

文章编号 1006-8147(2023)04-0391-07

论 著

CD24 调节 iNKT 细胞介导的小鼠急性肝损伤的实验研究

汪河,海蕾,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:探讨小鼠急性肝损伤中 CD24 分子对不变的自然杀伤 T(iNKT)细胞的调控作用。方法:小鼠腹腔注射 α -半乳糖甘油酰胺(α -GalCer)特异活化 iNKT 细胞,诱导小鼠急性肝损伤。HE 染色观察小鼠肝脏炎症损伤程度,血清学方法检测转氨酶变化,免疫荧光染色观察肝内 iNKT 细胞的数量变化,流式细胞术检测肝内总 iNKT 细胞、iNKT 细胞亚型数量、比例及 iNKT 细胞活性的变化,定量-PCR(Q-PCR)检测肝组织中 iNKT 细胞相关细胞因子干扰素- γ (IFN- γ)和白细胞介素-4(IL-4)的表达。结果:注射 α -GalCer 后,CD24 基因敲除(CD24^{-/-})小鼠肝脏炎症细胞浸润比野生型(WT)小鼠少($F=10.10, P<0.01$),血清谷丙转氨酶(ALT)水平比 WT 小鼠低($F=10.11, P<0.01$)。免疫荧光染色结果表明,正常生理状态及 α -GalCer 模型中,CD24^{-/-}小鼠肝内 iNKT 细胞数量显著低于 WT 小鼠($F=13.27, P<0.01$)。流式细胞术分析发现,正常生理状态下,CD24^{-/-}小鼠肝内总 iNKT 细胞和其亚型的数量显著低于 WT 小鼠($F=6.841, P<0.05$);注射 α -GalCer 后,小鼠肝内总 iNKT 细胞数量显著增多($F=33.01, P<0.001$);进一步分析 iNKT 细胞亚型发现,NKT1、NKT2 细胞数明显增多($F=37.12, 40.55$, 均 $P<0.05$),但 CD24^{-/-}小鼠仍低于 WT 小鼠($F=40.07, 12.53$, 均 $P<0.05$),NKT17 细胞无变化($P>0.05$)。Q-PCR 结果表明,注射 α -GalCer 后,CD24^{-/-}小鼠肝组织中 IFN- γ 和 IL-4 mRNA 表达水平明显低于 WT 小鼠($F=14.34, 19.77$, 均 $P<0.01$),流式细胞术检测胞内细胞因子结果表明, α -GalCer 模型中,CD24^{-/-}小鼠 iNKT 细胞分泌的 IFN- γ 和 IL-4 明显低于 WT 小鼠($F=25.600, 5.574$, 均 $P<0.05$)。结论:肝内 iNKT 细胞与小鼠急性肝损伤密切相关,CD24 分子可以通过调节肝内 iNKT 细胞的数量和活性影响急性肝损伤进程。

关键词 CD24 分子; α -GalCer;iNKT 细胞;肝损伤

中图分类号 R392.1

文献标志码 A

CD24 Regulates acute liver injury through murine hepatic iNKT cells

WANG He, HAI Lei, ZHANG Xue-jun

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

Abstract **Objective:** To investigate the regulation of CD24 on invariant NKT cells (iNKT) in murine acute liver injury. **Methods:** Intraperitoneal injection of α -galactosylceramide (α -GalCer) was used to activate hepatic iNKT cells and induce acute liver injury in mice. Levels of alanine amino transferase (ALT) in serum were detected and liver sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) staining to assess the severity of liver injury. Changes of the number of iNKT cells in the liver were observed by immune-fluorescence staining. Flow cytometric analysis was used to detect the changes of the number and proportion of total iNKT cells, subtypes and iNKT cells activity in the liver. Q-PCR was used to detect the expression of iNKT cell-related cytokines including interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-4 (IL-4) in mice liver tissues. **Results:** After injection of α -GalCer, CD24 knockout (CD24^{-/-}) mice had less hepatic inflammatory cell infiltration and lower serum ALT levels when compared with wild-type (WT) mice ($F=10.10, 10.11$, both $P<0.01$). Immune-fluorescence staining results showed that the number of intrahepatic iNKT cells was significantly lower in CD24^{-/-} mice than in WT mice in the normal physiological state or in the α -GalCer induced acute liver injury model ($F=13.27, P<0.01$). Flow cytometry analysis showed that the number of total iNKT and subtypes in the liver of CD24^{-/-} mice was lower than that of WT mice under normal physiological conditions ($F=6.841, P<0.05$). After α -GalCer injection, the total number of iNKT cells in the liver of mice was significantly increased ($F=33.01, P<0.001$). Further analysis of iNKT cell subtypes showed that α -GalCer injection significantly increased the numbers of NKT1 and NKT2 cells ($F=37.12, 40.55$, both $P<0.05$), but CD24^{-/-} mice remained lower than WT mice ($F=40.07, 12.53$, both $P<0.05$), and NKT17 cells were unchanged ($P>0.05$). Q-PCR showed that the expression levels of IFN- γ and IL-4 mRNA were significantly lower in the liver tissues of CD24^{-/-} mice than WT mice after α -GalCer injection ($F=14.37, 19.77$, both $P<0.01$). Flow cytometry analysis showed that the secretion of IFN- γ and IL-4 were significantly lower in iNKT cells of CD24^{-/-} mice when compared with WT mice in α -GalCer induced liver injury model ($F=25.600, 5.574$, both $P<0.05$). **Conclusion:** iNKT cells in the liver are closely related to acute liver injury in mice, CD24 can affect the process of acute liver injury in mice by regulating the number and activi-

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 汪河(1997-),女,硕士在读,研究方向:肝脏炎症与免疫;通信作者:张学军, E-mail: xjzh@tmu.edu.cn。

ty of hepatic iNKT cells.

