

爆发性肝炎小鼠中髓系衍生抑制性细胞对 NK 细胞活性影响的研究

王 成, 吴丹青, 刘建华, 夏大静

(浙江大学医学院 免疫学研究所, 浙江 杭州 310058)

[摘要] **目的:**利用爆发性肝炎小鼠模型,研究髓系衍生抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)在爆发性肝炎进展过程中对自然杀伤细胞(nature killer cell, NK cell)的作用及其相关机制,探讨急性爆发性肝炎的发病机制及可能的干预措施。**方法:**通过腹腔注射细菌脂多糖和D-半乳糖胺诱发建立爆发性肝炎模型,流式细胞仪分析爆发性肝炎模型不同时间不同组织中MDSCs和NK细胞的比例变化以及NK细胞活性。**结果:**在模型小鼠中随着肝炎的发展不同组织中的MDSCs的比例增加,肝脏中NK细胞的比例增加,同时,不同组织中NK细胞表达NK细胞活化受体NKG2D的细胞比例增加,NKG2D的平均荧光强度增强。**结论:**小鼠爆发性肝炎模型中MDSCs能促进NK细胞的活化与增殖,初步揭示了在爆发性肝炎机体中MDSCs及NK细胞参与肝脏损伤的作用机制。

[关键词] 肝炎,动物/病理生理学;爆发性肝炎;髓系衍生抑制性细胞;NK细胞;NK活性;NKG2D

[中图分类号] R 575.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2010)04-0357-07

Promoting effect on NK cells induced by myeloid-derived suppressor cells in acute fulminate hepatitis of mice

WANG Cheng, WU Dan-xiao, LIU Jian-hua, XIA Da-jing (*Institute of Immunology, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate the interaction between myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and nature killer cells during acute fulminate hepatitis. **Methods:** Acute fulminate hepatitis were induced by i. p. co-injection of LPS and D-GalN in mice, and the ratio of MDSCs, NK cells and the activation of NK cells in different tissues were analyzed by FACS at 0 h, 1.5 h, 3 h and 6 h. **Results:** The percentage of MDSCs and NKG2D⁺ NK cells in different tissues increased as acute fulminate hepatitis progressed, with the increased NK cells in liver tissue. The mean fluorescence intensity of NKG2D on NK cells in different tissues were also enhanced. **Conclusion:** MDSCs induce the proliferation and activation of NK cells in mice with acute fulminate hepatitis.

收稿日期:2010-05-07 修回日期:2010-06-09

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2007CB512807);浙江省自然科学基金杰出青年团队资助项目(R207443)。

作者简介:王 成(1986-),男,硕士研究生。

通讯作者:夏大静(1968-),女,博士,教授,博士生导师,主要从事肿瘤和分子免疫学研究;E-mail:dxia@zju.edu.cn

[Key words] Hepatitis, animal/physiopathology; Acute fulminate hepatitis; Myeloid-derived suppressor cells; NK cell; NK activity; NKG2D

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2010,39(4):357-363.]

肝脏是机体重要的免疫器官,其含有大量参与天然免疫应答的细胞,其中自然杀伤细胞(nature killer cell, NK cell)的比例可高达30%,NK细胞在机体的固有免疫中发挥了重要的作用。髓系衍生抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)是一群高度异质性的髓系细胞群体,包括髓系祖细胞和未成熟的骨髓细胞,在小鼠中表达 Gr1 和 CD11b^[1],在肿瘤、炎症、感染和自身免疫性疾病等病理状况下具有快速增殖的特性^[2-3]。已有研究表明,肿瘤患者^[6]和荷瘤小鼠^[7]的 MDSCs 能够抑制 NK 细胞的活性,致使疾病不断恶化。本研究利用细菌脂多糖(LPS)和 D-半乳糖胺(D-GalN)诱导爆发性肝炎小鼠模型,通过检测不同时间不同组织中 MDSCs 和 NK 细胞的比例变化以及 NK 细胞的活性变化,探究炎症状况下 MDSCs 与 NK 细胞的作用,探求爆发性肝炎的可能干预手段。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 细菌脂多糖(LPS)(*Escherichia coli*, O26/B6)、D-半乳糖胺(D-GalN)、胶原酶 IV(Collagenase IV)均购自 Aldrich-Sigma 公司。流式细胞仪分析用的不同荧光素标记的抗小鼠单克隆抗体: FITC-anti-Gr1、PE-anti-CD11b、FITC-anti-NKG2D、PE-anti-CD3e、PE-Cy5-anti-NK1.1 和同型对照抗体均购自 eBioscience 公司。Percoll 购自 Pharmacia 公司。LSR 流式细胞仪为 BD 公司的产品。

