

GPR108 缺失对脂多糖诱发脓毒症小鼠的炎症反应

张银涛¹, 杨萍¹, 臧丹丹², 涂珍珍³, 徐如月¹, 周海胜^{1,2}

(安徽医科大学¹生物化学教研室、²科研实验中心、³临床免疫研究所, 合肥 230032)

摘要 目的 探究 G 蛋白偶联受体 108 (GPR108) 的缺失对脂多糖 (LPS) 诱导的脓毒症小鼠所产生全身性炎症反应的影响。方法 雄性 C57BL/6 小鼠和 GPR108 基因敲除鼠随机分为 4 组: WT 组、WT-LPS 组、KO 组、KO-LPS 组。观察不同组小鼠的生理特征, 肝脏、肺组织的形态变化。提取骨髓来源的巨噬细胞流式检测其 M1 极化情况, 同时检测其肝脏、肺组织、巨噬细胞及血清的白细胞介素-6 (IL-6) 的表达水平。结果 KO-LPS 组小鼠肝脏、肺组织损伤表现明显, KO-LPS 组小鼠较 WT-LPS 组小鼠骨髓源性巨噬细胞向 M1 极化的数量明显多; 同时, KO-LPS 组小鼠在组织水平、细胞水平、血清水平检测 IL-6 的表达均明显高于 WT-LPS 组小鼠 ($P < 0.05$)。结论 在 LPS 诱导的脓毒症小鼠全身性炎症感染时, GPR108 缺失加重全身炎症反应。GPR108 对 LPS 诱导的脓毒症小鼠的炎症反应具有抑制作用。

关键词 脓毒症; G 蛋白偶联受体 108; 巨噬细胞; 脂多糖; 白细胞介素-6

中图分类号 R 34

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)11-1896-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.11.002

脓毒症是由宿主感染反应失调引发的全身炎症反应性综合征, 是烧伤、创伤以及外科手术常见的并发症, 脓毒症常伴发多器官功能损伤, 其中, 肺及肝脏是脓毒症病情发展过程中最容易发生损伤的器官^[1]。宿主反应失调在脓毒症的发展中尤为重要, 其中免疫细胞的重塑起着重要作用。当发生脓毒症感染, 机体表现出促炎宿主反应, M1 巨噬细胞的过度活化, 从而导致大量的白细胞介素-6 (interleukin 6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,

TNF- α) 等细胞因子产生引发细胞因子风暴^[2]。大多数脓毒症是由革兰阴性细菌感染引起的, 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰阴性菌的细胞壁主要成分, 也是诱发脓毒症的主要内毒素。LPS 通过活化 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4), 诱发生机体产生包括 IL-6、TNF- α 在内的多种细胞因子, 从而发生炎症反应, 并导致肝脏、肺脏等多器官的损伤。有研究^[3]显示人体对于 LPS 反应的差异性与 TLR4 的突变有关。G 蛋白偶联受体 108 (G protein-coupled receptor 108, GPR108) 是 G 蛋白偶联受体超家族成员, 最初在人肺组织中获得 cDNA 序^[4]。前期研究^[5]表明, GPR108 是 TLRs 的负性调控分子, 在参与 TLR 介导的免疫应答保持平衡状态具有重要的作用。其调控的分子机制是抑制核因子 κ B (nuclear factor- κ -gene binding, NF- κ B) 信号通路及

2024-08-20 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82071832); 安徽医科大学研究生科研与实践创新项目 (编号: YJS20230003)

作者简介: 张银涛, 男, 硕士研究生;

周海胜, 男, 教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail: haishengs@ahmu.edu.cn

resistant CML patients and IM-resistant CML cells and overexpression of miR-141-5p could inhibit the growth of IM-resistant CML cells and promote their apoptosis. Research on tumor bearing mice had shown that miR-141-5p inhibits tumor growth *in vivo*. Finally, it was found that miR-141-5p could directly target ABCG1 in IM-resistant CML cells to regulate CML occurrence. **Conclusion** miR-141-5p and ABCG1 form a competing endogenous RNA (ceRNA) network to function in IM resistance, thus facilitating CML progression.

Key words chronic myeloid leukemia; miR-141-5p; imatinib; ABCG1; drug resistance; K562

Fund programs Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2008085MH296); Scientific Research Project of Anhui Medical University (No. 2020xkj186); Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2022AH051178)

Corresponding author Bao Jing, E-mail: baojing@ahmu.edu.cn

其下游的炎症因子 IL-6 的表达和分泌。为了探讨 GPR108 在脓毒症中的作用,该研究拟利用 LPS 诱发脓毒症,观察 GPR108 缺失对脓毒症小鼠发生全身性炎症反应的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 8周正常 C57BL/6J(wild type, WT)以及 Gpr108 敲除鼠(knockout, KO)体质量约为 20 g,均由本课题组繁殖,饲养于 SPF 级动物房,饲养环境维持在 23~25 °C 内,湿度 65%,12 h 明暗交替,自由饮食和进水。

