DOI:10.16016/j.1000-5404.202103181

Gpr183 基因敲除小鼠的构建及其在急性肝损伤中功能初步分析

吴学文[1],尹思琪[2],钱 颖[2],杜 冰[2],秦居亮[2],陈金联[1] 232001 安徽 淮南,安徽理工大学医学院[1];201100 上海,华东师范大学生命科学学院生命医学研究所[2]

[**摘要**] **目的** 利用成簇的规律间隔短回文重复序列和相关蛋白 9(CRISPR/Cas9)基因编辑技术构建 Gpr183 全基因敲除小鼠模型,并对 Gpr183 受体在淋巴细胞的调控功能和在急性肝损伤过程中的作用进行了初步分析。**方法** 根据 CRISPR/Cas9 基因编辑技术实验方法构建 Gpr183 全基因敲除纯合子 F2 代小鼠,随后通过 Western blot 方法检测野生型和敲除型小鼠肝脏和脾脏组织 Gpr183 基因蛋白表达水平,并通过免疫荧光(IF)技术分析了野生型和敲除型小鼠脾脏淋巴细胞的分布情况以及 IL-17 和 IL-22 的表达水平,最后我们对 Gpr183 受体敲除后在小鼠急性肝损伤模型中进行了初步分析?。**结果** Gpr183 基因敲除小鼠可正常生长繁殖,F2 代纯合子小鼠(KO)较野生小鼠(WT)相比基因片段部分缺失,同时 Western blot 结果显示 KO 小鼠肝脏、脾脏组织中 Gpr183 基因表达蛋白缺失,IF 结果显示 Gpr183 受体可引起小鼠脾脏 B 淋巴细胞由滤泡中央区向滤泡边缘区迁移,并且减弱了脾脏淋巴细胞 IL-17 和 IL-22 的分泌功能($P<0.05$),同时在小鼠急性肝损伤诱导模型中,我们发现 Gpr183 受体敲除小鼠能明显缓解小鼠急性肝损伤过程($P<0.01$),差异具有统计学意义。**结论** 成功构建了 Gpr183 受体敲除小鼠模型,为 Gpr183 基因功能在体内研究提供了稳定的小鼠敲除模型,同时 Gpr183 受体敲除后能减轻小鼠急性肝损伤。

[**关键词**] CRISPR/Cas9 基因编辑技术;G 蛋白偶联受体;基因敲除;急性肝损伤
[**中图法分类号**] R-332; R394-33; R575 [**文献标志码**] A

Construction of GPR183 knockout mice and its function in acute liver injury

WU Xuewen[1], YIN Siqi[2], QIAN Ying[2], DU Bing[2], QIN Juliang[2], CHEN Jinlian[1] [1]Medical College of Anhui University of Science and Technology, Huainan, Anhui Province, 232001; [2]Institute of Biomedical Science, School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai, 201100, China

[**Abstract**] **Objective** To construct a GPR183 knockout mouse model by genome editing using clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (Cas9) system, and to analyze the role of GPR183 receptor in lymphocyte regulation and acute liver injury. **Methods** Firstly, GPR183 full-gene knockout homozygous F2 generation mice were constructed using CRISPR/Cas9 gene editing technique. Then, the expression level of GPR183 protein in the liver and spleen tissues of wild-type (WT) and knockout (KO) mice was detected by Western blotting and the results were compared; the distribution of spleen lymphocytes and the expression of IL-17 and IL-22 in WT and KO mice were analyzed by immunofluorescence (IF) assay. Finally, the function of GPR183 knockout was explored in mouse model with acute liver injury. **Results** GPR183 KO mice could grow and reproduce normally, and F2 homozygous KO mice had partial deletion of gene fragments as compared to WT mice. Meanwhile, Western blotting showed that GPR183 expression was missing in the liver and spleen tissues of KO mice. In addition, the results of IF assay suggested that GPR183 receptor induced the migration of spleen B lymphocytes from the central to the peripheral region of the follicles, and reduced the secretion of IL-17 and IL-22 by the spleen lymphocytes ($P<$

[**通信作者**] 陈金联,E-mail:xuewenmed@163.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

0.05). We also found that GPR183 KO mice significantly alleviated the process of acute liver injury in mice ($P<0.01$). **Conclusion** A GPR183 knockout mouse model is successfully established, which provides a stable animal model for the further study of GPR183 gene function *in vivo*. Moreover, the knockout of GPR183 receptor can alleviate acute liver injury in mice.

