

· 基础研究 ·

牙龈卟啉单胞菌来源的脂多糖诱导非酒精性脂肪肝的局部巨噬细胞免疫耐受表型

郭力嘉¹ 刘奕彤² 陈颖怡² 徐骏疾² 刘怡²

1.首都医科大学附属北京口腔医院正畸科,北京 100050;

2.首都医科大学附属北京口腔医院牙周科,北京 100050

[摘要] 目的 探索牙龈卟啉单胞菌感染的非酒精性脂肪肝局部巨噬细胞功能变化及潜在调控靶点。方法 利用单细胞测序技术分析合并牙龈卟啉单胞菌感染的非酒精性脂肪性肝炎(NASH)小鼠肝脏中的各类细胞表型及其功能变化。进一步利用实时荧光定量聚合酶链反应、酶联免疫吸附和免疫荧光染色观察肝脏组织中的炎症程度及巨噬细胞抗原呈递功能标志物表达水平,利用油红染色观察NASH肝脏局部脂肪组织堆积情况。体外利用牙龈卟啉单胞菌来源的脂多糖干预小鼠腹腔巨噬细胞,通过实时荧光定量聚合酶链反应和转录组测序验证体内试验结果。结果 与健康肝脏中的巨噬细胞相比,牙龈卟啉单胞菌感染的NASH小鼠肝脏巨噬细胞表现出了显著的异质性,其高表达包括C1qb、C1qc、Mafk、Apoe和Cd14在内的多个炎症基因,但与抗原呈递功能相关的基因Cd209a、H2-Aa、H2-Ab1和H2-DMb1等的表达相对较低。进一步的体内外研究表明,这些巨噬细胞的活化和浸润可能是由于局部牙龈卟啉单胞菌来源的脂多糖的积累和诱导造成的。结论 牙龈卟啉单胞菌来源的脂多糖诱导非酒精性脂肪肝的局部巨噬细胞免疫耐受表型,可能是牙周炎致病菌感染促进NASH炎症和发病的关键机制。本研究结果进一步阐明巨噬细胞在NASH相关疾病发病过程中的功能障碍和调节机制,并为其临床治疗提供了几个潜在的调控靶点。

[关键词] 牙龈卟啉单胞菌; 非酒精性脂肪性肝炎; 巨噬细胞; 抗原呈递; 单细胞测序

[中图分类号] R 780.2 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2023.2023111



开放科学(资源服务)
标识码(OSID)

Liver macrophages show an immunotolerance phenotype in nonalcoholic fatty liver combined with *Porphyromonas gingivalis*-lipopolysaccharide infection Guo Lijia¹, Liu Yitong², Chen Yingyi², Xu Junji², Liu Yi². (1. Dept. of Orthodontics, Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China; 2. Dept. of Periodontics, Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

Supported by: National Key R&D Program of China (2022YFC2504200); National Nature Science Foundation of China (81600891, 82201053, 81991504, 81974149); Innovation Research Team Project of Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University (CXTD202202); Innovation Foundation of Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University (21-09-18); Young Scientist Program of Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University (YSP202105); Young Clinical Research Fund of Chinese Stomatological Association (CSA-SIS2022-11); Beijing Municipal Administration of Hospitals' Youth Programme (QML20181501; QML20-231506); Beijing Municipal Administration of Hospitals Clinical Medicine Development of Special Funding Support (ZYLX202121); Beijing Municipal Administration of Hospitals' Ascent Plan (DFL20181501); Beijing Mu-

[收稿日期] 2023-04-11; **[修回日期]** 2023-05-01

[基金项目] 国家重点研发计划(2022YFC2504200);国家自然科学基金(81600891, 82201053, 81991504, 81974149);首都医科大学附属北京口腔医院创新团队建设项目(CXTD202202);首都医科大学附属北京口腔医院创新基金(21-09-18);首都医科大学附属北京口腔医院青年科技创新人才培育计划(YSP202105);中华口腔医学会青年临床科研基金(CSA-SIS2022-11);北京市医管局青年人才培养计划“青苗”计划(QML20181501; QML20231-506);北京市医院管理局临床医学发展专项—“扬帆计划”(ZY-LX202121);北京市医院管理局“登峰”人才培养计划(DFL20-181501);北京市属医院科研培育计划(PX2023054)

[作者简介] 郭力嘉, 副主任医师, 博士, E-mail: guolijia@mail.ccmu.edu.cn

[通信作者] 刘怡, 主任医师, 博士, E-mail: lililiuyi@163.com

tal, Capital Medical University (CXTD202202); Innovation Foundation of Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University (21-09-18); Young Scientist Program of Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University (YSP202105); Young Clinical Research Fund of Chinese Stomatological Association (CSA-SIS2022-11); Beijing Municipal Administration of Hospitals' Youth Programme (QML20181501; QML20-231506); Beijing Municipal Administration of Hospitals Clinical Medicine Development of Special Funding Support (ZYLX202121); Beijing Municipal Administration of Hospitals' Ascent Plan (DFL20181501); Beijing Mu-

nicipal Administration of Hospitals Incubating Program (PX2023054). Correspondence: Liu Yi, E-mail: lililiuyi@163.com.

[Abstract] Objective This study aimed to explore the functions and potential regulatory targets of local macrophages in nonalcoholic fatty liver combined with *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) infection. **Methods** Single-cell RNA sequencing was used to analyze the phenotypes and functional changes in various cells in the liver tissue of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) mice fed with *P. gingivalis*. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), enzyme-linked immunosorbent assay, and immunofluorescence staining were applied to observe the inflammation and expression levels of macrophage antigen presenting functional markers in the NASH liver. Oil red staining was performed to observe the accumulation of local adipose tissue in the NASH liver. Results were verified through RT-PCR and RNA sequencing using *P. gingivalis*-lipopolysaccharide treated mouse peritoneal macrophages. **Results** In comparison with healthy livers with Kupffer cells, the NASH liver combined with *P. gingivalis* infection-related macrophages showed significant heterogeneity. *C1qb*, *C1qc*, *Mafb*, *Apoe*, and *Cd14* were highly expressed, but *Cd209a*, *H2-Aa*, *H2-Ab1*, and *H2-DMb1*, which are related to the antigen presentation function, were weakly expressed. Further *in vivo* and *in vitro* investigations indicated that the activation and infiltration of these macrophages may be due to local *P. gingivalis*-lipopolysaccharide accumulation. **Conclusion** *P. gingivalis*-lipopolysaccharide induces a local macrophage immunotolerance phenotype in nonalcoholic fatty liver, which may be the key mechanism of periodontitis pathogen infection that promotes NASH inflammation and pathogenesis. This study further clarifies the dysfunction and regulatory mechanisms of macrophages in the pathogenesis of *P. gingivalis*-infected NASH, thereby providing potential therapeutic targets for its clinical treatment.