1.1.2 抗体及主要试剂 免疫组化试剂购自北京中杉金桥生物公司(PV-9000);小鼠血清炎症因子检测试剂盒 LEGENDplex 购自深圳达科为生物公司;抗兔 IL-6 抗体购自杭州华安生物;巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)购自苏州近岸蛋白;LPS 购自美国 MedChemExpress 公司;FITC-CD11b 抗体购自美国 Invitrogen 公司;PE-F4/80 抗体、BB700-CD86 均购自美国 BD Biosciences 公司;HRP 标记的抗兔 IgG 购自美国 Cell Signaling Technology 公司。PCR 引物由北京擎科生物科技有限公司合成,其序列为:Gpr108KO (F): 5'-ATTGTACCACAAGAGGCTGAACTG-3', Gpr108KO (R): 5'-GGATGGGTGAAAAGTCGGT-TATCA-3'; Gpr108WT (F): 5'-TGAGATTGGGAG-GAGTTTGG-3', Gpr108WT (R): 5'-GGATGAAGT-CAGGCTCCGTC-3'。

1.2 方法

1.2.1 Gpr108 敲除小鼠的基因型鉴定 剪取小鼠鼠尾,剪碎,鼠尾抽提液抽提,使用氯仿、异丙醇离心以提取鼠尾基因组 DNA,加入缓冲液溶解 DNA,逆转录 PCR,琼脂糖凝胶鉴定小鼠 DNA 基因型。

1.2.2 LPS 诱导脓毒症小鼠模型建立 选取雄性 8 周龄 C57BL/6 小鼠野生型和 Gpr108 敲除型各 6 只,将小鼠分为野生型假手术组(WT 组)、野生型实验组(WT-LPS 组)、Gpr108 敲除型假手术组(KO 组)和 Gpr108 敲除型实验组(KO-LPS 组)各 3 只。其中,实验组小鼠造模前禁食 12 h 后,腹腔注射 LPS 10 mg/kg,假手术组注射等量生理盐水。注射 24 h 之后,对所有小鼠进行眼球取血,并处死小鼠收集肺、肝脏,一半用于固定切片做苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE)以及免疫组化,一半用于组织研磨,进行 Western blot,并提取小鼠

骨髓巨噬细胞用于流式检测和蛋白提取。本实验过程中对动物的处理方法符合动物伦理学标准,动物伦理编号为:安徽医科大学 LLSC20200007。

1.2.3 HE 染色 4%多聚甲醛固定肺和肝脏组织,脱水,石蜡包埋并切片,二甲苯及乙醇脱水,然后对切片使用苏木精染核,伊红染料染细胞质,之后通过光学显微镜观察组织的病理变化情况。

1.2.4 免疫组化 4%多聚甲醛固定肺和肝脏组织,脱水,石蜡包埋并切片,二甲苯及乙醇脱水,抗原修复,室温阻断 1 h,封闭 40 min,4 °C 孵育一抗过夜,次日恢复室温,反应增强,室温孵育二抗 1 h,显色,苏木精染核,光学显微镜下观察炎症因子表达情况。

1.2.5 Western blot 称量等量的肺和肝脏组织,加入裂解液研磨组织蛋白;细胞直接加入裂解液冰上裂解,全都加入蛋白上样缓冲液,变性,上样聚丙烯酰胺凝胶电泳,采用半干转膜法转膜,5%脱脂牛奶室温封闭,2 h 后孵育一抗 IL-6(1:1 000 稀释),4 °C 冰箱中孵育过夜,次日孵育二抗 HRP 标记的抗兔 IgG(1:5 000 稀释),室温孵育 1 h,凝胶成像仪成像。

1.2.6 骨髓来源巨噬细胞(bone marrow derived macrophage, BMDM)的分离、培养和分化 将实验小鼠大腿骨转移至超净工作台,确保整个过程无菌操作,置于磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)中,剔除骨骼上的剩余组织。用 5 ml 无菌注射器针头插入股骨中,用无菌 PBS 缓冲液吹出所有骨髓并将细胞吹散,通过 100 μm 的细胞过滤器过滤到离心管中,离心,重悬在 500 μl 的红细胞裂解缓冲液中,置于冰上 5 min,加入 500 μl 的 PBS,离心,去除上清液,用含 20%胎牛血清、1%青、链霉素和 20 ng/ml M-CSF 的高糖 DMEM 完全培养基重悬,培养于 5% CO₂ 的 37 °C 恒温培养箱中,3 d 后,更换一半新鲜的分化培养基。细胞培养 6~7 d 后,完全分化为巨噬细胞。

