DOI: 10.14188/j.1671-8852.2024.0509　　**文章编号** 1671-8852(2025)02-0142-05

NKT细胞缺乏通过促进树突状细胞肺部募集减轻肺损伤

竹　雪[1]　刘世平[1]　王慧娟[1]　张云龙[1]　潘明亮[1]　张召才[2]　宋振举[3]　王　璐[1]　詹丽英[1]
[1]武汉大学人民医院重症医学科　湖北　武汉　430060；
[2]浙江大学医学院附属第二医院重症医学科/浙江省急危重症临床医学研究中心　浙江　杭州　310009；
[3]复旦大学附属中山医院急诊科/复旦大学应急救援与急危重症研究所　上海　200032

摘要　目的：探讨自然杀伤T（NKT）细胞促进急性呼吸窘迫综合征（ARDS）肺损伤的机制。方法：利用野生型C57BL/6和CD1d基因敲除小鼠（NKT细胞缺乏），采用气管滴注脂多糖（LPS）的方式构建ARDS模型，分为WT-Control组、WT-ARDS组、$CD1d^{-/-}$-Control组和$CD1d^{-/-}$-ARDS组。观察肺组织病理损伤；检测肺组织湿干重比、肺泡灌洗液蛋白浓度及中性粒细胞比例、肺组织树突状细胞（DC）比例及炎症因子变化。结果：与WT-ARDS组相比，$CD1d^{-/-}$-ARDS组病死率降低，HE染色显示肺组织病理损伤减轻，肺损伤评分减低，肺毛细血管内皮通透性降低（$P<0.05$）；而且缺乏NKT细胞ARDS小鼠肺组织DC细胞比例升高，促炎性细胞因子IL-6、TNF-α减少，抑炎性细胞因子IL-10增多（$P<0.05$）。结论：NKT细胞通过抑制DC细胞肺部募集加重ARDS肺损伤。

关键词　自然杀伤T细胞；树突状细胞；急性呼吸窘迫综合征；CD1d
中图分类号　R34
文献标识码　A　　**开放科学（资源服务）标识码（OSID）：**

NKT cells promote lung injury by inhibiting lung recruitment of DC cell

ZHU Xue[1], LIU Shiping[1], WANG Huijuan[1], ZHANG Yunlong[1], PAN Mingliang[1], ZHANG Zhaocai[2], SONG Zhenju[3], WANG Lu[1], ZHAN Liying[1]
[1]Dept. of Critical Care Medicine, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China;
[2]Dept. of Critical Care Medicine, The Second Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine & Zhejiang Province Clinical Research Center for Emergency and Critical Care Medicine, Hangzhou 310009, Zhejiang, China;
[3]Dept. of Emergency, Zhongshan Hospital Fudan University & Institute of Emergency Rescue and Critical Care, Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract

Objective: To investigate the mechanism of Natural Killer T (NKT) cells promoting lung injury in acute respiratory distress syndrome (ARDS). **Methods:** In this study, ARDS mouse models were induced in wild-type (C57BL/6) and CD1d knockout (KO) mice by intratracheal instillation of lipopolysaccharide (LPS). The mice were divided into four groups: the WT-Control, the WT-ARDS, the

课题来源：国家重点研发计划（编号：2021YFC2501800）；国家自然科学基金面上项目（编号：82272226）；武汉市知识创新专项项目（编号：2023020201010165）；武汉大学人民医院交叉创新人才项目（编号：JCRCZN-2022-017）
作者简介：竹雪，女，2001—，医学硕士，主要从事ARDS炎症反应研究，E-mail: 2023283020118@whu.edu.cn
通信作者：詹丽英，女，1971—，医学博士，主任医师，主要从事ARDS炎症反应研究，E-mail: zhanliying@whu.edu.cn

CD1d$^{-/-}$-Control, and the CD1d$^{-/-}$-ARDS. We observed the pathological changes in lung tissue and measured the wet/dry (W/D) weight ratio of the lung. Protein concentration and neutrophil ratio in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), the proportion of dendritic cells(DCs) and inflammatory factor levels in the lung were also measured. **Results:** Compared with those in the WT-ARDS group, the mortality, lung injury score and pulmonary capillary permeability all decreased significantly in the CD1d$^{-/-}$-ARDS group ($P<0.05$). HE staining showed that the pathological state of the lung tissues improved obviously in CD1d KO mice. Besides, levels of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF-α) were decreased and the expression of anti-inflammatory cytokine (IL-10) was increased ($P<0.05$). The proportion of DCs in lung tissues was increased after CD1d gene KO ($P<0.05$). **Conclusion:** NKT cells aggravate ARDS lung injury by inhibiting lung recruitment of DCs.