[Key words] *Porphyromonas gingivalis*; nonalcoholic steatohepatitis; macrophage; antigen presentation; single-cell RNA sequencing

非酒精性脂肪性肝病/非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis, NAFLD/NASH) 是最常见的慢性肝病之一, 导致患者肝脏组织脂肪变性, 并影响了全球约四分之一的人口, 因此是全球范围内的一大公共卫生挑战^[1]。NASH是一种NAFLD发病过程中的代表性阶段, 以肝脏组织的炎症浸润和进行性纤维化为主要表现, 若不加以有效控制, 最终将发展为肝硬化和肝癌^[2]。虽然有多篇研究关注到了NASH发病过程中的肠道菌群异位影响等因素会造成肝脏组织的炎症和脂肪堆积^[3], 并且牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*) 的感染也与NASH局部的炎症和组织破坏息息相关^[4], 但这一过程中NASH进展的分子机制依旧复杂且尚未完全阐明。目前NAFLD/NASH的治疗手段十分局限, 尚无有效的临床治疗药物^[5], 因此针对NASH的发病机制和治疗靶点的探索一直是相关领域的研究热点。

巨噬细胞在不同组织来源或不同疾病微环境因素的影响下表现出不同的表型和功能^[6]。尽管肝巨噬细胞被报道是局部主要的免疫调节和解毒角色, 但在肥胖相关疾病 (如NAFLD^[7]) 中, 其表型和功能存在显著的异质性。NAFLD疾病中肝巨

噬细胞的激活是由炎症细胞因子、异位细菌和脂多糖等多种因素介导的, 它们的释放可能是由于肠道通透性增加以及肠道微生物及其代谢产物的迁移造成的^[8]。在这些因素的影响下, 局部巨噬细胞被显著激活, 其中M1表型表现出了明显的吞噬活性并分泌多种炎症细胞因子^[9-13]。在急性炎症期间, 这些M1巨噬细胞诱导细胞外基质降解 (纤维蛋白溶解), 从而介导疾病组织的改建和转归^[11,14]。相反, 巨噬细胞的另一种抗炎表型M2表型的激活也可能通过免疫抑制效果和纤维化促进效果参与NASH的病变过程, 其机制可能是由于M2巨噬细胞高表达白细胞介素 (interleukin, IL) -13和转化生长因子 (transforming growth factor, TGF) - β 1造成的^[15]。然而, 巨噬细胞在NASH肝脏中的表型分化和功能相对更加复杂。到目前为止, NASH肝脏中有3种类型的促炎表型和4种类型的抗炎表型巨噬细胞被报道^[16-17], 但每种类型的巨噬细胞具体的功能变化和调控效果尚不清楚。本研究拟采取单细胞测序技术探索合并了*P. gingivalis*肠道感染的NASH小鼠模型中的肝巨噬细胞的表型特点及功能变化, 以阐明NASH肝脏巨噬细胞的分群特点、*P. gingivalis*对NASH小鼠肝脏免疫微环境的影响和潜在治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器

DMEM 培养基、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS)、双抗 (链霉素、青霉素) 及谷氨酰胺 (Invitrogen 公司, 美国), 优质胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (GIBCO 公司, 美国), 巨噬细胞分选试剂盒 (Miltenyi Biotec 公司, 德国), TRIzol (Invitrogen 公司, 美国), RNA 逆转录试剂盒 (Takara 公司, 日本), Power SYBR[®] Green 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 试剂盒 (Life Technologies 公司, 英国), RIPA 裂解液、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), CD11b 抗体 (CST#17800, Cell Signaling Technology 公司, 美国), 兔抗 488 荧光二抗 (ab150077, Abcam 公司, 美国), PE-MHC- II 抗体 (CST#67762, Cell Signaling Technology 公司, 美国), 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, DAPI) (Vector 公司, 美国), 10% 山羊血清 (北京中杉金桥生物技术有限公司), *P. gingivalis* 来源的 LPS (*Pg*-LPS) (Invitrogen 公司, 美国), 酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司)。所有引物均购自上海生工生物工程有限公司。

Nikon 光学显微镜 (Nikon 公司, 日本), 紫外分光光度计 (Eppendorf 公司, 德国), 倒置显微镜及照相系统 (OLYMPUS 公司, 日本), SW-CJ-IF 超净工作台 (苏州净化设备有限公司), PCR 扩增仪、PCR 定量仪器 (BIO-RAD 公司, 美国), 细胞培养板及细胞刮匙 (Corning 公司, 美国)。

1.2 NASH 动物模型的建立

使用 6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠建立 NASH 模型, 小鼠购于北京维通利华实验动物技术有限公司。实验动物被饲养于 SPF 级标准化实验动物室, 饲养条件为 25 °C 的室温、12 h 光照/12 h 黑暗。本研究所开展的所有动物研究均遵循首都医科大学附属北京口腔医院动物伦理委员会制定的标准 (伦理审查号 KQYY-202206-007), 并符合 ARRIVE 指南。

NASH 组的动物连续 15 周喂食 D12492 研究型饮食 (北京斯贝福生物技术有限公司) 诱导小鼠 NASH 模型, 而对照组的动物则喂食正常饮食 (1130SH12090494D, 北京斯贝福生物技术有限公司)。

在 NASH 建模的最后 4 周时, 隔天灌喂 *P. gingivalis* 1×10^8 CFU, 直至建模结束。对照组不进行任何的额外操作, 正常饮食直至建模结束。

建模结束后处死 2 组老鼠, 取血清送首都医科大学附属北京口腔医院检验科进行血生化检测, 取动物肝脏进行肉眼观察及称重, 4% 多聚甲醛固定 24 h 后脱水包埋。

1.3 组织学评价

2 组老鼠的肝脏组织标本脱水包埋后, 进行组织切片 (切片厚度为 5 μ m), 之后进行苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色, 并在显微镜下观察切片。

1.4 TUNEL 染色

使用 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒来分析肝脏组织的局部细胞凋亡。利用 DAPI 对细胞核进行染色并用甘油封片。镜下计数, 计算 TUNEL 阳性的细胞比例。