1.2 实验动物 野生型 C57BL/6(B6, H-2^b)小鼠 55 只,雄性,6~8 周龄,购自中国科学院上海实验动物中心[许可证号:SCXK(沪)2007-0005],饲养于浙江大学医学院动物实验中心 SPF 级,环境温度 25℃,湿度 70%。

1.3 爆发性肝炎小鼠模型 细菌脂多糖(LPS)诱导的爆发性肝炎小鼠模型根据文献报道制备^[8],同时给予小鼠腹腔注射 LPS(5 μg/kg 体重)和 D-GalN(400 mg/kg 体重)。不同时

间点小鼠 8 只/组,每次实验均重复 3 次。

1.4 骨髓^[9]、脾脏、淋巴结和肝脏^[10]细胞悬液的制备 颈椎脱位法处死 C57BL/6 小鼠,用 75% 乙醇浸泡消毒 5 min,无菌条件下分离出股骨、胫骨、脾脏、淋巴结和肝脏,分别置于盛有等渗 PBS 的平皿中,用 1 ml 规格的无菌注射器吸取 PBS 反复冲洗出骨髓,获得骨髓细胞悬液;将脾脏置于平皿的不锈钢滤网(200 目)上,用 1 ml 注射器吸取 PBS 反复冲洗,使得细胞经网进入平皿的 PBS 中,得到脾脏细胞悬液;将淋巴结置于平皿的不锈钢滤网(500 目)上充分研磨,用 PBS 洗涤滤网获得淋巴结细胞悬液。离心,用 Tris-NH₄Cl 破去红细胞,离心,用 PBS 洗涤 2 次,用 RPMI 1640 重悬。肝脏用 PBS 灌注冲洗至灰白色,去除血污、包膜及纤维成分,用眼科剪将肝脏剪成 1 mm³左右的组织块,加入 0.25% 胶原酶 IV 37℃ 孵育 15 min,轻轻研磨组织块,经 200 目滤网过滤去除组织块。Tris-NH₄Cl 破去红细胞,离心,弃去上清,加入 33% Percoll(含肝素钠 100 N/ml),充分混匀;离心,弃去上清,沉淀即为淋巴细胞,用 PBS 洗涤 2 次,用 RPMI 1640 重悬。

1.5 细胞表型分析 收集待测细胞,离心,弃去上清。用 PBS 重悬混匀细胞,加入荧光标记的抗体,室温避光孵育 20~30 min,用 PBS 洗 2 次,流式细胞仪上机分析。

1.6 统计学分析 用 Student's *t* 检验或者 ANOVA 统计学方法分析数据,所得数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 爆发性肝炎小鼠模型小鼠的生存时间 正常 C57BL/6 小鼠腹腔注射 LPS 和 D-GalN 6.5 h 后开始出现死亡,到 10 h 内全部死亡。

图 1 为正常 C57BL/6 小鼠在腹腔注射 LPS 和 D-GalN 后不同时间小鼠的生存率变化,小鼠

在腹腔注射 LPS 和 D-GalN 后 6.5 h 开始出现死亡,7~8 h 小鼠大量死亡,10 h 内全部死亡。

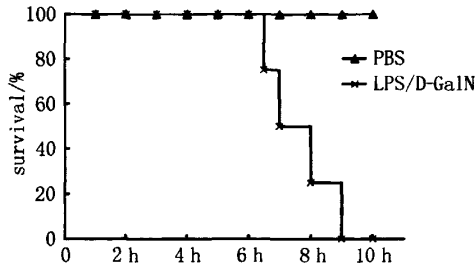
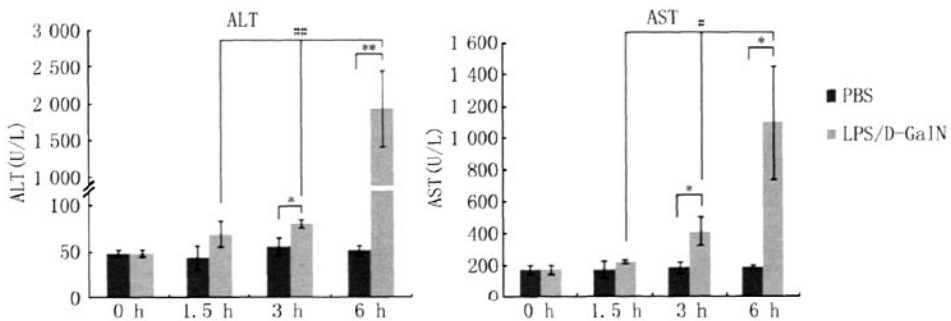