1.2.7 流式细胞分析技术 流式细胞分析技术检测 M1 型 BMDM:收集原代培养细胞,离心,PBS 洗涤 1 次,再用 100 μl 含有 2% FBS 的 PBS 缓冲液重悬,添加 F4/80、CD11b 抗体标记 BMDM,CD86 抗体标记 M1 极化 BMDM,避光孵育,离心,用 2% FBS 的 PBS 缓冲液重悬,流式分析仪上机检测。流式细胞分析技术检测血清炎症因子:小鼠眼球取血,离心收取上清液,使用 assay buffer 稀释,制备标准品孔做标准曲线,样本孔检测代用,各孔混合 beads,室温

避光震荡孵育 2 h, 使用 Wash Buffer 洗涤离心弃上清液, 加入检测抗体, 室温避光震荡孵育 1 h, 加入 SA-PE 室温避光震荡孵育 30 min, 用 Wash Buffer 洗涤并重悬至流式管中, 流式细胞仪进行分析。

1.3 统计学处理 实验数据采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行分析。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用独立样本 *t* 检验和单因素方差分析进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Gpr108 小鼠敲除鉴定 为了鉴定实验小鼠的基因型, 提取 KO 和 WT 小鼠鼠尾基因组 DNA 分别用对应的引物进行 PCR 扩增。电泳结果如图 1 所示: 其中 WT 小鼠在 621 bp 处出现特异性条带, 在 326 bp 处显示阴性结果; KO 小鼠在 326 bp 处出现特异性条带, 在 621 bp 处显示阴性结果。

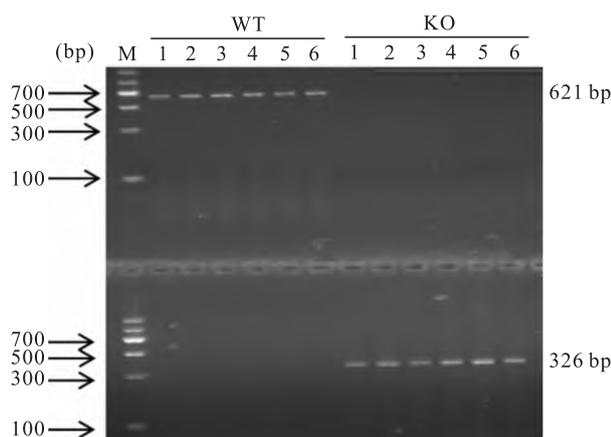


图1 PCR检测小鼠鼠尾基因组DNA的基因型鉴定

Fig.1 Identification of mouse tail genotype DNA using PCR

M: DNA marker (DL2000); WT: wild-type mice, lanes 1-6 (left); KO: Gpr108 knockout mice, lanes 1-6 (right).

2.2 GPR108 缺失加剧 LPS 诱导的脓毒症肝损伤

利用 LPS 诱发脓毒症小鼠模型, 在建立模型的 24 h 过程中: WT-LPS 组的 3 只小鼠均能够存活; 而 KO-LPS 小鼠存活 2 只, 死亡 1 只。在 KO-LPS 组小鼠中, LPS 注射 24 h 后出现全身无力、寒颤、呼吸急促等现象。为观察 LPS 诱导的脓毒症肝损伤, 对小鼠肝脏组织进行 HE 染色。结果显示(图 2A): WT 组的肝细胞形态正常; 24 h LPS 模型组中 KO-LPS 较 WT-LPS 组肝细胞分布不均匀, 出现空泡且核固缩、炎性细胞浸润更加严重。为了检测肝组织损伤是否与 IL-6 的分泌有关, 对收集的肝组织进行免疫组化分析, 结果显示与 WT 组相比, WT-LPS 组肝组

织中 IL-6 表达变化不明显; 而 KO-LPS 组的肝组织中 IL-6 具有较高的表达水平(图 2B)。通过检测免疫组化染色的光密度比较分析结果证实: KO-LPS 组与 WT-LPS 组相比, IL-6 表达明显升高, 差异有统计学意义($F = 768.0, P < 0.001$)(图 2C)。同时, 将肝组织提取的蛋白进行 Western blot 检测, 结果显示 KO-LPS 组的 IL-6 表达量明显高于 WT-LPS 组, 二者比较差异有统计学意义($F = 17.25, P = 0.0066$)(图 2D、E)。

2.3 GPR108 缺失加剧 LPS 诱导的脓毒症肺损伤

为了观察 LPS 诱导小鼠脓毒症模型的肺组织损伤状况, 对收集的小鼠肺组织进行 HE 染色。结果显示 WT 组小鼠肺泡壁薄, 肺组织结构正常(图 3A)。与 WT 组相比, 24 h LPS 模型组中 KO-LPS 组较 WT-LPS 组的小鼠出现肺泡壁增厚、间隔增宽, 肺间质中炎性细胞浸润更加严重。免疫组化检测肺组织中 IL-6 的表达水平, 结果显示, 与 WT 组相比, 两组模型组肺组织中 IL-6 表达明显升高; 且 KO-LPS 组较 WT-LPS 组肺组织中 IL-6 表达水平更高(图 3B)。通过检测免疫组化染色的光密度, 比较分析结果证实: KO-LPS 组与 WT-LPS 组相比, IL-6 表达明显升高, 差异有统计学意义($F = 848.7, P < 0.001$)(图 3C); 肺组织提取的蛋白经 Western blot 检测, 结果显示 KO-LP 组的 IL-6 表达量高于 WT-LPS 组($F = 85.20, P < 0.001$)(图 3D、E)。