Key words CD24 molecules; α -GalCer; iNKT; liver injury

急性肝损伤是由病毒感染、过量饮酒、脓毒症、自身免疫性疾病或药物不良反应等多种因素引起的常见临床并发症,随着大量肝细胞死亡可进展为急性肝功能衰竭,临床死亡率为 25%~75%,目前唯一的治疗方法是肝移植^[1-3]。与其他外周器官相比,肝脏含有许多固有免疫细胞,包括库普弗细胞(KCs)、树突状细胞(DC)、自然杀伤(NK)细胞和自然杀伤性 T(NKT)细胞^[4]。肝脏的固有免疫在维持免疫耐受方面起主导作用,然而固有免疫系统的过度活动可能导致肝脏损伤,并引起急性和慢性肝病^[5]。

NKT 细胞是表达 T 细胞抗原受体(TCR)的固有样 T 细胞,占小鼠肝内淋巴细胞的 30%~40%,识别由 I 类主要组织相容性复合体(MHC)样分子 CD1d 呈递的外源性和内源性脂质抗原,在炎症性肝病中起重要作用^[6-7]。根据 TCR 链的差异和它们识别的抗原,NKT 细胞可分为两个亚群, I 型或不变的 NKT 细胞(iNKT),识别 α -半乳糖甘油酰胺(α -GalCer); II 型 NKT 细胞,识别硫酸盐或其他糖脂^[8]。在小鼠中 iNKT 占 NKT 细胞总数的 90%~95%,根据其谱系特异性转录因子的表达和产生的细胞因子,iNKT 细胞可以分为 3 个功能亚群:NKT1[T-bet、干扰素(IFN)- γ]、NKT2[GATA-3、白细胞介素(IL)-4]和 NKT17(ROR γ t, IL-17)^[4,9-10]。 α -GalCer 是一种合成糖脂,由 CD1d 分子呈递,可作为 iNKT 细胞的有效激活剂^[11]。iNKT 细胞活化后可以释放一系列的细胞因子,包括 IFN- γ 、IL-4 和肿瘤坏死因子(TNF),同时还伴随有肝脏炎症,甚至还会出现肝组织坏死^[12-13]。iNKT 细胞还被证明在刀豆蛋白 A(Concanavalin A, ConA)诱导的肝炎、酒精性肝病、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)以及缺血再灌注、病毒诱导的肝炎(HBV/HBC)和药物诱导的肝损伤的发病机制中起关键作用^[14]。

CD24 是一种高度糖基化的蛋白质,由多种免疫细胞表达^[15]。现有研究发现,CD24 是一种重要的炎症负反馈分子,如在对乙酰氨基酚诱导急性肝损伤中起到保护作用^[16-18]。本研究利用 α -GalCer 特异性激活 iNKT 细胞诱导肝损伤,探讨 CD24 分子是否通过调节肝内 iNKT 细胞进而影响急性肝损伤。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 C57BL/6J 野生型小鼠(WT 小鼠)购自北京斯贝福生物技术有限公司,许可证编号:SCXK(京)2019-0010。CD24 基因敲除(CD24^{-/-})小鼠

来自中国科学院生物物理所,许可证编号:SYXK(京)2011-0029。所有实验动物均在天津医科大学动物中心共同饲养,所有程序按照天津医科大学实验动物中心流程规范进行操作。实验时选用 8~10 周龄,体重 20~22 g,健康雄性小鼠。将小鼠随机分为实验组和对照组,每组包含 8 只 WT 小鼠和 8 只 CD24^{-/-}小鼠。

1.1.2 主要试剂和仪器 石蜡切片机和冰冻切片机购自 Leica 公司,Q-PCR 仪 Light Cycler96 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 公司,Percoll 购自英国 GE Healthcare 公司,IV 型胶原酶购自 Sigma 公司,流式抗体购自美国 eBioscience 公司, α -GalCer 购自 ABCam 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 建立急性肝损伤模型 实验组小鼠腹腔注射 α -GalCer,特异性激活小鼠肝内 iNKT 细胞,诱导急性肝损伤,用 1 mL 一次性无菌注射器吸取一定量 0.01 g/L α -GalCer,每只小鼠注射 200 μ L,对照组小鼠注射 200 μ L 0.02% DMSO,12 h 后处死小鼠,肉眼观察小鼠肝脏可见实验组小鼠肝脏充血肿大,对照组小鼠肝脏无异常,即为造模成功。

1.2.2 肝组织病理染色 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 μ m 厚度的切片,60℃烤片 1 h 后进行 HE 染色,其中,苏木素染色 3 min,分化液 30 s,伊红 1 min,染色完成后中性树胶封片,在 Nikon 90i 显微镜下拍照,每张片子选取 5 个视野,用 Photoshop 软件统计炎症细胞浸润面积。

1.2.3 肝组织免疫荧光染色 肝组织经 OCT 包埋后用液氮速冻,用冰冻切片机进行 5 μ m 切片,室温放置 30 min,4%多聚甲醛固定组织 15 min,0.2% Triton 透膜 30 min,0.1% PBST 洗 3 遍后封闭 1 h,加入荧光抗体(iNKT 细胞:Anti-CD1d: α -GalCer Dimer PE),室温孵育 1 h,0.1% PBST 洗 3 遍,DAPI 封片液封片。制好的片子用 Nikon 90i 荧光显微镜拍摄。

1.2.4 血清分离与转氨酶测定 取出的血液转入灭菌 1.5 mL 离心管中,于室温静置 4 h,随后 5 000 r/min 离心 10 min,收集上清,保存于 -80℃。采用全自动生化分析仪进行血清中转氨酶检测。

