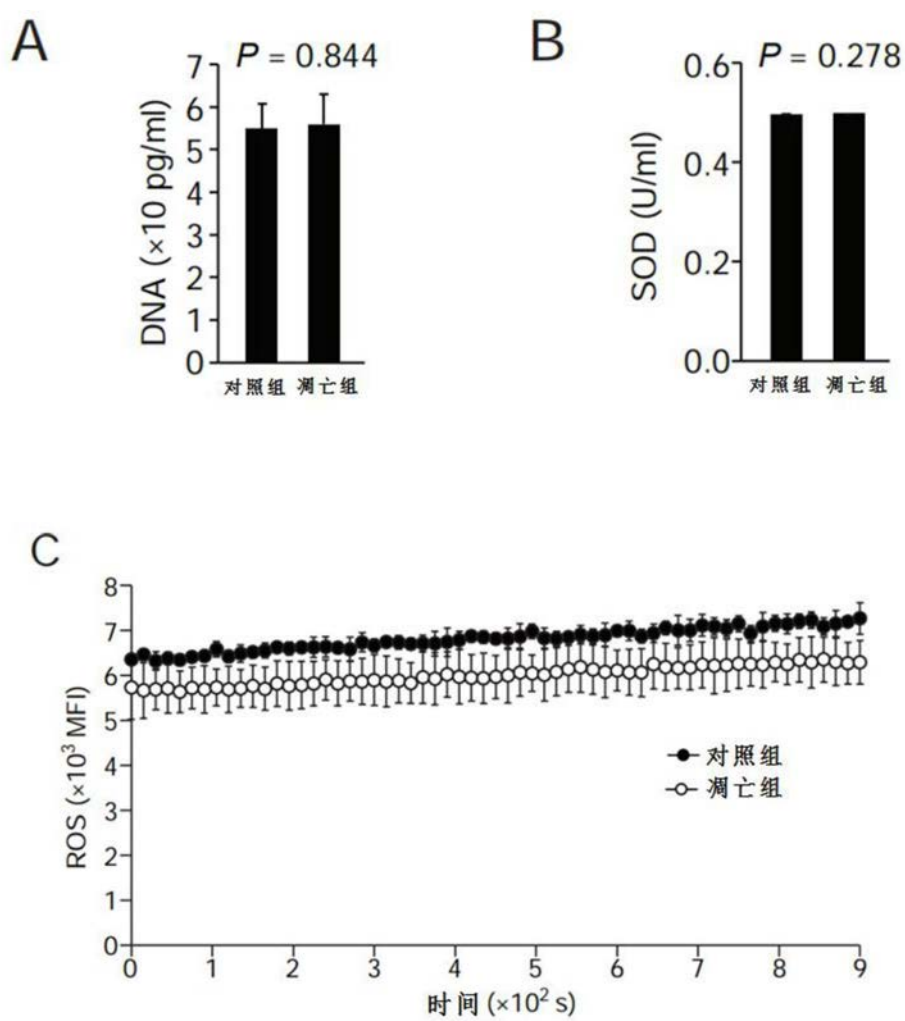


图16

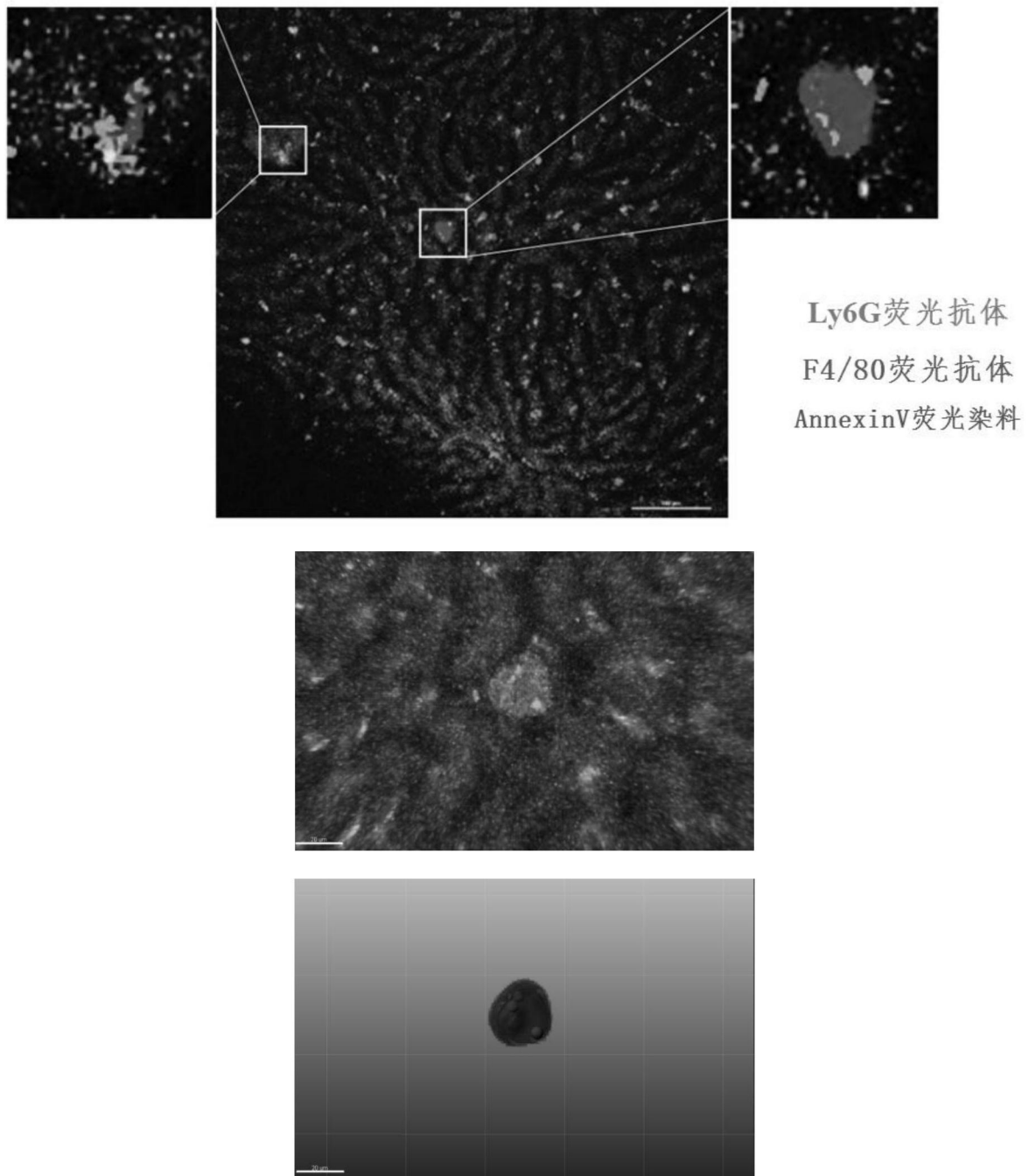


图17

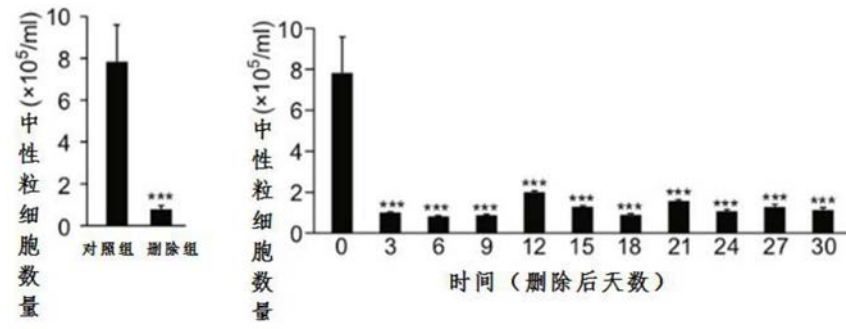


