DOI:10.16016/j.2097-0927.202110039

高盐饮食抑制小鼠 NK 细胞成熟和杀伤功能的研究

陶洪云,童师雯,殷文伟 400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院感染科,病毒性肝炎研究所

[摘要] **目的** 探究高盐饮食对小鼠自然杀伤(natural killer,NK)细胞成熟和功能的影响。**方法** 3~4 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠(体质量约 9 g)分为正常盐饮食(normal-salt diet,NSD)组(给予普通饲料及高压灭菌水喂养)和高盐饮食(high-salt diet,HSD)组(给予含 4% NaCl 高盐饲料及含 1% NaCl 高压灭菌水喂养)。采用 CD27 和 CD11b 的表达界定 NK 细胞成熟亚群,CD69 标记细胞的早期活化,流式细胞术分析两组小鼠 NK 细胞亚群分布和活化水平;采用 polyI:C 体内处理 18 h 和体外佛波酯/离子霉素刺激 4 h,流式细胞术检测两组小鼠 NK 细胞 IFN-γ 产生水平;通过 YAC-1 体内杀伤实验,流式细胞术评估两组小鼠 NK 细胞的细胞毒作用。**结果** 高盐饮食不影响肝脏、脾脏、骨髓和外周血 NK 细胞比例,但抑制肝脏、脾脏 NK 细胞 CD69 表达($P<0.01$)。高盐饮食组小鼠较正常盐饮食组小鼠肝、脾、骨髓中未成熟的 NK 细胞($CD27^+CD11b^-$)比例增加($P<0.05$),而成熟的 M1 NK 细胞亚群($CD27^+CD11b^+$)比例降低($P<0.05$),$DX5^+NK1.1^+$成熟 NK 细胞比例也降低($P<0.05$),表明高盐饮食抑制 NK 细胞成熟。高盐饮食组小鼠 NK 细胞 IFN-γ 的表达低于正常盐饮食组小鼠($P<0.01$),提示高盐饮食抑制 NK 细胞功能。体内杀伤实验表明,高盐饮食组小鼠腹腔剩余 YAC-1 细胞百分比和绝对数升高($P<0.01$),提示高盐饮食抑制 NK 细胞的细胞毒作用。**结论** 高盐饮食抑制 NK 细胞成熟,抑制 NK 细胞的活化和功能。

[关键词] 高盐饮食;NK 细胞;CD27;CD11b;IFN-γ;YAC-1 细胞

[中图法分类号] R151.1; R392.12 [文献标志码] A

High-salt diet inhibits maturation and killing function of NK cells in mice

TAO Hongyun, TONG Shiwen, YIN Wenwei Department of Infectious Diseases, Institute of Viral Hepatitis, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of high-salt diet on the maturation and function of NK cells. **Methods** Mouse models of normal salt diet (NSD) and high salt diet (HSD) were established by feeding food and drinking water with different salt content. The expression of CD27 and CD11b was used to define the NK cell maturation subsets, and the early activation of cells was labeled by CD69. Flow cytometry was employed to analyze the distribution of NK cell subsets and activation in NSD and HSD mice. The IFN-γ production level of NK cells from mice treated with polyI:C for 18 h *in vivo* and stimulated with PMA/Ionomycin for 4 h *in vitro* was detected by flow cytometry. Cytotoxic activity of NK cells was determined through the YAC-1 killing experiment *in vivo*. **Results** HSD showed no effect on the percentage of NK cells in the liver, spleen, bone marrow and peripheral blood, but inhibited the expression of CD69 in liver and spleen NK cells ($P<0.01$). The percentage of immature NK cells ($CD27^+CD11b^-$) subsets was significantly higher in the liver, spleen and bone marrow from HSD mice when compared to those in NSD mice ($P<0.05$), while the percentage of mature M1 NK cell subsets ($CD27^+CD11b^+$) as well as $DX5^+NK1.1^+$ mature NK cells were markedly lower in HSD mice ($P<0.05$), suggesting that HSD inhibits the maturation of NK cells. The

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81770570);重庆市渝中区基础研究与前沿探索项目(030)

[通信作者] 殷文伟,E-mail:yww@cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

expression of IFN-γ in NK cells of HSD mice was lower than that of NSD mice ($P<0.01$), indicating that HSD inhibited NK cell function. Moreover, YAC-1 *in vivo* killing experiment showed that the percentage and absolute number of residual YAC-1 cells in the abdominal cavity of HSD mice were higher than those of NSD mice ($P<0.01$), indicating that HSD inhibited the cytotoxicity of NK cells. **Conclusion** HSD inhibits the maturation of NK cells as well as the activation and function of NK cells.

[**Key words**] high-salt diet; NK cells; CD27; CD11b; IFN-γ; YAC-1 cells

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81770570) and the Basic Research and Frontier Exploration Project of Yuzhong District, Chongqing(030). Corresponding author: YIN Wenwei, E-mail: yww@cqmu.edu.cn

盐(NaCl)是维持人体生理功能和健康必不可少的物质之一。世界卫生组织推荐平均盐摄入量应<5 g/d[1],研究表明世界各地大多数人的盐摄入量明显超过日常生理需要量。过量的盐摄入会引发一系列的疾病,如高血压、心血管疾病、中风、痴呆、脂肪肝、慢性肾脏病、肿瘤等,严重危害人体健康[2-3]。