1.2.5 Q-PCR 将液氮速冻后的肝组织加入 1 mL

Trizol 充分研磨,室温静置 5 min 后加入氯仿剧烈混匀 15 s,静置后离心 15 min,吸取离心后的上层透明液体至新的无酶管中,加入异丙醇沉淀 30 min 后离心,再用 75%乙醇洗涤沉淀两遍,加入适量无酶水溶解,在 56℃金属恒温器上温浴 10 min,通过分光光度计对 RNA 浓度和纯度进行测定,每个样品取 2 μ g,使用反转录酶进行反转录。将得到的 cDNA 进行 10 倍稀释,按照 cDNA 4.5 μ L,引物 0.5 μ L,SYBR Green 5 μ 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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 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 SYBRGreen 嵌合荧光染料并使用 LightCycler96 进行 Q-PCR 检验。

1.2.6 肝内单个核细胞提取 将冷 PBS 灌注后的肝组织转移至含 0.05% IV 型胶原酶的消化液中剪碎,37℃,78 r/min,消化 30 min。消化好的肝脏通过 70 μ m 筛网得到单细胞悬液。4℃,50 g,3 min,多次离心去除肝细胞,将上清转移到新离心管中,500 g 离心 5 min 后去掉上清。30%Percoll 重悬细胞沉淀,450 g 离心 20 min,留下最底层细胞,加入冷 ACK 进行红细胞裂解,裂解完成后用 PBS 洗两遍,重悬计数。

1.2.7 流式细胞术 取 1×10^6 个细胞,用 CD16/32 (Clone:93)抗体 4℃封闭 15 min 后进行细胞表面染色,同时孵育同型对照抗体。对于细胞内染色,单个核细胞在含 Brefeldin A 的 10% FBS RPMI 1640 培养基中培养 4 h 后,先对表面染色,之后进行固定、破膜,并对细胞因子进行染色。所用抗体如下:抗小鼠 α -GalCer;CD1d 抗体(克隆号:L363)、小鼠 IgG2a K

同型对照抗体(克隆号:eBM2a)、抗小鼠 TCR- β 抗体(克隆号:H57-597)、小鼠 IgG 同型对照抗体(克隆号:eBio299Arm)、抗小鼠 PLZF 抗体(克隆号:Mags.21F7)、小鼠 IgG1 K 同型对照抗体(克隆号:P3.6.2.8.1)、抗小鼠 ROR γ t 抗体(克隆号:B2D)、抗小鼠 IFN- γ 抗体(克隆号:XMG1.2)、抗小鼠 IL-4 抗体(克隆号:11B11)。使用 BD FACS Canto II 流式细胞仪进行检测。Flowjo10.6.2 软件对实验结果进行分析。所用圈门策略见图 1。

1.2.8 肝内 iNKT 细胞数量统计 提取出肝内单个核细胞之后,对每个样本进行计数,并计算出该样本的细胞总数。分析流式数据,用圈门后所得的 iNKT 细胞数量除以该样本上样分析时获取的细胞数量,计算出 iNKT 细胞在该样本中的比例,再乘以该样本前期细胞计数的结果,即可得到每个样本中 iNKT 细胞的总量。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 8 进行数据汇总、分析、制图。多组数据之间比较和方差齐性分析采用 *Two-way ANOVA* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD24 分子敲除后 α -GalCer 诱导的肝脏炎症反应减轻 如图 2A、B 中 HE 染色结果显示,注射 α -GalCer 后,小鼠肝细胞出现轻微肿胀,同时伴随有部分区域出现炎性细胞浸润(箭头),与 WT 小鼠相比,CD24^{-/-}小鼠肝内淋巴细胞浸润面积显著降低($F=10.10, P < 0.01$)。如图 3C 血清谷丙转氨酶(ALT)检测结果显示,注射 α -GalCer 能够引起肝脏损伤,ALT 水平升高($F=48.8, P < 0.001$),但 CD24^{-/-}小鼠的血清 ALT 水平显著低于 WT 小鼠($F=10.11, P < 0.01$)。

表 1 定量-PCR 所用引物序列

Tab 1 Primer sequences used for Q-PCR

基因名称	上游(5'→3')	下游(5'→3')	产物大小(bp)
β -actin	AGAAGAGCTACGAGCTGCCTGAC	TAGTCCTGCTTGCTGATCCACAT	376
IFN- γ	ATGAACGCTACACACTGCATC	CCATCCTTTTGCCAGTTCCTC	182
IL-4	ACTTGAGAGAGATCATCGGCA	AGCTCCATGAGAACTAGAG	208