图18

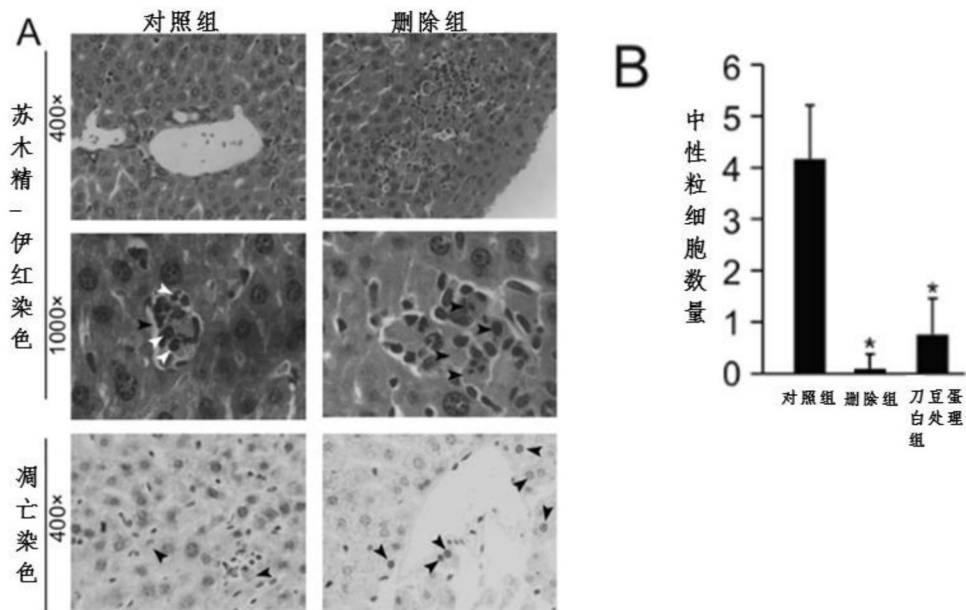


图19

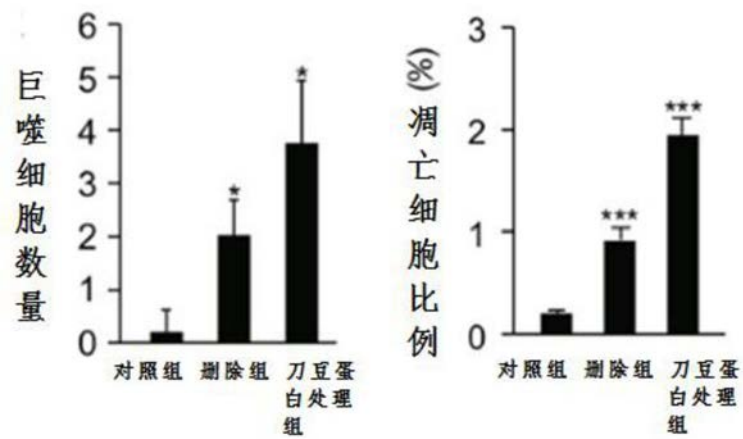


图20

