

CD1d 通过信号调节蛋白 α 抑制核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 等炎性因子的表达

https://doi.org/10.12307/2022.561

向明芝^{1, 2}, 袁紫林^{2, 3}, 王刚^{2, 3}, 程洁^{2, 4}, 刁波^{2, 3}, 刘跃平^{2, 3}

投稿日期: 2021-01-28

采用日期: 2021-03-04

修回日期: 2021-08-10

在线日期: 2021-09-03

中图分类号:

R459.9; R318; R392.1

文章编号:

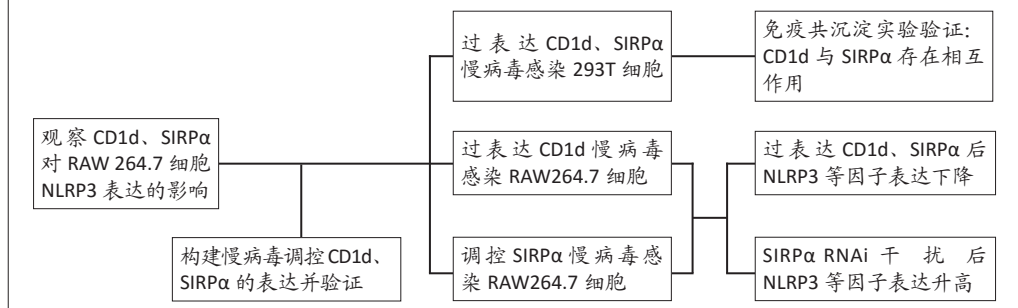
2095-4344(2022)24-03826-07

文献标识码: A

文章快速阅读:

文章特点一

△免疫共沉淀实验验证 CD1d 与 SIRP α 存在相互作用;
△构建慢病毒调控 CD1d 与 SIRP α 表达, 结果显示 CD1d 与细胞膜上 SIRP α 形成复合物, 通过 SIRP α 抑制下游 p38MAPK/NF- κ B 通路, 最终达到抑制 NLRP3 等炎性因子表达的目的。



文题释义:

NLRP3炎性因子: 是含核苷酸结合寡聚化结构域(nucleotide binding oligomerization domain, NOD)样受体(NOD like receptors, NLRs)家族的一员, 负责识别病原相关分子模式介导免疫炎症反应, 也是作用最广泛的炎性因子。

CD1d: 高表达于自然杀伤细胞、巨噬细胞等免疫细胞的一种分子, 其结构与MHC- I 类分子相似, 为免疫细胞提呈脂质, 扮演激活免疫机制及促进炎症递质释放等多种角色。

信号调节蛋白 α (signal-regulatory protein α , SIRP α): 主要由髓系细胞表达的质膜蛋白, 并且含有与抑制性免疫受体酪氨酸抑制基序一致的酪氨酸残基, 信号调节蛋白 α 通过磷酸化及与磷酸酶SHP2/SHP1结合诱导特征明确的抑制信号, 是公认的抑制性膜受体蛋白。

摘要

背景: 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3)炎性因子被证实与多种炎症性疾病相关, 调控其表达将成为治疗相关疾病的关键。

目的: 验证CD1d参与了调控NLRP3炎性因子表达, 并且进一步证明CD1d是通过信号调节蛋白 α (signal regulatory protein- α , SIRP α)来达到调控目的。

方法: ①使用Flag-CD1d、HA-SIRP α 慢病毒过表达载体转染293T细胞进行免疫共沉淀实验, 验证CD1d与SIRP α 的相互作用; ②使用Flag-CD1d慢病毒过表达载体转染RAW264.7细胞, RT-qPCR检测NLRP3等基因表达; ③使用HA-SIRP α 慢病毒过表达载体转染RAW264.7细胞, 在脂多糖刺激后RT-qPCR、Western blot检测NLRP3等基因和蛋白表达; ④使用SIRP α 慢病毒RNAi载体转染RAW264.7细胞, 在脂多糖刺激后RT-qPCR、Western blot检测NLRP3等基因和蛋白表达。

结果与结论: ①免疫共沉淀实验证实CD1d与SIRP α 存在相互作用; ②过表达CD1d基因后, NLRP3、pro-IL-1 β 、pro-IL-18基因表达明显低于正常组($P < 0.05$); ③在脂多糖刺激后过表达SIRP α 组NLRP3基因表达明显低于正常组($P < 0.05$); pro-IL-1 β 、pro-IL-18基因表达与正常组差异无显著性意义($P > 0.05$); 过表达SIRP α 组p38、p-p38、NLRP3、pro-IL-1 β 、pro-IL-18蛋白表达明显低于SIRP α 干扰组($P < 0.01$); ④脂多糖刺激后干扰SIRP α 组NLRP3、pro-IL-1 β 、pro-IL-18基因表达明显高于正常组($P < 0.05$); 干扰SIRP α 组p38、p-p38、NLRP3、pro-IL-1 β 、pro-IL-18蛋白表达明显高于过表达SIRP α 组($P < 0.01$); ⑤结果表明, CD1d与细胞膜上SIRP α 形成复合物, 通过SIRP α 抑制下游p38MAPK/NF- κ B通路, 最终达到抑制NLRP3等炎性因子表达的目的。

关键词: CD1d; 信号调节蛋白 α ; NLRP3; 炎性因子; p38MAPK; NF- κ B; 通路

缩略语: 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3: nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3; 信号调节蛋白 α : signal regulatory protein- α , SIRP α

¹ 武汉科技大学医学院, 湖北省武汉市 430081; ² 中部战区总医院基础医学实验室, 湖北省武汉市 430070; ³ 中枢神经系统肿瘤发生与干预湖北省重点实验室, 湖北省武汉市 430070; ⁴ 南方医科大学第一临床医学院, 广东省广州市 510515