注:以上引物均由上海生工生物工程有限公司合成;IFN- γ :干扰素- γ ;IL-4:白细胞介素-4

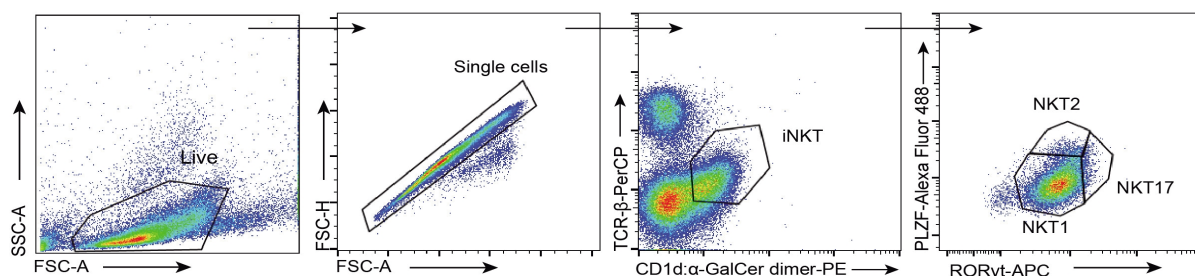
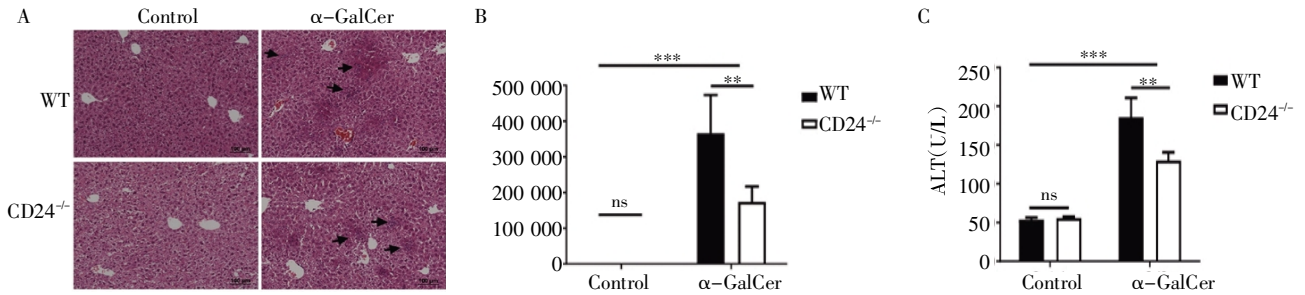


图 1 肝内 iNKT 细胞及其亚群的圈门策略

Fig 1 Gated strategies of iNKT cells and their subpopulations in the liver

2.2 α -GalCer 模型中 CD24^{-/-}小鼠肝内 iNKT 细胞数量低于 WT 小鼠 流式细胞术结果表明,在正常生理状态下 CD24^{-/-}小鼠肝内 iNKT 细胞的比例和数量显著低于 WT 小鼠(图 3A、B, $F=6.841$, $P<0.05$),在注射 α -GalCer 后,尽管两种基因背景小鼠肝内 iNKT 细胞均有明显增加(图 3A、B, $F=33.01$, $P<0.001$),但由于 CD24^{-/-}小鼠先天 iNKT 细胞缺乏,所以 α -GalCer 诱导后肝内 iNKT 细胞的比例和数量仍低于

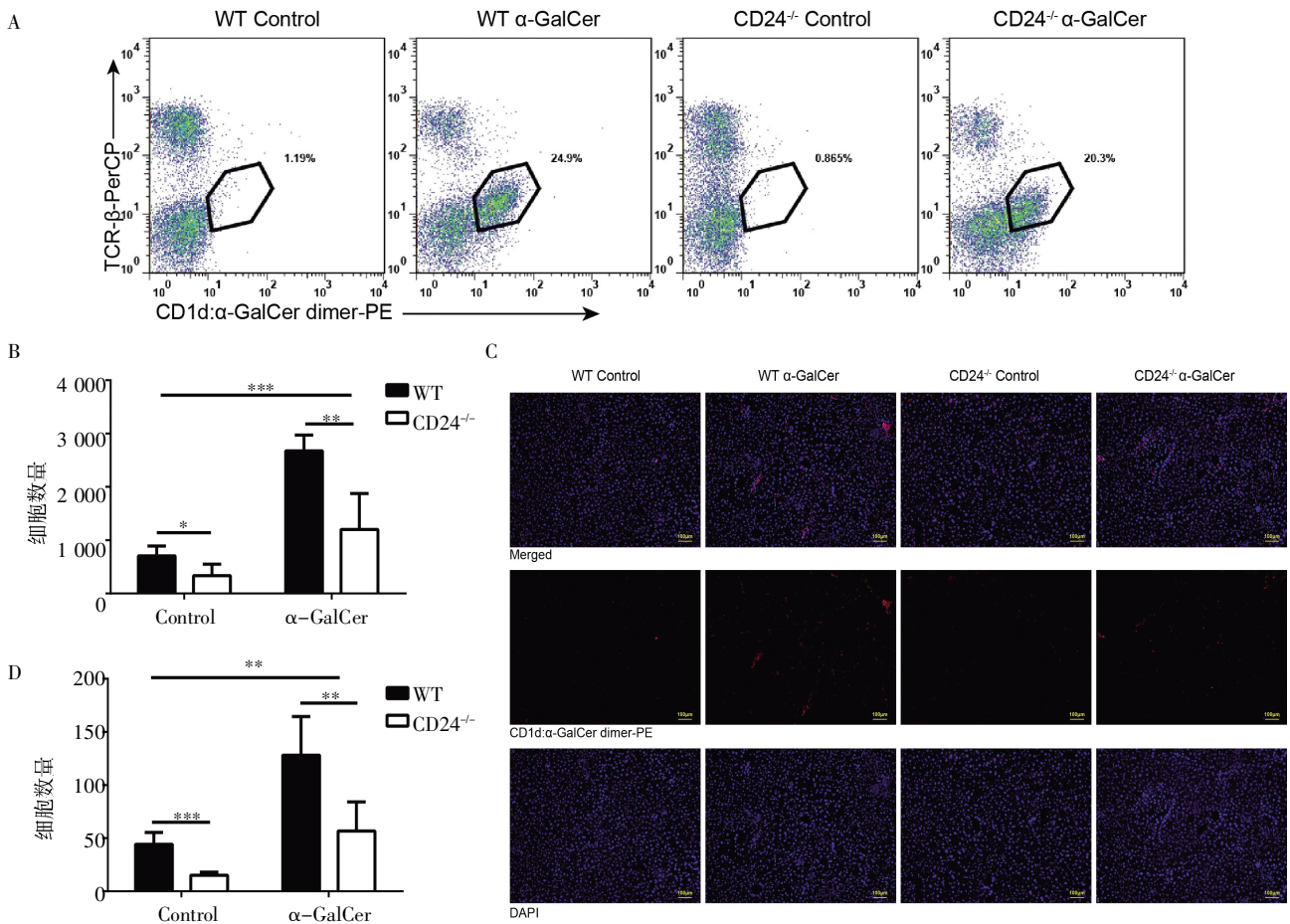
WT 小鼠(图 3A、B, $F=13.48$, $P<0.01$);免疫荧光染色证实肝组织 iNKT 细胞(红色)主要分布于肝血窦中,正常生理状态下 CD24^{-/-}小鼠肝内 iNKT 细胞数量低于 WT 小鼠(图 3C、D, $F=45.75$, $P<0.001$),注射 α -GalCer 后,小鼠肝内 iNKT 细胞大量增加(图 3C、D, $F=13.27$, $P<0.01$),但 CD24^{-/-}小鼠肝内 iNKT 细胞数量仍低于 WT 小鼠(图 3C、D, $F=13.27$, $P<0.01$)。