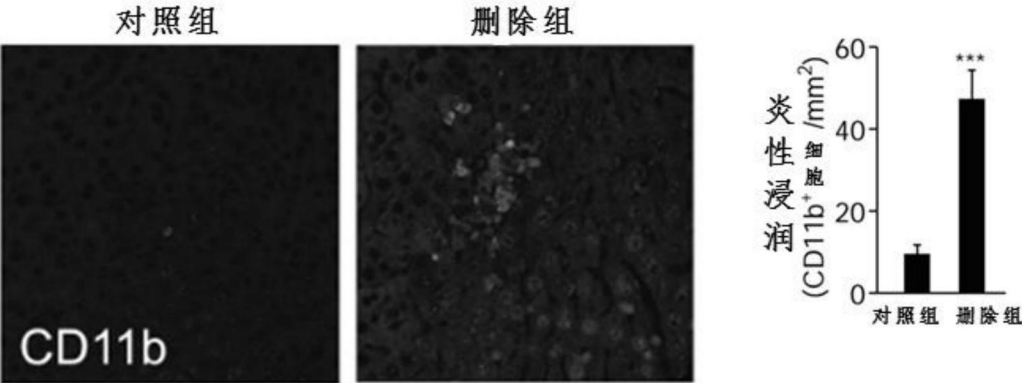


图21

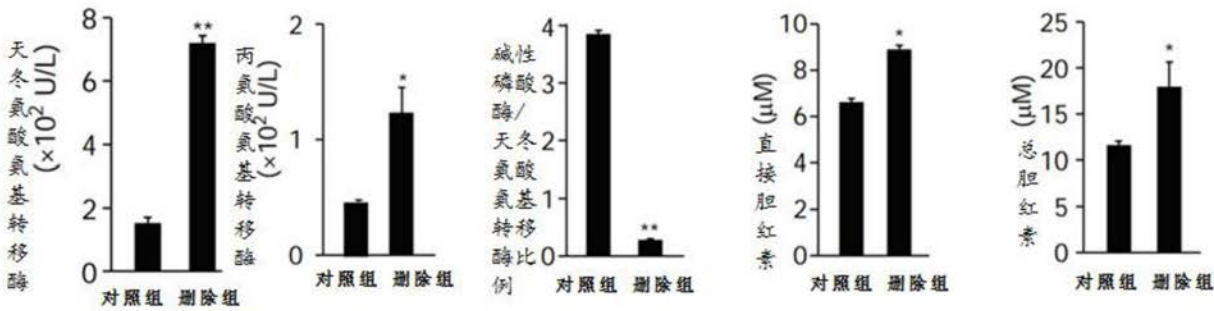


图22

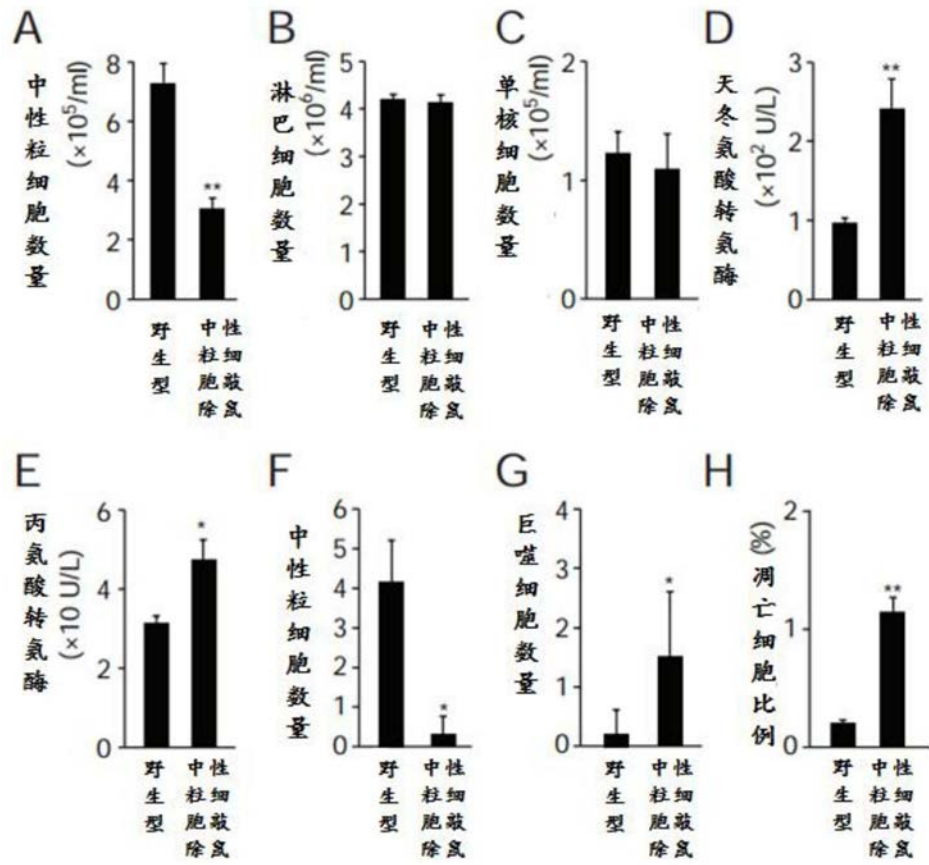


