

脂肪组织黏膜相关恒定T细胞通过分泌白介素4调节小鼠脂肪棕色化

叶潇^{1,2}, 宋迎香², 赵瑜², 朱大龙¹

¹南京医科大学鼓楼临床医学院内分泌科, 江苏 南京 210008; ²浙江省人民医院内分泌科(杭州医学院附属医院), 浙江 杭州 310014

摘要:目的 探究黏膜相关恒定T(MAIT)细胞与脂肪棕色化之间的关系以及调节脂肪棕色化的分子机制。方法 构建MAIT细胞功能缺陷小鼠模型,对比野生型小鼠及MAIT细胞缺陷小鼠,通过Western blot和RT-PCR检测冷刺激前后小鼠脂肪棕色化标志物的水平差异,并通过流式细胞术检测了小鼠脂肪组织内MAIT细胞在冷刺激前后数量、活化水平以及细胞因子分泌能力的差异。采用MAIT细胞与脂肪细胞共培养的方式,通过Western blot和RT-PCR检测是否存在MAIT细胞以及是否加入白介素4(IL-4)封闭抗体的条件下脂肪细胞棕色化标志物的表达差异。利用MAIT细胞缺陷的小鼠模型,通过代谢笼、免疫组化、Western blot和Seahorse方法检测MAIT细胞缺陷小鼠在冷刺激条件下的脂肪棕色化相关指标。结果 Western blot和RT-PCR结果显示小鼠冷刺激后脂肪组织棕色化标志物UCP-1、PGC1- α 的表达水平均上调,在此情景下小鼠脂肪组织内MAIT细胞数量差异无统计学意义($P>0.05$),CD69的表达水平上调($P<0.05$),效应细胞因子IL-4的表达水平上调($P<0.05$)。体外共培养实验显示,脂肪细胞与MAIT细胞共培养后的棕色化水平上调($P<0.05$),若阻断IL-4信号则棕色化水平下调($P<0.05$)。对MAIT细胞缺陷的小鼠进行冷刺激后,其能量消耗水平低于野生型小鼠($P<0.05$),脂肪棕色化水平低于野生型小鼠($P<0.05$),且脂肪细胞代谢水平低于野生型小鼠。结论 本研究首次通过MAIT细胞功能缺陷小鼠模型验证MAIT细胞参与脂肪棕色化,动物实验及体外实验进一步显示冷刺激通过促进MAIT细胞分泌IL-4调控脂肪细胞棕色化。

关键词:黏膜相关恒定T细胞;肥胖;棕色脂肪

Cold stimulation promotes interleukin-4 secretion by mucosal-associated invariant T cells in the adipose tissue to promote adipose browning in mice

YE Xiao^{1,2}, SONG Yingxiang², ZHAO Yu², ZHU Dalong¹

¹Department of Endocrinology, Drum Tower Hospital Clinical College of Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China; ²Department of Endocrinology, Zhejiang Provincial People's Hospital (Affiliated People's Hospital of Hangzhou Medical College), Hangzhou 310014, China

Abstract: Objective To investigate the role of mucosal-associated invariant T (MAIT) cells in the regulatory mechanism of adipose browning. **Methods** A mouse model with functional deficiency of MAIT cells was established for comparison with the wild-type mice for levels of brown adipose tissue markers in response to cold stimulation using Western blotting and RT-PCR. Flow cytometry was used to analyze the changes in the number, activation level and cytokine secretion ability of MAIT cells in mouse adipose tissue after cold stimulation. In a co-culture system of MAIT cells and adipocytes, the effect of interleukin-4 (IL-4) blocking antibodies on the expressions of brown adipose tissue markers in the adipocytes was evaluated using Western blotting and RT-PCR. In a mouse model of MAIT cell deficiency, the changes in adipose browning-related indicators in response to cold stimulation were analyzed using metabolic cages, immunohistochemistry, Western blotting and the Seahorse method. **Results** In both the mouse models of functional deficiency of MAIT cells and wild-type mice, cold stimulation significantly increased the expression levels of brown adipose tissue markers UCP-1 and PGC1- α and upregulated CD69 and IL-4 expressions in the adipose tissue without significantly affecting the number of MAIT cells in the adipose tissue. In the co-culture experiment, the adipocytes showed obviously increased browning level after co-culture with MAIT cells ($P<0.05$), but blocking IL-4 signaling strongly downregulated the browning level ($P<0.05$). The MAIT cell-deficient mice showed obviously lower levels of energy expenditure, adipose browning and metabolism of the adipocytes compared with the wild-type mice in response to cold stimulation ($P<0.05$). **Conclusion** MAIT cells participate in adipose browning in mice, and cold stimulation promotes MAIT cell secretion of IL-4 to positively regulate adipose browning.