第一作者: 向明芝, 女, 1992年生, 湖南省古丈县人, 土家族, 武汉科技大学在读硕士, 医师, 主要从事肿瘤、免疫研究。

通讯作者: 刁波, 博士, 副教授, 中部战区总医院基础医学实验室, 湖北省武汉市 430070; 中枢神经系统肿瘤发生与干预湖北省重点实验室, 湖北省武汉市 430070

并列通讯作者: 刘跃平, 硕士, 副主任技师, 中部战区总医院基础医学实验室, 湖北省武汉市 430070; 中枢神经系统肿瘤发生与干预湖北省重点实验室, 湖北省武汉市 430070

https://orcid.org/0000-0003-2741-9031 (向明芝)

基金资助: 国家自然科学基金项目(81971478, 81771691), 项目参与人: 刁波

引用本文: 向明芝, 袁紫林, 王刚, 程洁, 刁波, 刘跃平. CD1d 通过信号调节蛋白 α 抑制核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 等炎性因子的表达 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(24):3826-3832.



CD1d-mediated inhibition of the nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 inflammatory factor expression via signal regulatory protein- α

Xiang Mingzhi^{1,2}, Yuan Zilin^{2,3}, Wang Gang^{2,3}, Cheng Jie^{2,4}, Diao Bo^{2,3}, Liu Yueping^{2,3}

¹Medical College, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, Hubei Province, China; ²Basic Medical Laboratory, General Hospital of Central Theater Command, Wuhan 430070, Hubei Province, China; ³Hubei Key Laboratory of Central Nervous System Tumor and Intervention, Wuhan 430070, Hubei Province, China; ⁴First School of Clinical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangzhou Province, China

Xiang Mingzhi, Master candidate, Physician, Medical College, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, Hubei Province, China; Basic Medical Laboratory, General Hospital of Central Theater Command, Wuhan 430070, Hubei Province, China

Corresponding author: Diao Bo, MD, Associate professor, Basic Medical Laboratory, General Hospital of Central Theater Command, Wuhan 430070, Hubei Province, China; Hubei Key Laboratory of Central Nervous System Tumor and Intervention, Wuhan 430070, Hubei Province, China

Co-corresponding author: Liu Yueping, Master, Associate chief technician, Basic Medical Laboratory, General Hospital of Central Theater Command, Wuhan 430070, Hubei Province, China; Hubei Key Laboratory of Central Nervous System Tumor and Intervention, Wuhan 430070, Hubei Province, China

Abstract

BACKGROUND: Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammatory factors have been proven to be associated with a variety of inflammatory diseases, and regulating their expression will provide some insights into the treatment of related diseases.

OBJECTIVE: To explore whether CD1d regulates the expression of NLRP3 inflammatory factors so as to verify the underlying mechanism that CD1d regulates the NLRP3 inflammasomes expression via signal regulatory protein- α (SIRP α).

METHODS: (1) 293T cells were transfected with Flag-CD1d and HA-SIRP α lentivirus overexpression vectors for co-immunoprecipitation assay to verify the interaction between CD1d and SIRP α . (2) RAW264.7 was transfected with the Flag-CD1d lentiviral overexpression vector. RT-qPCR was used to detect the expression of NLRP3 and other genes. (3) RAW264.7 was transfected with the overexpression vector of HA-SIRP α lentivirus. The gene and protein expression levels of NLRP3 were detected by RT-qPCR and western blot assay, respectively. (4) SIRP α lentivirus RNAi vector was used to transfect RAW264.7. After lipopolysaccharide stimulation, gene and protein expression levels of NLRP3 were detected by RT-qPCR and western blot assay.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Co-immunoprecipitation assay confirmed the interactions between CD1d and SIRP α . (2) After overexpression of CD1d gene, the expression levels of NLRP3, pro-IL-1 β and pro-IL-18 gene in the experimental group were significantly lower than those in the normal group ($P < 0.05$). (3) The expression of NLRP3 in the experimental group was significantly lower than that in the normal group after lipopolysaccharide stimulation ($P < 0.05$), but there were no differences in the expression of pro-IL-1 β and pro-IL-18 between the experimental group and the control group ($P > 0.05$). The protein expression of p38, P-P38, NLRP3, pro-IL-1 β and pro-IL-18 in the experimental group was significantly lower than that in the SIRP α interference group ($P < 0.01$). (4) The expression of NLRP3, pro-IL-1 β , and pro-IL-18 gene in the experimental group was significantly higher than that in the normal group after lipopolysaccharide stimulation ($P < 0.05$). The protein expression of p38, p-p38, NLRP3, pro-IL-1 β , and pro-IL-18 in the experimental group was significantly higher than that in the overexpression SIRP α group ($P < 0.01$). (5) It is concluded that CD1d forms a complex with SIRP α on the cell membrane, then inhibits the downstream p38MAPK/NF- κ B pathway via SIRP α , and finally inhibits the expression of NLRP3 inflammatory factors.

Key words: CD1d; signal regulatory protein- α ; NLRP3; inflammatory factor; p38MAPK; NF- κ B; pathway

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81971478, No. 81771691 (to DB)

How to cite this article: XIANG MZ, YUAN ZL, WANG G, CHENG J, DIAO B, LIU YP. CD1d-mediated inhibition of the nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 inflammatory factor expression via signal regulatory protein- α . *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(24):3826-3832.