[**Key words**] CRISPR/cas9 gene editing technology; G protein coupled receptor; gene knockout; acute liver injury

Corresponding author: CHEN Jinlian, E-mail: xuewenmed@163.com.

Gpr183 也称为 Epstein-Barr virus-induced molecule 2(EBI2),其基因位于人的第 13 号染色体上,受鸟嘌呤核苷酸调控的一种膜蛋白受体,属于 G 蛋白偶联受体视紫红质家族成员[1-2]。Gpr183 受体广泛表达于免疫细胞膜上,尤其在受到 EBV 感染后淋巴细胞膜上有较高表达[3-4]。研究表明它是引导淋巴细胞定位的关键性趋化受体,能够在次级淋巴器官(如脾脏、淋巴结等)引导活化的 B 细胞由滤泡间区向滤泡外区迁移[5-7]。

由于 Gpr183 受体主要在免疫细胞膜上表达,因此目前人们对 Gpr183 受体的研究,主要是围绕免疫细胞开展的,如淋巴细胞、巨噬细胞等,既往研究表明 Gpr183 受体能够调控免疫细胞参与多种疾病的炎性反应过程[8],除此之外,Gpr183 受体在其它细胞膜上也有少量表达,例如:文献[9]报道利用糖尿病患者和非糖尿患者的胰岛细胞研究发现 Gpr183 受体能够增强胰岛素分泌,有效防止了葡萄糖中毒诱导 的 β 细胞功能障碍。G 蛋白偶联受体作为细胞膜上最大的膜蛋白受体家族在维持细胞稳态和引导疾病转归过程中发挥了重要的作用。因此构建稳定的动物敲除模型对深入研究 Gpr183 受体具有重要的意义。

传统的基因敲除系统方法(如 ZFN 即锌指核糖核酸酶和 TALENs 即转录激活因子样效应物核酸酶),缺乏良好的有效性和特异性,而 CRISPR 基因敲除系统具有成本低、周期短、突变效率高等特点[10-12]。本研究利用 CRISPR/Cas9 基因敲除技术构建 Gpr183 受体敲除小鼠,并验证了它对脾脏发育和淋巴细胞功能的影响,为 Gpr183 基因在细胞中的调控作用机制研究提供了一个稳定的敲除动物模型。

急性肝损伤是由多种致病因素导致的肝脏发生的急性炎症反应,其常见的病因有药源性、病毒性和酒精性等[13]。急性肝损伤形成的过程是体内多细胞参与作用的结果,我们已熟知肝脏内淋巴细胞产生的 IFN-γ 是急性肝损伤形成的重要环节,除此之外, IL-17 和 IL-22 也参与了急性肝损伤的形成[14-15]。我们猜想 Gpr183 受体在急性肝损伤疾病过程中是否也发挥了一定的功能,因此我们通过构建 Gpr183 全基因敲除小鼠对小鼠急性肝损伤进行了初步探究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 实验所用野生小鼠为 C57BL/6 品系,周龄为 6~8 周,健康雄性小鼠,购于上海斯莱克实验动物有限公司,饲养于华东师范大学 SPF 级实验动物中心。Gpr183 基因敲除小鼠由华东师范大学生命科学学院杜冰教授课题组和实验动物中心构建完成,动物实验由华东师范大学动物伦理委员会授权。

1.1.2 实验材料 低温高速离心机(Eppendof, Germany);PCR 仪(TaKaRa, Japan);6 孔细胞培养板(Thermo , USA);1640 培养基(Gibco, USA); FBS(Gibco, USA);反转录试剂盒,组织器官淋巴细胞分离液(Solaibio, CHN);反转录试剂盒(TaKaRa, Japan);qPCR 试剂盒(TaKaRa, Japan);Gpr183 Western blot 抗体(Thermo , USA);β-Actin Western blot 抗体(塞维尔,CHN);丙氨酸检测试剂盒 ALT(南京建成,CHN);天冬氨酸转氨酶 AST(南京建成,CHN);HE 染色试剂盒(南京建成,CHN)