注:A:注射 α -GalCer 后,两种基因型小鼠肝组织 HE 染色(箭头指示炎症细胞浸润);B:肝组织炎症细胞浸润面积统计;C:血清 ALT 水平;
 $n=8$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns:无显著性差异;ALT:谷氨酸丙氨酸氨基转移酶; α -GalCer: α -半乳糖甘油酰胺

图 2 CD24 分子敲除后 α -GalCer 诱导的肝脏炎症减轻

Fig 2 α -GalCer induced liver inflammation in mice was attenuated after CD24 knockout



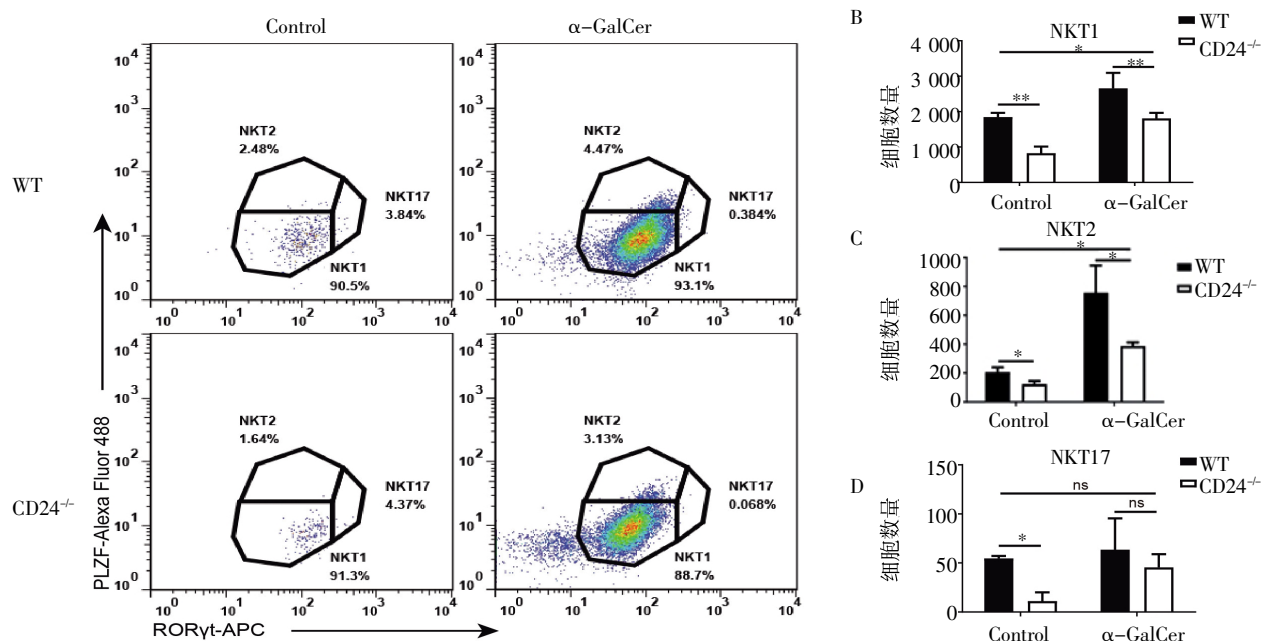
注:A:注射 α -GalCer 后,两种基因型小鼠肝内 iNKT 细胞比例变化;B:注射 α -GalCer 后,两种基因型小鼠肝内 iNKT 细胞数量的变化;C:肝组织切片 iNKT 细胞(红色部分)免疫荧光染色(放大倍数 100 \times ,标尺 100 μ m);D:对肝组织切片 iNKT 细胞(红色部分)免疫荧光染色的统计分析;
 $n=8$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; α -GalCer: α -半乳糖甘油酰胺;iNKT:不变的自然杀伤 T 细胞

图 3 CD24^{-/-}小鼠肝内 iNKT 细胞数量低于 WT 小鼠

Fig 3 The number of hepatic iNKT was decreased in CD24^{-/-} mice compared with WT

2.3 CD24 分子影响小鼠肝内 iNKT 细胞的增殖 流式细胞术结果表明,小鼠肝内 iNKT 细胞 3 个亚型中, NKT1(CD1d: α -GalCer⁺ TCR- β PLZF^{low}ROR γ t⁻)占比最高,可达 90%以上,其次是 NKT2(CD1d: α -GalCer⁺ TCR- β PLZF^{high}ROR γ t⁺), NKT17(CD1d: α -GalCer⁺ TCR- β PLZF⁺ROR γ t⁺)最少(图 4A);正常生理状态下,CD24^{-/-}小鼠肝内 NKT1($F=24.13, P<0.01$)、NKT2