0 引言 Introduction

核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症因子是固有免疫重要的组成部分。在防御病原体入侵人体过程中 NLRP3 炎症因子作为胞浆型模式识别受体能快速识别抗原相关分子模式激活并组装成 NLRP3 炎症小体 (NLRP3、pro-Caspase-1 和 ASC 蛋白复合物)。pro-IL-1 β /pro-IL-18 等无活性的炎性递质在 NLRP3 炎症小体作用下成熟并分泌胞外^[1], 以应对微生物感染和细胞损伤。但 NLRP3 炎症因子在体内的过度表达与蓄积则会加剧炎症性疾病的进程, 已证实 NLRP3 炎症因子与多种炎症性疾病相关, 如病毒性重型肝炎、2 型糖尿病、阿尔茨海默病、动脉粥样硬化、炎症肠病 (包括克罗恩、溃疡性结肠炎)、肺炎链球菌感染和脑出血神经炎症等^[2-6], 所以负性调控 NLRP3 炎症因子的表达能为相关炎症性疾病提供治疗方向。目前 NLRP3 炎症因子的表达调控机制尚不完全明确。

CD1d 分子是自然杀伤细胞及巨噬细胞等免疫细胞分泌的一种结构类似组织相容性复合体 I 类分子, 它通过提呈脂质, 激活相关免疫反应^[7]。大量研究证明巨噬细胞 (NLRP3 小体加工及活化的主要场所) 表达的 CD1d 分子能抑制 NLRP3

等炎性递质的表达, 敲除 CD1d 基因 (CD1d^{-/-}) 小鼠的溃疡性结肠炎症状较正常组明显加剧^[8-9]。CUI 等^[10]进一步表明 iGB3/CD1d1 启动了反馈信号, 抑制 p38-MAPK 磷酸化, 且导致 NF- κ B 自身的 RELA 通路及 NF- κ B 依赖的 JunB 和 ELK-1 信号通路的转录被抑制, 从而下调巨噬细胞中 NLRP3、白细胞介素 1 β 和白细胞介素 18 的表达。作者通过建立基于泛素裂解的酵母双杂交技术发现 CD1d 能与信号调节蛋白 α (signal regulatory protein- α , SIRP α) 直接相互作用。SIRP α 又被称为非受体类型底物 1(non-receptor type substrate 1, PTPNS1)、含 SH2 域的蛋白酪氨酸磷酸酶底物 1(SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate 1, SHPS1)、CD172A 或 P84, 是 SIRP 家族中典型的抑制性膜蛋白^[11-12]。SIRP α 含有与抑制性免疫受体酪氨酸抑制基序 (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs, ITIMs) 一致的酪氨酸残基, 而介导 SIRP α 与蛋白酪氨酸磷酸酶 2(phosphatase SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2, SHP2) 的联系, 同时在胞质区域有 4 个酪氨酸残基是潜在的磷酸化位点, 通过磷酸化诱导特征明确的抑制信号^[13]。在肿瘤细胞免疫逃逸机制中, CD47 在各种类型的实体瘤中呈高表达, 与 SIRP α 形成信号复合体, 使这些癌细胞逃脱巨噬细胞介导的吞噬^[13], 也参与调节多种

髓系细胞的活性，特别是 CD8⁺T 细胞^[14]。抑制巨噬细胞的吞噬作用似乎由下游招募的 SHP-1/SHP-2 激酶介导^[15]。同时，SIRPα 通过负调控 p38-MAPK、NF-κB 而降低 COX-2 和细胞因子的表达，该通路于 CD1d 模式一致。此研究主要验证 CD1d 参与调控 NLRP3 炎症因子表达，并且进一步证明 CD1d 是通过 SIRPα 来达到调控目的。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验，两组数据间比较采用独立样本 *t* 检验，多组数据间比较采用方差分析。

1.2 时间及地点 实验于 2019 年 1 月至 2021 年 1 月在中部战区总医院基础医学实验室及中枢神经系统肿瘤发生与干预湖北省重点实验室完成。

1.3 材料 脂多糖 (美国 Sigma-Aldrich 公司, 货号 L2630); 核酸染料 (北京索莱宝科技有限公司, 货号: G5560); TAE Buffer [生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 货号: B548101-0500]; 琼脂糖 (北京百奥斯科生物技术有限公司, 货号: MD912987); 293T 细胞株 (武汉大学细胞库); RAW264.7 细胞株 (北京百奥斯科生物技术有限公司); p38MAPK 抗体 (武汉 Protintech 公司, 批号: 14064-1-AP); CD1d 抗体 (武汉 Protintech 公司, 批号: 17336-1-AP); pro-IL-18 抗体 (武汉 Protintech 公司, 批号: 60070-1-Ig); GAPDH 抗体 (武汉 Protintech 公司, 批号: 60004-1-Ig); FLAG 抗体 (武汉 Protintech 公司, 批号: 20543-1-AP); HA 抗体 (武汉 Protintech 公司, 批号: 51064-2-AP); pro-p38 抗体 (美国 Abcam 公司, 批号: ab178867); NLRP3 抗体 (美国 Abcam 公司, 批号: ab214185); pro-IL-1β 抗体 (美国 Affinity Biosciences 公司); Trizol (美国 Invitrogen 公司, 货号: 15596026); RIPA 裂解液 (北京酷来搏科技有限公司, 货号: SL1010); rProtein A Beads 琼脂糖珠 (武汉勤致杰生物技术有限公司, 货号: SA015005); Re-vertAid Reverse Transcriptase Kit 试剂盒 (美国 ThermoFisher 公司); 荧光定量试剂盒 (美国 KAPA BIOSYSTEMS 公司); pHBLV-CMV-MCS-3FLAG-EF1-ZsGreen-T2A-puromycin、pHBLV-CMV-MCS-EF1-ZsGreen1-T2A-puromycin、pSPAX2、pMD2G 质粒 [汉恒生物科技 (上海) 有限公司]; GV493、Helper 1.0、Helper 2.0 质粒 (上海吉凯基因化学技术有限公司); 引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成。