近年来越来越多的证据表明高盐饮食(high-salt diet, HSD)会影响机体免疫细胞的分化与功能,比如诱导致病性 Th17 细胞产生多种促炎因子加重中枢神经系统的自身免疫[4];还可诱导人 Naïve T 细胞向 Th2 细胞分化,增强 Th2 细胞的效应功能,与特应性皮炎的发病机制相关[5]。除 T 细胞之外,高盐饮食还被报道对其他免疫细胞产生影响,如中性粒细胞吞噬和杀灭大肠杆菌的能力在高盐环境中受到抑制[6]。此外,高盐负荷可诱导巨噬细胞向促炎型转变,促进炎症发生[7-8]。还可促进树突状细胞的免疫激活,加重系统性红斑狼疮[9]。

自然杀伤(natural killer,NK)细胞是天然免疫系统的重要组成部分,与 T、B 淋巴细胞不同,它们能够在没有抗原预先刺激的情况下对靶细胞做出快速反应,在病毒感染的早期控制、肿瘤的免疫监视、识别和清除等方面发挥关键性的作用[10-11]。NK 细胞的成熟主要指其获得细胞因子分泌能力及对靶细胞杀伤功能的成熟,且其表面标志物随之发生变化。以 CD27 和 CD11b 两个分子的不同表达可以把 NK 细胞划分为 4 个亚群:$CD27^-CD11b^-$、$CD27^+CD11b^-$(未成熟型)、$CD27^+CD11b^+$(成熟 M1 NK)、$CD27^-CD11b^+$(成熟 M2 NK),并按照 $CD27^-CD11b^-$、$CD27^+CD11b^-$、$CD27^+CD11b^+$、$CD27^-CD11b^+$顺序成熟,在此过程中,NK 细胞逐渐终末成熟,也逐渐获得其效应功能[12]。

据目前报道的资料,高盐饮食影响多种免疫细胞的分化和功能发挥,其中包括 T 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞等免疫细胞。NK 细胞作为天然免疫系统不可或缺的重要成员,对维持机体健康的免疫状态至关重要。而高盐饮食是否会影响 NK 细胞的成熟与功能,目前尚不清楚。因此本研究拟通过饮食干预构建正常盐饮食和高盐饮食小鼠模型,采用流式细胞术检测两组小鼠 NK 细胞亚群变化、NK 细胞活化和 NK 细胞 IFN-γ 表达水平,并通过 YAC-1 体内杀伤实验比较两组小鼠 NK 细胞的细胞毒作用,初步探讨高盐饮食是否影响 NK 细胞的成熟与功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及饲料 3~4 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠,体质量约 9 g,购自重庆医科大学实验动物中心[实验动物使用许可证号:SYXK(渝) 2018-0003],饲养于重庆医科大学实验动物中心无特定病原体(SPF 级),光照、黑暗为 12 h/12 h 循环的恒温恒湿环境。实验动物伦理由重庆医科大学附属第二医院审批(科伦审第(2018)108 号)。高盐饲料(4% NaCl)和普通饲料(0.45% NaCl)购自江苏省协同医药生物工程有限责任公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 小鼠流式抗体 APC-anti-CD3、PE-anti-NK1.1、PE-CY7-anti-CD27、FITC-anti-CD11b、Percp-Cy5.5-anti-DX5、Percp-Cy5.5-anti-CD3、APC-anti-CD4、PE-CY7-anti-CD8、FITC-anti-CD19、PE-anti-CD69、PE-anti-IFN-γ 购自美国 BD、eBioscience 或者 BioLgend 公司。聚肌胞苷酸(polyI:C)购自美国 InvivoGen 公司。佛波酯/离子霉素混合物购自中国联科生物公司。莫能霉素购自美国 BioLgend 公司。CFSE 购自美国 BD 公司。YAC-1 细胞(源自 Mo-MuLV 诱导的 A/Sn 小鼠淋巴瘤,对 NK 细胞的作用敏感)由安徽医科大学药学院王学富教授馈赠。CytoFLEX 流式细胞仪购自美国 beckman 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立 C57BL/6J 小鼠分为正常盐饮食(normal-salt diet, NSD)组和高盐饮食(high-salt

diet,HSD)组,每组各 15 只用于体质量测量,后续流式实验每组各 4~5 只。高盐饮食组小鼠给予含 4% NaCl 高盐饲料及含 1% NaCl 高压灭菌水喂养,正常盐饮食组小鼠给予普通饲料及高压灭菌水喂养。所有动物自由摄食和饮水,喂养 6 周。

1.2.2 单个核细胞分离

1.2.2.1 肝脏单个核细胞分离 取肝脏过 200 目不锈钢网 50×*g* 离心 5 min,取上清液 750×*g* 离心 10 min,沉淀以 40% Percoll 重悬后叠加于 70% Percoll 之上,室温 1 260×*g* 离心 20 min。两层 Percoll 间的白细胞层即为肝脏单个核细胞。

1.2.2.2 脾脏单个核细胞分离 载玻片磨砂面研磨脾脏过 200 目膜,450×*g* 离心 10 min,沉淀用红细胞裂解液充分裂解,PBS 洗涤后即得脾脏单个核细胞。

1.2.2.3 骨髓单个核细胞分离 注射器抽取 PBS 从小鼠股骨和胫骨两端对骨髓腔进行反复吹洗分离骨髓,细胞悬液过 200 目膜,450×*g* 离心 5 min,弃上清,红细胞裂解液充分裂解去除红细胞,PBS 洗涤后即得骨髓单个核细胞。

1.2.2.4 血液单个核细胞分离 抗凝外周血以红细胞裂解液充分裂解去除红细胞,PBS 洗涤后即得血液单个核细胞。

1.2.3 细胞表面标志物染色 从不同组织制备的单细胞悬液首先与大鼠血清 4 ℃孵育 10 min 以阻断非特异性抗体结合,然后加入混合流式抗体,4℃避光孵育 30 min。