Keywords: mucosal-associated invariant T cells; obesity; brown adipose tissue

超重乃至肥胖已经成为危害人类健康的重要因素,与心血管疾病、2型糖尿病、高血压和高血脂等多种慢性

收稿日期:2023-10-06

基金项目:国家自然科学基金(82100911);浙江省自然科学基金(LY19H070002)

Supported by National Natural Science Foundation of China (82100911).

作者简介:叶潇,在读博士研究生,副研究员,E-mail:semper_fi@foxmail.com

通信作者:朱大龙,主任医师,博士生导师,E-mail:zhudalong@nju.edu.cn

疾病密切相关,给个人和社会带来巨大的健康和经济负担^[1,2]。脂肪组织与肥胖的发病密切相关,它主要包括负责能量贮存的白色脂肪组织和负责在寒冷环境产热的棕色脂肪组织两种^[3,4]。在寒冷的刺激下,白色脂肪组织内会出现线粒体上高表达UCP-1蛋白的脂肪细胞,被称为棕色脂肪细胞,这一现象也被称为白色脂肪棕色化^[5]。白色脂肪棕色化能明显提高机体的能量消耗水平,因此是近年来肥胖研究中的重要方向和干预靶点。

近年来,免疫细胞对脂肪组织功能调节的重要性逐渐得到认识^[6,7]。免疫细胞对脂肪棕色化的调控主要依赖于以IL-4/IL-5/IL-13为中心,ILC2、嗜酸性粒细胞、M2型巨噬细胞为效应细胞的调控网络^[8,9]。黏膜相关恒定T(MAIT)细胞最初被发现定植于人类、小鼠和牛的组织黏膜表面,属于固有免疫细胞的新亚群^[10,11]。研究证实,MAIT细胞也参与了自身免疫性代谢疾病的发生^[12-14]。最新研究发现,人体脂肪组织内也存在MAIT细胞,而肥胖人群脂肪组织内MAIT细胞数量显著减少^[15]。然而,MAIT细胞是否参与脂肪组织功能的调控乃至肥胖的发生发展仍不清楚。本研究拟通过基因敲除动物模型,在细胞和动物水平进行研究,探究MAIT细胞在脂肪棕色化过程中的作用,并阐明其调控脂肪细胞棕色化的方式及相关信号通路,为进一步理解肥胖发生的原因以及探寻治疗肥胖的方法提供帮助。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF级8~10周龄健康雄性C57BL/6小鼠、Mr1^{-/-}小鼠(苏州赛业公司及南京集萃药康公司)。按照最佳饲养空间将小鼠随机分笼,饲养温度23~25℃,湿度55%~63%,12h光照/12h黑暗循环,定期更换垫料,保证所有小鼠可自由饮食。动物实验的所有操作均由浙江省人民医院实验动物福利委员会批准(批准号2022-145)。

1.2 主要试剂及仪器

DMEM/F12培养基、RPMI 1640培养基、胎牛血清(Gbico),Lymphoprep淋巴细胞分离液(Stem cell),FACS缓冲液(BD Biosciences),Foxp3固定/渗透试剂盒(Thermo Fisher Scientific),胰蛋白酶、青链霉素、RIPA蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂、4%多聚甲醛组织固定液(生工生物),Trizol裂解液、逆转录试剂盒(Takara);IL-4 mab(BD Biosciences),实时荧光定量PCR试剂盒(Thermo),Seahorse XF细胞线粒体压力测试试剂盒(安捷伦);FACS Aria II流式细胞仪(BD Bioscience),超声破碎仪,Seahorse XF分析仪(安捷伦)。