1.2 实验方法

1.2.1 Gpr183 受体敲除小鼠的构建与鉴定 将小鼠 Gpr183 基因目标靶点 16 个碱基(CCACTG-GCAACGTCTC)与已经设计的片段合成完整的引物,体外进行扩增转录,得到 SgRNA。将 SgRNA(25 ng/μL)和 Cas9mRNA(50 ng/μL)用 TE 缓冲液稀释至 30 μL,置于冰上,移交至华东师范大学实验动物中心进行受精卵显微注射。

待小鼠出生 1 周左右,剪取小鼠的指甲,利用酚/氯仿法提取小鼠基因组 DNA。通过 PCR 进行扩增鉴定,PCR 引物设计在目标靶点左右。Gpr183 引物序列为:上游:5′-CTGGCCTTGGTTGTCATTG-3′;下游:5′-ACACCTGCGTACGTGTTGAT-3′。根据 PCR 鉴定结果,选择第 1 代小鼠中的杂合子进行交配,同上方法对其后代进行鉴定从而获得 Gpr183 基因敲除的纯合子小鼠。

1.2.2 鼠 Gpr183 基因表达蛋白 Western blot 检测 和敲除型小鼠肝脏和脾脏组织蛋白,用 BCA 试剂盒

测定蛋白总浓度,按比例稀释好蛋白,进行蛋白电泳。采用湿转法进行转膜(PVDF 膜),5% BSA 封闭液封闭 1 h,TBST 洗膜 3 次,加入 Gpr183 Western blot 抗体,4 ℃冰箱孵育过夜,洗膜,加入山羊抗鼠二抗孵育 1 h,洗膜,使用 Odyssey 仪器,选择 700/800 nm 进行荧光扫膜。

1.2.3 免疫荧光检测小鼠脾脏中淋巴细胞 各取 1 只野生型和敲除型小鼠脾脏,进行固定、脱水浸蜡处理后,制作小鼠脾脏组织石蜡蜡块和组织切片。组织切片抗原修复液修复,3% H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶,封闭液封闭 60 min,滴加 CD3 和 CD19(1∶100)多克隆抗体,4 ℃孵育过夜。第 2 天,取出复温,用 PBS 冲洗 3 次,加入荧光二抗,在黑暗条件下孵育 30 min,细胞核用 DAPI 染色 5~10 min 并在荧光显微镜下拍照。

1.2.4 脾脏淋巴细胞功能 qPCR 检测 按实验方法制备野生型和敲除型小鼠脾脏单细胞悬液,按组织器官淋巴细胞分离液试剂盒方法,分离出小鼠脾脏淋巴细胞。按 RNA 抽提试剂盒提取淋巴细胞 RNA,然后反转成 cDNA,采用 RT-qPCR 法检测小鼠脾脏中淋巴细胞 IL-17 和 IL-22 mRNA 的表达情况。

1.2.5 Gpr183 受体在小鼠急性肝损伤作用功能 小鼠急性肝损伤模型建立:6~8 周周龄 WT 和 Gpr183 KO 小鼠各 6 只,分为 4 组:WT 对照组($n=2$);WT 实验组($n=4$);Gpr183 KO 对照组($n=2$);Gpr183 KO 实验组($n=4$)。对照组橄榄油 1.0 mL/kg 小鼠腹腔注射,实验组 20% CCl4(橄榄油稀释)1.0 mL/kg 小鼠腹腔注射。小鼠于注射后 24 h 取出,眼球取血脱颈椎处死,取出肝脏组织,固定于 4%多聚甲醛中。

小鼠血清 ALT 和 AST 检测:将小鼠眼球取血的全血样品置于冰上静置 2 h,然后 3 000 r/min 4 ℃离心 15 min,取上层血清,进行 ALT 和 AST 检测前,样品均稀释 5 倍用。按 ALT 和 AST 检测试剂盒说明书进行实验操作,

小鼠肝脏 HE 染色:将固定好的小鼠肝脏组织,进行乙醇浓度梯度脱水、浸蜡、包埋、切片等处理,随后将切片进行二甲苯脱蜡、HE 染色、二甲苯透明、封片等处理,最后将制作好的肝脏组织 HE 染色切片在纤维镜下观察评估并拍照。