2.4 GPR108 缺失增加 LPS 诱导脓毒症模型小鼠中 M1 型巨噬细胞和血清 IL-6 的水平

小鼠的股骨分离巨噬细胞, 体外培养后利用 M-CSF 诱导, 通过流式细胞仪筛选出 $F4/80^+$ 、 $CD11b^+$ BMDMs(图 4A), 然后检测 $CD86^+$ 的 M1 型 BMDMs。结果显示 M1 型 BMDMs 在 WT 组小鼠和 KO 小鼠之间差异无统计学意义($P = 0.4255$)(图 4B、C)。LPS 诱发脓毒症模型时, WT-LPS 组小鼠和 KO-LPS 组小鼠的 M1 ($F4/80^+ CD11b^+ CD86^+$) 型 BMDMs 比例较对照组都明显升高, 其中 WT-LPS 组 M1 型 BMDMs 的比例为 29.72%, KO-LPS 组小鼠为 37.98%; 同时, KO-LPS 组小鼠的 M1 型 BMDMs 的比例显著高于 WT-LPS 组小鼠($F = 148.3, P < 0.001$)。收集不同组别的 BMDMs 蛋白, Western blot 检测其 IL-6 表达量。结果显示: KO-LPS 组 BMDMs 的 IL-6 表达量显著高于 WT-LPS 组($F = 12.91, P = 0.036$)(图 4D、E)。

