doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2024.12.001

❖基础研究❖

iNKT 细胞过继转移对哮喘小鼠肺部免疫细胞-神经元相互作用的研究

陈亚宾,张雪丽,李宏贵,李燕维,梁俊杰,吉训超,许华
(广州中医药大学第一附属医院儿科,广东 广州 510405)

【摘要】**目的:** 观察 iNKT 细胞过继转移对哮喘小鼠肺部免疫细胞与神经元相互作用的影响,探讨其在哮喘免疫调节中的潜在机制。**方法:** 选取 30 只雌性 BALB/c 小鼠作为研究对象,随机分为对照组、哮喘组和 iNKT 细胞转移组。对照组接受等量的生理盐水注射,不进行 OVA 致敏和激发,也不进行 iNKT 细胞转移;哮喘组按照标准的 OVA 致敏和激发方案建立哮喘模型,不进行 iNKT 细胞转移;iNKT 细胞转移组在建立哮喘模型后通过尾静脉注射 iNKT 细胞。模型建立通过 HE 染色和显微镜观察肺组织的炎症细胞浸润程度进行验证。通过流式细胞术分析 T 细胞、B 细胞和巨噬细胞等肺部免疫细胞群体水平的变化。免疫荧光染色用于检测肺组织神经元标志物(NeuN、ChAT)的表达。ELISA 用于检测肺部组织中炎症因子(TNF-α、IL-6、IL-13)和神经递质(乙酰胆碱、去甲肾上腺素)水平。**结果:** MTT 结果显示,与对照组相比,哮喘组的细胞存活率明显更低($P<0.05$),iNKT 过继转移后,细胞存活率较哮喘组升高($P<0.05$);流式细胞术分析显示,与哮喘组相比,iNKT 细胞转移组小鼠肺部 T 细胞和巨噬细胞的比例增加($P<0.05$),B 细胞比例降低($P<0.05$)。免疫荧光染色结果显示,iNKT 细胞转移组小鼠肺组织中神经元标志物 NeuN 和 ChAT 的表达水平高于哮喘组($P<0.05$)。ELISA 结果显示,iNKT 细胞转移组小鼠的炎症因子 TNF-α、IL-6 和 IL-13 的水平显著低于哮喘组($P<0.05$),iNKT 细胞过继转移组小鼠肺组织中的乙酰胆碱和去甲肾上腺素水平显著高于哮喘组($P<0.05$)。**结论:** 过继转移 iNKT 细胞能够调节哮喘小鼠肺部免疫细胞的组成,降低炎症因子水平,显示出潜在的治疗哮喘的作用。

【关键词】iNKT 细胞;哮喘;免疫细胞;神经元
【中图分类号】R392.12 【文献标志码】A

Study of immune cell-neuron interactions in the lungs of asthma mice by adoptive transfer of iNKT cells

CHEN Ya-bin, ZHANG Xue-li, LI Hong-gui, LI Yan-wei, LIANG Jun-jie, JI Xun-chao, XU Hua
(*Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou* 510405, *Guangdong, China*)

【**Abstract**】**Objective:** To investigate the effect of adoptive transfer of iNKT cells on the interaction between lung immune cells and neurons in asthma mice, and to reveal its potential mechanism in asthma immune regulation. **Methods:** A total of 30 female BALB/c mice were randomly divided into three groups: control group, asthma group and iNKT cell transfer group. The control group received the same amount of normal saline injection, no OVA sensitization and provocation, and no iNKT cell transfer. The asthma group established an asthma model according to the standard OVA sensitization and provocation protocol, and no iNKT cell transfer was performed. The iNKT cell transfer group was injected with iNKT cells through the tail vein after the asthma model was established. The model was successfully established and verified by HE staining and microscopy to observe the degree of inflammatory cell infiltration in lung tissue. Changes in lung immune cell populations such as T cells, B cells, and macrophages were analyzed by flow cytometry. Immunofluorescence staining was used to detect the expression of neuronal markers (NeuN, ChAT) in lung tissue. ELISA was used to detect the levels of inflammatory factors (TNF-α, IL-6, IL-13) and neurotransmitters (acetylcholine, norepinephrine) in lung tissue. **Results:** MTT results showed that compared with the control group, the cell survival rate in the asthma group was significantly lower than that in the control group ($P<0.05$). After adoptive transfer of iNKT, the cell survival rate was higher in the asthma group ($P<0.05$). Flow cytometry Cytometry analysis showed that compared with the asthma group, the proportion of T cells and macrophages in the lungs of mice in