图1 注射 LPS 和 D-GalN 后小鼠的生存率观察
Fig.1 Survival rate after co-injected with LPS and D-GalN



实验组与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;实验组 6h 与 1.5h 和 3h 比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图2 注射 LPS 和 D-GalN 后,小鼠血清谷草转氨酶和谷丙转氨酶含量

Fig.2 Serum ALT and AST levels after co-injected with LPS and D-GalN

2.3 小鼠肝脏病理学检查 根据爆发性肝炎小鼠模型的生存率变化曲线和不同时间点的小鼠血清谷草转氨酶和谷丙转氨酶的含量变化,分别选取未作处理的小鼠肝脏,腹腔注射 PBS 对照的小鼠肝脏,爆发性肝炎模型 1.5、3 和 6 h 的小鼠肝脏进行病理学检查。腹腔注射 PBS 对照组的小鼠肝脏病理切片图与未处理组的肝脏切片相似;注射 LPS 和 D-GalN 1.5h 肝脏病理切片示肝细胞有较多的核分裂,有散在的中性粒细胞浸润;3 h 肝脏病理切片示肝细胞有较多的核分裂,有散在的中性粒细胞浸润,部分区域呈小灶性炎症细胞浸润,有部分肝细胞死亡;6 h 肝脏病理切片示肝细胞有较多的核分裂,有较多的中性粒细胞浸润,局部呈小灶性炎症细胞浸润,其周围有大量肝细胞死亡,肝脏的炎症随着

2.2 小鼠血清谷草转氨酶和谷丙转氨酶的检测

利用小鼠腹腔注射 LPS 和 D-GalN 后的生存率变化曲线,选取 0、1.5、3 和 6 h 时间点,检测爆发性肝炎模型小鼠及 PBS 对照小鼠血清中谷草转氨酶 (AST) 和谷丙转氨酶 (ALT) 的含量。

图 2 为小鼠爆发性肝炎模型 0、1.5、3 和 6 h 的血清 AST 和 ALT 的含量,在小鼠腹腔注射 LPS 和 D-GalN 3 及 6 h 后,血清 AST 和 ALT 含量显著高于 PBS 对照组小鼠血清 AST 和 ALT 含量。同时,小鼠爆发性肝炎模型 6 h 的血清 AST 和 ALT 含量,显著高于该模型 1.5 和 3 h 的血清 AST 和 ALT 含量。结合爆发性肝炎小鼠模型生存时间,说明腹腔注射 LPS 和 D-GalN 后 6 h 为小鼠肝炎爆发的时间。

爆发性肝炎的发展不断加重,如图 3 所示。

2.4 爆发性肝炎模型中 MDSCs 的分布变化

已有研究表明,在病理状况下如肿瘤、炎症、感染和自身免疫性疾病的发生发展过程中,MDSCs 能在骨髓、脾脏、淋巴结、血液及疾病相关组织或器官中大量积累^[23]。为此,我们检测了爆发性肝炎小鼠模型 0、1.5、3 和 6 h 肝脏、脾脏、骨髓和淋巴结中 Gr1⁺CD11b⁺ MDSCs 细胞比例。

图 4 为爆发性肝炎模型肝脏、脾脏、骨髓和淋巴结在 0、1.5、3 和 6 h 的 MDSCs 分布比例变化,图示在不同组织中,随着爆发性肝炎的进行性发展,MDSCs 的比例不断增加,说明 MDSCs 在爆发性肝炎小鼠模型中的不同器官都出现了积累,并且随着肝炎的发展 MDSCs 的积累不断增加。