Key Words　Natural Killer T Cells; Dendritic Cells; Acute Respiratory Distress Syndrome; CD1d

急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome，ARDS)是由多种原因(如严重感染、创伤、烧伤和大手术等)引起的强烈炎症反应导致的肺部损伤。尽管国内外进行了大量的基础和临床研究，ARDS目前尚无有效的药物治疗，关键在于ARDS炎症反应的机制尚未完全阐明。自然杀伤T(natural killer T cell，NKT)细胞是一类独特的淋巴细胞亚群，通常分为Ⅰ型和Ⅱ型，只能通过识别CD1d分子递呈的糖脂抗原而激活[1]。激活的NKT细胞产生大量细胞因子，导致细胞因子风暴[2]。我们前期研究表明NKT细胞能够促进ARDS炎症反应[3]，但具体机制不清。

树突状细胞(dendritic cells，DC)是一组形态、结构和功能异质性的专职抗原递呈细胞，也是迄今为止发现的功能最强的抗原递呈细胞，它可经体循环进入炎症部位，调节T细胞和B细胞应答，在免疫应答和免疫耐受中起重要作用[4-5]。研究表明，NKT细胞通过DC细胞激活，然后反馈性调节DC细胞的活化、分化及功能[6]。目前有多项研究[5,7]利用模型抗原证实NKT细胞对DC细胞的影响。但在ARDS发生发展过程中NKT细胞与DC细胞的交互作用尚未阐明。本研究利用CD1d基因敲除小鼠探究NKT细胞和DC细胞在ARDS炎症反应中的相互作用机制。

1　材料与方法

1.1　实验试剂　anti-CD45、anti-CD11b、anti-Ly6G、anti-CD3、anti-CD11c(BD Pharmingen，美国)，LPS(Sigma-Aldrich，美国)，BCA试剂盒(塞维尔，中国)，TRIzol(TaKaRa Bio，日本)、NanoDrop分光光度计、RT-PCR试剂盒(Monad Bio，中国)、RIPA缓冲液(塞维尔，中国)、BCA蛋白检测试剂盒(塞维尔，中国)。

1.2　实验动物　6～8周SPF级雄性野生型C57BL/6和CD1d基因敲除小鼠，体重20～25 g，购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司。在武汉大学第一临床学院实验动物中心进行适应性喂养72 h，维持昼夜节律为12 h∶12 h。所有实验程序严格按照中国实验动物管理立法规定进行，该实验经武汉大学人民医院动物研究伦理委员会批准(WDRM No. 20230312B)，本研究中进行的所有动物实验均符合实验动物保护和使用指南。

1.3　实验动物模型构建　将WT小鼠及CD1d基因敲除小鼠分为四组(每组5只)，分别为WT-Control组、WT-ARDS组、CD1d$^{-/-}$-Control组和CD1d$^{-/-}$-ARDS组。通过腹腔注射2%戊巴比妥钠50 mg/kg麻醉小鼠，用微量注射器气道内注射LPS 30 mg/kg构建ARDS模型。仰卧固定小鼠于实验台上，消毒后逐层暴露气管，用微量注射器朝向心端穿过气管软骨环间隙刺入，若回抽有气体溢出则将LPS或生理盐水注入气管内。术毕迅速将小鼠上下及左右分别旋转20次，使药液均匀分布于肺内后放回笼中饲养。造模成功24 h后取材并进行指标检测。

1.4　肺泡灌洗术　安乐死处死小鼠后，仰卧固定小鼠，逐层暴露气管和胸腔，结扎右肺，用1 mL注射器吸取0.4 mL生理盐水缓慢注入气道内，可见肺组织膨胀，维持15 s后缓慢回抽灌洗液，支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid，BALF)回收率达70%以上为灌洗有效，重复3次；300 g 5 min，离心收集细胞及上清，上清保存于－80 ℃冰箱内，收集