($F=14.23, P<0.05$)和 NKT17($F=10.26, P<0.05$)细胞都显著减少(图 4B、C、D);注射 α -GalCer 后,WT 和 CD24^{-/-}小鼠肝内 NKT1 和 NKT2 细胞增多(图 4B、C, $F=37.12, 40.55$, 均 $P<0.05$),但 CD24^{-/-}小鼠肝内 NKT1(图 4B, $F=40.07, P<0.01$)和 NKT2(图 4C, $F=12.53, P<0.05$)细胞数仍低于 WT 小鼠, NKT17 细胞数量太少未检测到显著变化(图 4D, $F=4.479, P>0.05$)。



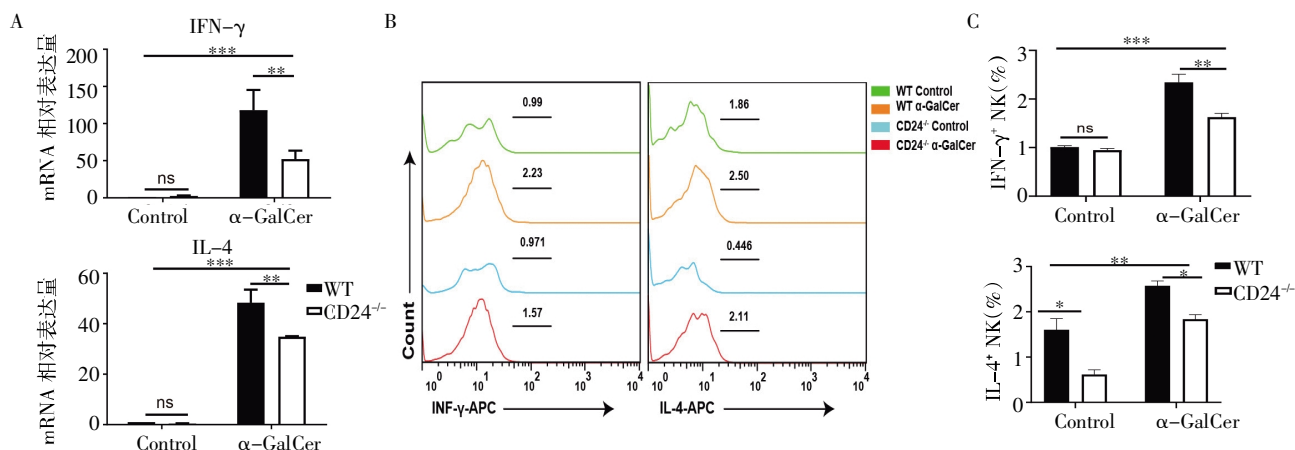
注:A:小鼠肝内 iNKT 细胞亚型的变化;B:小鼠肝内 NKT1 细胞的绝对数;C:小鼠肝内 NKT2 细胞的绝对数;D:小鼠肝内 NKT17 细胞的绝对数; $n=6$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, ns:无显著性差异

图 4 CD24^{-/-}小鼠肝内 iNKT 细胞亚型的改变

Fig 4 Changes of hepatic iNKT subtypes in CD24^{-/-} mice

2.4 α -GalCer 模型中 CD24^{-/-}小鼠肝内 iNKT 细胞活性低于 WT 小鼠 如图 5A 小鼠肝组织 mRNA 检测结果显示,注射 α -GalCer 后引起 iNKT 细胞相关细胞因子 IFN- γ 、IL-4 的表达水平显著升高($F=48.12, 41.53$, 均 $P<0.001$),但 CD24^{-/-}小鼠显著低于 WT 小鼠

($F=14.34, 19.77$, 均 $P<0.01$)。如图 5B、C 流式结果显示, α -GalCer 刺激后, iNKT 细胞 IFN- γ ($F=35.4, P<0.001$)和 IL-4 ($F=16.54, P<0.01$)的分泌量增加,但 CD24^{-/-}小鼠 iNKT 细胞 IFN- γ ($F=25.6, P<0.01$)、IL-4 ($F=5.574, P<0.05$)的分泌量仍低于 WT 小鼠。



注:A:小鼠肝组织水平 IFN- γ 、IL-4 的 mRNA 表达;B:小鼠肝内 iNKT 细胞 IFN- γ 、IL-4 的分泌水平、 $n=8$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns:无显著性差异;IFN- γ :干扰素- γ ;IL-4:白细胞介素-4

图 5 CD24^{-/-}小鼠肝内 iNKT 细胞活性低于 WT 小鼠

Fig 5 Activity of hepatic iNKT subtypes was decreased in CD24^{-/-} mice compared with WT

3 讨论

许多实验研究表明,iNKT 细胞活性在局部免疫和炎症中起重要作用,iNKT 细胞活化可以是保护性的,但过度活化会导致破坏性的组织损伤^[19]。注射 α -GalCer 后,激活的 iNKT 细胞通过释放 IFN- γ 诱导小鼠致命炎症,活化的 iNKT 细胞也可以通过增加 FAS 抗原配体 (FASL) 表达以及肿瘤坏死因子 (TNF)、穿孔素和颗粒酶 B 的释放,直接导致肝细胞死亡^[20-21]。