1.5 免疫荧光分析

组织切片首先用 10% 山羊血清在 37 °C 下封闭 1 h, 之后将组织切片与 CD11b 和 MHC- II 抗体 (50 μ g/mL) 在 4 °C 下孵育过夜, 将切片与兔抗 488 荧光二抗 (1 μ g/mL) 孵育, 并用 DAPI 复染后封片。镜下观察切片, 将 CD11b 阳性 (CD11b⁺) 的细胞定义为巨噬细胞, 观察 CD11b⁺ 巨噬细胞群体中 MHC- II 的表达水平。

1.6 油红 O 染色

使用油红 O 染色试剂盒进行油红 O 染色以及脂滴的检测。检测方法为显微镜下观察至少 5 个随机区域。

1.7 单细胞测序及分析

采用 SeekOne^{MM} 高通量单细胞转录组试剂盒 (编号 K00104-04, 北京寻因生物科技有限公司) 对肝脏组织进行单细胞测序分析。更多信息详见参考文献[18]。

1.8 小鼠腹膜巨噬细胞的分离培养

小鼠腹膜巨噬细胞的分离方法详见参考文献 [19]。使用巨噬细胞分选试剂盒分选巨噬细胞。随后在 DMEM 培养基中培养, 该培养基含有 10% 的胎牛血清、5% 的青霉素/链霉素和 5% 的谷氨酰胺, 细胞培养条件为 37 °C 和 5% CO₂。

1.9 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)

将分选后的巨噬细胞分别在 PBS (Control 组) 或 *P. gingivalis* 来源的 LPS (LPS 组) 条件下进行诱导, 使用 TRIzol 提取总 RNA, Power SYBR[®] Green

PCR 试剂盒和特定引物 (表 1) 进行 RT-PCR 检测。

表 1 本研究使用的引物序列
Tab 1 Primers used in this study

基因名称	序列 (5'-3')
Gapdh	F: GAGAGGCCCTATCCCAACTC R: TCAAGAGAGTAGGGAGGGCT
Tnfa	F: CCACCACGCTCTTCTGTCTA R: TGGTTTGTGAGTGTGAGGGT
Nos2	F: CGGAGATCAATGTGGCTGTG R: GAAGGACTCTGAGGCTGTGT
Cd209a	F: CTGGGAGAGGAAGACTGTGC R: CTTGCTAGGGCAGGAAGTTG
H2-Aa	F: TTCTTCAAGTGACCCCAAC R: AATTCCAAGGGTGTGTGAGC
H2-Eb1	F: CTGGAACACCACAACCTCCT R: TTCCGGAACCATCTGACTTC
H2-Ab1	F: TCTGCTCCGAATTCCTGACT R: TCACAAGAGCTGAGGTGGTG
H2-DMb1	F: AACAAAGGAGAAGACGGCTCA R: GTGTAGACGTCCCCGTAGGA
Cd14	F: TCTCAGATCCGAAGCCAGAT R: CGTGTCCACACGCTTTAGAA

1.10 ELISA 测定

利用 ELISA 测定肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) - α 、IL-1 β 等炎症细胞因子在体内的表达水平。使用 RIPA 裂解液提取组织总蛋白, 利用各组的蛋白质样品 (100 μ g) 进行 ELISA 检测。

1.11 体外转录组测序 (RNA sequencing, RNA-seq) 分析

将分选后的巨噬细胞分别在 PBS (Control 组) 或 *P. gingivalis* 来源的 LPS (LPS 组) 条件下进行诱导, 之后将其储存于液氮。用 TRIzol 试剂提取 RNA, 并评估其纯度和浓度。合格的 RNA 样本由广州基迪奥生物科技有限公司进行测序, 并使用在线工具 (<http://www.omicshare.com/tools>) 进行后续的生物信息学分析, 包括基因集富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA)。

1.12 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。所有的实验至少重复 3 次。数据用均数 \pm 标准差表示。符合正态分布的数据使用 *t* 检验进行分析, 多组变量比较使用单因素方差分析 (ANOVA) 进行比较。

2 结果

2.1 小鼠 NASH 模型中肝脂肪变性、肝功能障碍和局部细胞损伤凋亡

本研究通过高脂肪饮食诱导 15 周建立了小鼠

NASH 模型, 同时在诱导最后 4 周时给予小鼠 *P. gingivalis* 的灌喂。肉眼观察及组织学染色观察评估建模小鼠肝脏的变化, 结果显示, NASH 组小鼠的肝脏明显较大, 颜色较浅, 边缘圆钝, 呈现出典型的 NASH 样肝脏病变 (图 1A)。HE 染色结果显示, NASH 组的肝组织出现脂肪堆积造成的气球样病变 (图 1B), 这与 NASH 肝的典型病理特征一致。除了肝脏的组织学变化及重量变化 (图 1C) 外, 血生化检测结果也显示, 与对照组相比, NASH 组的肝功能指标均呈上调趋势, 表明其存在肝组织损伤和肝功异常 (图 1D~G)。TUNEL 染色结果显示, NASH 组肝组织中凋亡细胞的数量显著增加 (图 1H、I)。以上结果均表明, 高脂饮食+*P. gingivalis* 灌喂诱导的 NASH 小鼠模型中肝脂肪变性、肝功能障碍和局部细胞损伤凋亡, 证明本研究体内模型建模成功。

2.2 NASH 肝脏中巨噬细胞发挥关键调节作用, 具有异质性和亚群变化

单细胞测序技术分析 2 组肝组织中各种细胞的变化, 结果显示 NASH 组肝脏中单核巨噬细胞的数量显著增加 (从对照组的 6.28% 增加到 NASH 组的 33.69%) (图 2A、B), 成为 NASH 肝脏中最大的细胞集群, 表明巨噬细胞可能在 NASH 的进展中发挥关键作用。对这群巨噬细胞簇中的高表达基因进一步分析, 发现对照组的巨噬细胞高表达包括抗原呈递相关基因 H2-Aa、Cd209a。但 NASH 组的巨噬细胞明显出现了一群不同的分群 (图 2A 中蓝色虚线标记的细胞群), 其高表达补体基因包括 C1qb 和 C1qc, 但 H2-Aa、Cd209a 相对表达降低。这群巨噬细胞与对照组肝组织中的正常巨噬细胞存在显著的差异 (NASH 组巨噬细胞的相关基因表达分布如图 2C、D 所示)。