的细胞行流式细胞术。

1.5 肺组织HE病理染色 将小鼠左肺上叶组织固定、包埋和切片后进行苏木精-伊红(HE)染色,然后高倍镜下拍照,采用Smith评分评估肺损伤程度。

1.6 BCA(Bicinchoninic acid)法检测BALF蛋白浓度 按照BCA试剂盒说明书检测肺泡灌洗液蛋白浓度。

1.7 肺组织湿干重(wet-to-dry,W/D)比值的测定 用生理盐水清洗肺组织,滤纸吸干表面水分,称量并记录肺湿重后,把肺组织放入60 ℃恒温烘箱内烘烤48 h,称量并记录相应肺组织干重;在Excel中输入公式计算肺组织W/D比值,以评价肺组织水肿程度。

1.8 q-PCR法检测肺组织炎症因子水平 使用TRIzol试剂(TaKaRa)提取肺组织总RNA。使用逆转录酶试剂盒合成cDNA,实时荧光定量法检测靶基因IL-6、TNF-α、IL-10、GAPDH的表达,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算mRNA的相对表达量。

1.9 流式细胞术检测肺组织DC细胞的比例和BALF中性粒细胞的比例 取出肺脏组织后放入含有1 mL 2%FBS的EP管内,置于冰上,剪碎碾磨制备成单细胞悬液。取相同数目细胞进行表面染色,加入相应表面抗体CD45、CD11b、CD11c、Ly6g,混匀后4 ℃冰箱内孵育40 min,注意避光;加入2 mL PBS混匀洗涤;300 g×5 min 4 ℃离心;轻轻弃掉上清,将100 μL 2%多聚甲醛加入试管内固定细胞;应用流式细胞仪上调好电压条件后收集细胞,应用Flowjo软件进行数据分析。

1.10 统计学方法 运用Graphpad 8.0软件分析处理数据并绘制柱状图。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组样本间比较采用单因素方差分析,两两比较采用t检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NKT细胞缺乏降低ARDS病死率 应用CD1d基因敲除小鼠探讨NKT细胞对ARDS病死率的影响。构建ARDS模型后,每天观察并记录死亡的小鼠数量,如图1所示。在第2天,WT-ARDS组小鼠存活率为75%,$CD1d^{-/-}$-ARDS组小鼠存活率为83.3%;在第7天,WT-ARDS组小鼠存活率为25%,而$CD1d^{-/-}$-ARDS组小鼠存活率为66.7%,故NKT细胞缺乏ARDS小鼠与WT小鼠相比,病死率显著降低($P<0.05$)。

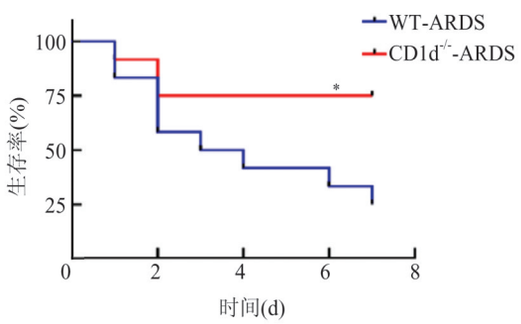


图1 NKT细胞缺乏降低LPS诱导的ARDS小鼠病死率

生存率曲线图,*$P<0.05$

2.2 NKT细胞缺乏减轻ARDS肺损伤 应用CD1d基因敲除小鼠探讨NKT细胞对ARDS肺损伤的影响。WT-Control组HE染色显示肺组织结构正常(图2A)。WT-ARDS组肺组织中白细胞浸润增多、肺泡充血/出血,伴有肺泡塌陷和肺泡壁增厚(图2A)。与WT-ARDS组相比,$CD1d^{-/-}$-ARDS组肺部形态学损伤较轻,表现为白细胞浸润减少、肺泡充血/出血减轻、肺泡塌陷和肺泡壁增厚面积减少(图2A)、肺损伤评分(图2B)明显减低($P<0.001$)。