本实验发现,与 WT 小鼠相比, α -GalCer 刺激后 CD24^{-/-}小鼠肝脏炎症细胞浸润较少,血清 ALT 水平较低,说明 CD24 分子可能参与 iNKT 细胞介导的肝脏损伤。分析肝内 iNKT 细胞发现,正常生理状态下 CD24 基因敲除后肝内 iNKT 细胞数量显著降低, α -GalCer 刺激后小鼠肝内 iNKT 细胞显著增加,但 CD24^{-/-}小鼠仍低于 WT 小鼠,提示 CD24 分子影响 iNKT 细胞在肝内的增殖。

研究表明,NKT1 细胞在小鼠肝脏中高度富集^[22],这与本实验结果相一致,即小鼠肝内 iNKT 细胞 3 个亚型中,NKT1 占比最高,可达 90%以上,其次是 NKT2, NKT17 最少。正常生理状态下,与 WT 小鼠相比,CD24^{-/-}小鼠肝内 NKT1 细胞显著减少,NKT2 和 NKT17 细胞也有减少,但程度不及 NKT1 细胞;注射 α -GalCer 后,两种基因背景小鼠肝内 NKT1 和 NKT2 细胞都显著增多,但 CD24^{-/-}小鼠肝内 NKT1 和 NKT2 细胞仍低于 WT 小鼠,其中 NKT1 的降低程度更为显著,NKT17 细胞未检测到显著变化,进一步说明 CD24 分子可能影响小鼠肝内 iNKT 细胞发育,尤其是 NKT1 细胞。为探究 CD24 分子对 iNKT 细胞的活性是否具有调控作用,笔者通过 Q-PCR 检测小鼠肝脏 IFN- γ 、IL-4 mRNA 表达变化,并利用流式细胞术检测 iNKT 细胞 IFN- γ 、IL-4 的表达水平,结果发现,注射 α -GalCer 后,两种基因背景小鼠肝组织和 iNKT 细胞 IFN- γ 、IL-4 的表达水平均显著升高,其中 IFN- γ 的表达水平升高幅度更大,与 WT 小鼠相比,CD24^{-/-}小鼠 IFN- γ 、IL-4 都显著降低,其中 IFN- γ 的降低幅度更大。由于 NKT1 占肝内 iNKT 细胞的比例最大,其细胞数量和功能活性的改变都会对肝脏炎症产生显著影响。NKT1 细胞类似于辅助性 T 细胞 1,比其他 iNKT 细胞亚群具有更强大的细胞毒性功能,活化后可以分泌大量 IFN- γ ,而 IFN- γ 浓度过高会刺激肝脏炎症并加剧肝损伤。除了 IFN- γ 之外,它们还可以产生 IL-4, IL-4 可以诱导肝细胞增殖,促进损伤部位愈合^[19,23]。本实验中,注射 α -GalCer 后引起 NKT1 细胞大量增

加,IFN- γ 表达水平显著升高,并且 CD24⁺小鼠的 NKT1 细胞和 IFN- γ 表达水平显著低于 WT 小鼠,因此,推测 CD24 分子可能主要诱导 NKT1 细胞数量增加和活性增强,从而调控 iNKT 细胞介导的小鼠急性肝损伤。

NKT 细胞同时具有 NK 细胞和 T 细胞的特征,参与多种固有免疫和适应性免疫的应答过程,在维持肝脏免疫能力方面的核心地位与它们在调节肝脏肿瘤免疫、缺血再灌注损伤和自身免疫性肝病等中的基本作用是一致的^[24]。现有研究表明,iNKT 细胞发育早期 CD24 分子表达水平较高,随着 iNKT 细胞的发育成熟,从胸腺迁至外周器官的过程中,CD24 分子的表达逐渐降低^[25-26]。CD24 分子本身是一种黏附性分子,能够通过其自身的糖基磷脂酰肌醇在细胞外将细胞膜与胞外基质锚定在一起^[27]。因此,推测 CD24 分子可能直接参与 iNKT 细胞发育、分化和外周迁移过程的调控。此外,CD24 分子还可以调控其他免疫细胞,例如树突状细胞和巨噬细胞,而这两种细胞与 iNKT 细胞有较强的相互作用。研究表明,树突状细胞与 iNKT 细胞可以通过分泌 IL-12 相互促进彼此活化,巨噬细胞可以内化和呈递特定的脂质抗原给 iNKT 细胞,并参与 iNKT 细胞早期活化、细胞因子分泌和淋巴结扩张,表达 CD1d 的枯否细胞也已被确定为肝脏中 iNKT 细胞活化的关键^[28-30]。本研究结果表明,CD24 分子可以调控 iNKT 细胞的增殖与活化,但这一过程是直接作用还是间接作用以及具体的分子机制,还需要进一步探讨和研究。

参考文献:

- [1] RANGASWAMY C, MAILER R K, ENGLERT H, et al. The contact system in liver injury[J]. *Semin Immunopathol*, 2021, 43(4): 507-517.
- [2] STRAVITZ R T, LEE W M. Acute liver failure[J]. *Lancet*, 2019, 394(10201): 869-881.
- [3] XU L, YANG Y, WEN Y, et al. Hepatic recruitment of eosinophils and their protective function during acute liver injury[J]. *J Hepatol*, 2022, 77(2): 344-352.
- [4] BANDYOPADHYAY K, MARRERO I, KUMAR V. NKT cell subsets as key participants in liver physiology and pathology[J]. *Cell Mol Immunol*, 2016, 13(3): 337-346.
- [5] LIU H, HAI L, TIAN J, et al. Anti-CD24 neutralizing antibody exacerbates Concanavalin A-induced acute liver injury in mice via liver M1 macrophages[J]. *Immunol Lett*, 2017, 181: 87-93.
- [6] TANG W, ZHOU J, YANG W, et al. Aberrant cholesterol metabolic signaling impairs antitumor immunosurveillance through natural killer T cell dysfunction in obese liver[J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(7): 834-847.
- [7] MARRERO I, MARICIC I, FELDSTEIN A E, et al. Complex network of NKT cell subsets controls immune homeostasis in liver and gut[J].