图23

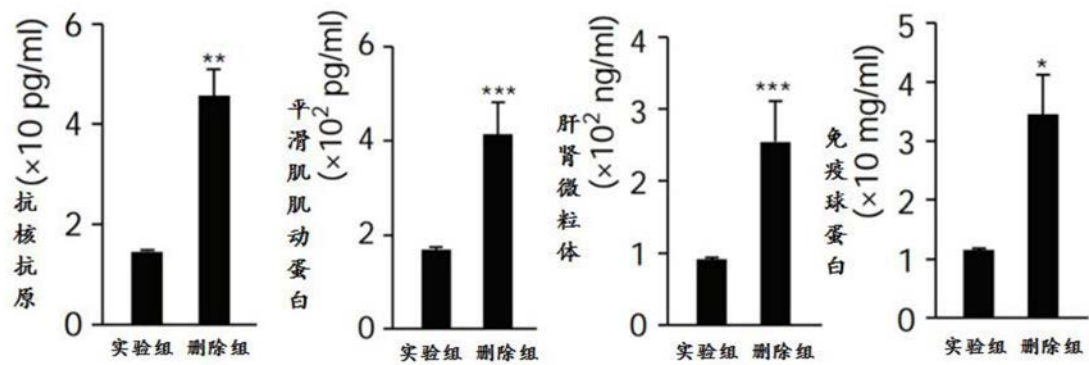


图24

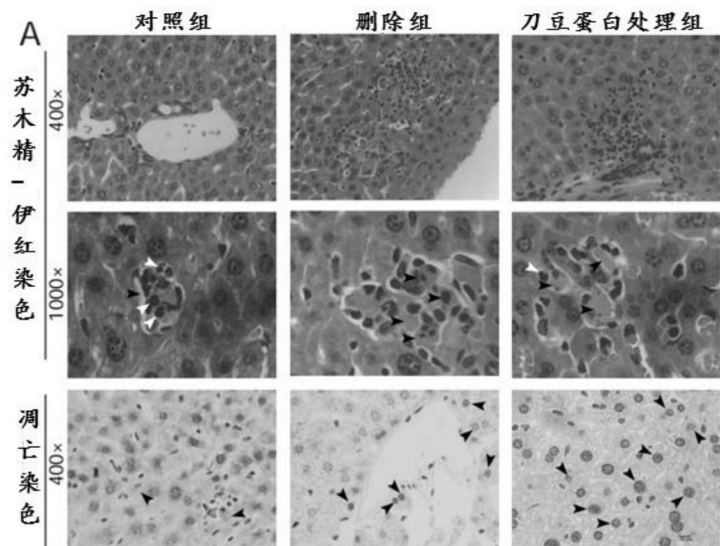


图25