1.2.4 细胞内 IFN-γ 染色 100 μg polyI:C 小鼠尾静脉注射体内刺激 18 h 预活化 NK 细胞,18 h 后分离肝脏单个核细胞,体外佛波酯/离子霉素刺激 4 h,首先对细胞表面标志物进行染色,固定破膜后进行胞内 IFN-γ 的染色。

1.2.5 YAC-1 细胞培养及体内杀伤实验 YAC-1 细胞用含 10%胎牛血清、1%青-链霉素的 1640 培养基在 37 ℃、5% CO_2 的条件下培养,细胞密度达到 90%时用于后续实验。YAC-1 单细胞悬液用 PBS 洗涤两次以去除血清,与 CFSE(2 μmol/L 的终浓度)室温避光染色 10 min 后 1640 完全培养基清洗 3 次,腹腔注射 2×10^6 个细胞至高盐饮食小鼠和正常盐饮食小鼠体内。注射后 24 h 取腹腔细胞进行细胞计数及流式细胞仪检测。

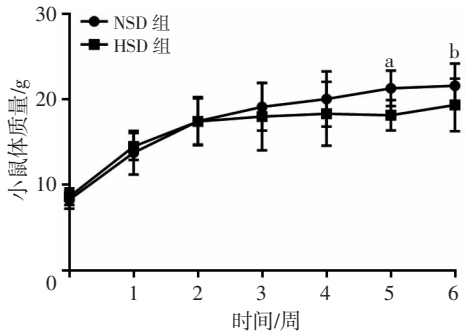
1.3 统计学分析

采用 FlowJo V10 进行流式数据分析、SPSS 25.0 统计软件进行数据统计、GraphPad Prism 6.01 进行作图。数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 Student's *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 高盐饮食后小鼠体质量轻微降低

前 2 周 2 组小鼠体质量无明显差异。从第 3 周开始,高盐饮食组小鼠体质量比对照鼠略低;第 5 周 2 组小鼠体质量差异有统计学意义($P<0.001$),第 6 周时高盐饮食组小鼠体质量虽稍有上升,但是仍低于正常盐饮食组小鼠($P<0.05$,图 1)。



a:$P<0.001$;b:$P<0.05$,与 NSD 组比较

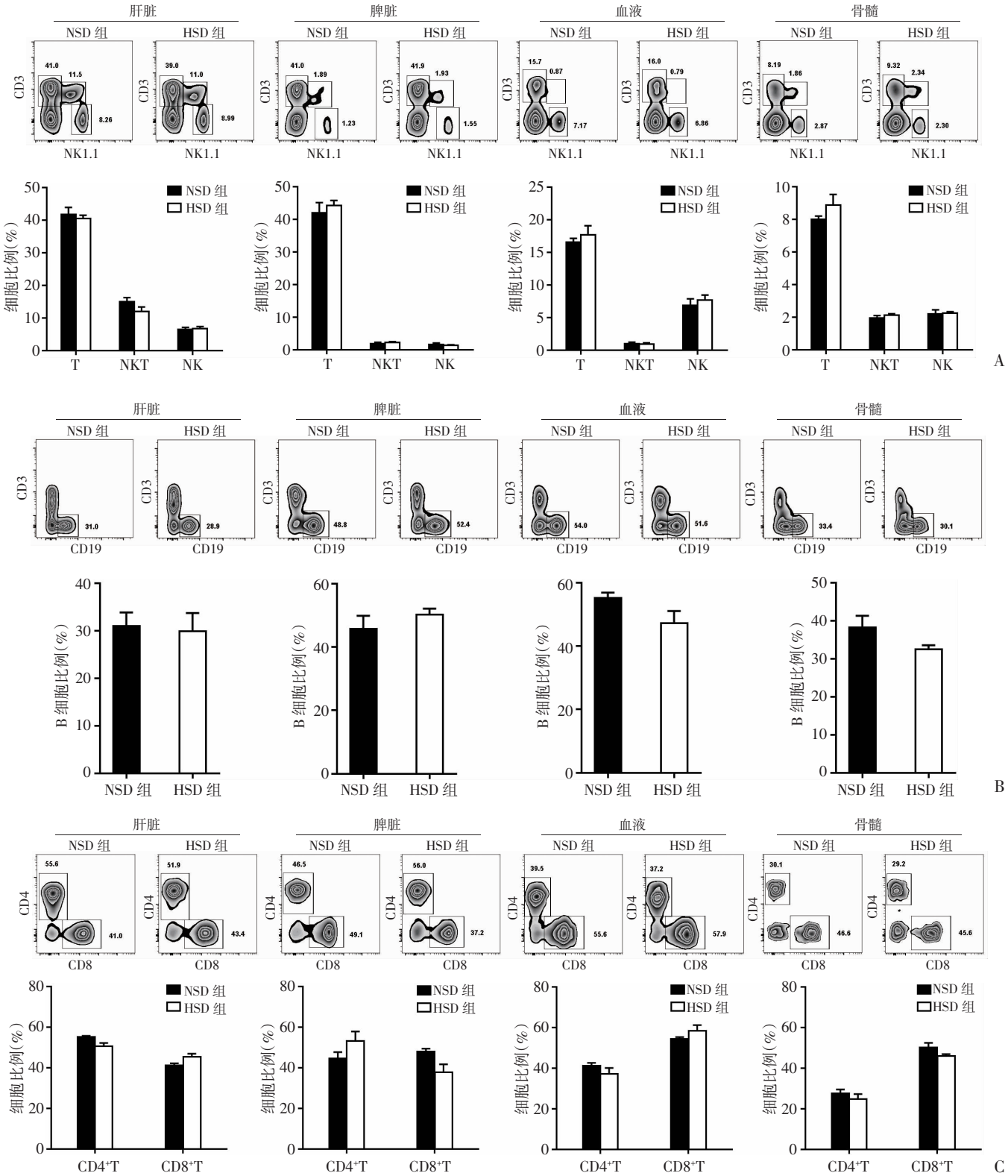
图 1 正常盐饮食和高盐饮食 6 周小鼠体质量定量分析($n=15,\bar{x}\pm s$)