小鼠肝脏组织细胞相关功能 qPCR 检测:按实验方法步骤提取野生、敲除小鼠实验组和对照组的肝脏组织总 RNA,进而反转获得 cDNA,以 GAPDH 为内参,检测小鼠肝脏 IL-17、IL-22、TNF-α、IL-10 和 TGF-β 等相关基因的表达情况。

1.3 统计学分析

利用 Graphpad prism 8.0 分析软件,对数据结果进行分析,两组间比较采用独立样本 t 检验,$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 Gpr183 目标靶点和子一代 Gpr183 基因敲除小鼠的鉴定结果分析

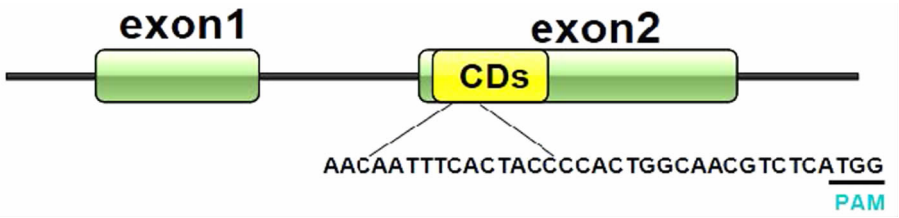
首先通过 Ensembl 网站上查找 Gpr183 基因敲除目标靶点,目标靶序列为 AACAATTTCACTACCCCAC-TGGCAACGTCTCATGG(图 1)。利用 CRISPRI/Cas9 技术获得 F0 代小鼠,取 F0 代小鼠基因组 DNA 测序,将嵌合体 F0 代小鼠与 WT 小鼠杂交获得 F1 代小鼠,再将 F1 代杂合子合笼繁殖,通过 F2 带小鼠基因型鉴定结果显示:在 F2 代小鼠中,可获得 Gpr183 基因缺失纯合子小鼠(KO)(图 2)。

2.2 $Gpr183^{-/-}$ 小鼠 Gpr183 基因蛋白表达缺失

通过 Western blot 检测结果显示,野生型(WT)小鼠肝脏和脾脏组织 Werstern blot 检测 Gpr183 基因表达蛋白正常表达,而在 Gpr183 基因敲除小鼠中表达缺失(图 3)。

2.3 $Gpr183^{-/-}$ 小鼠脾脏淋巴细胞差异性分布

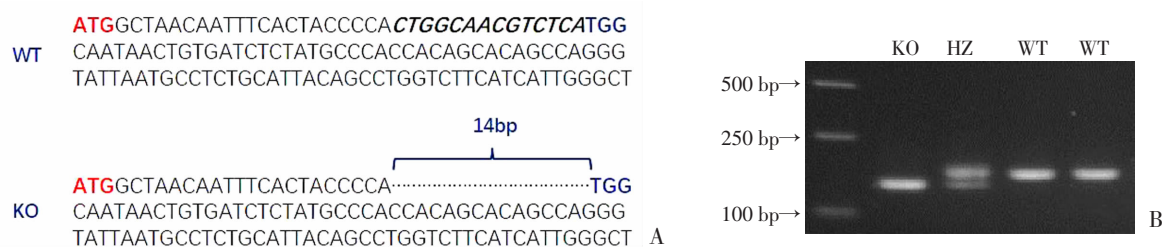
免疫荧光结果显示,野生型小鼠脾脏 T 淋巴细胞(CD3)和 B 淋巴细胞(CD19)在脾脏中的分布具有一定的规律,B 淋巴细胞(CD19)主要分布在脾脏淋巴滤泡的边缘区,T 淋巴细胞(CD3)主要分布在脾脏的中央区。而 Gpr183 受体敲除小鼠 B(CD19)淋巴细胞在脾脏淋巴滤泡边缘区和中央区均有分布,表明了 Gpr183 受体能引导 B 淋巴细胞由滤泡中央区向滤泡边缘区迁移(图 4)。



SgRNA Gpr183 序列:

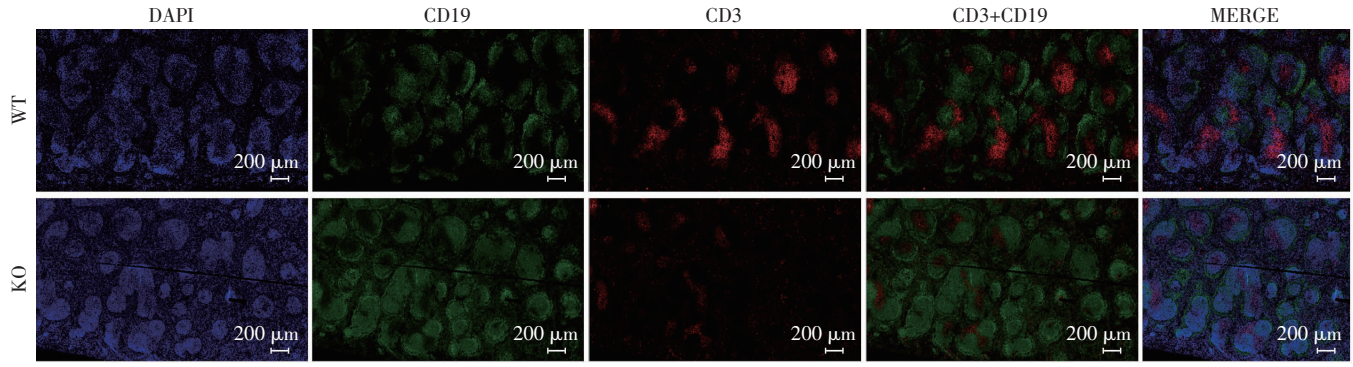
GATCACTAATACGACTCACTATAGGCCCACTGGCAACGTCTCAGTTTTAGAGCTAGAAAT

图 1 Gpr183 基因敲除目标靶点序列



KO:Gpr183 基因敲除小鼠;HZ:杂合子小鼠;WT:野生型小鼠

图 2 PAM 靶点序列(A)和小鼠基因型鉴定(B)



CD19:B 淋巴细胞 Marker;CD3:T 淋巴细胞 Marker;DAPI:细胞核染色

图 4 免疫荧光染色 WT 小鼠和 Gpr183$^{-/-}$小鼠脾脏变化

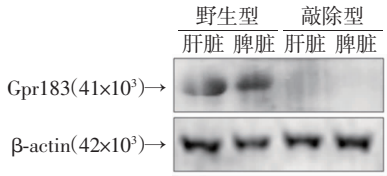


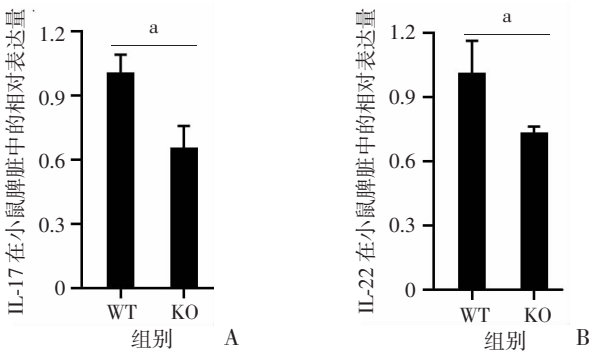
图 3 Gpr183 基因表达蛋白在小鼠肝脏和脾脏表达水平

2.4 Gpr183$^{-/-}$小鼠减弱了 IL-17 和 IL-22 基因的表达

IL-17 和 IL-22 主要由淋巴细胞产生,qPCR 结果显示,Gpr183 受体敲除小鼠脾脏淋巴细胞分泌 IL-17 和 IL-22 的功能较野生型小鼠脾脏淋巴细胞功能降低(图 5)。