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81373686);广东省名中医传承工作室建设项目[粤中医办涵(2023)108 号];广东省广州市科技计划项目(2023A04J1172)
作者简介: 陈亚宾(1989-),女,博士,主治医师。E-mail:Chenyb220827@163.com
通讯作者: 许华,博士,教授。E-mail:xuhua212@126.com

the iNKT cell transfer group was increased ($P<0.05$), while the proportion of B cells was decreased ($P<0.05$). Immunofluorescence staining results showed that the expression levels of neuronal markers NeuN and ChAT in the lung tissue of mice in the iNKT cell transfer group were higher than those in the asthma group ($P<0.05$). ELISA results showed that the levels of inflammatory factors TNF-α, IL-6 and IL-13 in the mice in the iNKT cell transfer group were significantly lower than those in the asthma group ($P<0.05$). The levels of acetylcholine and norepinephrine in the lung tissue of mice in the iNKT cell adoptive transfer group norepinephrine was higher than that in the asthma group ($P<0.05$). **Conclusion**: Adoptively transferred iNKT cells can regulate the composition of lung immune cells and reduce the level of inflammatory factors in asthma mice, showing potential therapeutic effects for asthma.

【**Key words**】 iNKT cells; Asthma; Immune cells; Neuron

哮喘是一种常见的慢性气道炎症性疾病,并且发病率和死亡率在过去几十年中呈上升趋势[1]。在哮喘的病理生理学过程中,气道神经元的激活也在哮喘病理生理学中占有重要地位,涉及神经递质如乙酰胆碱和去甲肾上腺素的分泌及其对气道平滑肌的作用[2]。免疫系统在哮喘的发病机制中扮演着核心角色,其中涉及到多种免疫细胞的相互作用,如 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞等[3]。iNKT 细胞是一类特殊的 T 淋巴细胞,能够同时表达 T 细胞受体(TCR)和自然杀伤(NK)细胞标志物。这些细胞在快速识别抗原、启动免疫反应及调节其他免疫细胞活性中起着重要作用[4]。已有研究[5]表明,iNKT 细胞通过分泌大量的细胞因子,如 γ 干扰素(IFN-γ)、白细胞介素 4(IL-4)、IL-13 等,能够在哮喘的免疫病理学过程中发挥双重作用。基于此,本研究通过观察 iNKT 细胞过继转移对哮喘小鼠肺部免疫细胞与神经元相互作用的影响,探讨其在哮喘免疫调节中的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取 30 只雌性 BALB/c 小鼠,6 周龄,体质量(23.34 ± 2.63)g。所有小鼠均在温度(22 ± 2) ℃、湿度(50 ~ 60)% 和 12 h 光暗周期条件下饲养。小鼠可自由获取标准实验饲料和灭菌饮用水。所有实验过程均符合国际动物实验伦理准则,并经过当地动物伦理委员会审批和监督。实验过程中尽量减少小鼠的痛苦和压力。

1.2 造模与分组

建立哮喘模型[6]:(1)致敏阶段:于第 1 天和第 7 天:小鼠经腹腔注射 20 μg 卵清蛋白(OVA, Grade V, Sigma-Aldrich, A5503)与 2 mg 氢氧化铝(Thermo Fisher Scientific, 77161)混合的生理盐水悬液,总体积为 200 μL。(2)激发阶段:于第 14、15、16 天:小鼠每天暴露于 1% 的 OVA 溶液(溶于生理盐水,体积:10 mL)30 min,通过鼻内滴入方式进行激发。每只小鼠使用的液体量为 50 μL。模型验证:为确保模型的可靠性,本课题组在实验前进行了预实验,以验证模型建立的成功率。预实验结果表明,模型建立成功率达到预期目标,从而确保了实验的可行性。实验结束后,进一步对模型进行验证:取小鼠的肺部组织进行病理分析。通过取肺组织进行 HE 染色,观察并评估炎症细胞浸润的程度。肺组织切片的显微镜观察炎症细胞的聚集和数量增多可判断模型建立成功。