1.4 实验方法

1.4.1 慢病毒载体构建及病毒包装 将过表达 CD1d、SIRPα 基因序列分别构建到穿梭质粒 pHBLV-CMV-MCS-3FLAG-EF1-ZsGreen-T2A-puromycin、pHBLV-CMV-MCS-EF1-ZsGreen1-T2A-puromycin 上，采用汉恒的 Lipofiter™ 转染试剂将三质粒 (psPAX2 10 μg、pMD2G 5 μg 和穿梭质粒 10 μg) 共转染 293T 细胞。将 SIRPα-RNAi 干扰序列构建到穿梭质粒 GV493 上，采用吉凯转染试剂将三质粒 (GV493 载体质粒 20 μg、pHelper 1.0 载体质粒 15 μg、pHelper 2.0 载体质粒 10 μg) 共转染 293T 细胞，转染后 48 h 分别收集病毒上清液，采用超速离心 (4 °C

82 700×g 离心 120 min) 的浓缩纯化方式得到高滴度的慢病毒保存液，进行基因测序。

1.4.2 验证慢病毒是否构建成功 采用含体积分数为 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基复苏 293T 细胞，并在体积分数为 5%CO₂、95% 湿度、37 °C 的恒温培养箱中培养；待细胞密度达到 80%，使用 3%EDTA 胰蛋白酶消化，1 : 3 比例进行传代。待细胞状态良好，收集细胞接种至 6 孔板，细胞浓度为 1×10⁵ L⁻¹，过表达 CD1d 组进行慢病毒感染。采用含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养基复苏小鼠巨噬细胞 RAW264.7，培养条件同上，接种 6 孔板后过表达 SIRPα、SIRPα-RNAi 干扰慢病毒分别感染，48，72 h 后荧光显微镜下观察转染情况，并收集细胞进行反转录 - 定量聚合酶链式反应 (reverse transcription quantitative PCR, RT-qPCR) 及蛋白质印迹 (Western blot) 检测基因及蛋白表达。

1.4.3 免疫共沉淀实验验证 CD1d 与 SIRPα 相互作用 将 293T 细胞分成 3 组，即过表达 CD1d 组、过表达 SRIPα 组，过表达 CD1d+SRIPα 共感染组。用过表达 CD1d、SRIPα 慢病毒分别感染 72 h 后收集各组细胞，1 mL RIPA 工作液制备细胞裂解液，一部分蛋白进行 Western blot 实验 (Input)，另一部分蛋白加入 FLAG 抗体 (CD1d 携带的标签) 室温孵育 2 h，再加入 Protein A 琼脂糖珠 (100 mL/L) 捕捉抗原抗体复合物，收集沉淀后的蛋白用 SIRPα 抗体进行 Western blot 实验 (Output)。

1.4.4 RT-qPCR 检测过表达 CD1d 后 NLRP3 等 mRNA 的表达 收集过表达 CD1d 慢病毒感染 72 h 后的 RAW264.7 细胞，分为过表达 CD1d 组及正常组。使用 Trizol 法提取总 RNA，检测 A₂₆₀/A₂₈₀ 的比值和样品浓度，采用反转录试剂盒将 RNA 反转录成模板 cDNA，再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增 (PCR 设置条件: 95 °C 180 s, 95 °C 3 s, 60 °C 30 s, 40 个循环)。以 GAPDH 为内参，用 2^{-ΔΔCt} 法计算 NLRP3、pro-IL-1β/pro-IL-18 相对表达量。所用引物序列见表 1。

表 1 | RT-qPCR 引物序列

Table 1 | Primer sequences of RT-qPCR

基因	引物序列	产物长度 (bp)
NLRP3	F: CGT GTT GTC AGG ATC TCG CA	210
	R: GGT TGG TTT TGA GCA CAG AGG	
pro-IL-1β	F: CCT GCT GGT GTG TGA CGT TC	245
	R: TGC CGT CTT TCA TTA CAC AGG A	
pro-IL-18	F: TCC TCT TGG CCC AGG AAC AAT	117
	R: TCC AGG TCT CCA TTT TCT TCA GG	
GAPDH	F: TCC AGG TCT CCA TTT TCT TCA GG	169
	R: TCG CTC CTG GAA GAT GGT GAT	
CD1d	F: GGC AGC TTT CAT CAC ACC CT	154
	R: TGC TTG TCC CTG GTA GGT CT	
SIRPα	F: AAC CAC ACG GAG TAT GCC AG	184
	R: ACC ACG GTC CCA TTC ACT TC	

表注: F 为正向; R 为反向

1.4.5 琼脂糖凝胶电泳验证 RT-qPCR 产物 称取 1 g 琼脂糖置于锥形瓶中，加入 100 mL×TAE Buffer 稀释缓冲液，放入微波炉里加热 2 min，取出加入 10 μL 10 000×SolarRed 核酸染料，

上样电泳 (电压: 160 V, 电流: 184 mA, 时间: 30 min), 凝胶成像分析仪紫外灯波长 302 nm, 拍照。根据引物计算扩增产物大小, 比对电泳条带是否与目的产物相符。

1.4.6 调控 SIRP α 后 RT-qPCR、Western blot 检测下游因子表达 过表达 SIRP α 、SIRP α -RNAi 干扰慢病毒感染 RAW264.7 细胞, 分为过表达 SIRP α 组、SIRP α -RNAi 干扰组及正常组, 48 h 后加入嘌呤霉素 (2 g/L) 筛选稳转细胞株, 最后使用脂多糖 (2 mg/L) 分别刺激各组细胞 0, 12, 24 h, 用预冷 PBS 洗涤细胞 2 遍, 加入 100 μ L RIPA 工作液冰上裂解 30 min, 离心 (4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 10 min) 后取上清即为提取的总蛋白, 上清中加入 5 \times 蛋白上样缓冲液沸水中变性 5 min, 配置 15%SDS-PAGE 分离胶电泳 (条件: 80 V, 30 min; 120 V, 90 min)。