2.2 高盐饮食不影响肝、脾、血液、骨髓中 T、B、NKT、NK 细胞比例

与正常盐饮食组小鼠相比:高盐饮食组小鼠肝脏、脾脏、骨髓、血液中总 T($CD3^+NK1.1^-$)细胞、NK($CD3^-NK1.1^+$)细胞、NKT($CD3^+NK1.1^+$)细胞和 B($CD3^-CD19^+$)细胞的比例未发生明显变化(图 2A、B);$CD4^+$ T($CD3^+CD4^+NK1.1^-$)细胞、$CD8^+$ T($CD3^+CD8^+NK1.1^-$)细胞在 2 组小鼠肝脏、脾脏、骨髓和外周血中比例也相当(图 2C)。以上数据表明高盐饮食不影响各器官常见淋巴细胞百分比。

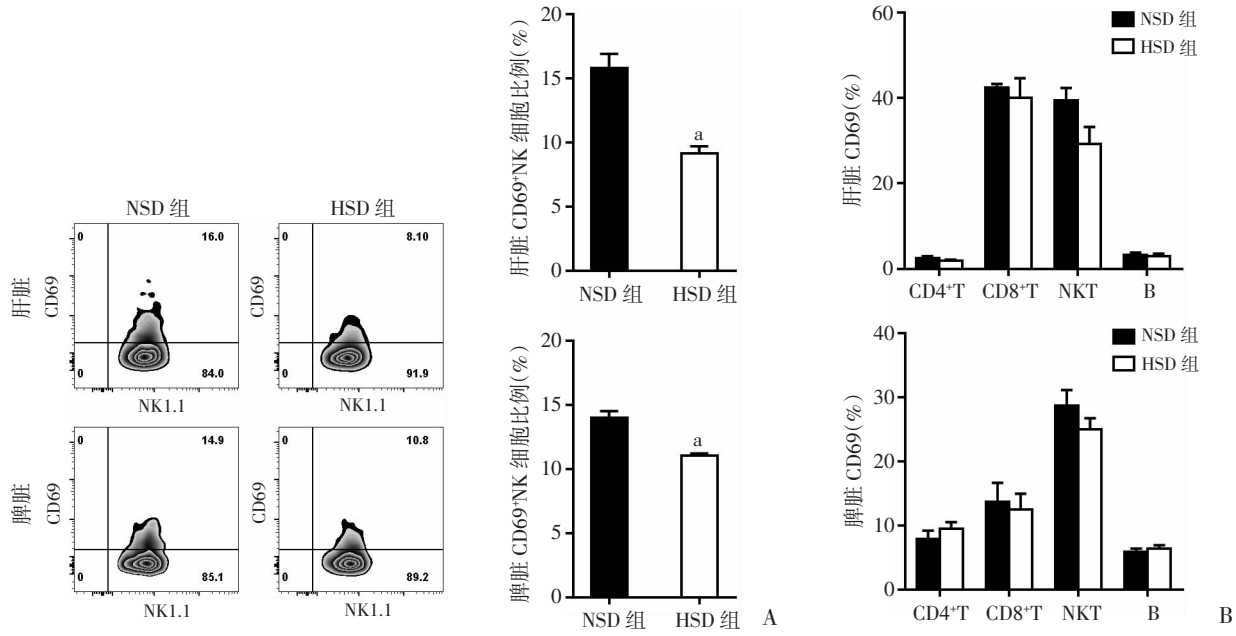
2.3 高盐饮食不影响肝、脾中 T、B、NKT 细胞活化,但抑制 NK 细胞活化

研究以 CD69 作为细胞早期活化的标志,用流式细胞术检测肝脏、脾脏中 $CD4^+$ T 细胞、$CD8^+$ T 细胞、B 细胞、NK 细胞、NKT 细胞的活化情况。结果显示高盐饮食组小鼠肝脏中 $CD69^+$ NK 细胞的比例显著低于正常盐饮食组小鼠($P<0.01$);脾脏中 $CD69^+$ NK 细胞的比例也显著低于正常盐饮食组小鼠($P<0.01$,图 3A)。然而 2 组小鼠肝脏和脾脏中 $CD4^+$ T 细胞、$CD8^+$ T 细胞、B 细胞、NKT 细胞 CD69 的表达差异无统计学意义(图 3B)。表明高盐饮食抑制 NK 细胞 CD69 的表达,NK 细胞的活化受到抑制,可能导致 NK 细胞功能受损。



A:流式细胞仪检测小鼠各器官 T、NKT、NK 细胞在淋巴细胞中的比例及分析;B:流式细胞仪检测小鼠各器官 B 细胞在淋巴细胞中的比例及分析;C:流式细胞仪检测小鼠各器官 $CD4^+$ T、$CD8^+$ T 细胞在 T 细胞中的比例及分析(门控 $CD3^+NK1.1^-$ 细胞)

图 2 正常盐饮食和高盐饮食小鼠肝、脾、血液、骨髓淋巴细胞比例分析($n=5$,$\bar{x}\pm s$)



A:流式细胞仪检测小鼠肝、脾 $CD69^+$ NK 细胞在 NK 细胞中的比例及分析 a:$P<0.01$,与 NSD 组比较;B:小鼠肝、脾 $CD4^+$ T、$CD8^+$ T、NKT、B 细胞活化分析