分组:对照组注射等量的生理盐水(PBS)而不进行 OVA 致敏和激发,也不进行 iNKT 细胞转移;哮喘组按照标准的 OVA 致敏和激发方案建立哮喘模型,不进行 iNKT 细胞转移;iNKT 细胞转移组建立哮喘模型后,通过尾静脉注射 iNKT 细胞。

1.3 iNKT 细胞制备与过继转移

iNKT 细胞制备:供体小鼠在无菌条件下麻醉后断颈处死,并迅速取出脾脏。将脾脏在无菌 PBS 中冲洗,除去多余的血液和组织残渣。使用玻璃玻棒或细胞筛将脾脏组织研磨,以释放脾细胞。将悬浮细胞液过 70 μm 细胞筛,去除组织碎片。使用抗-NK1.1 和抗-TCR β 抗体(BioLegend, 108706、109206)的磁珠分选系统(MACS 系统)进行 iNKT 细胞分离。按照生产商提供的操作手册,将脾细胞悬液与抗体结合的磁珠共孵育,然后通过磁性分离器进行纯化。对分选得到的细胞进一步进行流式细胞术检测,确保 iNKT 细胞的纯度。iNKT 细胞的标志物通常为 NK1.1 + TCRβ +。在磁珠分选过程中,细胞浓度应调整至 1×10^8 个/mL,以确保磁珠与细胞的有效结合。接着进行 iNKT 细胞扩增,硫酸脑苷脂激活 iNKT 细胞。将纯化的 iNKT 细胞与抗-CD3/CD28 抗体(Thermo Fisher Scientific)和 IL-2 共同孵育,以促进细胞增殖。每隔 2 ~ 3 d 更换培养基并补充 IL-2,直至获得足够数量的 iNKT 细胞。

过继转移:在转移当天,收集并计数扩增后的 iNKT 细胞。调整细胞浓度至 1×10^7 个/mL,使用冷 PBS 悬浮细胞以备注射。实验小鼠在麻醉后进行尾静脉注射。无菌注射器取 200 μL iNKT 细胞悬液(约 2×10^6 个细胞),缓慢注入小鼠尾静脉中。

1.4 MTT 法评估 iNKT 细胞在肺组织中的存活率

从麻醉并处死的小鼠中取肺组织,使用剪刀和

镊子将其切碎。将切碎的组织置于含有胶原酶 D 的 RPMI-1640 培养基中。使用胰蛋白酶处理肺组织,以分离出单个细胞。经过一定时间后,用细胞过滤器过滤以去除未消化的组织块。自动细胞计数仪计数分离后的细胞,调整浓度至 1×10^6 个/mL,将细胞接种在 96 孔板中,每孔添加相同数量的细胞(如 100 μL)。细胞培养 24 h 后,每孔添加 20 μL 的 MTT 溶液(5 mg/mL),继续培养 4 h。将培养基去除,并加入 100 μL 的 DMSO 以溶解形成的紫色甲臜晶体,轻轻摇晃使其完全溶解。使用酶标仪在波长 570 nm 下测定每孔的光吸收值(OD 值)。计算各组细胞存活率。

1.5　流式细胞术分析免疫细胞群体(T 细胞、B 细胞和巨噬细胞)

使用 40 μm 细胞筛过滤,收集细胞并用 PBS 或流式细胞术缓冲液重悬,取 50 μL 细胞悬液,加入抗体阻断剂(Fc Block),孵育 10 min 以防止非特异性结合。加入预标记的荧光抗体(抗-CD3、抗-CD19、抗-F4/80),按照生产商推荐的浓度进行染色。4 ℃避光孵育 30 min。染色后,用流式细胞仪(BD Biosciences)进行数据采集。使用 FlowJo 软件分析数据。

1.6　免疫荧光染色检测神经元标志物(NeuN、ChAT)