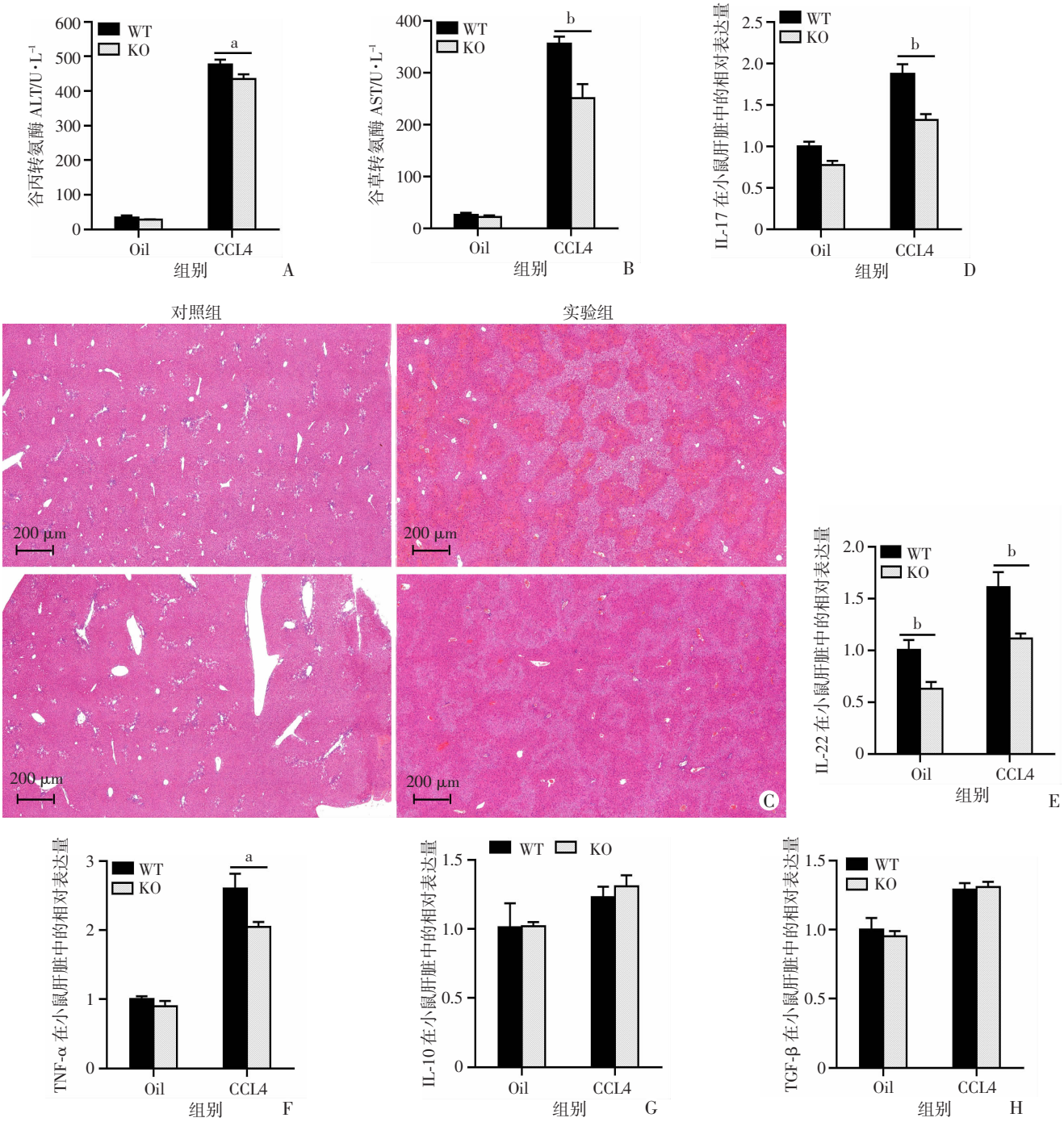
2.5 Gpr183 受体敲除后缓解了急性肝损伤

急性肝损伤是导致急性肝功能衰竭的重要原因,我们通过 Gpr183$^{-/-}$小鼠腹腔 CCL4 注射诱导急性肝损伤模型,与野生(WT)小鼠相比,Gpr183 KO 实验组小鼠血清 ALT 和 AST 含量低于 WT 实验组小鼠;小鼠肝脏组织 HE 染色结果显示:Gpr183 KO 实验组小鼠肝脏细胞坏死程度轻于 WT 实验组小鼠,WT 实验组小鼠肝脏细胞呈现大片状坏死,并出现了较多的淋巴细胞和中性粒细胞在肝脏组织中聚集;并且我们通过提取小鼠肝脏组织总 RNA,通过 RT-qPCR 检测 IL-17 和 IL-22 和促炎性因子 TNF-α 的基因表达水平,结果显示:Gpr183 KO 实验组小鼠肝脏组织,IL-17 和 IL-22 基因表达水平明显低于 WT 实验组小鼠,同时 KO 小鼠抑制了促炎性因子 TNF-α 的分泌,差异具有统计学意义。而抑炎性因子 IL-10 和 TGF-β WT 实验组和 KO 实验组相比,差异无统计学意义。综上结果显示,Gpr183 受体全基因敲除后,能通过抑制淋巴细胞 IL-17 和 IL-22 和促炎性因子 TNF-α 的基因表达,从而缓解了急性肝损伤的形成过程(图 6)。