图 3 正常盐饮食和高盐饮食小鼠肝、脾淋巴细胞活化分析($n=4$,$\bar{x}\pm s$)

2.4 高盐饮食抑制 NK 细胞成熟

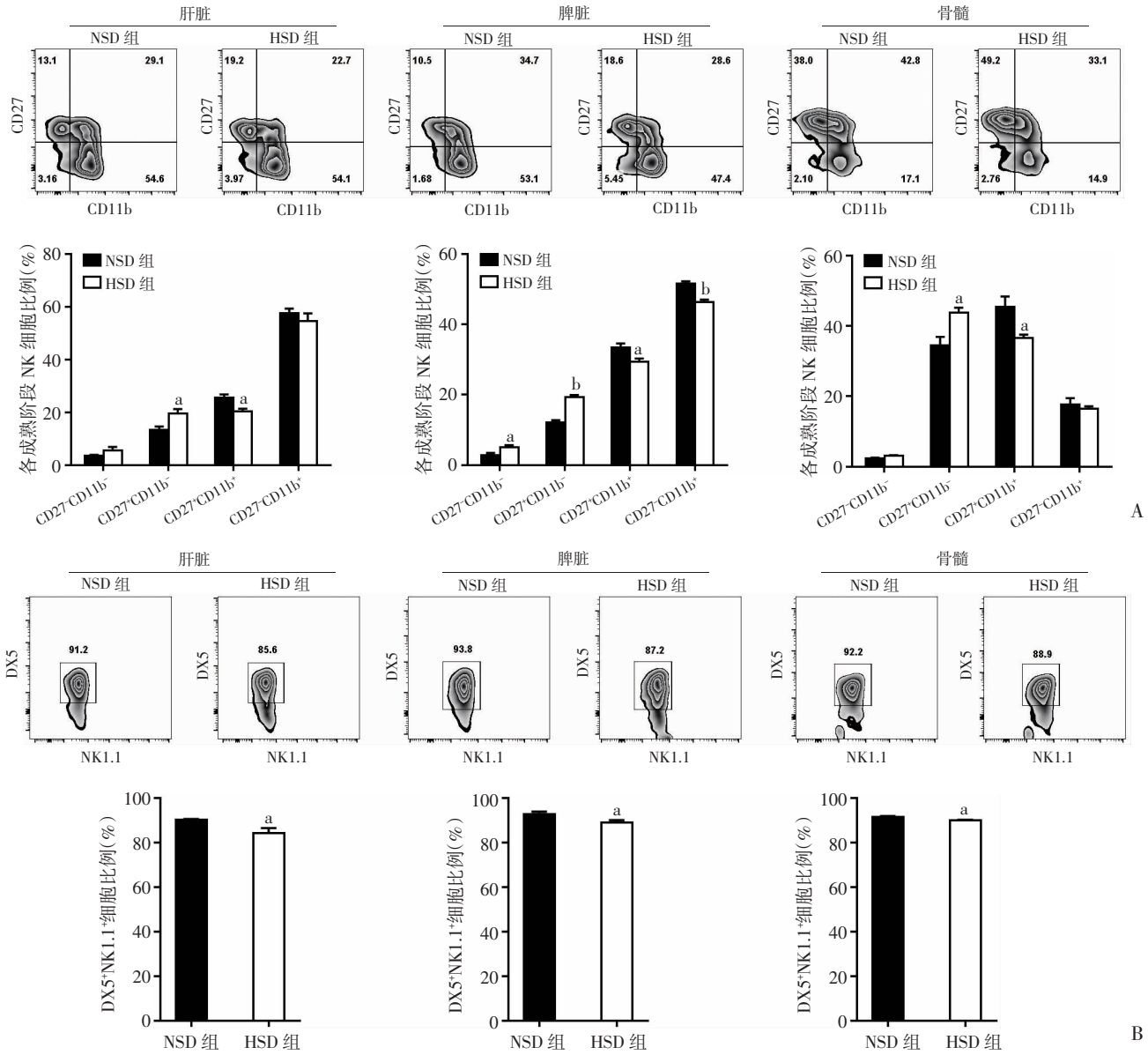
对 2 组小鼠肝脏、脾脏、骨髓中不同发育阶段的 NK 细胞检测结果显示:与正常盐饮食组小鼠相比较,高盐饮食组小鼠脾脏中未成熟的 NK 细胞($CD27^+CD11b^-$)比例增加($P<0.01$),而成熟的 M1 NK 细胞亚群($CD27^+CD11b^+$)和 M2 NK 细胞亚群($CD27^-CD11b^+$)的比例却显著降低($P<0.05$,$P<0.01$,图 4A),提示高盐饮食抑制了脾脏 NK 细胞的成熟。与脾脏相一致的是,在高盐饮食组小鼠的肝脏和骨髓中,未成熟的 NK 细胞($CD27^+CD11b^-$)比例增加($P<0.05$),成熟的 M1 NK 细胞亚群($CD27^+CD11b^+$)的比例显著降低($P<0.05$,图 4A),表明高盐饮食在肝脏和骨髓中同样抑制了 NK 细胞成熟。为了进一步证实这一假设,我们使用 $DX5^+NK1.1^+$来标记成熟 NK 细胞。同样的,在高盐饮食组小鼠的肝脏、脾脏、骨髓中成熟($CD3^-DX5^+NK1.1^+$)NK 细胞的比例显著降低($P<0.05$,图 4B)。以上这些数据显示高盐饮食抑制小鼠 NK 细胞成熟。