将固定的肺组织用蔗糖溶液逐级脱水,然后用 OCT 包埋并在 -20 ℃下冷冻。使用冷冻切片机,将包埋的组织切成 10 μm 厚的切片,并粘附在载玻片上。切片自然干燥后,用 4% 多聚甲醛固定 10 min。用柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0)进行抗原修复,95 ℃孵育 10 min。冷却至室温后,用 PBS 清洗。在组织切片上滴加 5% BSA 封闭液,室温孵育 1 h。加入一抗(抗-NeuN、抗-ChAT,Abcam),4 ℃孵育过夜。次日用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。加入荧光标记的二抗(Thermo Fisher Scientific),室温孵育 1 h,避光。用 DAPI 染色核,室温孵育 5 min。用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。加盖玻片并用抗荧光淬灭封片剂封片。使用共聚焦显微镜(Leica Microsystems,Leica TCS SP8)采集荧光图像,分析神经元标志物(NeuN、ChAT)的表达。

1.7　ELISA 检测炎症因子和神经递质水平

麻醉小鼠并采集血液样本,离心后收集血清。取肺组织,冷冻后研磨并用适量冷 PBS 提取蛋白质,离心收集上清。选择合适的 ELISA 试剂盒(TNF-α、IL-6、IL-13、乙酰胆碱、去甲肾上腺素,R&D Systems,Abcam),按照试剂盒说明书操作。将样本和标准品加入酶标板中,按说明书进行孵育和洗涤。加入酶结合物,孵育后再次洗涤。加入显色底物,反应一定时间后加入终止液。在波长 450 nm 下使用酶标仪(Thermo Fisher Scientific)读取光密度值。使用标准曲线计算样本中炎症因子 TNF-α、IL-6、IL-13 和乙酰胆碱、去甲肾上腺素浓度。

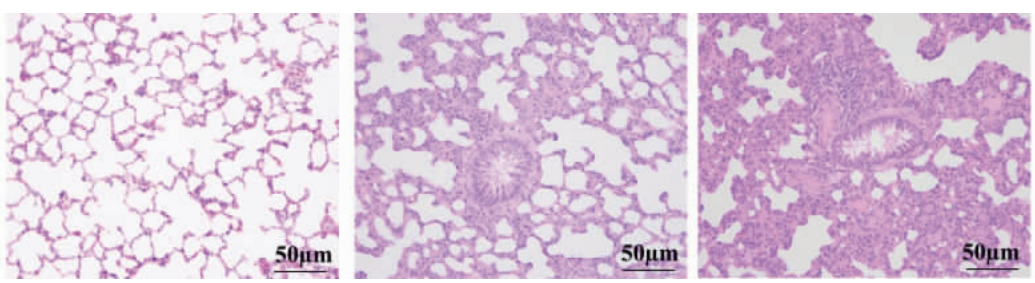
1.8　统计学分析

使用 GraphPad Psrism10. 1. 2 统计软件进行数据处理和分析。计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验。计数资料以[n(%)]表示,组间比较采用独立样本 χ^2 检验。多组间比较采用方差分析(ANOVA)及事后两两比较(Tukey's HSD)。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　炎症细胞浸润的验证结果

各组 HE 染色后的显微镜图像显示:正常对照组肺泡壁较为完整,没有明显的炎症细胞聚集。哮喘组肺部组织中存在显著的炎症细胞浸润,尤其是在肺泡间质和气道周围区域。可以观察到大量的炎症细胞(如中性粒细胞和淋巴细胞)浸润,肺泡壁增厚,气道结构受损。过继转移组图像显示 iNKT 细胞过继转移后,肺部组织中炎症细胞的浸润有所改善,相比哮喘模型组的显著炎症浸润,iNKT 细胞过继转移组小鼠的炎症细胞数量减少,肺泡壁相对恢复正常,气道结构也得到一定程度的保护。见图 1。



对照组　　哮喘组　　过继转移组

图 1　各组肺部炎症细胞浸润情况(HE×400)

2.2　MTT 法评估 iNKT 细胞在肺组织中的存活率

MTT 结果显示，与对照组相比，哮喘组的细胞存活率明显低于对照组（$P<0.05$），iNKT 过继转移后，细胞存活率较哮喘组升高（$P<0.05$）。见图 2。

2.3　iNKT 细胞过继转移对哮喘小鼠肺部免疫细胞的影响

流式细胞术分析显示，与对照组相比，哮喘组肺部 T 细胞和巨噬细胞的比例较低（$P<0.05$），B 细胞比例较高（$P<0.05$）；与哮喘组相比，iNKT 细胞转移组小鼠肺部 T 细胞和巨噬细胞的比例增加（$P<0.05$），B 细胞比例降低（$P<0.05$）。见图 3。