1.3 实验方法

1.3.1 流式细胞术 在表面染色前,使用CD16/32抗体(Biolegend)阻断Fc受体的非特异性结合。表面染色时,将细胞重悬于含有抗体鸡尾酒的100 μL FACS缓冲液中,在4℃避光条件下染色30 min。细胞内染色:使用Foxp3固定/渗透试剂盒(Thermo Fisher Scientific)在4℃下固定和渗透45 min,用100 μL含抗体混合的渗透缓冲液在4℃避光条件下染色45 min。

1.3.2 Western blotting 采用超声破碎仪将组织在冰上充分均浆,加入含有蛋白酶抑制剂的RIPA蛋白裂解液中冰上裂解30 min。将悬液置于4℃以10 000 g离心5 min,取上清先测定蛋白浓度后再加入Loading

buffer,充分混合后煮沸10 min。变性后的蛋白经凝胶电泳后转膜至PVDF膜上,先4℃孵育一抗过夜,再室温孵育二抗1 h,显影分析。

1.3.3 mRNA的抽提以及RT-PCR RNA提取按照10 μL体系,参照说明书使用Takara逆转录试剂盒逆转录cDNA,使用Light Cycler480II定量PCR仪检测,采用β-actin作为内参基因。定量RT-PCR在40个重复的热循环中进行,使用SYBR green(94℃ 30 s,57℃ 20 s,72℃ 20 s),随后在72℃下进行最后的延伸5 min。

1.3.4 冷刺激小鼠模型的建立 构建冷刺激的小鼠模型:6周龄C57BL/6雄鼠,分为正常对照组和寒冷刺激组,6只/组,均提供足量的饮水和食物。正常对照组饲养环境为25℃;寒冷刺激组每日25℃饲养20 h后转移至4℃环境中饲养4 h,以适应寒冷刺激,4 d后将小鼠转移至4℃环境中,持续寒冷刺激1周。

1.3.5 免疫组化 组织经固定、脱水后包埋,制成冰冻切片。4℃孵育对应的一抗过夜,PBS漂洗3次;室温孵育二抗1 h,PBS漂洗3次。DAPI染核,ddH₂O漂洗,封片后光学显微镜观察。

1.3.6 脂肪组织细胞分离及培养 将脂肪组织称重后在冰上剪成小块,转移至15 mL离心管中,用1640 RPMI培养基定容至8 mL,加入0.2%的1型胶原酶,37℃水浴消化30~40 min,期间每5 min上下颠倒离心管使组织与酶溶液充分接触。消化结束后加1640 RPMI培养基至15 mL终止消化,室温下500 g离心5 min,吸去最上层油脂和上层培养基。采用10% FBS的DMEM高糖培养基复悬细胞,接种至培养皿中。细胞因子及抗体直接按照目标浓度加入培养基中。

1.3.7 Seahorse 脂肪细胞在XF96微孔板中培养并分化。分化第7天,细胞洗1次,置于37℃室温恒温培养箱中孵育1 h(XF基础培养基添加25 mmol/L葡萄糖、2 mmol/L谷氨酸和2%不含脂肪酸的牛血清白蛋白,pH 7.4)。将试剂盒内对应浓度的寡霉素5 μmol/L、FCCP 1 μmol/L、鱼藤酮2.5 μmol/L、抗霉素A 5 μmol/L的浓度装入传感器的注射口。上机记录数据。

1.4 统计学分析

全部试验数据均采用SPSS22.0及R软件上完成统计分析。体外实验均重复3次,采用t检验或单因素方差分析。非正态分布的计量资料采用两独立样本Mann-Whitney秩和检验进行比较;率的比较采用卡方检验或Fisher精确检验;相关分析采用Pearson或Spearman相关分析。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 冷刺激促进脂肪组织MAIT细胞分泌IL-4