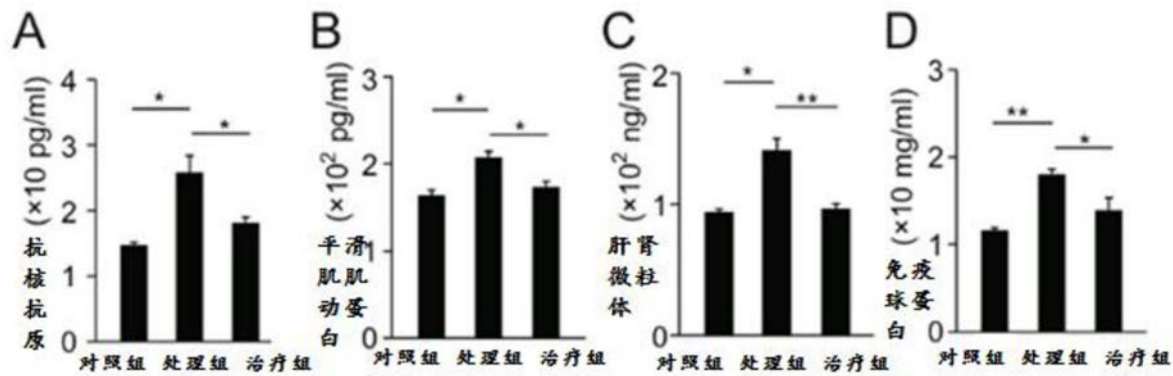


图26

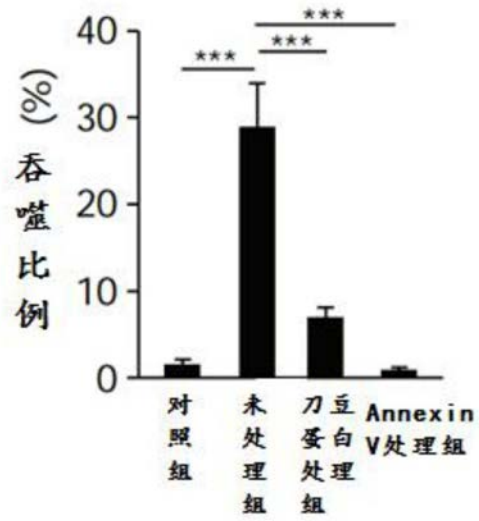


图27

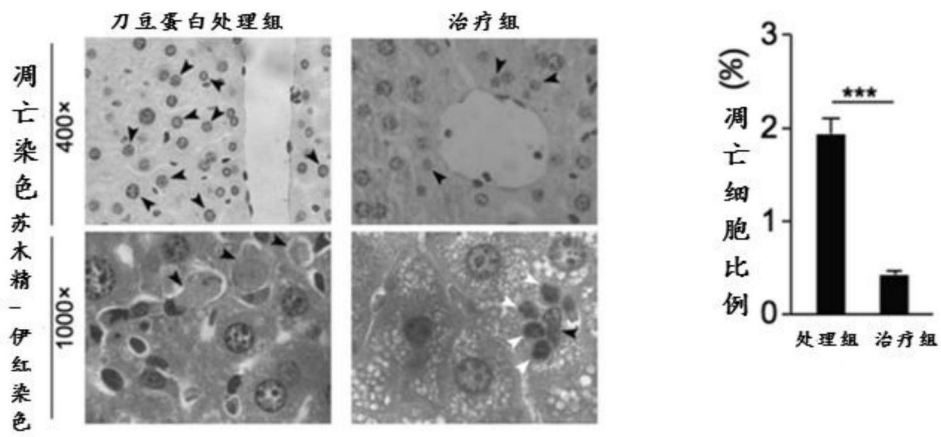