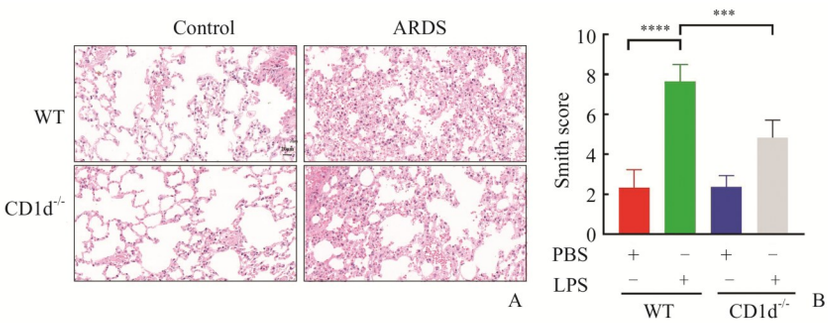


图2 NKT细胞缺乏减轻LPS诱导的ARDS肺病理损伤

气管内注射LPS 24 h后留取肺组织。A.肺组织HE染色(n=5),比例尺=20 μm;B.肺病理损伤评分。所示数据为均数±标准差。***$P<0.001$,****$P<0.000\,1$

2.3　NKT 细胞缺乏降低 ARDS 肺毛细血管通透性　为了探讨 NKT 细胞对 ARDS 肺毛细血管通透性的影响，检测肺组织 W/D 比值、BALF 蛋白浓度及中性粒细胞比例。与 WT-Control 组相比，WT-ARDS 组蛋白浓度增高（图 3A）（$P<0.000\ 1$），中性粒细胞比例增多（图 3B）（$P<0.01$），W/D 比值升高（图 3C）（$P<0.05$）；与 WT-ARDS 组相比，CD1d$^{-/-}$-ARDS 组蛋白浓度及 W/D 比值均减少（图 3A、3C）（$P<0.05$），中性粒细胞比例降低（图 3B）（$P<0.000\ 1$）。

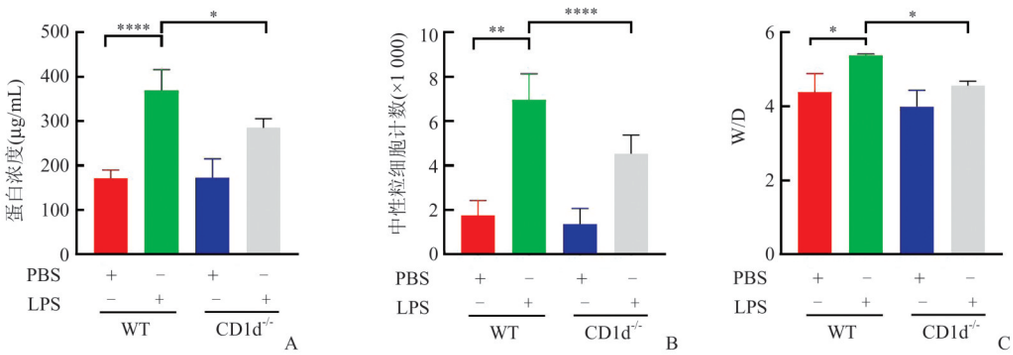


图 3　NKT 细胞缺乏降低 LPS 诱导的 ARDS 小鼠肺毛细血管通透性

气管内注射 LPS 后 24 h 取 BALF 和肺组织检测。A. BALF 中的蛋白浓度比较；B. BALF 中性粒细胞计数；C. 计算 W/D 比值以评价小鼠肺水肿程度。所示数据为均数±标准差。$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{****}P<0.000\ 1$

2.4　NKT 细胞缺乏减轻 ARDS 肺部炎症　为了评估 NKT 细胞对 ARDS 炎症反应因子表达的影响，我们应用 q-PCR 法检测肺组织炎症因子 mRNA 表达水平。与 WT-Control 组相比，WT-ARDS 组肺组织炎症因子 IL-6、TNF-α 均显著增多（图 4）（$P<0.05$）。与 WT-ARDS 组相比，CD1d$^{-/-}$-ARDS 组炎症因子 IL-6、TNF-α 均显著减少，IL-10 显著增多（图 4）（$P<0.05$）。