经过冷刺激处理后,小鼠白色脂肪的棕色化水平上调,体现为棕色化标志物的上调(P<0.05,图1A、B)。通

过流式细胞术检测小鼠脂肪组织内 MAIT 细胞的数量及 CD69 的表达水平,发现相比于未接受冷刺激的小鼠,冷刺激后的小鼠脂肪组织内 MAIT 细胞数量无明显变

化($P>0.05$,图 1C),而 MAIT 细胞表面 CD69 的表达水平上调($P<0.05$,图 1D)。冷刺激后小鼠脂肪组织内 MAIT 细胞分泌 IL-4 的能力较对照组上升($P<0.05$,图 1E)。

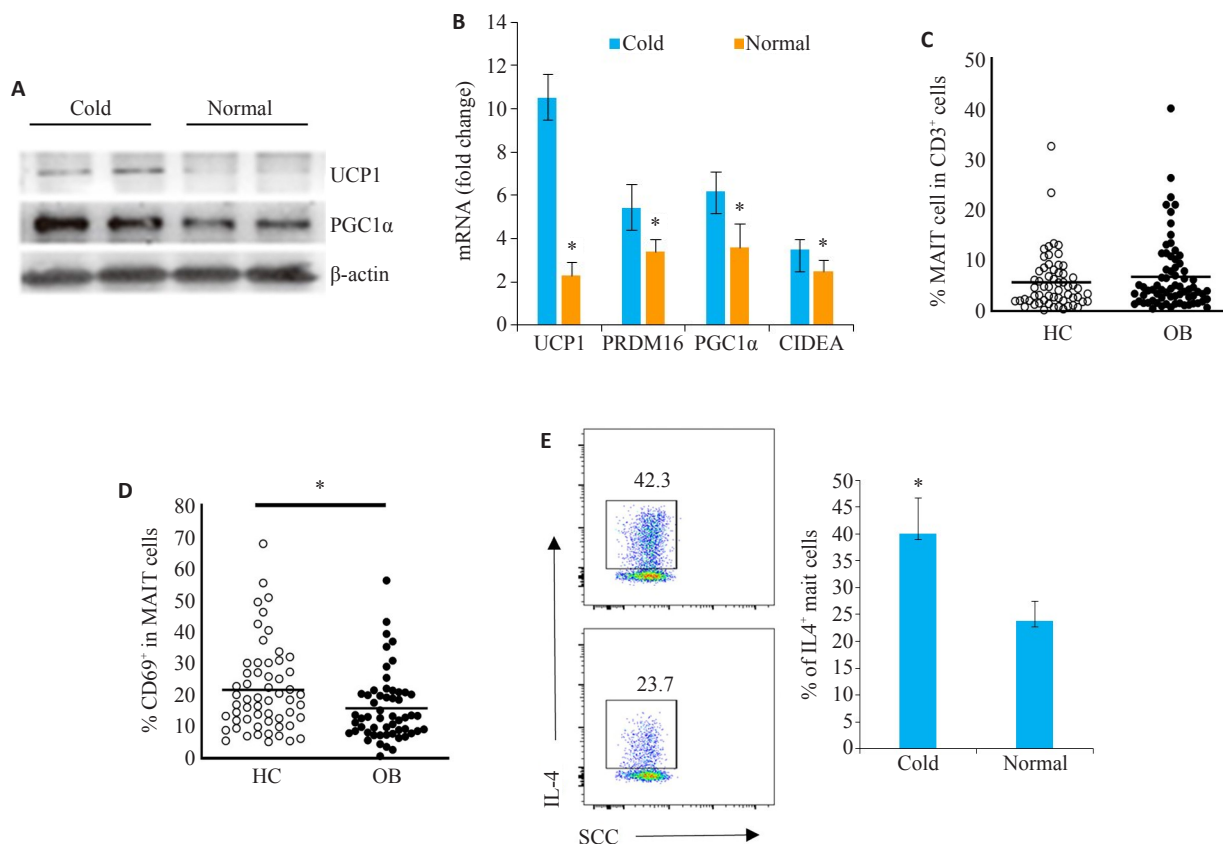


图1 冷刺激调控小鼠脂肪组织内MAIT细胞功能

Fig.1 Cold stimulation (4 $^{\circ}$ for 1 week) regulates the function of MAIT cells in mouse adipose tissue. A, B: Effect of cold stimulation on the browning index of fat tissue in mice. C: Comparison of the proportion of MAIT cells in fat tissue of obese and normal mice. D: Comparison of the proportion of CD69- positive MAIT cells in fat tissue of mice in the two groups. E: Comparison of the proportion of IL-4- positive MAIT cells in fat tissue of mice after cold stimulation. * $P<0.05$.

2.2 冷刺激后MAIT细胞通过分泌IL-4促进脂肪棕色化

对照组小鼠脂肪细胞与冷刺激后小鼠MAIT细胞共培养后棕色化相关标志上调($P<0.05$,图2A、B)。在脂肪细胞培养体系中加入IL-4或IL-4联合IL-4的阻断抗体(IL-4处理浓度均为10 ng/mL,IL-4 mab为10 μ g/mL,处理时间均为24 h)处理后,IL-4抗体联合处理组棕色化相关指标低于IL-4单独处理组($P<0.05$,图2C、D)。

2.3 MAIT细胞缺陷会导致脂肪棕色化受损

给予MAIT细胞功能缺陷模型鼠Mr1^{-/-}小鼠冷刺激后,基因敲除小鼠的能量消耗水平低于野生型小鼠(图3A);免疫组化以及Western blotting也显示,同样长时间冷刺激后基因敲除小鼠的脂肪棕色化水平低于野生型小鼠(图3B、C)。由于棕色化脂肪细胞的代谢特征与白色脂肪存在显著差异,我们通过Seahorse的方法检测了冷刺激后野生型/基因敲除小鼠脂肪细胞的代谢特

征,结果发现基因敲除小鼠脂肪细胞的OCR水平下降(图3D、E),其棕色化程度下降。

3 讨论

越来越多的证据表明,免疫系统与肥胖和2型糖尿病的发病有关,而MAIT细胞作为一群新发现的免疫细胞在其中的作用还不清楚^[16]。脂肪细胞棕色化的过程被认为是影响肥胖发生发展的关键因素,该过程中免疫细胞及其效应分子也起到了重要的调控作用。本研究利用MAIT细胞功能缺陷小鼠模型,首次探索MAIT细胞在脂肪组织棕色化过程中的作用。结果提示在肥胖发生发展的过程中伴随着MAIT细胞功能的受损,MAIT细胞在肥胖的发生发展过程中可能起到保护作用。