2.5 高盐饮食降低 NK 细胞 IFN-γ 表达

研究使用 100 μg polyI:C 尾静脉注射入小鼠体内预活化 NK 细胞,18 h 后分离肝脏单个核细胞,体外佛波酯/离子霉素刺激 4 h,流式细胞术检测 NK 细胞 IFN-γ 的表达。如图 5 所示,高盐饮食组小鼠显示出比正常盐饮食组小鼠更低的 $IFN\text{-}\gamma^+$ NK 细胞百分比($P<0.01$),提示高盐饮食抑制 NK 细胞产生细胞因子,抑制了 NK 细胞功能。

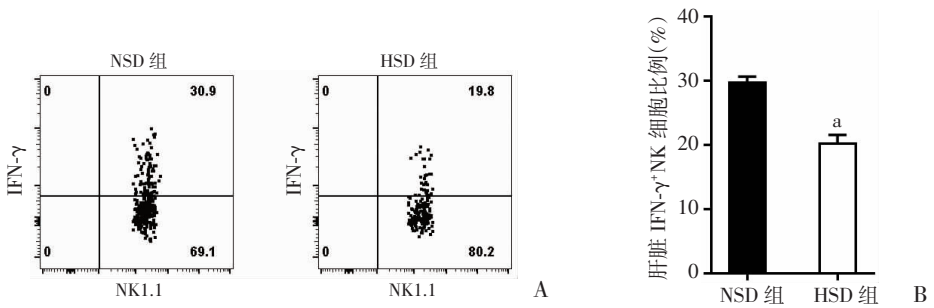
2.6 高盐饮食抑制 NK 细胞杀伤活性

本研究将 2×10^6 个 CFSE 标记的 YAC-1 细胞分别注射入 2 组小鼠腹腔,24 h 后取腹腔细胞进行流式细胞术检测和细胞绝对计数。如图 6A 所示,注射之前 YAC-1 细胞占比 90%以上;注射 24 h 后,较之正常盐饮食组,高盐饮食组小鼠腹腔中剩余 YAC-1 细胞百分比显著增高($P<0.01$,图 6B),YAC-1 细胞的绝对数也显著升高($P<0.01$,图 6C),表明高盐饮食限制了 NK 细胞的细胞毒作用,高盐饮食后 NK 细胞杀伤 YAC-1 肿瘤细胞的能力不足,细胞毒作用受到抑制。



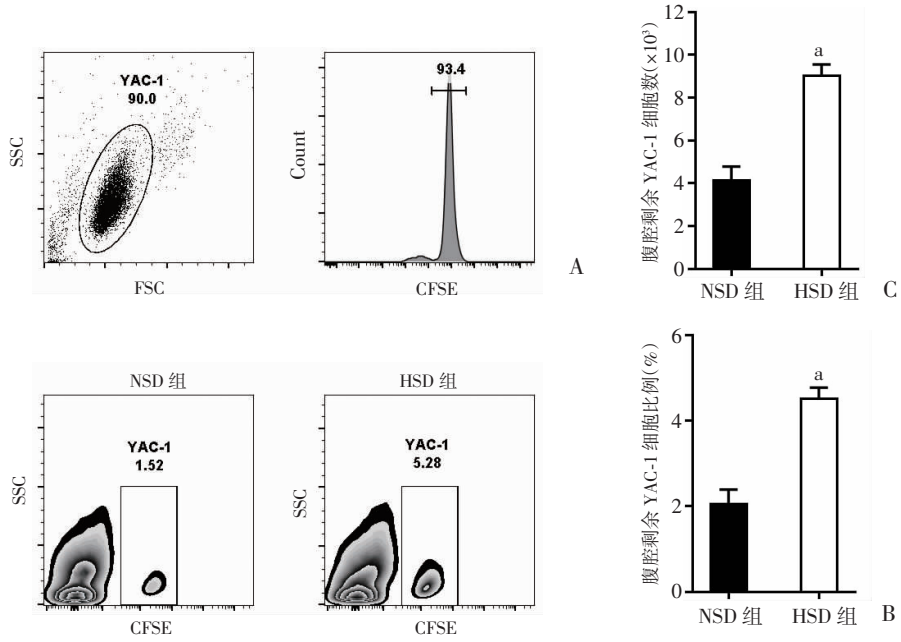
A:流式细胞仪检测 2 组小鼠肝、脾、骨髓 NK 细胞亚群比例及分析　a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 NSD 组比较;B:流式细胞仪检测 2 组小鼠肝、脾、骨髓 $DX5^+NK1.1^+$细胞在 NK 细胞中的比例及分析　a:$P<0.05$,与 NSD 组比较

图 4　正常盐饮食和高盐饮食小鼠肝、脾、骨髓 NK 细胞亚群比例分析($n=5$,$\bar{x}\pm s$)



A:流式细胞仪检测 2 组小鼠肝脏 IFN-γ^+ NK 细胞在 NK 细胞中的比例;B:2 组小鼠肝脏 IFN-γ^+ NK 细胞比例分析　a:$P<0.01$,与 NSD 组比较

图 5　正常盐饮食和高盐饮食小鼠肝脏 IFN-γ^+ NK 细胞比例分析($n=4$,$\bar{x}\pm s$)



A:腹腔注射前 YAC-1 细胞比例;B:流式细胞仪检测 2 组小鼠腹腔剩余 YAC-1 细胞在腹腔细胞中的比例及分析;C:2 组小鼠腹腔剩余 YAC-1 细胞绝对数分析 a:$P<0.01$,与 NSD 组比较

图 6 正常盐饮食和高盐饮食小鼠 YAC-1 细胞杀伤实验($n=4,\bar{x}\pm s$)