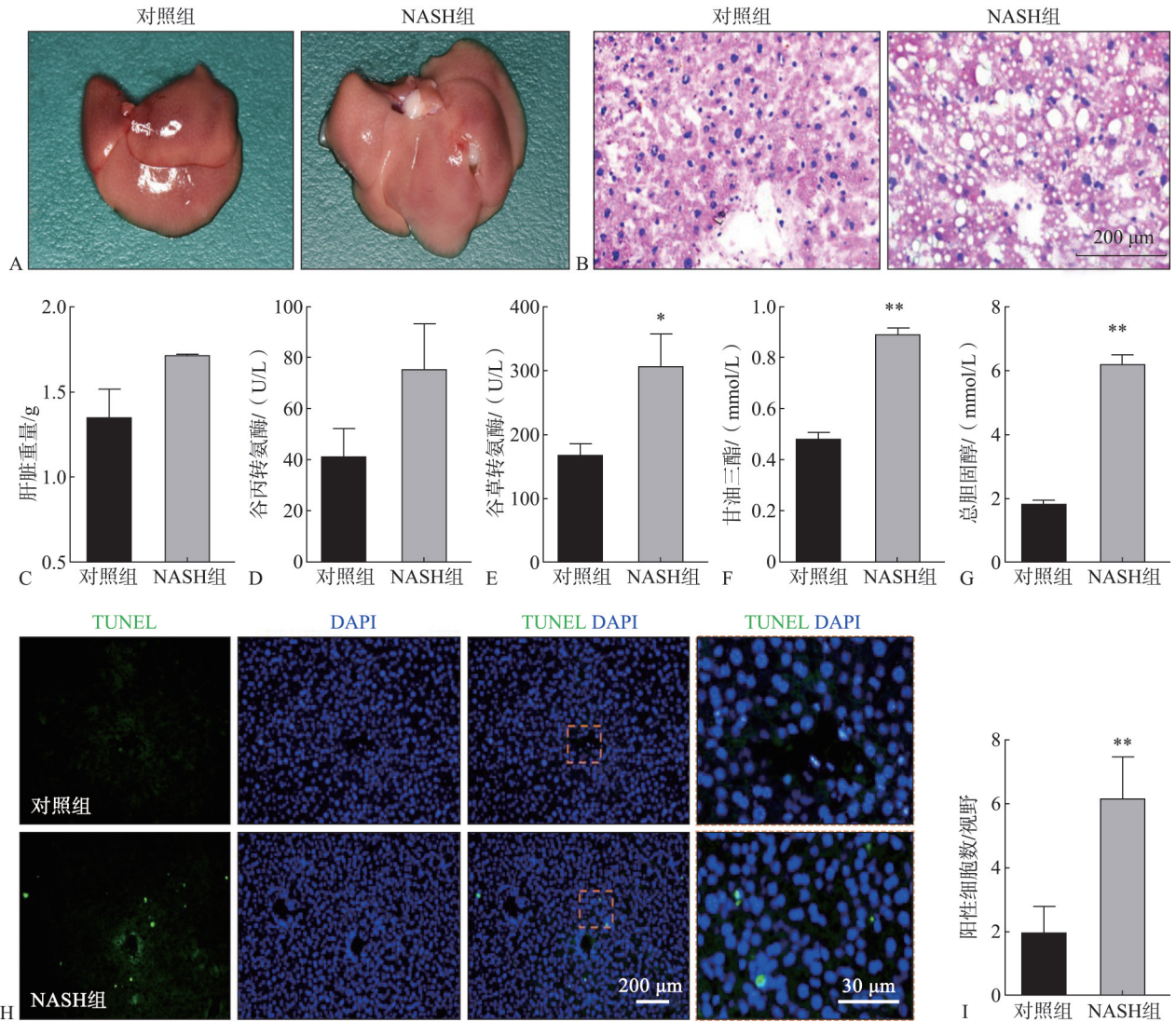
对这一特殊的巨噬细胞亚群 (测序结果中的细胞 2 群和 5 群) 进一步分析其基因表达情况, 结果提示其高度表达 *Gpnmb*、*Chil3* 等基因 (图 2E), 表明这些簇同时含有促炎和抗炎表型。KEGG 分析显示, 这些细胞对宿主免疫功能表现出抑制效果, 并参与了脂质储存过程 (图 2F)。研究结果表明, NASH 肝脏中的巨噬细胞高度活化, 但其抗原呈递功能相对受到抑制, 这可能不利于宿主的免疫防御和凋亡细胞或脂肪组织的清除。

2.3 NASH 肝脏中的巨噬细胞高度活化, 但其抗原呈递功能出现障碍

为了验证单细胞测序的结果, 采用 PCR 检测评估 2 组小鼠肝脏组织中的炎症基因表达水平。结

果显示, M1巨噬细胞的标志物 *Nos2* 和 *Tnfa* 在 NASH 肝脏中呈增加趋势 (图 3A、B)。ELISA 检测评估肝组织中炎症因子的表达水平, 结果证实了 NASH 肝脏中 *TNF- α* 和 *IL-1 β* 的上调 (图 3C、D)。这些结果表明, NASH 肝脏存在明显的炎症和显著的 M1 巨噬细胞活化。此外, *CD11b* 和 *MHC-II* 荧光双染进一步观察 NASH 肝脏中巨噬细胞的抗原

呈递功能, 与单细胞测序结果一致, NASH 肝脏中 *CD11b*⁺ 巨噬细胞中 *MHC-II* 的表达显著下调 (图 3E), 这表明巨噬细胞抗原呈递功能受到抑制。油红染色显示 NASH 组肝脏中局部大量脂滴积聚, 证实了这种抗原呈递功能障碍导致了 NASH 肝脏中的脂质组织无法有效去除, 局部大量脂滴积聚 (图 3F)。



A: 与对照组相比, NASH 组的肝脏明显变大、颜色变浅、边缘圆钝; B: HE 染色显示, NASH 组肝组织出现脂肪堆积造成的气球样病变; C: 与对照相比, NASH 组肝脏的重量增加; D~G: 血液生化测试显示, 与对照组相比, NASH 组小鼠的肝功能指标均呈上调趋势; H、I: TUNEL 染色表明, 与对照组相比, NASH 组局部肝组织中凋亡细胞数量显著增加。**P*<0.05, ***P*<0.01。