为了更深入地探究MAIT细胞在脂肪棕色化的过

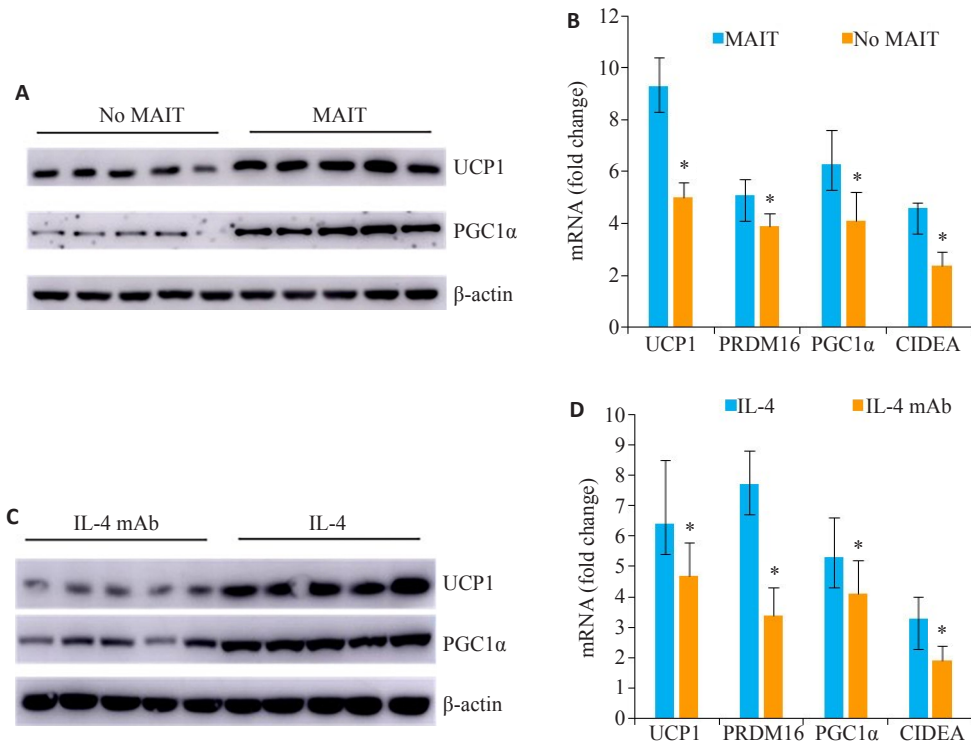


图2 冷刺激促进脂肪组织内MAIT细胞分泌IL-4
 Fig.2 Cold stimulation promotes IL-4 secretion by MAIT cells in the adipose tissue. **A, B:** Effect of adding MAIT cells to the co-culture system on the browning index of mouse adipose tissue. **C, D:** Effect of adding IL-4 alone and IL-4 combined with IL-4 mAb to the adipose tissue culture on the browning index of mouse adipose tissue. * $P < 0.05$.