为了观察 GPR108 缺失对 LPS 诱发脓毒症时炎症因子 IL-6 的影响, 腹腔注射 LPS(10 mg/kg) 24 h

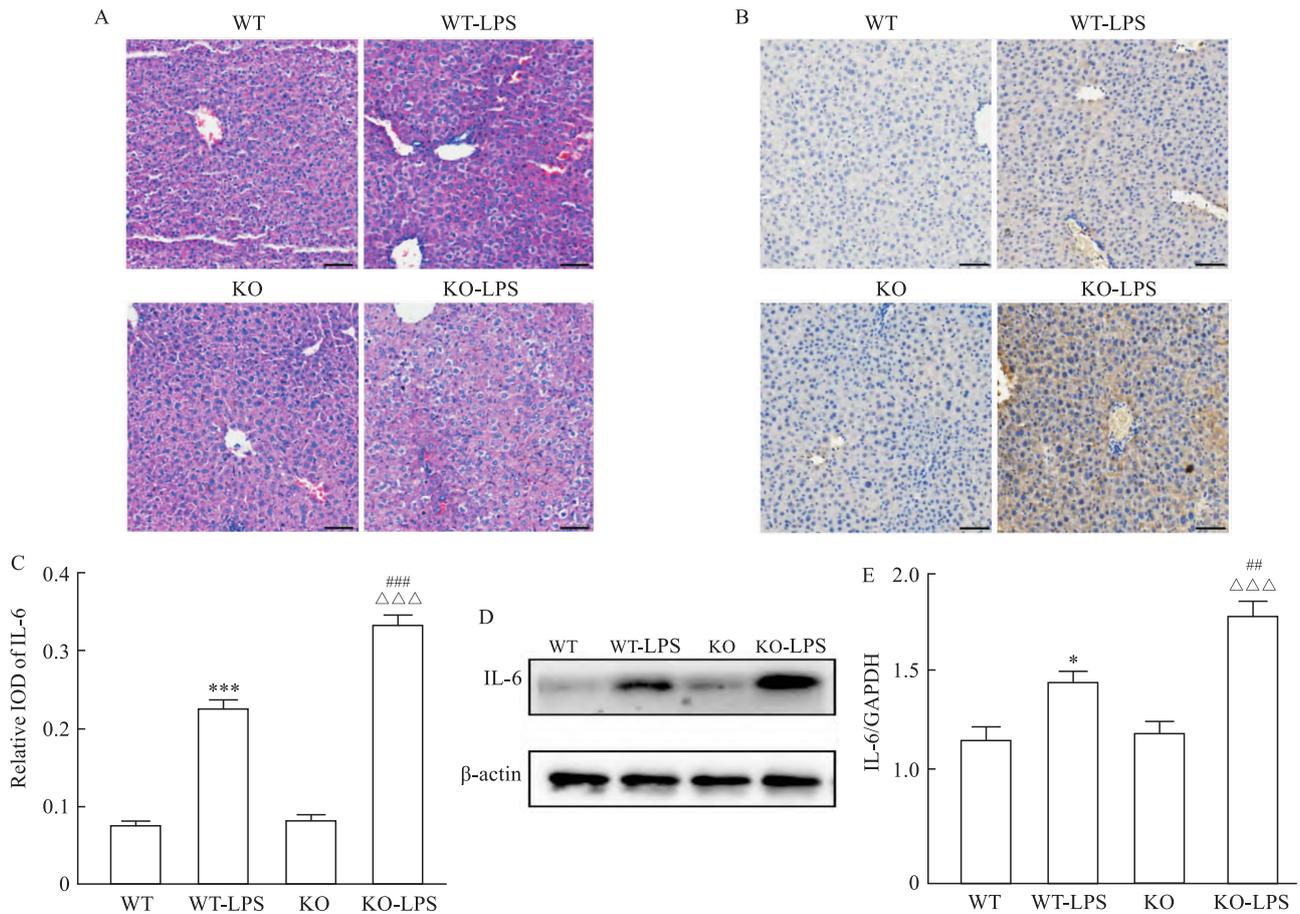


图2 GPR108 缺失加重 LPS 诱导脓毒症的肝损伤

Fig. 2 Absence of GPR108 exacerbated liver damage in LPS-induced sepsis

A: Mouse liver tissue HE staining $\times 200$; B: The expression of IL-6 in liver tissue was detected by IHC $\times 200$; C: Analysis of the average optical density of IL-6 index detected by IHC between different groups of mouse liver tissue; D: The level of IL-6 molecular expression in mouse liver was detected by Western blot; E: The relative quantitative analysis of IL-6 protein in mouse liver tissue with β -actin as the internal reference; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs WT; $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs KO; ### $P < 0.01$, ### $P < 0.01$ vs WT-LPS.

后,收集实验各组小鼠血清。通过 LEGENDplex 流式多因子检测法检测各组小鼠血清中的 IL-6 的含量。根据试剂盒说明孵育 beads 和抗体后,通过 FACS Verse 流式细胞仪收集数据,利用多因子在线分析软件制作标准曲线,最后分析各组 IL-6 的浓度。结果显示(图 4F、G):与 WT 组相比,经 LPS 诱导之后,血清 IL-6 分泌均有所升高,其中, KO-LPS 组血清 IL-6 值为 1.6 mg/ml (试剂盒测量上限); WT-LPS 组血清 IL-6 为 0.071 ~ 0.149 mg/ml,与 WT-LPS 组相比, KO-LPS 组血清 IL-6 水平明显增加,差异有统计学意义($F = 4.888$, $P < 0.001$)。

3 讨论

脓毒症是由细菌或真菌感染导致的严重疾

病^[6]。在建立脓毒症动物模型中,较为常见的有通过注射细菌或细菌毒素、盲肠结扎穿孔术或注射 LPS 等方法。其中 LPS 是脓毒症和感染性休克中最常见的微生物介质,也是革兰阴性菌外膜的主要成分,作为一种病原体相关的分子模式,主要由模式识别受体 TLR4 进行特异性识别,导致炎症反应发生,从而释放 IL-6、TNF- α 等炎症因子和一氧化氮、反应活性氧等生物活性介质进而引起炎症的瀑布级联反应,造成局部感染以及肝、肾和肺等组织的损伤甚至威胁生命^[7]。本研究通过腹腔注射 LPS 后,肝和肺组织均发生了损伤,并伴有炎症细胞浸润,同时血清 IL-6 的水平均显著增加,由此证实成功建立了小鼠脓毒症模型。