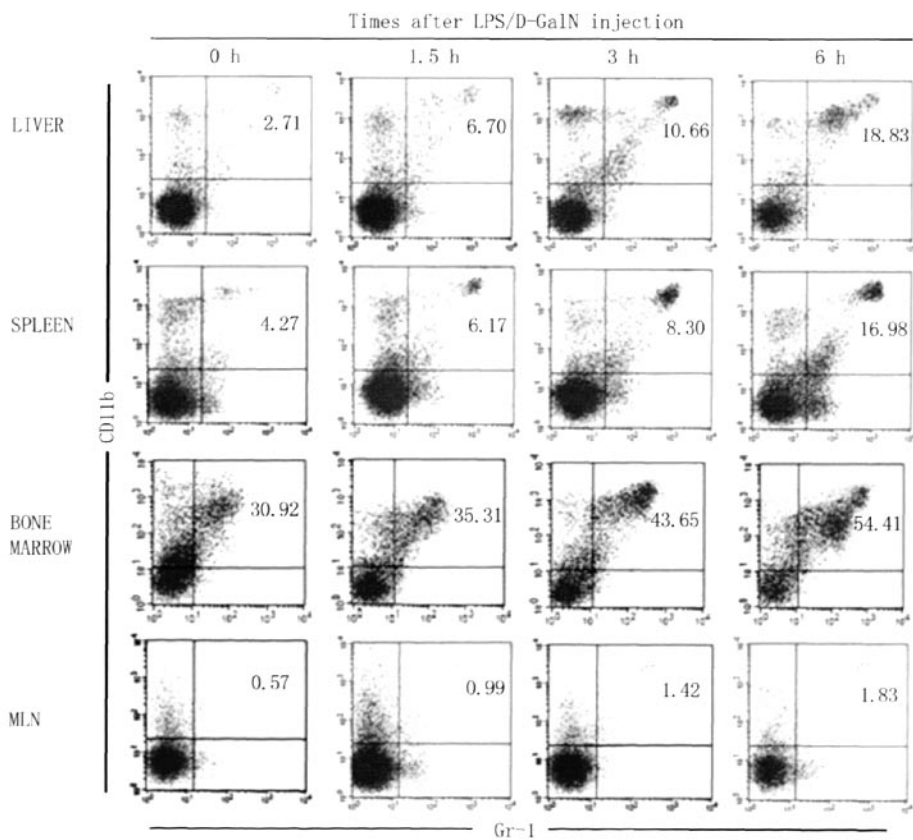
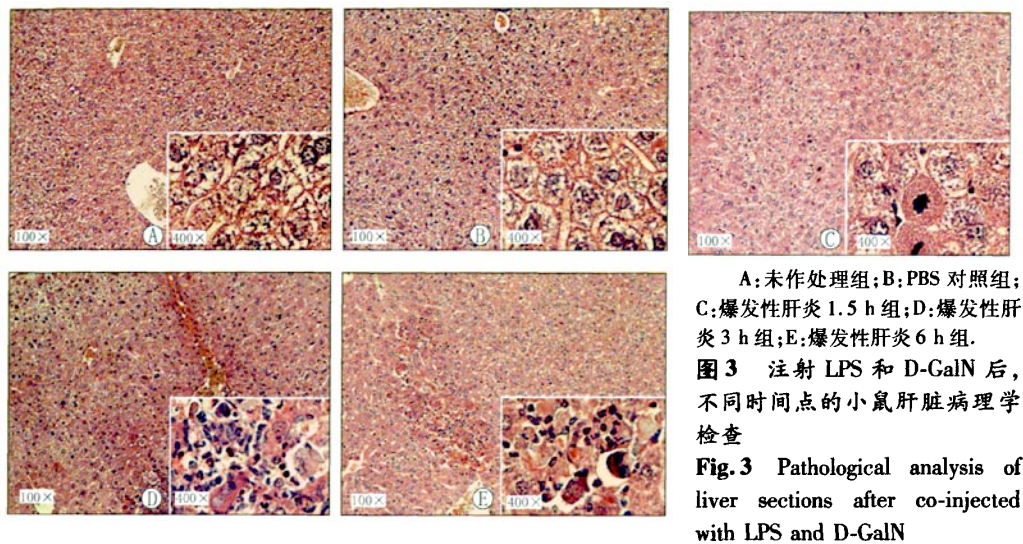