a:$P<0.05$,与 KO 组比较

图 5 qPCR 检测 WT 小鼠和 Gpr183$^{-/-}$小鼠脾脏淋巴细胞 IL-17(A)和 IL-22(B) mRNA 表达水平



A:小鼠血清 ALT 检测结果;B:小鼠血清 AST 检测结果;C:HE 染色观察小鼠肝脏组织病理学变化;D:qPCR 检测小鼠肝脏组织 IL-17 基因表达;E:qPCR 检测小鼠肝脏组织 IL-22 基因表达;F: qPCR 检测小鼠肝脏组织 TNF-α 基因表达;G:qPCR 检测小鼠肝脏组织 IL-10 基因表达;HqPCR 检测小鼠肝脏组织 TGF-β 基因表达 a:$P<0.05$,与野生(WT)小鼠组比较;b:$P<0.01$,与野生(WT)小鼠组比较

图 6 Gpr183 受体敲除后缓解了急性肝损伤

3 讨论

G 蛋白偶联受体是一个非常庞大的膜蛋白受体家族,在目前已上市的药物中,基于 G 蛋白偶联受体开发的药物约占 40%,代表性的有肾上腺素受体、乙酰胆碱能受体、多巴胺受体等[16]。研究表明,G 蛋白偶联受体能感知细胞内外环境的变化,参与调控多种癌症的发生和发展[17-18]。Gpr183 受体虽然能引起淋巴细胞在次级淋巴器官聚集分布,但是 Gpr183 受体在其他细胞上的功能尚不是很清楚,因此构建一个稳定的 Gpr183 受体全基因敲小鼠就显得非常有必要了。

我们通过构建的 Gpr183 受体全基因敲除小鼠在

急性肝损伤疾病模型中进行了初步的功能炎症?,发现Gpr183受体全基因敲除后缓解了急性肝损伤形成的过程,能通过抑制淋巴细胞促炎因子IL-17和IL-22的分泌来介导的这个过程。然而它具体在淋巴细胞的调控机制我们未进行深入探究,并且Gpr183受体在急性肝损伤过程中是否能通过影响其他类型的细胞而参与调控疾病的发生和发展,我们也未进行研究。

因CRISPR基因敲除系统敲除小鼠具有稳定繁殖的优势,目前已经广泛用于肿瘤疾病的研究中,由于肿瘤的发生、发展常常伴随着癌基因的激活、抑癌基因的失活或者染色体重排的出现,CRISPR/Cas9技术可以使癌基因的功能尚失,也可以使抑癌基因的功能重新激活。但由于SgRNA仅能靶向20 bp的DNA序列,常常会出现脱靶效应。合理设计SgRNA以及合理选择靶点位置,可以减少脱靶效应的概率。然而CRISPR/Cas9技术在生物细胞分子水平上的研究还需进一步考察,我们期待今后该技术能够在个性化肿瘤治疗中能够发挥巨大作用,为肿瘤患者带来新的希望。

参考文献:

[1] DAUGVILAITE V, MADSEN C M, LÜCKMANN M, *et al*. Biased agonism and allosteric modulation of G protein-coupled receptor 183—a 7TM receptor also known as Epstein-Barr virus-induced gene 2[J]. Br JPharmacol, 2017, 174(13): 2031-2042. DOI: 10.1111/bph.13801.

[2] SHEN Z J, HU J, KASHI V P, *et al*. Epstein-Barr virus-induced gene 2 mediates allergen-induced leukocyte migration into airways[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2017, 195(12): 1576-1585. DOI: 10.1164/rccm.201608-1580OC.

[3] WILLINGER T. Oxysterols in intestinal immunity and inflammation[J]. J Intern Med, 2019, 285(4): 367-380. DOI: 10.1111/joim.12855.