图 1 NASH 小鼠表现出典型的非酒精性脂肪肝症状

Fig 1 NASH mice showed typical pathological symptoms

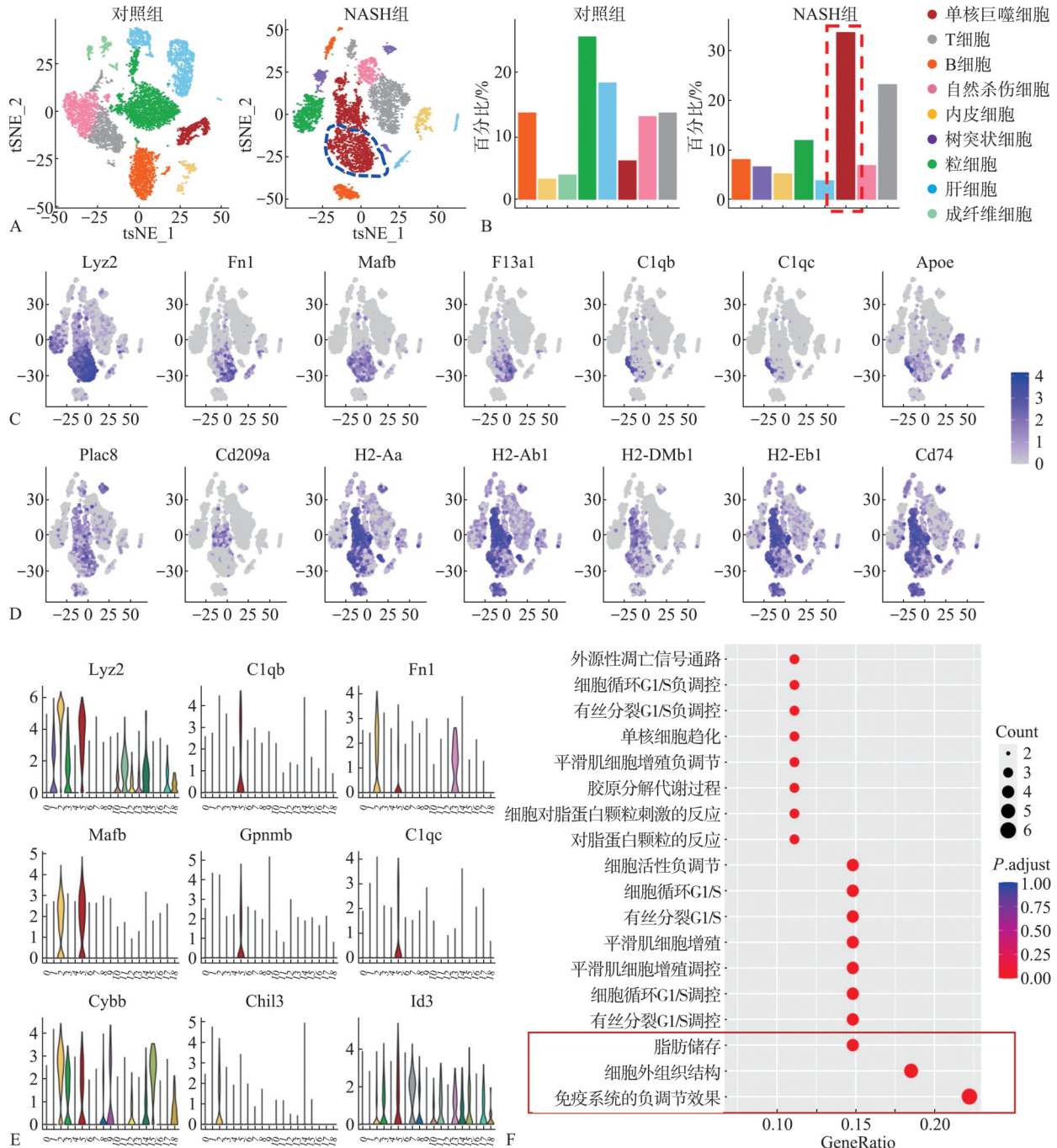
2.4 体外研究证明 *P. gingivalis* 来源的 LPS 抑制小鼠腹腔巨噬细胞抗原呈递功能相关基因的表达

小鼠腹腔巨噬细胞在 PBS (Control 组) 或 *P. gingivalis* 来源的 LPS (LPS 组) 条件下进行诱导后, RT-PCR 结果显示, LPS 组 *Cd14*、*Nos2* 和 *Tnfa*

表达水平增加 (图 4A~C), *Cd209a*、*H2-Aa*、*H2-Eb1*、*H2-DMb1* 和 *H2-Ab1* 表达水平降低 (图 4D~H)。Pg-LPS 的诱导增加了巨噬细胞炎症因子的表达水平, 这与体内研究结果一致。RNA-seq 进一步分析巨噬细胞中更多的基因表达水平, 结果显示, Pg-LPS 诱导后的巨噬细胞高表达包括 *Cd14* 和

Ccl9 在内的炎症基因，但 Cd209a 和包括 H2-Aa、H2-Eb1 在内的抗原呈递相关基因相对受到抑制 (图 4I)。此外，GSEA 显示，LPS 组 Toll 样受体途径 (经典的 M1 巨噬细胞活化途径) 相对上调 (图 4J)，抗原处理及提呈通路、脂肪降解通路相对下