3 讨论

许多研究证实高盐摄入危害人体健康。膳食中的盐摄入过多增加心脑血管疾病的发病风险[13-14],对高血压前期患者进行低钠饮食干预可显著降低心血管事件的累计发生率和死亡率[14]。同样,高盐负荷下炎症性肠病、系统性红斑狼疮的发病风险增加[9, 15]。与血清中的钠离子浓度相对恒定并维持在 140 mmol/L 左右不同,在间质和淋巴组织中钠离子浓度可能达到 160~250 mmol/L[16-17],暴露于该条件下的先天免疫细胞和获得性免疫细胞可以感知间质中的高渗钠,从而影响它们的分化和功能。多项研究表明高盐调节获得性免疫细胞的免疫反应。例如致病性 Th17 细胞在高盐环境下被激活产生多种促炎因子[4],高皮肤钠浓度促进 Th2 细胞的分化和功能[5]。天然免疫细胞同样受到高渗钠的调节,高盐在皮肤中激活巨噬细胞,增强了巨噬细胞的抗菌能力[18]。NK 细胞是天然免疫系统必不可少的重要成员,对维持机体的免疫稳态至关重要,高盐饮食是否影响 NK 细胞的成熟和功能尚不清楚。

在本研究中,我们发现高盐饮食抑制 NK 细胞成熟,并抑制 NK 细胞功能。具体表现为与正常盐饮食组小鼠相比,高盐饮食组小鼠肝脏、脾脏、骨髓中未成熟 NK 细胞亚群比例增加,成熟 M1NK 细胞亚群比例降低。同样属于成熟阶段的 NK 细胞,相比较于 M2 NK 细胞处于细胞分化的终末期,M1 NK 细胞具有更强的效能[19]。研究进一步用 $DX5^+NK1.1^+$来标记成熟阶段的 NK 细胞,发现高盐饮食组小鼠肝脏、脾脏和骨髓中成熟的 $DX5^+NK1.1^+$细胞的比例也明显减少,提示高盐饮食抑制 NK 细胞成熟。研究探究 NK 细胞功能在高盐环境下是否受到影响,结果显示与正常盐饮食组小鼠相比,高盐饮食组小鼠肝脏、脾脏中 $CD69^+$ NK 细胞比例降低,肝脏中 IFN-γ^+ NK 细胞比例降低。此外,高盐饮食组小鼠 NK 细胞对 YAC-1 靶细胞的杀伤能力显著下降,提示 NK 细胞的效应功能和细胞毒作用在高盐环境下受到抑制。研究继续分析其他常见免疫细胞的比例和活化,发现与正常盐饮食组小鼠相比,高盐饮食组小鼠肝脏和脾脏 $CD4^+$ T 细胞、$CD8^+$ T 细胞、NKT 细胞和 B 细胞比例与活化无明显改变。

RIZVI 等[20]和 HE 等[21]通过皮下注射 4T1 或 B16F10 细胞,建立乳腺和黑色素瘤的荷瘤小鼠模型,并分析高盐饮食后的肿瘤进展,发现高盐饮食可以延缓肿瘤进展。然而盐对于肿瘤的发生发展可能是一把双刃剑,高盐负荷在肿瘤早期诱导免疫细胞的炎症激活,增强免疫监视,导致肿瘤消除并阻碍肿瘤进展[22]。另一方面,高盐负荷也可以通过促进免疫衰竭来发挥促肿瘤作用,例如高盐对人单核/巨噬细胞的体外长时

间处理导致 M2 巨噬细胞表型转换,吞噬和抗原提呈能力降低,抗肿瘤效应降低[23]。在本实验中,小鼠经过长时间的高盐饮食喂养,NK 细胞的成熟和活化受到抑制,进而功能降低,不能发挥良好的细胞毒作用,与前面文献观点一致。此外,与 RIZVI 等[20]报道高盐饮食促进 NK 细胞功能不同,本研究发现 NK 细胞的功能在高盐环境下受到抑制,就此我们考虑有原因如下:①与 RIZVI 等[20]选用 6~8 周龄 NK 细胞已经发育成熟的小鼠不同,我们选用的是 3~4 周龄 NK 细胞尚处于发育阶段的小鼠进行高盐饮食喂养,高盐环境可能对已发育成熟的 NK 细胞和尚未完全发育成熟的 NK 细胞产生不同的影响;②与 RIZVI 等[20]报道在荷瘤的同时给予高盐喂养的建模方式不同,本研究中小鼠在经过长达 6 周的高盐饮食喂养后再腹腔注射 YAC-1 细胞,由于小鼠 NK 细胞尚未完全发育成熟,在经过高盐饮食长期喂养的过程中可能受到了更为剧烈的影响。

总之,与众多可促进 NK 细胞成熟的因素不同,像转化生长因子-β(TGF-β)对 NK 细胞的发育产生负向调控的因素却鲜少报道[24-25],这里我们证明高盐饮食同样可以抑制 NK 细胞的发育和成熟。高盐负荷下 NK 细胞的效应功能和细胞毒作用受损。本实验结果不仅为负向调控 NK 细胞成熟的外部环境因素提供了新思路,也扩展了我们对高负荷盐调控免疫细胞功能的了解,有助于我们加深对盐的生理功能和高盐饮食对机体的影响的认识。而导致 NK 细胞对外部环境敏感的机制值得进一步探究。

参考文献:

[1] POWLES J, FAHIMI S, MICHA R, *et al*. Global, regional and national sodium intakes in 1990 and 2010: a systematic analysis of 24 h urinary sodium excretion and dietary surveys worldwide[J]. BMJ Open, 2013, 3(12): e003733. DOI: 10.1136/bmjopen-2013-003733.

[2] HE F J, TAN M, MA Y, *et al*. Salt reduction to prevent hypertension and cardiovascular disease: JACC state-of-the-art review[J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 75(6): 632-647. DOI:10.1016/j.jacc.2019.11.055.