图28

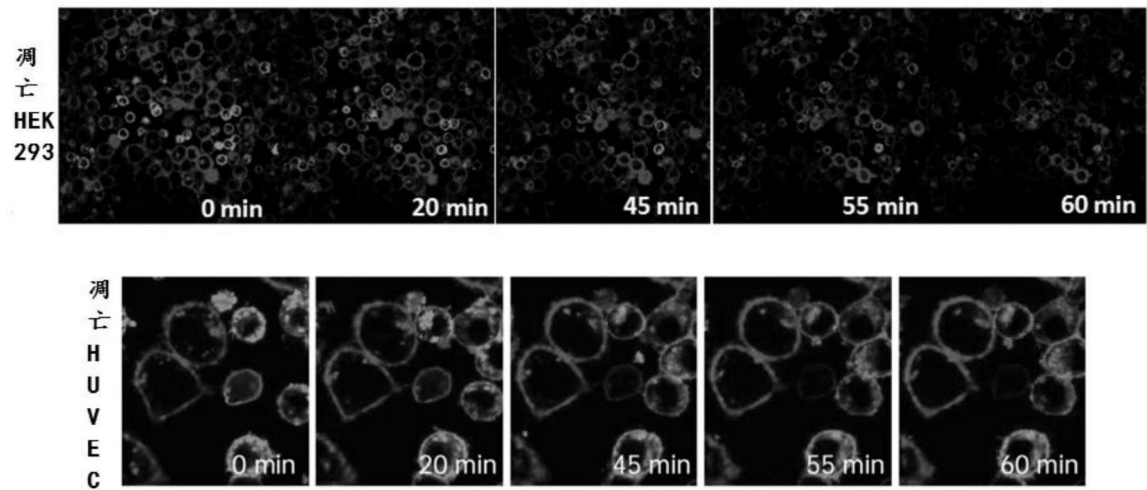


图29

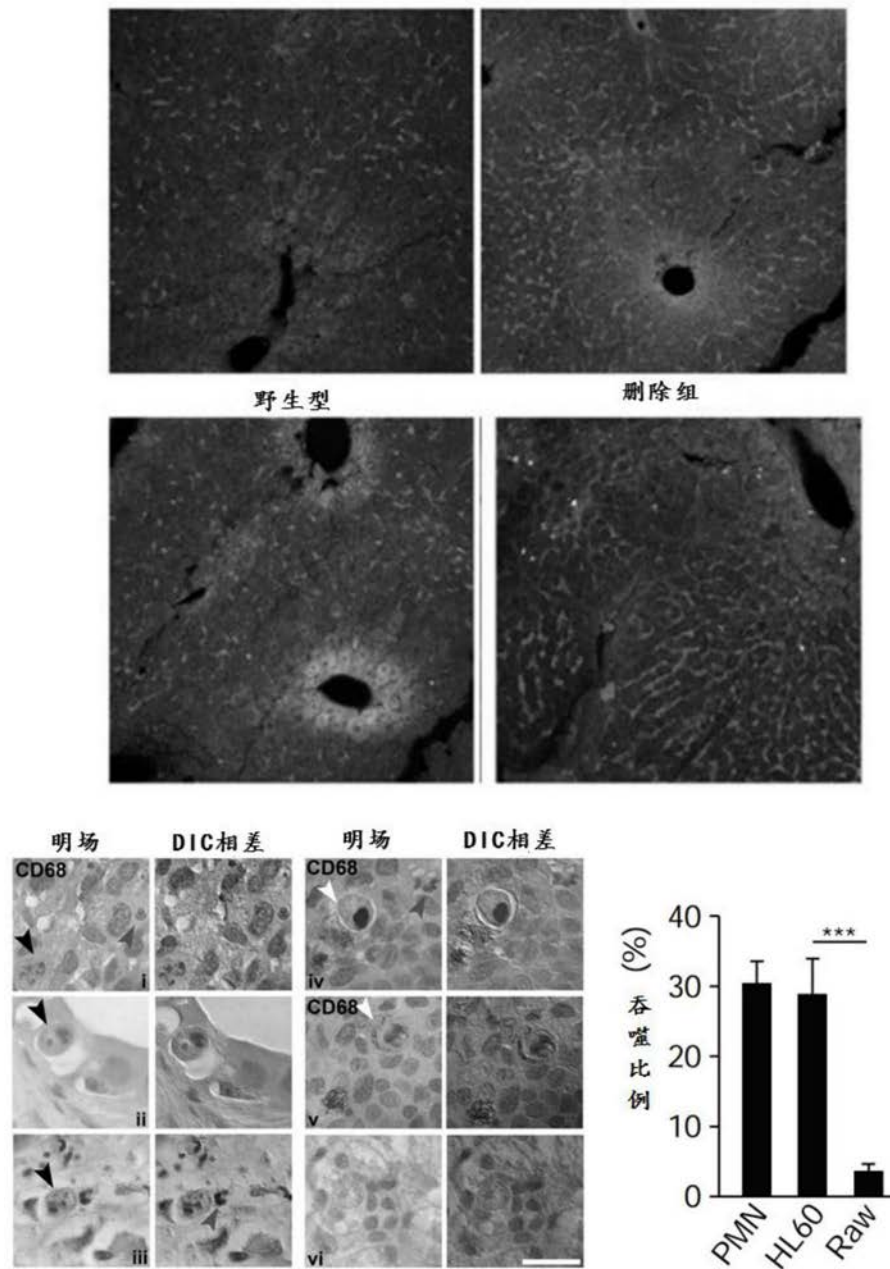


图30