[4] WILLINGER T. Metabolic control of innate lymphoid cell migration[J]. Front Immunol, 2019, 10: 2010. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02010.

[5] TANEERA J, MOHAMMED I, MOHAMMED A K, *et al*. Orphan G-protein coupled receptor 183 (GPR183) potentiates insulin secretion and prevents glucotoxicity-induced β-cell dysfunction[J]. Mol Cell Endocrinol, 2020, 499: 110592. DOI: 10.1016/j.mce.2019.110592.

[6] NEVIUS E, GOMES A C, PEREIRA J P. Inflammatory cell migration in rheumatoid arthritis: a comprehensive review[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2016, 51(1): 59-78. DOI: 10.1007/s12016-015-8520-9.

[7] 赵国华, 浦佳丽, 唐北沙. ZFN、TALEN和CRISPR/Cas9基因编辑技术在疾病研究及基因治疗中的应用[J]. 中华医学遗传学杂志, 2016, 33(6): 857-862. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2016.06.025.
ZHAO G H, PU J L, TANG B S. Applications of ZFN, TALEN and CRISPR/Cas9 techniques in disease modeling and gene therapy[J]. Chin J Med Genet, 2016, 33(6): 857-862. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2016.06.025.

[8] CHENG Z, LI-SHA G, YUE-CHUN L. Autonomic nervous system in viral myocarditis: pathophysiology and therapy[J]. Curr Pharm Des, 2016, 22(4): 485-498. DOI: 10.2174/1381612822666151222160810.

[9] REINECKE B A, WANG H, ZHANG Y. Recent advances in the drug discovery and development of dualsteric/ bitopic activators of G protein-coupled receptors[J]. Curr Top Med Chem, 2019, 19(26): 2378-2392. DOI: 10.2174/1568026619666191009164609.

[10] JIANG Y H, ZHUO X, MAO C Q. G protein-coupled receptors in cancer stem cells[J]. Curr Pharm Des, 2020, 26(17): 1952-1963. DOI: 10.2174/1381612826666200305130009.

[11] WANKE F, MOOS S, CROXFORD A L, *et al*. EBI2 is highly expressed in multiple sclerosis lesions and promotes early CNS migration of encephalitogenic CD4 T cells[J]. Cell Rep, 2017, 18(5): 1270-1284. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.01.020.

[12] LI J, LU E, YI T, *et al*. EBI2 augments Tfh cell fate by promoting interaction with IL-2-quenching dendritic cells[J]. Nature, 2016, 533(7601): 110-114. DOI: 10.1038/ nature17947.

[13] HO B, LOH S, CHAN W, *et al*. In vivo genome editing as a therapeutic approach[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(9): 2721. DOI: 10.3390/ijms19092721.

[14] SHAN Q, BALTES N J, ATKINS P, *et al*. ZFN, TALEN and CRISPR-Cas9 mediated homology directed gene insertion in Arabidopsis: a disconnect between somatic and germinal cells[J]. J Genet Genom, 2018, 45(12): 681-684. DOI: 10.1016/j.jgg.2018.07.011.

[15] WANG W, CHEN Z X, GUO D Y, *et al*. Regulation of prostate cancer by hormone-responsive G protein-coupled receptors[J]. Pharmacol Ther, 2018, 191: 135-147. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.06.005.

[16] DEVARBHAVI H, CHOUDHURY A K, SHARMA M K, *et al*. Drug-induced acute-on-chronic liver failure in Asian patients[J]. Am J Gastroenterol, 2019, 114(6): 929-937. DOI: 10.14309/ajg.0000000000000201.

[17] BAO S, ZHAO Q, ZHENG J, *et al*. Interleukin-23 mediates the pathogenesis of LPS/GalN-induced liver injury in mice[J]. Int Immunopharmacol, 2017, 46: 97-104. DOI: 10.1016/j.intimp.2017.03.001.

[18] WU Q, CHEN J, HU X, *et al*. Amphiregulin alleviated concanavalin A-induced acute liver injury via IL-22[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2020, 42(5): 473-483. DOI: 10.1080/08923973.2020.1810271.

(**收稿**:2021-03-22;**修回**:2021-06-01)

(编辑 王 红)