GPR108 作为 G 蛋白偶联受体超家族成员,目

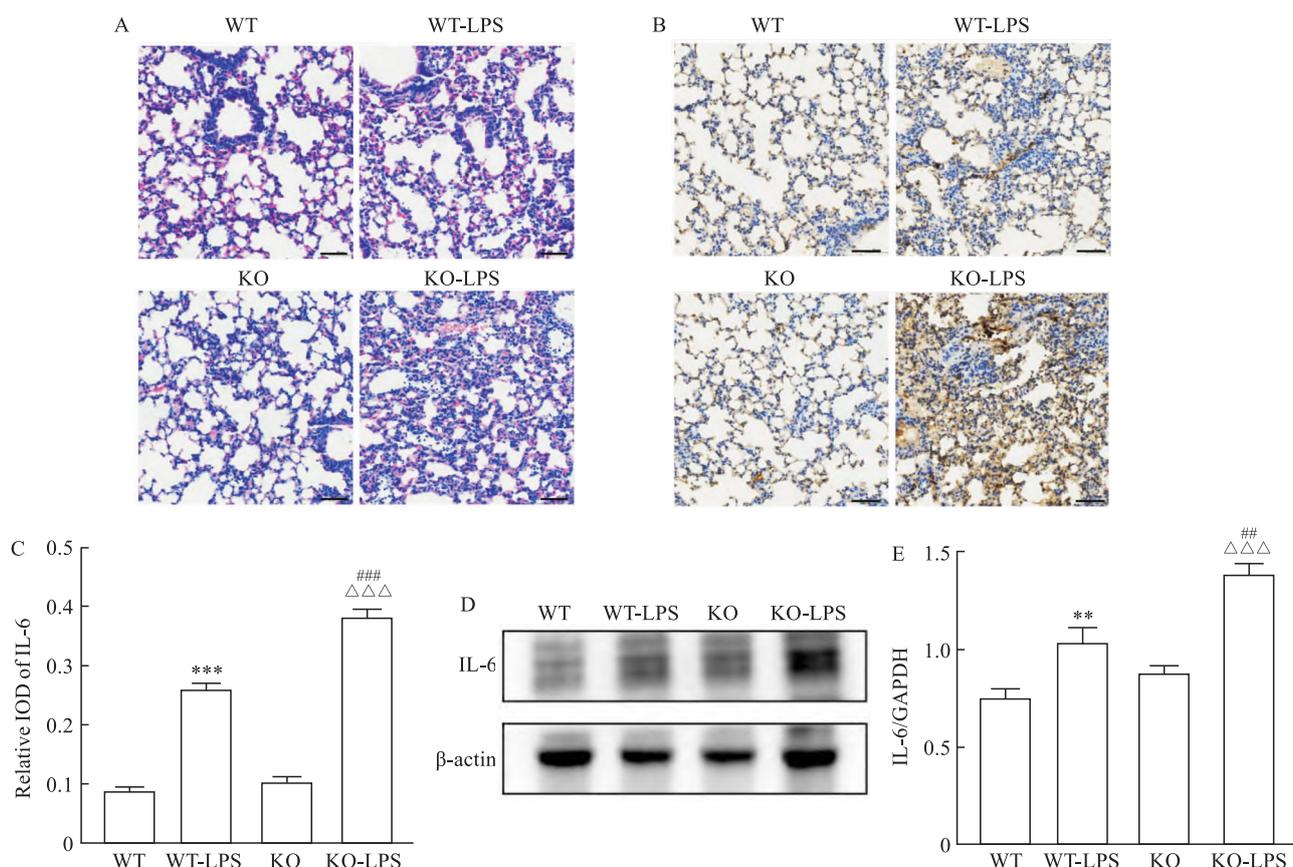


图3 GPR108 的缺失促进 LPS 诱发脓毒症的肺损伤

Fig. 3 Absence of GPR108 promoted lung damage in LPS-induced sepsis

A: Mouse lung tissue HE staining $\times 200$; B: The expression of IL-6 in lung tissue was detected by IHC $\times 200$; C: Analysis of the average optical density of IL-6 index detected by IHC between different groups of mouse lung tissue; D: The level of IL-6 molecular expression in mouse lung tissue was detected by Western blot. E: The relative quantitative analysis of IL-6 protein in mouse lung tissue with β -actin as the internal reference; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs WT; $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ vs KO; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs WT-LPS group.

前尚没有确定其配体,因此是属于孤儿受体,过去研究^[5]证实:GPR108 与包括 TLR3、TLR4、TLR7 在内的广泛 TLRs 存在共定位现象。GPR108 是 TLR4 介导免疫反应的负调节因子,其作用的机制是 GPR108 可能通过调节肿瘤坏死因子受体相关因子 6(一种泛素连接酶)的表达水平,进而抑制 TLRs 下游的信号分子 MyD88 的泛素化,降低其对 TLR4 的亲和力。在本研究中,GPR108 缺失的小鼠,在建模过程中发生呼吸困难致死的个例,并且在 LPS 诱发脓毒症时,从组织损伤、炎症因子 IL-6 的分泌等方面均显示,其造成了更严重的脓毒症。其原因可能是在脓毒症发生过程中,依赖于免疫细胞的 TLR4 信号通路的活化^[8]。而 GPR108 的缺失,导致 TLR4 的负调控作用减弱,在 LPS 刺激下,TLR4 的信号通路更易活化。

TLR 信号通路与炎症免疫密切相关,炎症因子的分泌与免疫细胞,尤其是巨噬细胞密切相关^[9]。脓毒症与炎症因子释放,甚至诱发炎症风暴有关,其中的 IL-6、TNF- α 是重要的炎症因子。这些炎症因子大都来源于免疫细胞,包括促进炎症反应的 M1 型巨噬细胞^[10]。在 GPR108 缺失时,LPS 模型小鼠血清炎症因子检测中以及在分离提取的巨噬细胞中,IL-6 的分泌水平均显著提高;同时 LPS 有利于小鼠巨噬细胞发生 M1 极化。尽管在实验中,模型组 TNF- α 之间差异无统计学意义,这可能与前期报道 GPR108 敲除的巨噬细胞存在构成性炎症状态有关。因为来自 GPR108 敲除小鼠的 BMDM 细胞分泌更高水平的 IL-6,产生较低水平的 TNF- α ^[5]。相关的分子机制拟在后续研究中进行深入探讨。