将分离胶条带转印至 PVDF 膜 (条件: 150 mA, 70 min), 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后, 加入一抗孵育过夜 (p38、p-p38、NLRP3、pro-IL-1 β 、pro-IL-18、GAPDH), TBST 洗膜 5 遍, 加入二抗孵育 2 h, 洗膜 5 遍后 ECL 化学发光试剂液 (A 液 : B 液 = 1 : 1) 显色 3 min, 凝胶成像曝光仪曝光并拍摄图片, 采用 Image J 软件进行分析。RT-qPCR 实验方法如 1.4.4 所述。

1.5 主要观察指标 ①细胞生长状态; ②慢病毒感染情况; ③ NLRP3、pro-IL-1 β 、pro-IL-18 基因表达水平及 p38、p-p38、NLRP3、pro-IL-1 β 、pro-IL-18 蛋白表达水平。

1.6 统计学分析 采用 GraphPad Prism 5.0 软件作柱状图; IBM SPSS(V25.0, Armonk, NY, IBM Corp) 进行数据分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析, *P* < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 慢病毒构建及验证

2.1.1 慢病毒载体构建及病毒包装 将目的基因 CD1d、SIRP α 和 SIRP α -RNAi 干扰序列克隆至 pHBLV-CMV-MCS-3FLAG-EF1-ZsGreen-T2A-puromycin、pHBLV-CMV-MCS-EF1-ZsGreen1-T2A-puromycin、GV493 载体质粒。如图 1A 所示, 质粒 pHBLV-CMV-MCS-3FLAG-EF1-ZsGreen-T2A-puromycin 在 1-952 的位置与 CD1d 目的基因序列完全一致; 如图 1B 所示, 质粒 pHBLV-CMV-MCS-3FLAG-EF1-ZsGreen-T2A-puromycin 在 1-1288 位置与 SIRP α 目的基因序列完全一致; 如图 1C 所示, GV493 质粒序列中含有与设计的 SIRP α -RNAi 干扰序列 (CCG GGC AAG CAT TGA GAC AGG CAA ACT CGA GTT TGC CTG TCT CAA TGC TTG CTT TTT g) 完全一致。以上说明慢病毒载体构建成功, 可用于后续实验。

2.1.2 慢病毒构建验证

(1) 荧光显微镜下观察慢病毒感染细胞的 GFP 荧光标记情况: 生长状态良好的 293T 细胞、RAW264.7 细胞, 慢病毒感染 48 h 后, 荧光显微镜下观察结果: 添加目的基因实验组及阴性载体对照组, 因有 GFP 标记, 所以镜下可见绿

色荧光。根据公式 (病毒感染率 = 荧光细胞数 / 明视野细胞数 $\times 100\%$) 计算感染率。①如图 2 所示, 过表达 CD1d 组病毒感染率为 (85.462 \pm 1.316)%; 过表达 SIRP α 组病毒感染率为 (86.593 \pm 1.928)%; 过表达 CD1d+SIRP α 共感染组病毒感染率为 (79.724 \pm 1.731)%; 阴性对照组病毒感染率为 (80.219 \pm 1.579)%。空白对照组因未添加目的基因片段, 无荧光标记, 所以荧光显微镜下无绿色荧光。②如图 3 所示, 过表达 SIRP α 组病毒感染率为 (76.872 \pm 1.740)%; SIRP α -RNAi 干扰组病毒感染率为 (78.371 \pm 1.327)%; 阴性对照组病毒感染率为 (77.825 \pm 1.147)%。空白对照组无绿色荧光。结果提示目的基因成功感染至细胞中, 可以进行下一步实验。

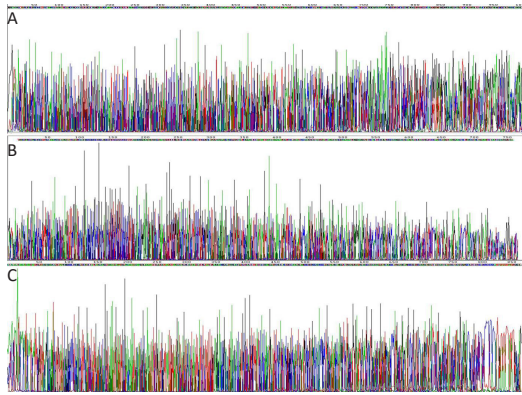
(2) RT-qPCR 和 Western blot 检测基因及蛋白表达验证慢病毒感染情况: 过表达 CD1d、过表达 SIRP α 和 SIRP α -RNAi 干扰慢病毒感染细胞 72 h 后, 结果如图 4 所示, 过表达 CD1d 组 CD1d mRNA 及蛋白表达水平较对照组明显升高 (mRNA: *P* < 0.001; 蛋白: *P* < 0.001); 如图 5 所示, 过表达 SIRP α 组 SIRP α mRNA 及蛋白表达水平较对照组显著升高 (mRNA: *P* = 0.002; 蛋白: *P* = 0.001); SIRP α -RNAi 干扰组 SIRP α mRNA 及蛋白表达水平较对照组显著下降 (mRNA: *P* < 0.001; 蛋白: *P* = 0.001)。综上所述, 慢病毒转染后达到靶向调控目的基因及蛋白的作用, 成功构建过表达 CD1d、过表达 SIRP α 和 SIRP α -RNAi 干扰慢病毒。

2.2 免疫共沉淀证实 CD1d 与 SIRP α 相互作用 如图 6 所示, Input 阳性对照显示各细胞裂解液中含有相应蛋白; Output 显示在含有两种蛋白的裂解液中下拉 CD1d 蛋白后可检测出 SIRP α 蛋白, 证实了 CD1d 与 SIRP α 两蛋白之间存在相互作用。

2.3 过表达 CD1d 组及正常组 RAW264.7 细胞中 NLRP3、pro-IL-1 β 、pro-IL-18 基因表达 如图 7 所示, 过表达 CD1d 组 RAW264.7 细胞 NLRP3、pro-IL-1 β 、pro-IL-18 的表达水平较正常组 RAW264.7 细胞显著降低 (NLRP3: *P* = 0.038; pro-IL-1 β : *P* = 0.012; pro-IL-18: *P* = 0.031)。