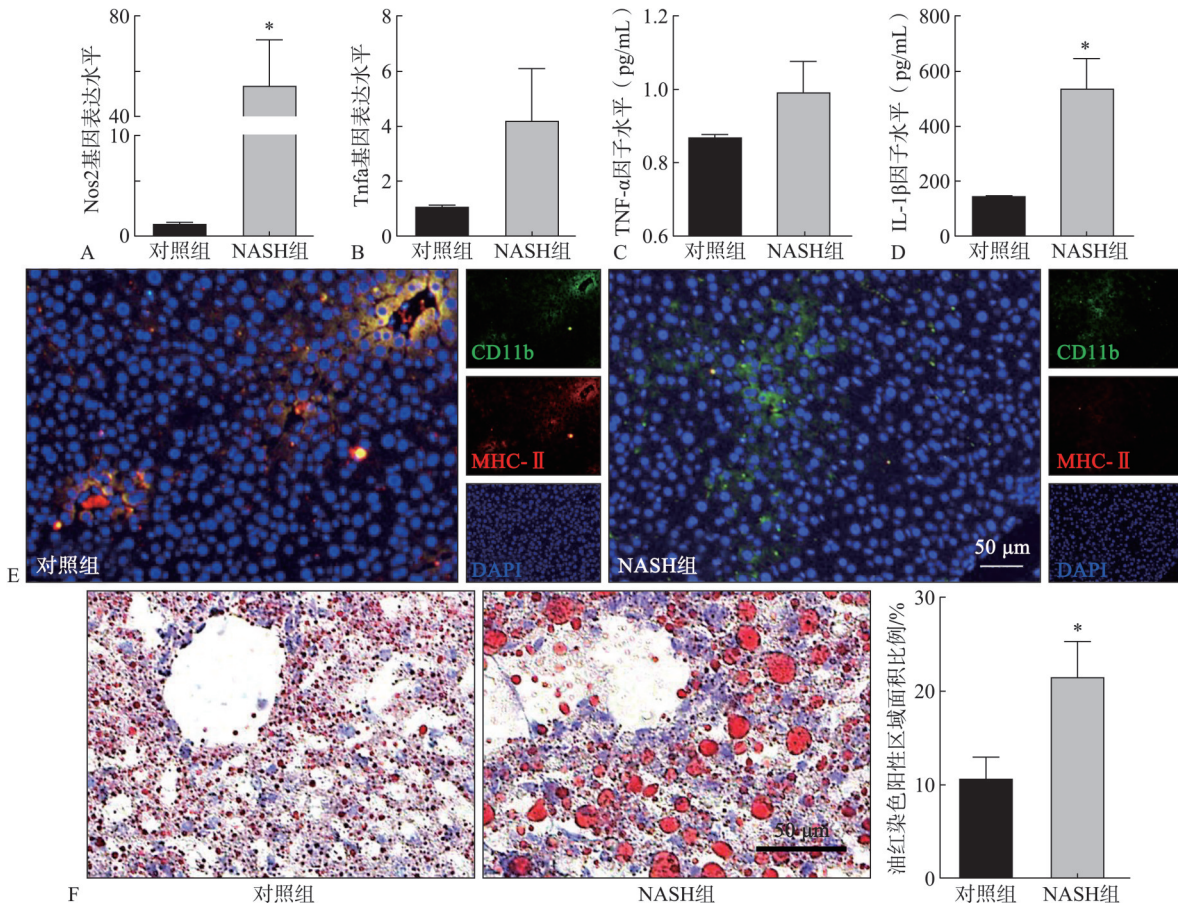
调 (图 4K)。这些体外研究结果支持体内实验的结论，即 *P. gingivalis* 感染的 NASH 肝脏中局部巨噬细胞抗原呈递功能和相关基因表达的变化可能是 NASH 发病的病理机制和潜在的治疗靶点。



A: 2组肝脏组织单细胞测序的tSNE结果; B: NASH组肝组织中单核巨噬细胞的数量显著增加 (从对照组的6.28%增加到NASH组的33.39%); C: NASH组的巨噬细胞表现出明显的异质性, 其中A图蓝色虚线标记的亚群与对照组的巨噬细胞特征显著不同, 其高表达补体基因C1qb、C1qc和脂质代谢相关基因Apoc; D: NASH组巨噬细胞的抗原呈递相关基因H2-Aa、Cd209a表达水平较低; E: 对测序结果中的细胞2群和5群进一步分析, 其表达M1和M2巨噬细胞标志物, 表明这群巨噬细胞是高度活化的; F: KEGG分析发现, 这群巨噬细胞对宿主免疫功能表现出负调控作用效果, 并参与了脂质储存过程。

图 2 单细胞测序结果表明NASH肝脏中巨噬细胞出现明显的异质性和亚群变化

Fig 2 Single-cell RNA sequencing results indicated the heterogeneity and subgroup changes in NASH-related macrophages



A、B: RT-PCR 结果显示, NASH 组 Nos2 和 Tnfa 基因表达增加; C、D: ELISA 结果显示, NASH 组 TNF- α 和 IL-1 β 表达上调; E: CD11b 和 MHC- II 荧光双染结果显示, NASH 肝脏中巨噬细胞抗原呈递功能受到抑制; F: 油红染色显示, NASH 组大量脂滴积聚。* $P < 0.05$ 。

图 3 体内研究证实 NASH 局部巨噬细胞的抗原呈递功能障碍

Fig 3 *In vivo* studies confirmed the antigen presentation dysfunction of NASH-related macrophages

3 讨论

脂质堆积、肝脏脂肪变性、炎症细胞浸润、细菌感染、氧化应激^[20]等全身代谢紊乱表现是 NAFLD/NASH 的主要病理表现。近年来,越来越多的证据^[21-23]表明,固有免疫细胞在 NASH 的进展中起着关键作用。然而,巨噬细胞在 NASH 中的调节机制尚不明确。肝脏巨噬细胞包括组织中常驻的枯否细胞(Kupffer 细胞)和从腹腔/骨髓趋化而来的巨噬细胞,它们通过产生不同的细胞因子、趋化因子、补体因子参与各种肝脏疾病的发生和发展。同时巨噬细胞作为抗原呈递细胞参与调节 T 细胞和 B 细胞的功能,对识别和清除微生物及细胞碎片至关重要,是维持肝组织稳态及降低肝组织炎症不可或缺的功能之一^[24]。巨噬细胞的抗原呈递功能是否在 NASH 组织中发生变化以及这种变化对疾病发展的调控意义尚不明确,需要体内