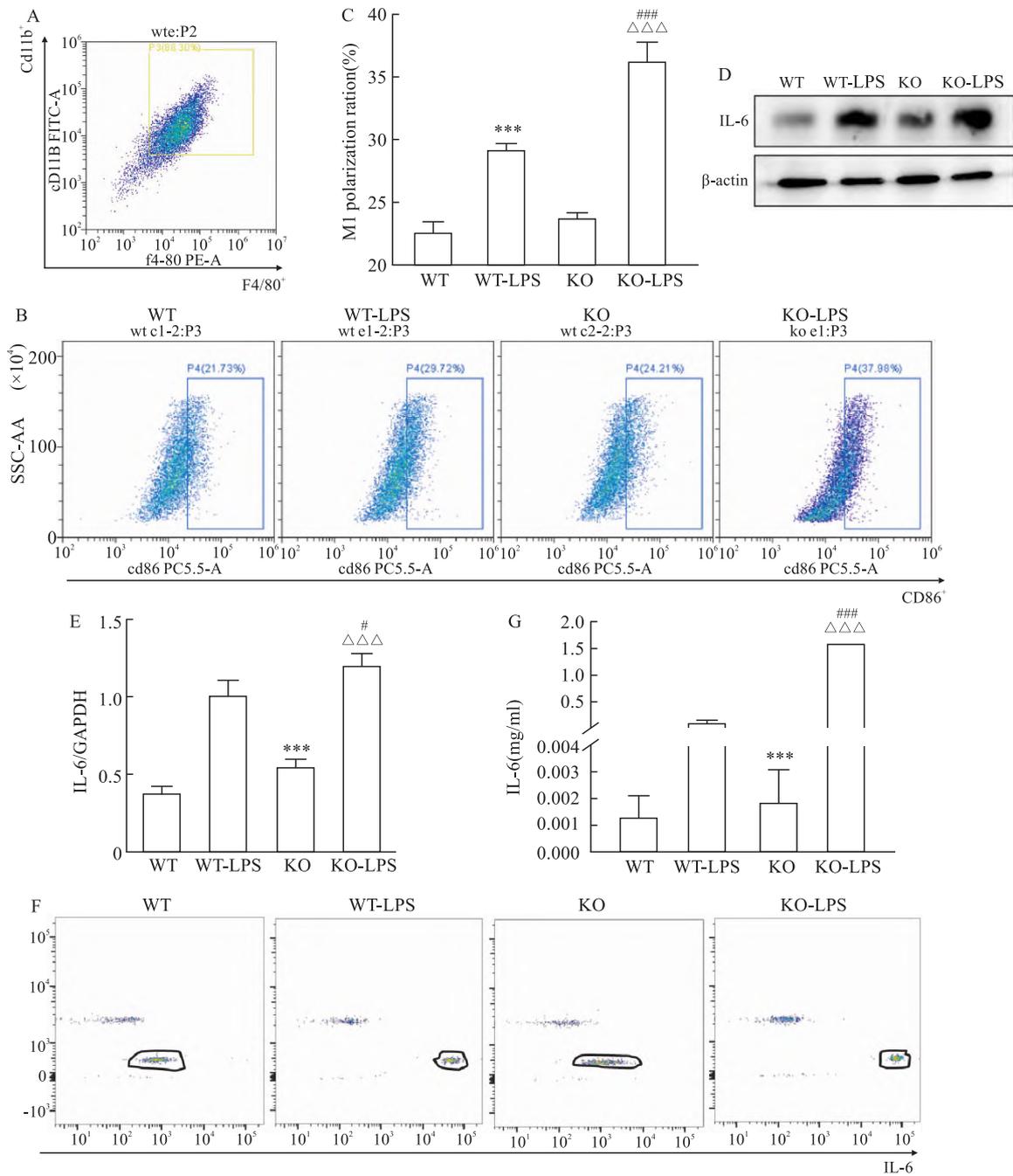


图4 GPR108 缺失增加 LPS 诱导脓毒症模型小鼠中 M1 巨噬细胞和血清 IL-6 的水平

Fig. 4 GPR108 deletion increased M1 macrophages and serum IL-6 levels in mice with LPS-induced sepsis

A: Flow labeled macrophages; B: Flow cytometry analysis showed that the number of BMDMs polarized to M1 in KO-LPS group increased; C: Relative quantitative analysis of polarization ratio of mouse BMDMs M1; D: Western blot analysis of the IL-6 molecular expression in mouse BMDMs; E: The relative quantitative analysis of IL-6 protein of mouse BMDMs was performed with β -actin as the internal reference; F: FACS Verse flow cytometry was used to collect serum inflammatory factor data; G: Relative quantitative analysis of serum inflammatory factor IL-6; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs WT; $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ vs KO; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$ vs WT-LPS group.