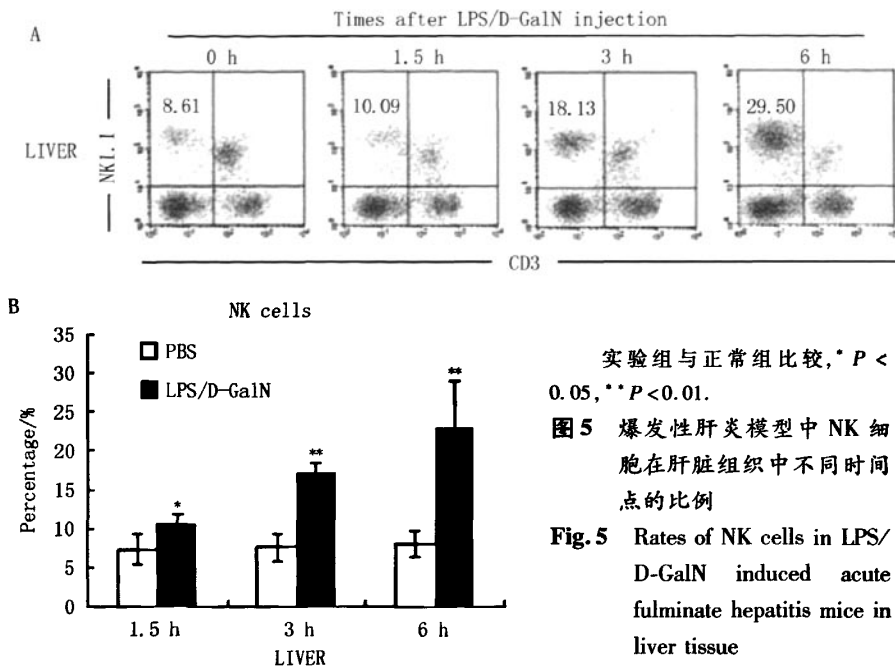
图 4 爆发性肝炎小鼠中 MDSCs 在不同组织、不同时间点的分布

Fig. 4 Dynamic accumulation of the MDSCs in different tissues in LPS/D-GalN induced acute fulminate hepatitis mice

2.5 爆发性肝炎模型中NK细胞在肝脏组织中的分布变化 在 小鼠中NK细胞表达NK1.1,不表达CD3。我们检测了爆发性肝炎模型0、1.5、3和6h肝脏中CD3⁻NK1.1⁺NK细胞比例。

图5为爆发性肝炎模型0、1.5、3和6hNK

细胞比例的变化,A图示随着爆发性肝炎的发展,肝脏中NK细胞的比例不断增加,肝炎进展到6h,NK细胞的比例增加尤为明显;B图为NK细胞在肝脏中比例的直方图统计图。说明肝脏中NK细胞比例随着MDSCs的积累同时升高。



实验组与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$.

图5 爆发性肝炎模型中NK细胞在肝脏组织中不同时间点的比例

Fig.5 Rates of NK cells in LPS/D-GalN induced acute fulminate hepatitis mice in liver tissue

2.6 爆发性肝炎模型中NK细胞的活化状况

鉴于爆发性肝炎模型小鼠肝脏NK细胞比例随着MDSCs的积累同时升高,我们检测了骨髓、脾脏和肝脏中NK细胞表达NK细胞活化受体NKG2D的比例,以及活化受体NKG2D的平均荧光强度。

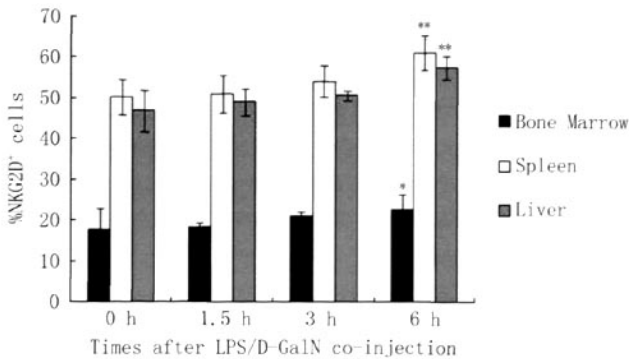
图6为爆发性肝炎小鼠模型0、1.5、3和6h骨髓、脾脏和肝脏中,NK细胞表达活化受体NKG2D的比例。图示骨髓、脾脏和肝脏中NK细胞表达NK细胞活化受体NKG2D的比例,在6h点显著高于正常小鼠的比例。