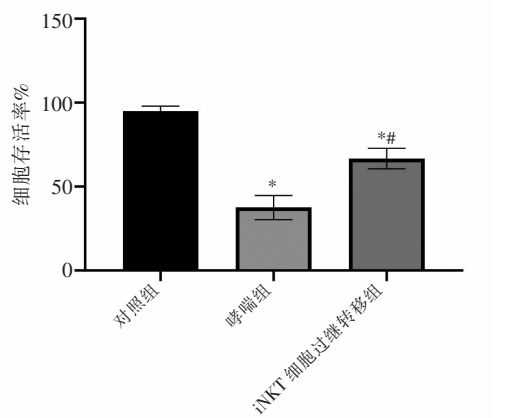


图 2　MTT 法评估 iNKT 细胞在肺组织中的存活率

*P<0.05，与对照组比较；#P<0.05，与哮喘组比较。

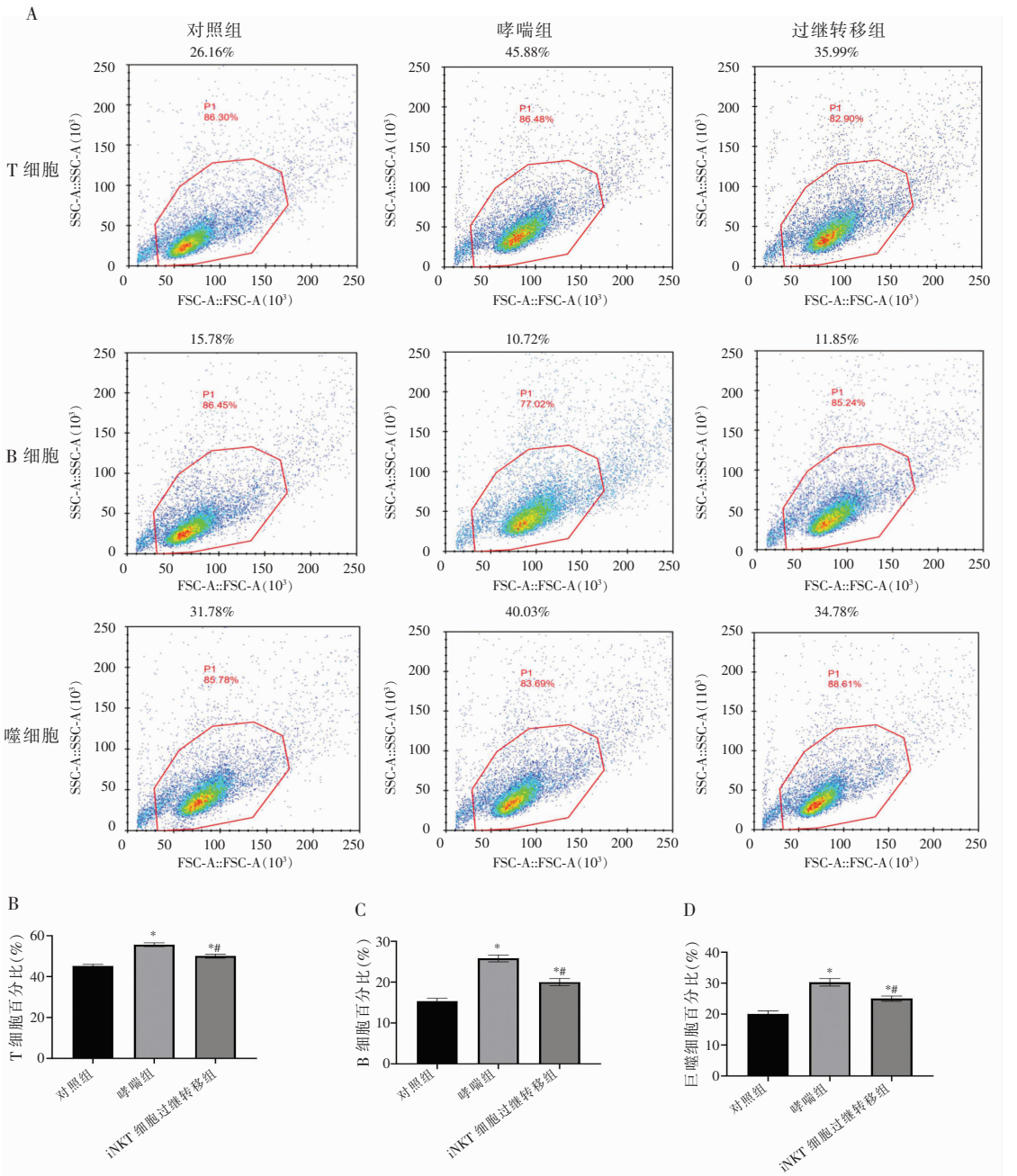


图 3　流式细胞术检测各组免疫细胞水平

A. 各组流式细胞术检测免疫细胞结果比较；B. 各组 T 细胞百分比比较；C. 各组 B 细胞百分比比较；D. 各组巨噬细胞百分比比较。*P<0.05，与对照组比较；#P<0.05，与哮喘组比较。

2.4　iNKT 细胞过继转移对哮喘小鼠肺部神经元的影响

免疫荧光染色结果显示,iNKT 细胞转移组小鼠肺组织中神经元标志物 NeuN 和 ChAT 的表达水平高于哮喘组($P<0.05$)。见图 4。