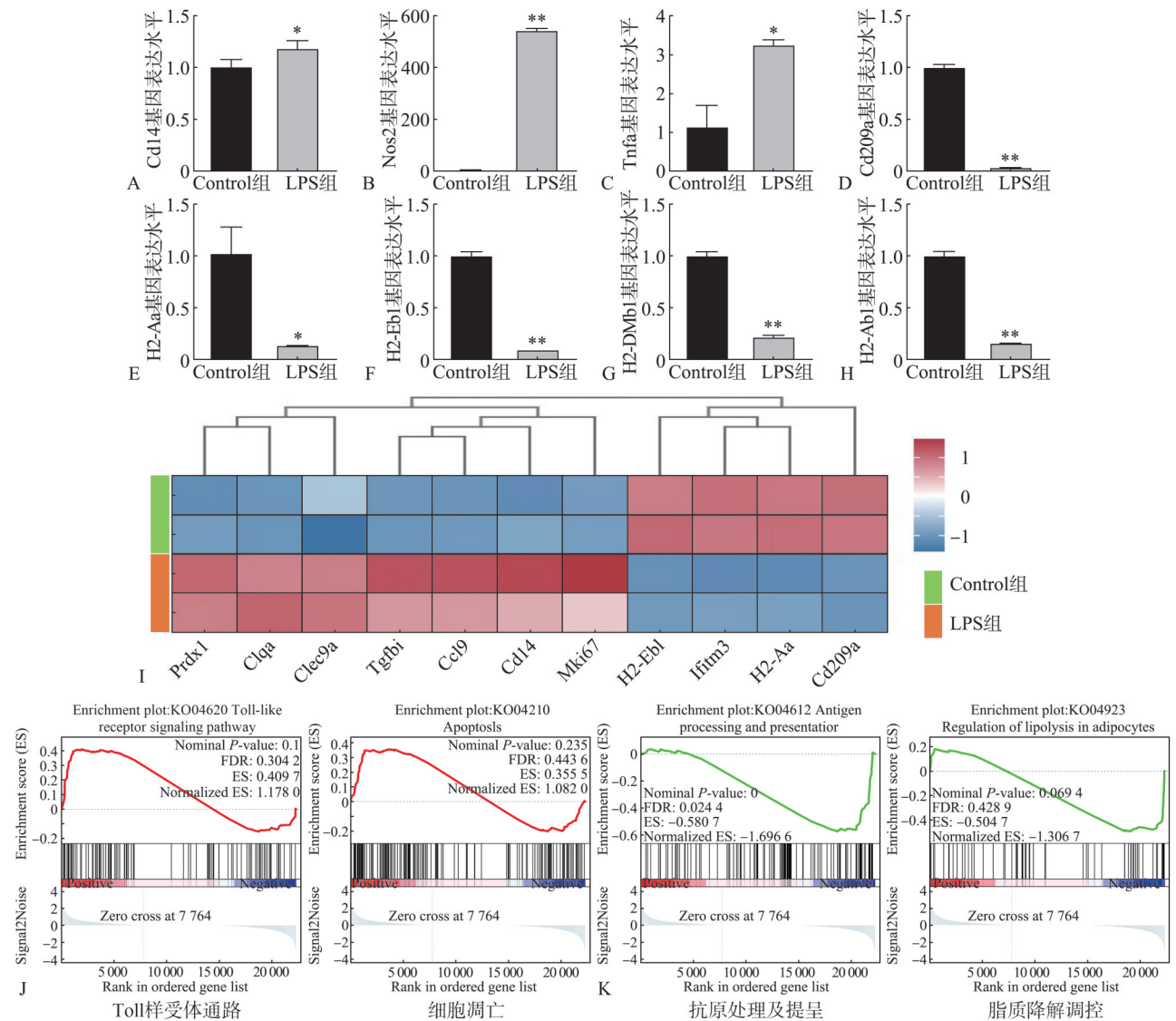
外研究证据证明。

P. gingivalis 作为牙周炎的主要致病菌之一,被证明与全身健康和多种系统性疾病息息相关。近年来,研究发现 *P. gingivalis* 通过调控体内巨噬细胞功能参与了多种全身脂代谢相关疾病的发病和进展。有学者^[25]发现,高脂血症兔肺泡巨噬细胞膜表面清道夫受体-A 的基因表达在 *Pg*-LPS 作用下显著增加,导致动脉粥样硬化的发病风险提高。而对肝脏微环境而言, *P. gingivalis* 可引起肝脏巨噬细胞浸润增加,导致基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-9、IL-1 β 、单核细胞趋化蛋白(monocyte chemoattractant protein, MCP)-1 表达上调,同时伴有脂代谢平衡受损以及血清脂多糖水平提高^[26]。然而,这是否意味着 *P. gingivalis* 参与并促进了 NASH 的发病尚不明确, *P. gingivalis* 在 NASH 发病过程中对巨噬细胞功能及分化的调控机制和靶点还需要进一步深入的研究。

本研究利用单细胞测序技术深入地探讨了合

并 *P. gingivalis* 感染的 NASH 肝脏中各种细胞表型及其功能变化。与健康肝脏中高表达 Cd209a 和 MHC-II 类基因的 Kupffer 细胞不同, NASH 相关巨噬细胞表现出明显的异质性, 包括高表达 C1qb 和 C1qc (补体功能相关基因^[27])、Mafb 和 Apoc (脂质代谢相关基因^[28-29]), 以及 Cd14 和 Ccl9 (炎症相

关基因^[30-31]), 低表达 Cd209a、H2-Aa、H2-Ab1 和 H2-DMb1。这些细胞高表达 M1 和 M2 表型的标记基因, 表明其被高度激活, 但抗原呈递相关基因被明显抑制, 这一结果提示其适应性免疫诱导功能可能受损。



A~C: Real-time PCR 结果显示, LPS 组巨噬细胞炎症因子 Cd14、Nos2 和 Tnfa 的表达水平增加; D~H: LPS 组 Cd209a、H2-Aa、H2-Eb1、H2-DMb1、H2-Ab1 的表达水平受到抑制; I: RNA-seq 分析热图显示 LPS 组与 Control 组之间的差异基因水平变化; J、K: GSEA 分析显示, LPS 组巨噬细胞的 Toll 样受体通路和细胞凋亡通路上调, 但其抗原处理及提呈通路和脂肪降解通路被抑制。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 4 体外研究表明 *Pg*-LPS 下调小鼠腹腔巨噬细胞的抗原呈递功能基因表达

Fig 4 *In vitro* studies showed that the antigen-presenting function genes of mouse peritoneal macrophages was down-regulated under *Pg*-LPS induction

通过进一步的体内验证和体外研究, 结果发现小鼠腹腔巨噬细胞的 MHC-II 类基因在 *P. gingivalis* 来源的 LPS 诱导下受到抑制, 这不利于免疫反应的调节和对凋亡细胞或细菌的清除, 从而加重了 NASH 的炎症和病理现象。本研究的结论与

以前的研究^[32]一致, 即 NASH 相关的巨噬细胞表现出明显的免疫耐受表型。本研究进一步展示了这类细胞的多个标志物和潜在调控靶点, 这将有助于未来 NASH 的机制探索和临床治疗策略的开发。

本研究尚存在一些不足之处, 如体内分组的

设计是基于探讨合并 *P. gingivalis* 感染的 NASH 小鼠肝脏局部微环境变化特点, 因此只设立了健康对照组及 *P. gingivalis* 感染的 NASH 模型组。在本研究 NASH 肝脏中发现的免疫耐受表型的巨噬细胞是否普遍存在于 NAFLD 的局部组织中并发挥关键作用, 需要未来更加详细和严谨的探索及验证。

综上, *P. gingivalis* 感染的 NASH 肝脏中存在一类与脂质代谢有关的巨噬细胞亚型。这些细胞高表达 C1qb、C1qc、Mafb、Apoe 和 Cd14, 但低表达 Cd209a、H2-Aa、H2-Ab1 和 H2-DMb1 等多个抗原呈递功能相关基因。这些巨噬细胞的活化和浸润可能是由于局部 *P. gingivalis* 来源的脂多糖的积累。本研究结果进一步阐明了 *P. gingivalis* 感染促进 NASH 发病的相关分子机制, 并为其临床治疗提供了几个潜在的治疗靶点。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