2.4 调控 SIRP α 基因表达后对下游基因及蛋白的影响 RT-qPCR 实验结果显示, 脂多糖刺激后, SIRP α -RNAi 干扰组 NLRP3、pro-IL-1 β 、pro-IL-18 基因表达水平较对照组明显升高 (NLRP3: *P* < 0.001; pro-IL-1 β : *P* = 0.019; pro-IL-18: *P* = 0.001); 过表达 SIRP α 组 NLRP3 基因表达水平较对照组明显降低 (*P* = 0.011), 但 pro-IL-1 β 、pro-IL-18 基因表达水平较对照组无明显差异 (pro-IL-1 β : *P* = 0.728; pro-IL-18: *P* = 0.064), 见图 8, 说明 SIRP α 基因能负向调控 NLRP3、pro-IL-1 β 、pro-IL-18 基因。琼脂糖凝胶电泳实验结果显示 RT-qPCR 扩增产物电泳条带位置与目的产物长度相符。

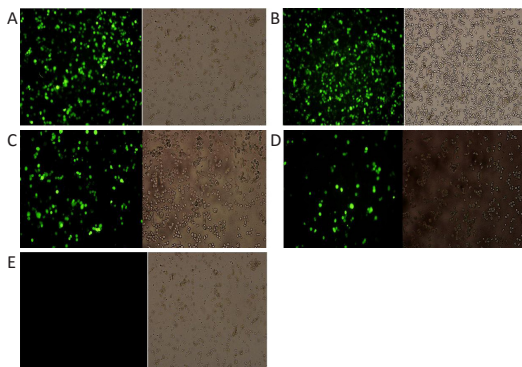
Western blot 实验结果表明, SIRP α -RNAi 干扰组 p38, p-p38、NLRP3、pro-IL-1 β 、pro-IL-18 蛋白表达水平较过表达 SIRP α 组显著升高 (p38: *P* < 0.001; p-p38: *P* = 0.003; NLRP3: *P* = 0.007; pro-IL-1 β : *P* = 0.002; pro-IL-18: *P* = 0.003), 见图 9, 表明 SIRP α 能负向调控下游 p38、p-p38、NLRP3、pro-IL-1 β 、pro-IL-18 蛋白表达。



图注：图中 A 为构建 CD1d 慢病毒载体基因测序结果；B 为构建 SIRP α 慢病毒载体基因测序结果；C 为构建 SIRP α -RNAi 干扰慢病毒载体基因测序结果

图 1 | 慢病毒载体质粒基因测序

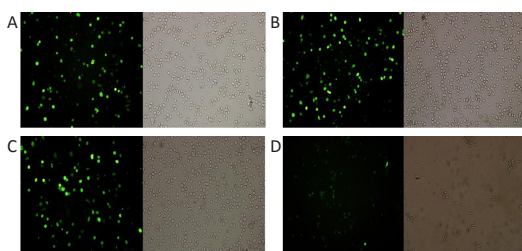
Figure 1 | Sequencing of lentiviral vector plasmid



图注：图中 A 为过表达 CD1d 组，病毒感染率为 (85.462±1.316)%；B 为过表达 SIRP α 组，病毒感染率为 (86.593±1.928)%；C 为过表达 CD1d+SIRP α 共感染组，病毒感染率为 (79.724±1.731)%；D 为阴性对照，病毒感染率为 (80.219±1.579)%；E 为正常 293T 细胞，作为空白对照，无荧光标记

图 2 | 荧光显微镜下感染慢病毒的 293T 细胞 (×200)

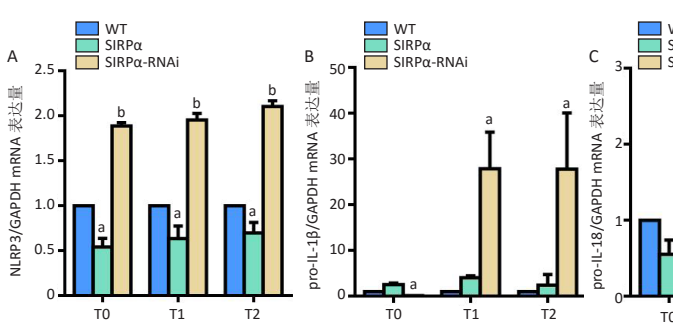
Figure 2 | 293T cells infected with lentivirus under a fluorescence microscope (×200)



图注：图中 A 为过表达 SIRP α 组，病毒感染率为 (76.872±1.740)%；B 为 SIRP α -RNAi 干扰组，病毒感染率为 (78.371±1.327)%；C 为阴性对照组，病毒感染率为 (77.825±1.147)%；D 为空白对照组无绿色荧光

图 3 | 荧光显微镜下感染慢病毒的 RAW264.7 细胞 (×200)

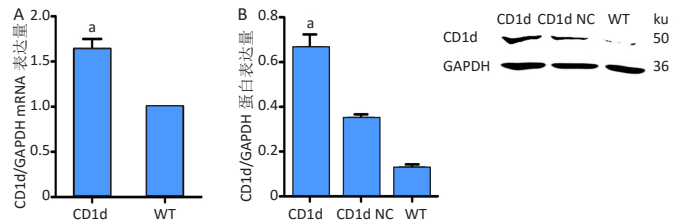
Figure 3 | RAW264.7 cells infected with lentivirus under fluorescence microscope (×200)



图注：图中 A-C 为过表达 SIRP α 组与 SIRP α -RNAi 干扰组 NLRP3、pro-IL-1 β 、pro-IL-18 基因表达水平；T0，T1，T2：脂多糖刺激 0，12，24 h。SIRP α ：过表达 SIRP α 组；SIRP α -RNAi：SIRP α -RNAi 干扰组；WT：正常组；与 WT 组比较，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ ($n=3$)