2.5　iNKT 细胞过继转移对哮喘小鼠肺部炎症细胞的影响

哮喘组的 TNF-α、IL-6、IL-13 水平高于对照组($P<0.05$),iNKT 细胞过继转移组的 TNF-α、IL-6、IL-13 水平较于哮喘组低($P<0.05$)。见图 5。

2.6　iNKT 细胞过继转移对哮喘小鼠肺部神经递质的影响

ELISA 检测结果显示,iNKT 细胞过继转移组小鼠肺组织中的乙酰胆碱和去甲肾上腺素水平高于哮喘组($P<0.05$)。见图 6。

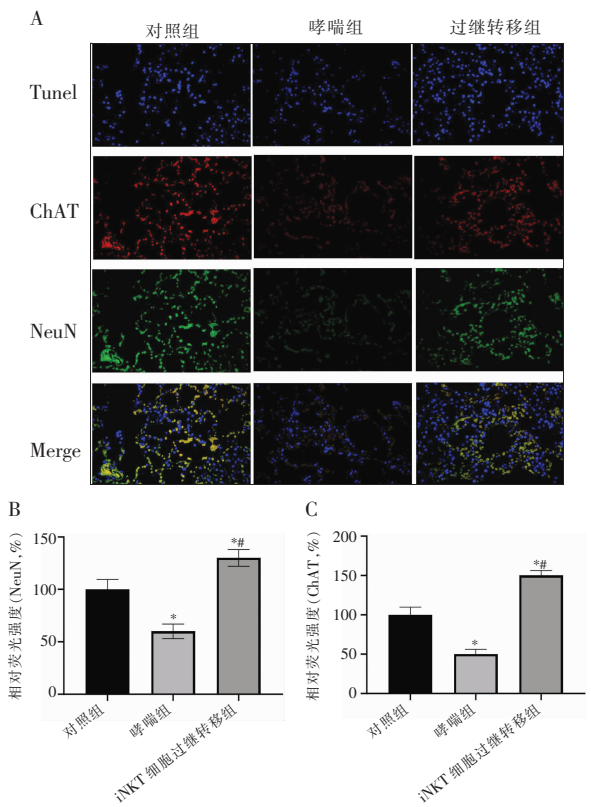
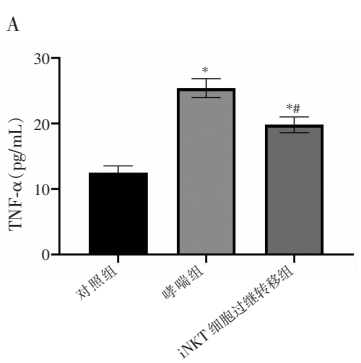


图 4　免疫荧光染色检测神经元标志物结果(×400)