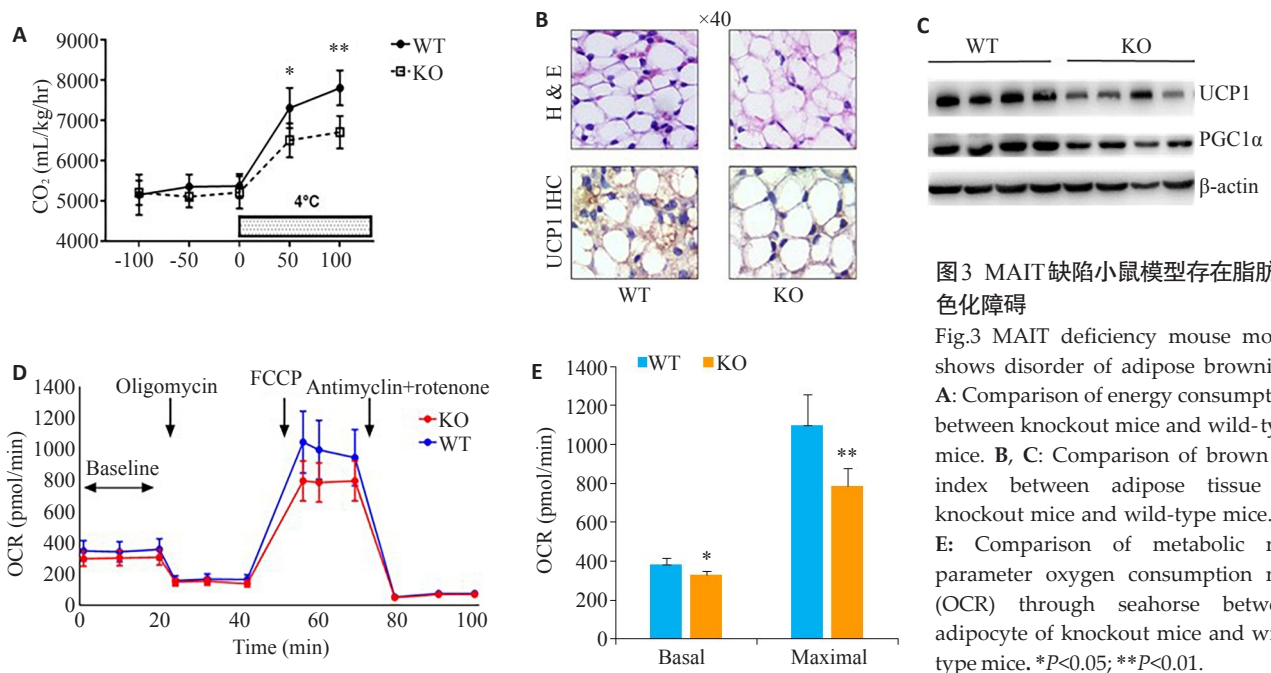


图3 MAIT缺陷小鼠模型存在脂肪棕色化障碍

Fig.3 MAIT deficiency mouse model shows disorder of adipose browning. **A:** Comparison of energy consumption between knockout mice and wild-type mice. **B, C:** Comparison of brown fat index between adipose tissue of knockout mice and wild-type mice. **D, E:** Comparison of metabolic rate parameter oxygen consumption rate (OCR) through seahorse between adipocyte of knockout mice and wild-type mice. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

程中的作用,我们开展了多种动物模型以及体外实验。研究表明,冷刺激能直接促进小鼠白色脂肪组织的棕色化^[17]。因此本研究也采用冷刺激的模型,结果显示冷刺激后小鼠白色脂肪的棕色化标志物明显上调,MAIT的功能也伴随出现显著的变化,体现为数量不变的基础上活化相关的表面标志CD69的表达上调。研究表明,多

种细胞分泌的效应因子参与了脂肪棕色化的调控,最新研究提示 ILC2 细胞可以被 IL-33 激活,分泌 Met-enk 在白色脂肪组织中促进棕色化;传统观点则认为,IL-4 是关键性的调控因子^[18]。而 MAIT 细胞也被报道可以在相应的刺激下分泌 IL-4^[19]。本研究也发现,冷刺激后小鼠脂肪组织中的 MAIT 细胞分泌 IL-4 的能力显著上调。