- Front Immunol, 2018, 9: 2082.
- [8] WANG Y, ZHANG C. The roles of liver-resident lymphocytes in liver diseases[J]. Front Immunol, 2019, 10: 1582.
- [9] CHEN Y, TIAN Z. Innate lymphocytes: pathogenesis and therapeutic targets of liver diseases and cancer[J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(1): 57-72.
- [10] SEINO K, TANIGUCHI M. Functionally distinct NKT cell subsets and subtypes [J]. J Exp Med, 2005, 202(12): 1623-1626.
- [11] PAUL S, CHHATAR S, MISHRA A, et al. Natural killer T cell activation increases iNOS(+)CD206(-) M1 macrophage and controls the growth of solid tumor[J]. J Immunother Cancer, 2019, 7(1): 208.
- [12] NELSON A, GEBREMESKEL S, LICHTY B D, et al. Natural killer T cell immunotherapy combined with IL-15-expressing oncolytic virotherapy and PD-1 blockade mediates pancreatic tumor regression[J]. J Immunother Cancer, 2022, 10(3): e003923.
- [13] BIBURGER M, TIEGS G. Activation-induced NKT cell hyporesponsiveness protects from alpha-galactosylceramide hepatitis and is independent of active transregulatory factors[J]. J Leukoc Biol, 2008, 84(1): 264-279.
- [14] UMESHAPPA C S, SOLE P, YAMANOUCI J, et al. Re-programming mouse liver-resident invariant natural killer T cells for suppressing hepatic and diabetogenic autoimmunity[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 3279.
- [15] ALTEVOGT P, SAMMAR M, HUSER L, et al. Novel insights into the function of CD24: a driving force in cancer[J]. Int J Cancer, 2021, 148(3): 546-559.
- [16] LI D, HU M, LIU Y, et al. CD24-p53 axis suppresses diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinogenesis by sustaining intrahepatic macrophages[J]. Cell Discov, 2018, 4: 6.
- [17] BAI X F, LI O, 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.
- [18] CHEN G Y, TANG J, ZHENG P, et al. CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses[J]. Science, 2009, 323(5922): 1722-1725.
- [19] CROSBY C M, KRONENBERG M. Tissue-specific functions of invariant natural killer T cells[J]. Nat Rev Immunol, 2018, 18(9): 559-574.
- [20] SANTODOMINGO-GARZON T, SWAIN M G. Role of NKT cells in autoimmune liver disease[J]. Autoimmun Rev, 2011, 10(12): 793-800.
- [21] TAKEDA K, HAYAKAWA Y, VAN KAER L, et al. Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(10): 5498-5503.
- [22] LEE Y J, WANG H, STARRETT G J, et al. Tissue-specific distribution of iNKT cells impacts their cytokine response[J]. Immunity, 2015, 43(3): 566-578.
- [23] LIEW P X, LEE W Y, KUBES P. iNKT cells orchestrate a switch from inflammation to resolution of sterile liver injury[J]. Immunity, 2017, 47(4): 752-765.
- [24] LEINWAND J C, PAUL B, CHEN R, et al. Intrahepatic microbes govern liver immunity by programming NKT cells[J]. J Clin Invest, 2022, 132(8): e151725.
- [25] GAPIN L. Development of invariant natural killer T cells[J]. Curr Opin Immunol, 2016, 39: 68-74.
- [26] KAY R, TAKEI F, HUMPHRIES R K. Expression cloning of a cDNA encoding M1/69-J11d heat-stable antigens[J]. J Immunol, 1990, 145(6): 1952-1959.
- [27] PEI Z, ZHU G, HUO X, et al. CD24 promotes the proliferation and inhibits the apoptosis of cervical cancer cells *in vitro*[J]. Oncol Rep, 2016, 35(3): 1593-1601.
- [28] BENDELAC A, SAVAGE P B, TEYTON L. The biology of NKT cells [J]. Annu Rev Immunol, 2007, 25: 297-336.
- [29] BARRAL P, POLZELLA P, BRUCKBAUER A, et al. CD169 (+) macrophages present lipid antigens to mediate early activation of iNKT cells in lymph nodes [J]. Nat Immunol, 2010, 11(4): 303-312.
- [30] SCHMIEG J, YANG G, FRANCK R W, et al. Glycolipid presentation to natural killer T cells differs in an organ-dependent fashion [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(4): 1127-1132.

(2023-02-02 收稿)

(上接第 390 页)

- in glioma cells and promotes tumorigenesis via NF- κ B activation[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1): 59.
- [9] 陈云升, 郭杨, 申汉威, 等. TAGLN2 基因在低级别胶质瘤中的表达及其与患者预后相关性的生物信息学分析[J]. 中华神经医学杂志, 2019, 18(12): 1262-1267.
- [10] 夏之柏, 吴新建, 齐铁伟, 等. 人脑胶质瘤白介素 13 受体基因表达与肿瘤增殖活性的关系研究[J]. 中华显微外科杂志, 2006, 29(6): 438-441.
- [11] ZHE S, JUNFU W, QINGHONG S, et al. The role of MMP-2 and MMP-9 in the metastasis and development of hypopharyngeal carcinoma[J]. Braz J Otorhinolaryngol, 2021, 87(5): 521-528.
- [12] YONGQIANG Q, DA W, WENHUA H, et al. CyclinD1 inhibits dicer and crucial miRNA expression by chromatin modification to promote the progression of intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 413.

(2023-02-01 收稿)