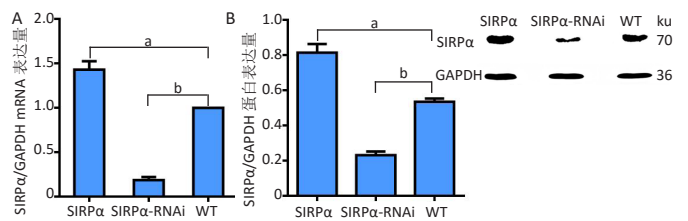
图 8 | 调控 SIRP α 基因后 RAW264.7 细胞 NLRP3、pro-IL-1 β 、pro-IL-18 基因表达

Figure 8 | Expression of NLRP3, pro-IL-1 β and pro-IL-18 genes in RAW264.7 cells after regulation of SIRP α gene



图注：图中 A 为过表达 CD1d 后 293T 细胞中 CD1d mRNA 表达水平，与 WT 组比较，^a $P < 0.05$ ($n=3$)；B 为过表达 CD1d 后 293T 细胞中 CD1d 蛋白表达水平，与 CD1d NC 组及 WT 组比较，^a $P < 0.05$ ($n=3$)。CD1d：过表达 CD1d 组；CD1d NC：阴性对照组；WT：正常组

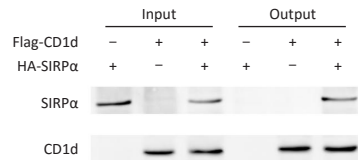
图 4 | 过表达 CD1d 慢病毒感染后 293T 细胞 CD1d mRNA 和蛋白的表达
Figure 4 | Expression of CD1d mRNA and protein in 293T cells after overexpression of CD1d lentivirus infection



图注：图中 A、B 为过表达 SIRP α 和 SIRP α -RNAi 干扰后 RAW264.7 细胞中 SIRP α mRNA 及蛋白表达水平。SIRP α ：过表达 SIRP α 组；SIRP α -RNAi：SIRP α -RNAi 干扰组；WT：正常组；与 WT 组比较，^a $P < 0.05$ ，^b $P \leq 0.001$ ($n=3$)

图 5 | 过表达 SIRP α 、SIRP α -RNAi 干扰慢病毒感染后 RAW264.7 细胞 SIRP α mRNA 和蛋白的表达

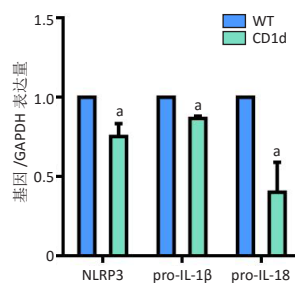
Figure 5 | Overexpression of signal regulatory protein- α (SIRP α) and SIRP α -RNAi interferes with SIRP α mRNA and protein expression in RAW264.7 cells after lentivirus infection



图注：Output 后 Flag-CD1d+HA-SIRP α 组检测出 SIRP α 蛋白，余两组未检测出，说明 CD1d 与 SIRP α 蛋白相互作用，下拉 CD1d 的同时，也下拉了其结合的 SIRP α 蛋白

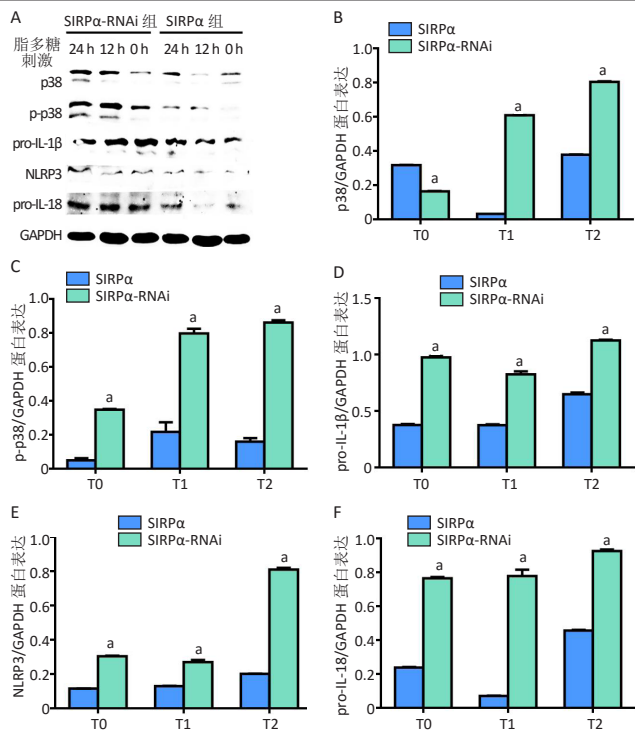
图 6 | 免疫共沉淀证实 CD1d 与 SIRP α 相互作用

Figure 6 | Interaction between CD1d and SIRP α confirmed by co-immunoprecipitation



图注：WT 为正常组；CD1d 为过表达 CD1d 组；与 WT 组相比，^a $P < 0.05$ ($n=3$)

图 7 | 过表达 CD1d 后 RAW264.7 细胞中 NLRP3、pro-IL-1 β 、pro-IL-18 mRNA 的表达
Figure 7 | Expression of NLRP3, pro-IL-1 β and pro-IL-18 mRNA in RAW264.7 cells after overexpression of CD1d



图注：图中 A 为 Western blot 实验检测 p38、p-p38、NLRP3、pro-IL-1 β 、pro-IL-18 蛋白条带；B-F 分别为过表达 SIRP α 组与 SIRP α -RNAi 干扰组 p38、p-p38、pro-IL-1 β 、NLRP3、pro-IL-18 蛋白表达水平；T0, T1, T2: 脂多糖刺激 0, 12, 24 h。与过表达 SIRP α 组比较, $^aP < 0.01(n=3)$