图7为爆发性肝炎模型0、1.5、3和6h骨髓、脾脏和肝脏中,NK细胞表达活化受体NKG2D平均荧光强度的变化。图示随着爆发性肝炎的发展,不同组织中活化受体NKG2D的平均荧光强度不断增强。说明爆发性肝炎小

鼠模型中NK细胞的活性随着MDSCs的积累也逐渐增强。

3 讨论

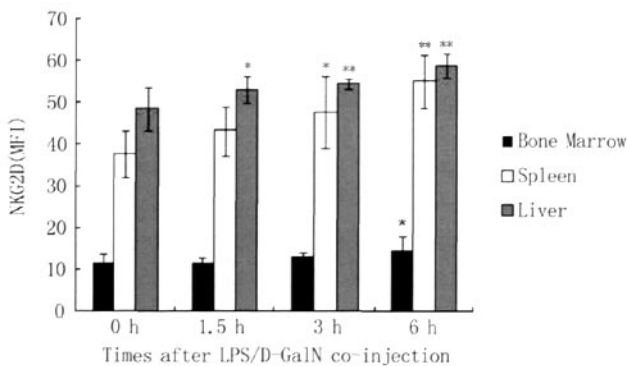
肝脏是机体内较为独特的实体器官,生理状态下,在肝脏内的NK细胞可高达30%,如此高比例的NK细胞在肝内的定居,使得机体能适时激活天然免疫,清除肝内外来的病原微生物,维持肝内稳态。然而当大量外来抗原从肝门静脉进入体内,也可通过免疫调节诱导机体对此类抗原的耐受,此即“门脉耐受”现象。因此,肝脏局部的免疫状态需要非常精细的调节,才能保证在特定的情况下,正确选择启动免疫应答还是诱导免疫耐受^[11]。而爆发性肝炎则是由于机体过度地免疫应答,破坏了这种平衡状态,产生了大量的促炎症细胞因子损伤肝



实验组与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图 6 爆发性肝炎模型中不同组织、不同时间点 NKG2D⁺ NK 细胞的比例

Fig. 6 Ratio of NKG2D⁺ NK cells in different tissues in LPS/D-GalN induced acute fulminate hepatitis mice



实验组与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图 7 爆发性肝炎模型中不同组织、不同时间点 NK 细胞表面的 NKG2D 的平均荧光强度

Fig. 7 Mean fluorescence intensity of NKG2D on NK gated cells in LPS/D-GalN induced acute fulminate hepatitis mice in different tissues

细胞^[12-13],并诱导其凋亡、坏死,最终引起肝脏的衰竭。我们通过腹腔同时注射 LPS 和 D-GalN 的方法来诱导爆发性肝炎,其中 D-GalN 能显著增加小鼠对 LPS 的敏感性,从而引起严重的肝脏炎症甚至死亡^[8]。我们通过检测爆发性肝炎模型小鼠的生存时间,发现小鼠在 6.5 h 开始出现死亡,直至 10 h 全部死亡,选取了 1.5、3 和 6 h 作为实验的检测时间点,检测

了小鼠血清中 ALT 和 AST 的含量,发现血清 ALT 和 AST 水平随着肝炎的进展不断上升,并在 6h 达到峰值,说明我们腹腔注射小鼠 LPS 和 D-GalN 后 6 h 左右肝炎爆发。同时,我们也对爆发性肝炎模型小鼠肝脏进行了病理学检查,发现腹腔注射 PBS 的对照组与未处理组的肝脏切片相似,而爆发性肝炎模型小鼠肝脏切片随着肝炎发展炎症细胞浸润和坏死程度加重,6h 的肝脏组织坏死最为严重。

抑制性细胞亚群作为机体免疫调控的重要负向调控元件,在抗原递呈、细胞因子产生和效应细胞活化等各个环节中有着不可或缺的作用,故而在疾病的免疫治疗研究中备受关注。近几年,小鼠中表型为 Gr1⁺ CD11b⁺ 的 MDSCs 越来越受到广大研究者的重视,并且已有研究发现,MDSCs 能在多种病理状态中出现积累^[2-5],在外周免疫器官中的 MDSCs 数量及功能的异常参与了肿瘤、感染等疾病的发生发展。我们的研究中选取了不同时间点检测爆发性肝炎模型小鼠肝脏、脾脏、骨髓和淋巴结中 Gr1⁺ CD11b⁺ MDSCs 比例变化,发现不同脏器中 MDSCs 都随着肝炎的发展不断出现积累,与其他相关文献^[2-3,7]的报道一致。