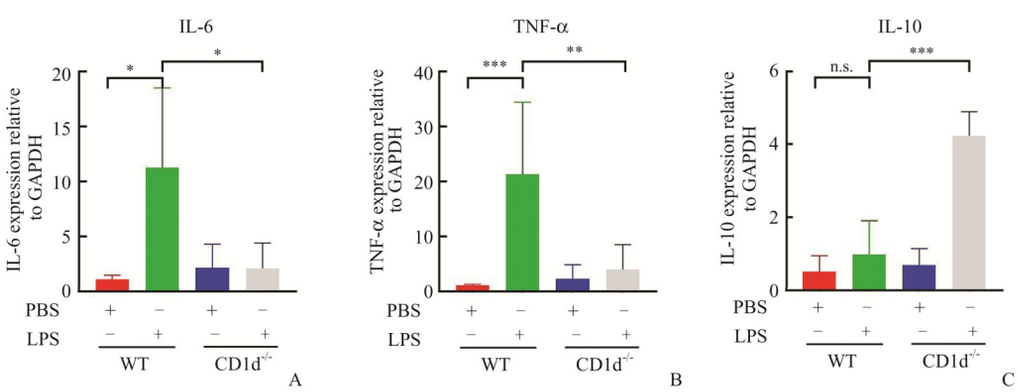


图 4　NKT 细胞缺乏减轻 LPS 诱导的 ARDS 小鼠肺部炎症

ARDS 造模后 24 h 收集肺组织检测。q-PCR 法检测小鼠肺组织中的 IL-6（A）、TNF-α（B）和 IL-10 水平（C），以评价炎症因子的表达水平（$n=5$）。所示数据为均数±标准差。$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$，n.s.：差异无统计学意义

2.5　NKT 细胞缺乏促进 DC 细胞在肺部的募集　为进一步探究 NKT 细胞促进 ARDS 早期炎症反应的机制，我们应用流式细胞术检测肺组织中固有免疫提呈细胞 DC 细胞的比例。与 WT-Control 组相比，WT-ARDS 组肺组织 DC 细胞（CD45^{+}-CD11b^{+}CD11c^{+}）（图 5A）比例显著减少（图 5B）（$P<0.05$）；与 WT-ARDS 组相比，CD1d$^{-/-}$-ARDS 组肺组织 DC 细胞比例显著增多（图 5B）（$P<0.001$）。

3　讨论

本研究选用 CD1d 基因敲除的小鼠，并通过气道滴注 LPS 构建 ARDS 模型，深入研究了 NKT 细胞促进 ARDS 肺损伤的机制。通过小鼠生存率、肺组织 HE 染色、炎症因子表达水平和肺毛细血管通透性等发现，NKT 细胞抑制 DC 细胞在肺部的募集，加重肺组织炎症反应，进而降低 ARDS 小鼠的存活率。

研究表明，NKT 细胞浸润促进早期肺部炎症反

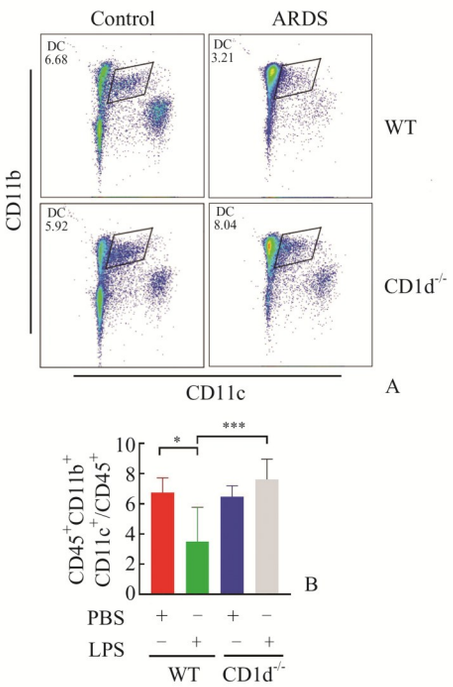


图5 NKT细胞缺乏促进DC细胞在LPS诱导的ARDS小鼠肺组织中募集

气管内注射LPS 24 h后取肺脏制备单细胞悬液，并用抗CD45、抗CD11b、抗CD11c抗体染色。A. 通过流式细胞术检测肺组织中DC细胞的比例，DC细胞定义为$CD45^+CD11b^+CD11c^+$(n=5)；B. 数据表示为肺脏中DC细胞与$CD45^+$细胞的比值(n=3～5)。所示结果来自三个独立实验之一；数据为平均值±标准差；$^*P<0.05$，$^{***}P<0.001$