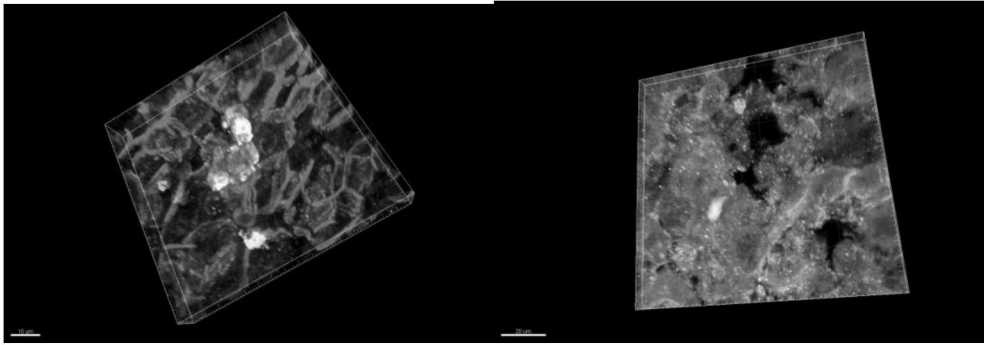


图31

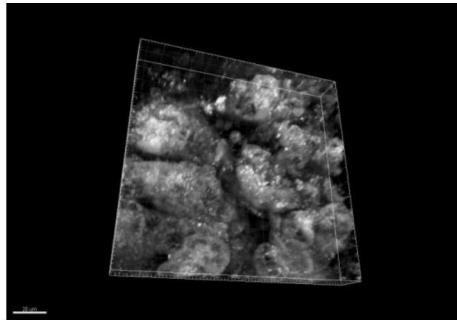


图32

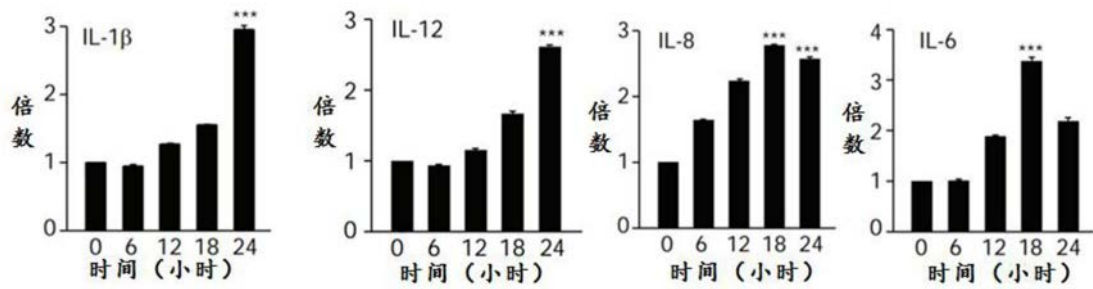