A. 免疫荧光染色检测神经元标志物结果图比较;B. NeuN 相对荧光强度比较;C. ChAT 相对荧光强度比较。*P<0.05,与对照组比较;#P<0.05,与哮喘组比较。



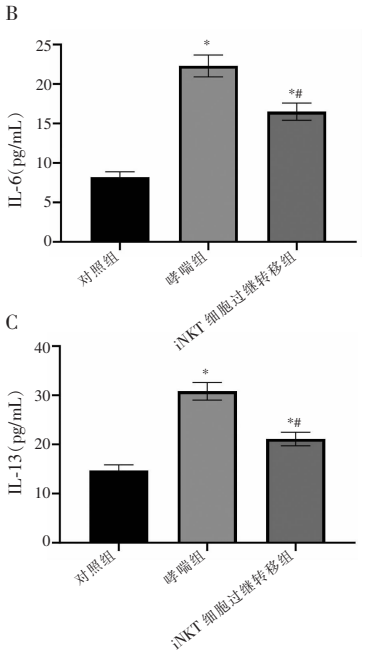


图 5　各组炎症因子表达的对比

A. TNF-α 水平的比较;B. IL-6 水平的比较;C. IL-13 水平的比较。*P<0.05,与对照组比较;#P<0.05,与哮喘组比较。

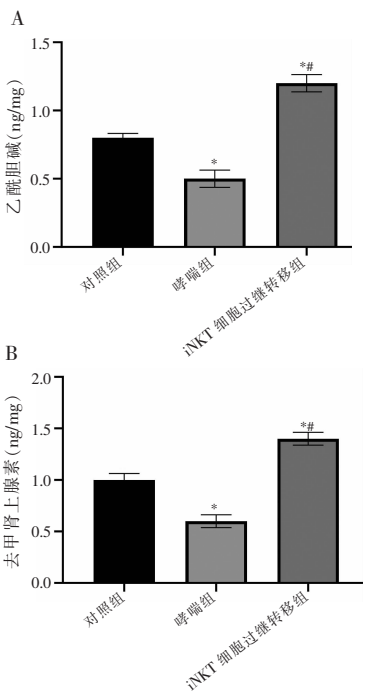


图 6　各组神经递质水平的对比

A. 乙酰胆碱水平的比较;B. 去甲肾上腺素水平的比较。*P<0.05,与对照组比较;#P<0.05,与哮喘组比较。

3　讨论

近年来,免疫系统在哮喘中的核心作用逐渐被揭示,其中 iNKT 细胞作为一种具有免疫调节功能的特殊 T 细胞亚群,受到了广泛关注。iNKT 细胞不仅在哮喘相关的炎症反应中发挥关键作用,还可能通过调节神经元-免疫细胞的相互作用,影响气道的

神经免疫调节[7]。

首先,MTT 结果显示,iNKT 过继转移后,细胞存活率较哮喘组升高,提示转移后的 iNKT 细胞在肺部的存活率增高,iNKT 细胞在肺部有效归巢,可有效参与免疫反应。进一步流式细胞术结果显示,与哮喘组相比,iNKT 细胞转移组中肺部 T 细胞和巨噬细胞的比例显著增加,而 B 细胞比例则明显降低。这表明 iNKT 细胞能够调控免疫细胞的分布,从而可能影响哮喘的病理进程。T 细胞和巨噬细胞的增加可能增强了免疫系统对抗原的识别和清除能力,进而抑制了哮喘相关的过敏性反应[8]。这一发现与已有研究中 iNKT 细胞在调节免疫反应中的角色相一致[9],进一步证实了其在哮喘免疫调节中的重要性。iNKT 细胞是一种介于先天性免疫和适应性免疫之间的免疫细胞,能够快速识别和响应脂质抗原。过继转移的 iNKT 细胞可能通过直接与肺部 T 细胞、巨噬细胞和 B 细胞相互作用,调节这些细胞的活化状态和功能[10]。例如,iNKT 细胞通过分泌细胞因子(如 IFN-γ)来抑制 Th2 型免疫反应,从而减少炎症细胞的浸润和炎症因子的释放。这种免疫调节可能是降低哮喘相关炎症反应的关键。