应[8-9]。本研究结果显示，CD1d基因敲除的ARDS小鼠肺组织W/D比值降低、肺泡灌洗液中中性粒细胞比例及蛋白浓度减少，促炎性细胞因子IL-6、TNF-α减少，抑制性细胞因子IL-10增多，这些结果也提示了NKT细胞促进ARDS肺损伤，增加ARDS病死率。

目前已知一些NKT细胞表达不变的T细胞受体α链，被称为恒定自然杀伤T细胞[10](invariant natural killer T cells，iNKT)。Bourgeois等[11]的研究发现，iNKT细胞能够防御肺部病毒性感染，在癌症、自身免疫性疾病中起重要作用。但在本研究中，我们观察到CD1d基因敲除的ARDS小鼠病死率降低，肺组织病理损伤减轻。因此我们推测，NKT细胞在肺部炎症反应中的调节作用较为复杂。

多项研究[12-14]表明，在呼吸道衣原体感染中NKT细胞能够反馈性调节DC细胞的表型和功能。NKT细胞缺乏小鼠肺组织中DC细胞的数量、表型和细胞因子谱发生显著改变[13]。我们的实验结果也显示，NKT细胞能够抑制DC细胞在肺部的募集，在NKT细胞缺乏的ARDS小鼠肺组织DC细胞募集显著增多。

我们的研究具有一定的局限性：首先本研究利用的是气道内注入LPS 30 mg/kg构建ARDS模型[15]，然而该模型不能完全反映肺外性因素(如休克、大手术等)或者其他非革兰阴性菌感染等所导致的ARDS。其次本研究仅在ARDS动物模型上观察到NKT能够抑制DC细胞在肺部的募集，但仍需进一步的动物实验以及临床研究进行验证并阐明其潜在的机制，为我们更好地理解ARDS发病机制奠定基础。

综上所述，NKT细胞可以通过抑制DC细胞在肺部的募集从而促进ARDS炎症的发生。该研究为我们深入了解NKT细胞和DC细胞在ARDS早期炎症反应中的交互作用奠定了基础，同时也有助于我们更好地理解ARDS炎症反应机制。

参考文献

[1] Almeida C F, Sundararaj S, Le Nours J, et al. Distinct CD1d docking strategies exhibited by diverse Type Ⅱ NKT cell receptors [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 5242.

[2] van Kaer L, Parekh V V, Wu L. The response of CD1d-restricted invariant NKT cells to microbial pathogens and their products [J]. Front Immunol, 2015, 6: 226.

[3] Zou L, Dang W, Tao Y, et al. The IL-33/ST2 axis promotes acute respiratory distress syndrome by natural killer T cells [J]. Shock, 2023, 59(6): 902-911.

[4] Mildner A, Jung S. Development and function of dendritic cell subsets [J]. Immunity, 2014, 40(5): 642-656.

[5] Del Prete A, Salvi V, Soriani A, et al. Dendritic cell subsets in cancer immunity and tumor antigen sensing [J]. Cell Mol Immunol, 2023, 20(5): 432-447.

[6] Zhao L, Yang X. Cross talk between natural killer T and dendritic cells and its impact on T cell responses in infections [J]. Front Immunol, 2022, 13: 837767.

[7] Hermans I F, Silk J D, Gileadi U, et al. Dendritic cell function can be modulated through cooperative actions of TLR ligands and invariant NKT cells [J]. J Immunol, 2007, 178(5): 2721-2729.

[8] Hodge G, Hodge S. Therapeutic targeting steroid resistant pro-inflammatory NK and NKT-like cells in chronic inflammatory lung disease [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(6): 1511.

(下转第165页)