参考文献

[1] Das U N. Infection, inflammation, and immunity in sepsis[J]. Biomolecules, 2023, 13 (9): 1332. doi: 10. 3390/bi-oml3091332.

[2] Wu D, Shi Y, Zhang H, et al. Epigenetic mechanisms of immune remodeling in sepsis: targeting histone modification [J]. Cell Death Dis, 2023, 14 (2): 112. doi:10. 1038/s41419 - 023 -

- 05656–9.
- [3] Li Q, Wu C, Liu Z, et al. Increased TLR4 expression aggravates sepsis by promoting IFN- γ expression in CD38^{-/-} Mice [J]. *J Immunol Res*, 2019, 2019: 3737890. doi: 10.1155/2019/3737890.
- [4] Žilienė E, Inčiūra A, Ugenskienė R, et al. Pathomorphological manifestations and the course of the cervical cancer disease determined by variations in the TLR4 gene [J]. *Diagnostics (Basel)*, 2023, 13(12): 1999. doi:10.3390/diagnostics13121999.
- [5] Dong D, Zhou H, Na S Y, et al. GPR108, an NF- κ B activator suppressed by TIRAP, negatively regulates TLR-triggered immune responses [J]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e0205303. doi:10.1371/journal.pone.0205303.
- [6] Sae-Khow K, Phuengmaung P, Issara-Amphorn J, et al. Less severe polymicrobial sepsis in conditional *mgmt*-deleted mice using LysM-cre system, impacts of DNA methylation and MGMT inhibitor in sepsis [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(12): 10175. doi:10.3390/ijms241210175.
- [7] Gabarin R S, Li M, Zimmel P A, et al. Intracellular and extracellular lipopolysaccharide signaling in sepsis: avenues for novel therapeutic strategies [J]. *J Innate Immun*, 2021, 13(6): 323–32. doi:10.1159/000515740.
- [8] 陈赛男, 谭迎, 肖筱婵, 等. TLR4 基因敲除对脓毒症小鼠急性肝损伤的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2020, 36(11): 1425–8. doi:10.3969/j.issn.1006–5725.2020.11.004.
- [8] Chen S N, Tan Y, Xiao X C, et al. Effect of TLR4 gene knockout on acute liver injury in septic mice [J]. *J Pract Med*, 2020, 36(11): 1425–8. doi:10.3969/j.issn.1006–5725.2020.11.004.
- [9] Zhao Q, Sheng M F, Wang Y Y, et al. LncRNA Gm26917 regulates inflammatory response in macrophages by enhancing Annexin A1 ubiquitination in LPS-induced acute liver injury [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 975250. doi: 10.3389/fphar.2022.975250.
- [10] 王雯雯, 涂珍珍, 臧丹丹, 等. 基于 CRISPR/Cas9 系统建立 GPR108 缺失的 THP-1 细胞株及其功能初步研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(4): 528–33. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2023.04.002.
- [10] Wang W W, Tu Z Z, Zang D D, et al. Construction of THP-1 cell line with GPR108 gene deletion by CRISPR/Cas9 system and exploration of its function [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(4): 528–33. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2023.04.002.

The absence of GPR108 results in decreased inflammatory response in lipopolysaccharide-induced sepsis mice

Zhang Yintao¹, Yang Ping¹, Zang Dandan², Tu Zhenzhen³, Xu Ruyue¹, Zhou Haisheng^{1,2}

(¹Dept of Biochemistry, ²Center Scientific Research, ³Institute of Clinical Immunology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of G protein-coupled receptor 108 (GPR108) gene knockout on systemic inflammation in lipopolysaccharide (LPS)-induced sepsis mice. **Methods** Male C57BL/6 mice and GPR108 gene knockout mice were randomly divided into 4 groups: WT group, WT-LPS group, KO group, KO-LPS group. The physiological characteristics of mice in different groups were observed, and the morphological changes of liver and lung tissues were observed. Macrophages were extracted from bone marrow and subjected to flow cytometry to detect their M1 polarization status. The expression levels of IL-6 in liver and lung tissues, macrophages, and serum were also measured. **Results** KO-LPS group mice showed significant liver and lung tissue damage, with a significantly greater number of bone marrow-derived macrophages polarizing towards M1 in the KO-LPS group compared to the WT-LPS group. Additionally, at the tissue, cellular, and serum levels, the expression of IL-6 in the KO-LPS group mice was significantly higher than that in the WT-LPS group mice ($P < 0.05$). **Conclusion** During the systemic inflammatory infection induced by LPS in mice, the lack of GPR108 exacerbates the systemic inflammatory response. GPR108 has an inhibitory effect on the inflammatory response in mice with LPS-induced sepsis.

Key words sepsis; G protein-coupled receptor 108; macrophage; lipopolyaccharide; interleukin 6

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82071832); Graduate Student Scientific Research and Practical Innovation Project of Anhui Medical University (No. YJS20230003)

Corresponding authors Zhou Haisheng, E-mail: haishengs@ahmu.edu.cn