以上实验说明,冷刺激能够促进MAIT细胞的活化及其效应细胞因子的分泌,进一步提示MAIT细胞可能通过分泌IL-4参与了脂肪棕色化的调控。

为了直接证明MAIT细胞能够通过分泌IL-4直接促进脂肪细胞细胞的棕色化,本研究将小鼠冷刺激后的MAIT细胞与脂肪细胞共培养,发现共培养后的脂肪细胞棕色化标志物表达上调。为了验证这一过程中是否存在IL-4的作用,我们在利用IL-4抗体阻断这一信号,结果显示没有IL-4信号的情况下,MAIT细胞将不能促进脂肪细胞棕色化,表明冷刺激后MAIT细胞可以通过分泌IL-4促进脂肪细胞棕色化。

研究指出,MAIT细胞发育的过程依赖于MR1分子递呈的信号,敲除这一分子将会导致MAIT细胞发育异常,因此MRI基因敲除小鼠是经典的MAIT细胞功能缺陷小鼠模型^[20]。为了进一步验证我们的结论,我们对Mr1^{-/-}小鼠进行了冷刺激,通过体内实验多角度的探究MAIT细胞的功能。我们发现,Mr1^{-/-}小鼠冷刺激后能量代谢异常,提示其脂肪棕色化可能存在异常。免疫组化和Western blot实验也证明MAIT细胞缺陷后冷刺激将不能正常地促进脂肪细胞棕色化。研究指出,棕色化后脂肪细胞的氧化磷酸化水平显著上升,因此脂肪细胞的氧化磷酸化水平也被认为是评估脂肪细胞棕色化的重要指标^[21,22];而本实验发现,MAIT细胞缺陷小鼠的脂肪细胞氧化磷酸化的水平也存在缺陷。这说明在体内水平上,MAIT细胞功能缺陷会导致冷刺激促进脂肪细胞棕色化的能力降低,即MAIT细胞是调控脂肪棕色化的重要调控者。

综合我们基因敲除小鼠模型实验,我们的研究证明了MAIT细胞可以通过分泌IL-4促进脂肪细胞的棕色化,而MAIT细胞功能受损会导致脂肪细胞棕色化异常进而导致肥胖的发生发展。但本研究也存在一定局限性:本研究仅发现脂肪组织中MAIT细胞对棕色化存在效应,并未探索MAIT细胞上游的调控机制;另外,除IL-4外,MAIT细胞是否存在其他调控脂肪组织棕色化的通路也未能发现。