[3] LANASPA M A, KUWABARA M, ANDRES-HERNANDO A, *et al*. High salt intake causes leptin resistance and obesity in mice by stimulating endogenous fructose production and metabolism[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(12): 3138-3143. DOI:10.1073/pnas.1713837115.

[4] KLEINEWIETFELD M, MANZEL A, TITZE J, *et al*. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells[J]. Nature, 2013, 496(7446): 518-522. DOI:10.1038/nature11868.

[5] MATTHIAS J, MAUL J, NOSTER R, *et al*. Sodium chloride is an ionic checkpoint for human T H_2 cells and shapes the atopic skin microenvironment[J]. Sci Transl Med, 2019, 11(480): eaau0683. DOI: 10.1126/scitranslmed.aau0683.

[6] JOBIN K, STUMPF N E, SCHWAB S, *et al*. A high-salt diet compromises antibacterial neutrophil responses through hormonal perturbation[J]. Sci Transl Med, 2020, 12(536): eaay3850. DOI: 10.1126/scitranslmed.aay3850.

[7] HUCKE S, ESCHBORN M, LIEBMANN M, *et al*. Sodium chloride promotes pro-inflammatory macrophage polarization thereby aggravating CNS autoimmunity[J]. J Autoimmun, 2016, 67: 90-101. DOI:10.1016/j.jaut.2015.11.001.

[8] ZHANG W C, ZHENG X J, DU L J, *et al*. High salt primes a specific activation state of macrophages, M(Na)[J]. Cell Res, 2015, 25(8): 893-910. DOI:10.1038/cr.2015.87.

[9] XIAO Z X, HU X, ZHANG X, *et al*. High salt diet accelerates the progression of murine lupus through dendritic cells via the p38 MAPK and STAT1 signaling pathways[J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 34. DOI: 10.1038/s41392-020-0139-5.

[10] VIVIER E, TOMASELLO E, BARATIN M, *et al*. Functions of natural killer cells[J]. Nat Immunol, 2008, 9(5): 503-510. DOI:10.1038/ni1582.

[11] HABIF G, CRINIER A, ANDRÉ P, *et al*. Targeting natural killer cells in solid tumors[J]. Cell Mol Immunol, 2019, 16(5): 415-422. DOI:10.1038/s41423-019-0224-2.

[12] CHIOSSONE L, CHAIX J, FUSERI N, *et al*. Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program[J]. Blood, 2009, 113(22): 5488-5496. DOI:10.1182/blood-2008-10-187179.

[13] HE J, WHELTON P K, APPEL L J, *et al*. Long-term effects of weight loss and dietary sodium reduction on incidence of hypertension[J]. Hypertension, 2000, 35(2): 544-549. DOI:10.1161/01.hyp.35.2.544.

[14] COOK N R, CUTLER J A, OBARZANEK E, *et al*. Long term effects of dietary sodium reduction on cardiovascular disease outcomes: observational follow-up of the trials of hypertension prevention (TOHP)[J]. BMJ, 2007, 334(7599): 885. DOI:10.1136/bmj.39147.604896.55.

[15] WEI Y, LU C, CHEN J, *et al*. High salt diet stimulates gut Th17 response and exacerbates TNBS-induced colitis in mice[J]. Oncotarget, 2017, 8(1): 70-82. DOI:10.18632/

oncotarget. 13783.

[16] MACHNIK A, NEUHOFER W, JANTSCH J, *et al*. Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism[J]. Nat Med, 2009, 15(5): 545-552. DOI:10.1038/nm.1960.

[17] GO W Y, LIU X B, ROTI M A, *et al*. NFAT5/TonEBP mutant mice define osmotic stress as a critical feature of the lymphoid microenvironment[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(29): 10673-10678. DOI: 10.1073/pnas.0403139101.

[18] JANTSCH J, SCHATZ V, FRIEDRICH D, *et al*. Cutaneous na+ storage strengthens the antimicrobial barrier function of the skin and boosts macrophage-driven host defense[J]. Cell Metab, 2015, 21(3): 493-501. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.02.003.

[19] HAYAKAWA Y, SMYTH M J. CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity[J]. J Immunol, 2006, 176(3): 1517-1524. DOI:10.4049/jimmunol.176.3.1517.

[20] RIZVI Z A, DALAL R, SADHU S, *et al*. High-salt diet mediates interplay between NK cells and gut microbiota to induce potent tumor immunity[J]. Sci Adv, 2021, 7(37): eabg5016. DOI:10.1126/sciadv.abg5016.

[21] HE W, XU J, MU R, *et al*. High-salt diet inhibits tumour growth in mice via regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 1732. DOI:10.1038/s41467-020-15524-1.

[22] ALLU A S, TIRIVEEDHI V. Cancer salt nostalgia[J]. Cells, 2021, 10(6): 1285. DOI:10.3390/cells10061285.

[23] AMARA S, WHALEN M, TIRIVEEDHI V. High salt induces anti-inflammatory MΦ2-like phenotype in peripheral macrophages[J]. Biochem Biophys Rep, 2016, 7: 1-9. DOI:10.1016/j.bbrep.2016.05.009.

[24] TANG P M, ZHOU S, MENG X M, *et al*. Smad3 promotes cancer progression by inhibiting $E4BP_4$-mediated NK cell development[J]. Nat Commun, 2017, 8: 14677. DOI:10.1038/ncomms14677.

[25] MARCOE J P, LIM J R, SCHAUBERT K L, *et al*. TGF-β is responsible for NK cell immaturity during ontogeny and increased susceptibility to infection during mouse infancy[J]. Nat Immunol, 2012, 13(9): 843-850. DOI: 10.1038/ni.2388.

(收稿:2021-10-10;修回:2021-12-07)

(编辑 王 红)