- [1] Xu X, Poulsen KL, Wu L, et al. Targeted therapeutics and novel signaling pathways in non-alcohol-associated fatty liver/steatohepatitis (NAFL/NASH)[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 287.
- [2] Zhang C, Yang M. Current options and future directions for NAFLD and NASH treatment[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(14): 7571.
- [3] Jayakumar S, Loomba R. Review article: emerging role of the gut microbiome in the progression of nonalcoholic fatty liver disease and potential therapeutic implications[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2019, 50(2): 144-158.
- [4] Nagasaki A, Sakamoto S, Arai T, et al. Elimination of *Porphyromonas gingivalis* inhibits liver fibrosis and inflammation in NASH[J]. *J Clin Periodontol*, 2021, 48(10): 1367-1378.
- [5] Sumida Y, Yoneda M. Current and future pharmacological therapies for NAFLD/NASH[J]. *J Gastroenterol*, 2018, 53(3): 362-376.
- [6] Diskin C, Pålsson-McDermott EM. Metabolic modulation in macrophage effector function[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 270.
- [7] Barreby E, Chen P, Aouadi M. Macrophage functional diversity in NAFLD-more than inflammation[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2022, 18(8): 461-472.
- [8] Kazankov K, Jørgensen SMD, Thomsen KL, et al. The role of macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(3): 145-159.
- [9] Mehal WZ, Schuppan D. Antifibrotic therapies in the liver[J]. *Semin Liver Dis*, 2015, 35(2): 184-198.
- [10] Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, et al. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ[J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(3): 181-194.
- [11] Ramachandran P, Pellicoro A, Vernon MA, et al. Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis[J]. *PNAS*, 2012, 109(46): E3186-E3195.
- [12] Tacke F, Zimmermann HW. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis[J]. *J Hepatol*, 2014, 60(5): 1090-1096.
- [13] Karlmark KR, Weiskirchen R, Zimmermann HW, et al. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis[J]. *Hepatology*, 2009, 50(1): 261-274.
- [14] Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(1): 56-65.
- [15] Schuppan D, Surabattula R, Wang XY. Determinants of fibrosis progression and regression in NASH[J]. *J Hepatol*, 2018, 68(2): 238-250.
- [16] Eming SA, Wynn TA, Martin P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration[J]. *Science*, 2017, 356(6342): 1026-1030.
- [17] Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines[J]. *Immunity*, 2014, 41(1): 14-20.
- [18] Hou R, Huang R, Zhou Y, et al. Single-cell profiling of the microenvironment in decidual tissue from women with missed abortions[J]. *Fertil Steril*, 2023, 119(3): 492-503.
- [19] Xia H, Liu Y, Xia G, et al. Novel isoquinoline alkaloid litcubanine A—A potential anti-inflammatory candidate [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 685556.
- [20] Caligiuri A, Gentilini A, Marra F. Molecular pathogenesis of NASH[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(9): E1575.
- [21] Poynard T, Munteanu M, Charlotte F, et al. Impact of steatosis and inflammation definitions on the performance of NASH tests[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*,

- 2018, 30(4): 384-391.
- [22] Arrese M, Cabrera D, Kalergis AM, et al. Innate immunity and inflammation in NAFLD/NASH[J]. *Dig Dis Sci*, 2016, 61(5): 1294-1303.
- [23] Schuster S, Cabrera D, Arrese M, et al. Triggering and resolution of inflammation in NASH[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(6): 349-364.
- [24] Williams M, Scott CL. Liver macrophages in health and disease[J]. *Immunity*, 2022, 55(9): 1515-1529.
- [25] 刘崇武, 吴春芳, 骆凯, 等. 牙龈卟啉单胞菌脂多糖和白细胞介素-10对高脂血症兔肺巨噬细胞SR-A表达的影响[J]. *福建医科大学学报*, 2014, 48(4): 213-216.
- Liu CW, Wu CF, Luo K, et al. The impact of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide and IL-10 on the expression of SR-A in hyperlipidemic rabbit alveolar macrophages[J]. *J Fujian Med Univ*, 2014, 48(4): 213-216.
- [26] 申道南, 吴亚菲, 赵蕾. 牙周致病菌在动脉粥样硬化发生发展中的作用研究[J]. *中华口腔医学杂志*, 2021, 56(6): 584-590.
- Shen DN, Wu YF, Zhao L. Roles of periodontal pathogens in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. *Chin J Stomatol*, 2021, 56(6): 584-590.
- [27] Willems E, Alkema W, Keizer-Garritsen J, et al. Biosynthetic homeostasis and resilience of the complement system in health and infectious disease[J]. *EBioMedicine*, 2019, 45: 303-313.
- [28] Civeira-Marín M, Cenarro A, Marco-Benedí V, et al. A-POE genotypes modulate inflammation independently of their effect on lipid metabolism[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 12947.
- [29] Tran MTN, Hamada M, Jeon H, et al. MafB is a critical regulator of complement component C1q[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1700.
- [30] Wu Z, Zhang Z, Lei Z, et al. CD14: biology and role in the pathogenesis of disease[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2019, 48: 24-31.
- [31] Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(10): 1882-1886.
- [32] Orsi LA, Kreutzfeldt M, Goossens N, et al. Tolerogenic properties of liver macrophages in non-alcoholic steatohepatitis[J]. *Liver Int*, 2020, 40(3): 609-621.

(本文编辑 李彩)

《口腔临床摄影新视角》出版发行

书籍名称：《口腔临床摄影新视角》

主编：彼得·谢里丹 (Peter Sheridan)

主译：杨宏业

出版社：辽宁科学技术出版社

出版时间：2023年3月

内容简介：本书主要讲述了口腔数码影像，口腔临床摄影的应用，摄影的原理，口腔临床摄影设备，反光板、牵引器和背景板，标准临床影像指南，口腔临床摄影注意事项，影像管理与后期处理，临床影像改善医患沟通等内容。

亮点解读：摄影中的数字化技术的出现简化了静态影像的获取和管理。这使得高质量的数码摄影在临床环境中变得可行。本书旨在帮助口腔专业人士，以最简单和最实用的方式，了解和实践口腔临床摄影。口腔临床摄影的要求和技术与其他摄影种类有很大的不同，诊疗环境相对稳定，光线和运动变量非常小，这使得相机设置无须进行过多的修改。在一个受掌控的摄影空间中工作，需要医生能够探索相关的摄影原理，而不需要掌握户外摄影的所有知识与技能。所需要的只是合适的相机设备、对细微参数设置的理解以及合理的体位。