综上所述,探索脂肪组织中MAIT细胞为探索干预肥胖发生发展提供了新的机制,同时也为肥胖的治疗提供了潜在靶点。

参考文献:

- [1] Gregg EW, Shaw JE. Global health effects of overweight and obesity [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(1): 80-1.
- [2] Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2019, 15(5): 288-98.
- [3] Ikeda K, Maretich P, Kajimura S. The common and distinct features of brown and beige adipocytes [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2018, 29(3): 191-200.
- [4] Lidell ME, Betz MJ, Leinhard OD, et al. Evidence for two types of

- brown adipose tissue in humans [J]. *Nat Med*, 2013, 19(5): 631-4.
- [5] van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommel JW, Smulders NM, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(15): 1500-8.
- [6] Zhu Q, Glazier BJ, Hinkel BC, et al. Neuroendocrine regulation of energy metabolism involving different types of adipose tissues [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(11): 2707.
- [7] Kajimura S, Seale P, Spiegelman BM. Transcriptional control of brown fat development [J]. *Cell Metab*, 2010, 11(4): 257-62.
- [8] Trim WV, Lynch L. Immune and non-immune functions of adipose tissue leukocytes [J]. *Nat Rev Immunol*, 2022, 22(6): 371-86.
- [9] Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders [J]. *Nature*, 2006, 444(7121): 860-7.
- [10] Godfrey DI, Koay HF, McCluskey J, et al. The biology and functional importance of MAIT cells [J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(9): 1110-28.
- [11] Koay HF, Gherardin NA, Xu C, et al. Diverse MR1-restricted T cells in mice and humans [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2243.
- [12] Harms RZ, Lorenzo KM, Corley KP, et al. Altered CD161 bright CD8⁺ mucosal associated invariant T (MAIT)-like cell dynamics and increased differentiation states among juvenile type 1 diabetics [J]. *PLoS One*, 2015, 10(1): e0117335.
- [13] Hiejima E, Kawai T, Nakase H, et al. Reduced numbers and proapoptotic features of mucosal-associated invariant T cells as a characteristic finding in patients with inflammatory bowel disease [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2015, 21(7): 1529-40.
- [14] Böttcher K, Rombouts K, Saffioti F, et al. MAIT cells are chronically activated in patients with autoimmune liver disease and promote profibrogenic hepatic stellate cell activation [J]. *Hepatology*, 2018, 68(1): 172-86.
- [15] Magalhaes I, Pingris K, Poitou C, et al. Mucosal-associated invariant T cell alterations in obese and type 2 diabetic patients [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(4): 1752-62.
- [16] Brunton S. Pathophysiology of type 2 diabetes: the evolution of our understanding [J]. *J Fam Pract*, 2016, 65(4 Suppl): 416.
- [17] Ye L, Wu J, Cohen P, et al. Fat cells directly sense temperature to activate thermogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(30): 12480-5.
- [18] Qiu YF, Nguyen KD, Odegaard JI, et al. Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat [J]. *Cell*, 2014, 157(6): 1292-308.
- [19] Lee OJ, Cho YN, Kee SJ, et al. Circulating mucosal-associated invariant T cell levels and their cytokine levels in healthy adults [J]. *Exp Gerontol*, 2014, 49: 47-54.
- [20] Franciszkievicz K, Salou M, Legoux F, et al. MHC class I-related molecule, MR1, and mucosal-associated invariant T cells [J]. *Immunol Rev*, 2016, 272(1): 120-38.
- [21] Wang WS, Ishibashi J, Trefely S, et al. A PRDM16-driven metabolic signal from adipocytes regulates precursor cell fate [J]. *Cell Metab*, 2019, 30(1): 174-89.
- [22] Bertholet AM, Kazak L, Chouchani ET, et al. Mitochondrial patch clamp of beige adipocytes reveals UCP₁-positive and UCP₁-negative cells both exhibiting futile creatine cycling [J]. *Cell Metab*, 2017, 25(4): 811-22.