已有研究报道,荷瘤小鼠的 MDSCs 能抑制 NK 细胞的活性,降低 NK 细胞活化受体 NKG2D 的表

达^[7],通过抑制天然免疫来促进肿瘤的发生发展。为此,我们检测了爆发性肝炎模型小鼠不同时间点肝脏中 CD3⁻ NK1.1⁺ NK 细胞比例的变化,发现肝脏中 NK 细胞的比例随着炎症的发展不断升高,进而我们又检测了爆发性肝炎小鼠模型不同时间骨髓、脾脏和肝脏中 NK 细胞表达活化受体 NKG2D 的比例,以及 NK 细胞的 NKG2D 平均荧光强度。我们发现在骨髓、

脾脏和肝脏中,NK细胞表达活化受体 NKG2D 的比例以及 NKG2D 的平均荧光强度都显著升高了。这与荷瘤小鼠中NK细胞活性随着MDSCs 积累减弱相反,炎症状态下,肝脏中NK细胞的比例随着MDSCs 的积累增加,NK细胞活性随着MDSCs 的积累增强。肝炎发展过程中MDSCs 的作用表现为促进NK细胞的增殖与活化,MDSCs 的积累无法根本性阻止肝炎的爆发。这些发现,对于研究天然免疫细胞如NK细胞和调节性细胞如MDSCs 在肝脏损伤过程中的机制,有一定的提示作用。

References:

- [1] KUSMARTSEV S, NEFEDOVA Y, YODER D, et al. Antigen-specific inhibition of CD8⁺ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species [J]. *J Immunol*, 2004, 172(7): 989 - 999.
- [2] GABRILOVICH D I, NAGARAJ S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system [J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(3): 162-174.
- [3] EZERNITCHI A V, VAKNIN I, COHEN-DANIEL L, et al. TCR ξ down-regulation under chronic inflammation is mediated by myeloid suppressor cells differentially distributed between various lymphatic organs [J]. *J Immunol*, 2006, 177(7): 4763-4772.
- [4] YOUN J I, NAGARAJ S, COLLAZO M, et al. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice [J]. *J Immunol*, 2008, 181(8): 5791-5802.
- [5] BRONTE V, ZANOVELLO P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(8): 641-654.
- [6] HOECHST B, VOICTLAENDER T, ORMANDY L, et al. Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the Nkp30 receptor [J]. *Hepatology*, 2009, 50(3): 799-807.
- [7] LI He-quan, HAN Yan-mei, GUO Qiu-li, et al. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF- β 1 [J]. *J Immunol*, 2009, 182(1): 240-249.
- [8] JIANG W, SUN R, WEI H, et al. Toll-like receptor 3 ligand attenuates LPS-induced liver injury by down-regulation of toll-like receptor 4 expression on macrophages [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(47): 17077-17082.
- [9] MAEDA Y, MATSUYUKI H, SHIMANO K, et al. Migration of CD4⁺ T cells and dendritic cells toward sphingosine 1-phosphate (S1P) is mediated by different receptor subtypes; S1P regulates the functions of murine mature dendritic cells via S1P receptor type 3 [J]. *J Immunol*, 2007, 178(6): 3437-3446.
- [10] NAKASHIMA H, KINOSHITA M, NAKASHIMA M, et al. Superoxide produced by kupffer cells is an essential effector in concanavalin A-induced hepatitis in mice [J]. *Hepatology*, 2008, 48(6): 1979-1988.
- [11] CRISPE I N. The liver as a lymphoid organ [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 147-163.
- [12] DONG Z, WEI H, SUN R, et al. Involvement of natural killer cells in Poly I:C-induced liver injury [J]. *J Hepatol*, 2004, 41(6): 966-973.
- [13] HOEBE K H, WITKAMP R F, FINK-GREMMELS J, et al. Direct cell-to-cell contact between kupffer cells and hepatocytes augments endotoxin-induced hepatic injury [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, 280(4): 720-728.

[责任编辑 张荣连]