其次,免疫荧光染色结果显示,iNKT 细胞过继转移组小鼠肺组织中 NeuN 和 ChAT 的表达水平高于哮喘组。这可能暗示着 iNKT 细胞对肺部神经元的活性具有一定的影响。尽管神经系统在哮喘中的作用尚未完全阐明,但已有研究[11]表明,神经系统与免疫系统之间的相互作用可能在哮喘的发病机制中发挥重要作用。本研究结果为这一假设提供了新的证据,提示 iNKT 细胞可能通过调控神经元活动间接影响哮喘的病程。在哮喘中,气道的神经反射和神经元-免疫细胞的相互作用对气道的收缩和炎症反应起到重要作用[12-13]。iNKT 细胞可能通过调控乙酰胆碱、去甲肾上腺素等神经递质的水平,影响气道平滑肌的张力和炎症反应,从而在缓解哮喘症状中发挥作用。

iNKT 细胞能够迅速产生大量的细胞因子,从而在早期免疫反应中发挥调节作用。本研究发现,iNKT 细胞转移显著降低了哮喘小鼠肺部的 TNF-α、IL-6 和 IL-13 水平,这表明 iNKT 细胞可能通过抑制促炎因子的释放,减少气道的炎症损伤。这种机制可能是 iNKT 细胞在哮喘治疗中发挥保护作用的基础。这一结果与流式细胞术分析结果相呼应,进一步支持了 iNKT 细胞在哮喘免疫调节中的潜在治疗作用。但部分研究[14]发现,iNKT 细胞可能加剧哮喘,与本研究结果存在差异,这可能与 iNKT 细胞的分型、制备及转移方式的不同有关,因此可能需要更多的重复实验,对比不同 NKT 细胞亚型(如Ⅰ型 NKT 和Ⅱ型 NKT)的功能,或在不同哮喘模型中测试这些细胞的作用,进而验证其抗炎效果。

此外,在本研究中,iNKT 细胞过继转移显著增加了哮喘小鼠肺组织中乙酰胆碱和去甲肾上腺素的水平。乙酰胆碱是副交感神经系统的主要神经递质,它在哮喘中通过 M3 型胆碱能受体介导气道平滑肌收缩,从而引发气道高反应性[15]。然而,在 iNKT 细胞转移组中,乙酰胆碱水平的升高可能并非单纯引起气道收缩,反而可能通过调节免疫细胞的胆碱能受体,间接调控炎症反应。研究[16]表明,乙酰胆碱能通过 α7 烟碱型胆碱能受体发挥抗炎作用,减少气道中性粒细胞的浸润和炎症因子的释放。另外,去甲肾上腺素水平的升高可能增强了交感神经系统的抑炎作用,抑制了哮喘相关的过度免疫反应。这表明 iNKT 细胞可能通过调节去甲肾上腺素水平,影响神经-免疫网络,从而在哮喘的免疫调节中发挥多层次的作用。

综上,iNKT 细胞过继转移在哮喘模型中能够有效调节免疫细胞的组成和炎症因子水平,并可能通过影响神经元标志物表达间接调控哮喘病程。

参考文献

[1] Miller RL, Grayson MH, Strothman K. Advances in asthma: New understandings of asthma's natural history, risk factors, underlying mechanisms, and clinical management[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2021, 148(6): 1430-1441.

[2] Su Y, Xu J, Zhu Z, *et al*. Brainstem Dbh + neurons control allergen-induced airway hyperreactivity[J]. Nature, 2024, 631(8021): 601-609.

[3] 董学峰,杨亚龙. MiR-204-5p 通过调节 TLR2 的表达减轻哮喘小鼠的炎症反应和气道重塑[J]. 川北医学院学报, 2022, 37(6): 687-691.

[4] Cruz MS, Loureiro JP, Oliveira MJ, *et al*. The iNKT cell-macrophage axis in homeostasis and disease[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(3): 1640.

[5] Li N, Chen J, Xie S, *et al*. Oral antibiotics relieve allergic asthma in post-weaning mice via reducing iNKT cells and function of ADRB2[J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 1024235.

[6] 陈千慧,郭旭雪,邓霓姗,等. iNKT 细胞对哮喘小鼠肺树突状细胞表面分子和促炎性细胞因子表达水平的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(5): 539-544.

[7] Antunes L, Duarte de Souza AP, de Araújo PD, *et al*. iNKT cells are increased in children with severe therapy-resistant asthma[J]. Allergologia et Immunopathologia, 2018, 46(2): 175-180.

(下转第 1603 页)