图33

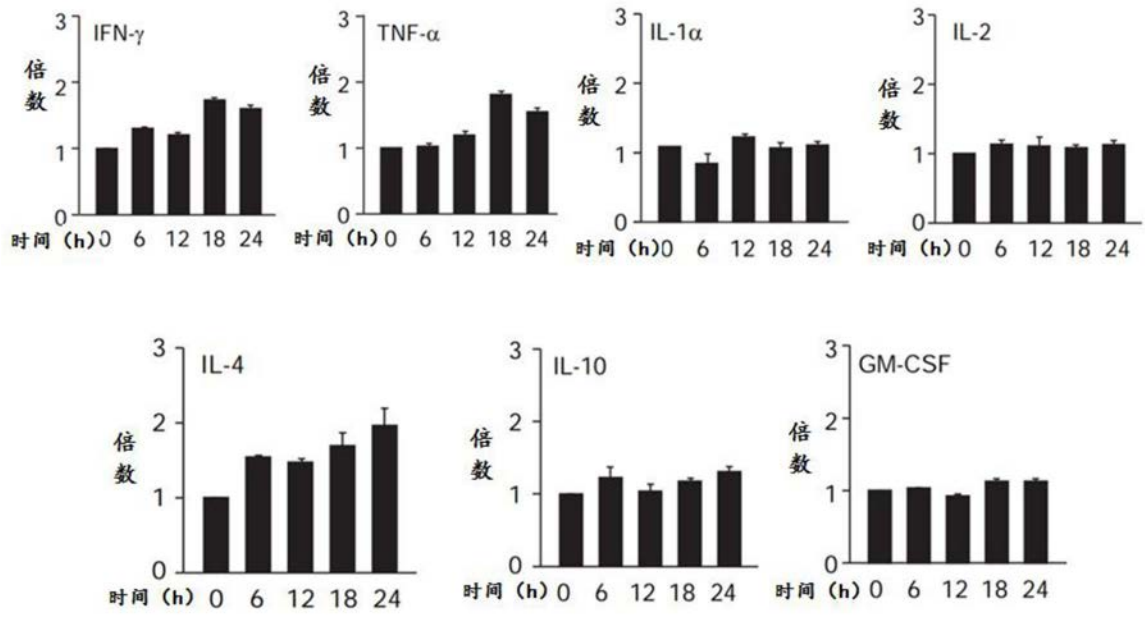


图34

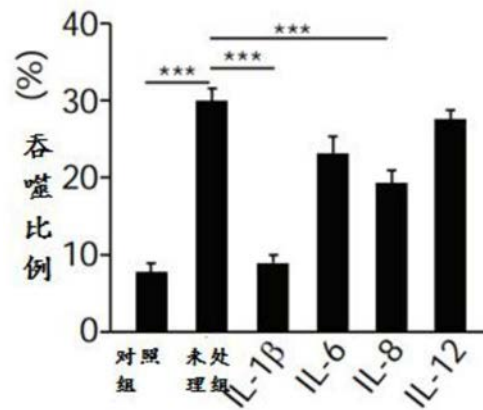


图35