图 9 | 调控 SIRP α 基因后 RAW264.7 细胞中 NLRP3 及相关蛋白表达

Figure 9 | Expression of NLRP3 and related proteins in RAW264.7 cells after regulation of SIRP α gene

3 讨论 Discussion

NLRP3 炎症因子是表达于免疫细胞表面的模式识别受体, 能为固有免疫反应提呈抗原, 在炎症性疾病的发生与发展中发挥着重要作用。多种因素能激活 NLRP3 炎症小体产生, 其机制也相对复杂, 除了经典的细菌、病毒、微生物、ATP、线粒体活性氧 (mtROS)、K⁺ 外流、氧化线粒体 DNA 以外, 近年发现 NEK7、半乳糖氨基半乳糖多糖 (AGA)、动力蛋白接头蛋白去乙酰化酶 6 (HDAC6) 等能触发 NLRP3 炎症小体的组装^[16-18]。而且一些非典型的炎症小体途径和替代的炎症小体途径及 NLRP3 泛素化和磷酸化对 NLRP3 炎症小体的激活起着非常重要的调节作用^[1]。近年来越来越多的 NLRP3 炎症小体抑制剂被发现, 并且在实验研究与临床应用中表现出延缓或减轻相关炎症疾病的潜力。如果能找到有效途径抑制其表达, 阻断炎症反应进程, 这将为炎症性疾病的治疗带来新希望。

近年来发现了大量负向调控 NLRP3 炎症小体的因素, 例如酮体 β -羟丁酸、 β -葡聚糖、乙型肝炎病毒、MCC950、MicroRNA 223、丝胶、干扰素等^[19-24], 主要机制是通过不同作用靶点介导 p38MAPK/NF- κ B 信号通路抑制下游炎症递质的表达, 与该研究 CD1d 通过该通路抑制 NLRP3 炎症因子表达一致^[10]。但 CD1d 与 p38MAPK/NF- κ B 之间联系的研究甚少, 有文章发现在人树突状细胞上 CD1d 表达的增加是通过 PPAR γ 和 RARA 通路以及部分通过 p38MAPK 激活介导, 但机制有待进一步研究。在一些前期工作基础上作者发现 CD1d

能与抑制蛋白 SIRP α 直接结合, 所以推测 CD1d 抑制 NLRP3 及 pro-IL-1 β /pro-IL-18 表达的可能机制: CD1d 在受到刺激后, 迅速与 SIRP α 结合并导致 SIRP α 胞浆区 C-端的酪氨酸磷酸化, 进一步招募 SHP-1 或 SHP-2 激酶抑制下游 p38MAPK 通路, 从而下调 NLRP3 及 pro-IL-1 β /pro-IL-18 mRNA 转录及蛋白表达。

此次研究为证实该机制进行了进一步验证, 结果显示上调巨噬细胞中 CD1d 基因的表达, 发现 NLRP3、pro-IL-1 β /pro-IL-18 基因表达明显降低, 证明了 CD1d 分子对 NLRP3 炎症因子确实有抑制作用。这与最新一项研究指出的 CD1d 通过一个上游事件导致 NF- κ B 激活, 最终介导巨噬细胞中 NLRP3 及其直接底物 IL-1 β 和 IL-18 转录下调一致^[10]。在此之前仅有文献报道癌细胞上过度表达的跨膜蛋白 CD47 能与 SIRP α 蛋白连接, 招募 SHP-1、SHP-2, 激活“不要吃我”信号和抑制巨噬细胞的吞噬功能^[25-29]。但关于 SIRP α 蛋白与 CD1d 的相关性并没有文献进行阐述。免疫共沉淀是以抗体和抗原之间的专一性作用为基础用于研究蛋白质相互作用的经典方法, 是确定两种蛋白质在完整细胞内生理性相互作用的有效方法。此研究的免疫共沉淀结果验证了 SIRP α 蛋白与 CD1d 蛋白相互作用, 这一发现能为 NLRP3 的调控机制提供新靶点及思路。通过进一步调控 SIRP α 基因表达, 发现下调组 RAW264.7 细胞 NLRP3、pro-IL-1 β /pro-IL-18 基因及蛋白表达显著升高, p38/p-p38 蛋白表达也明显升高; 上调组 RAW264.7 细胞 NLRP3 基因及蛋白表达显著降低, p38/p-p38、pro-IL-1 β 、pro-IL-18 蛋白表达也明显降低, 证实了 SIRP α 能通过 p38MAPK/NF- κ B 信号通路负性调控 NLRP3 炎症因子。在一些研究中也表明 SIRP α 通过下游因子 SHP-2 参与 p38MAPK 和 NF- κ B 信号通路的调节^[30-31]。有研究敲除树突状细胞 SIRP α 基因后, 发现 T 淋巴细胞分泌的细胞因子 (肿瘤坏死因子 α /白细胞介素 12/白细胞介素 6) 和干扰素 γ (IFN- γ) 分泌增加^[32]。这些研究都证实 SIRP α 对固有免疫存在负向调节作用。有趣的是, 在上调 SIRP α 后, pro-IL-1 β 、pro-IL-18 基因表达与对照组无明显差异, 这些结果可能与某些旁分泌促炎作用相关, 比如, 白细胞介素 1 β 可以被中性粒细胞衍生的丝氨酸蛋白酶如弹性蛋白酶、组织蛋白酶 G 和蛋白酶 3 激活, 而不依赖于 caspase-1 激活通路^[33]。总而言之, 该实验结果表明: CD1d 通过与信号调节蛋白 SIRP α 结合抑制下游 p38MAPK/NF- κ B 通路, 降低 NLRP3、pro-IL-1 β /pro-IL-18 的表达, 而抑制炎症因子白细胞介素 1 β 和白细胞介素 18 成熟与分泌。

该研究也存在的不足之处: p38MAPK 信号通路中相关因子的磷酸化水平没有得到分析, 虽然已经有很多研究证实 SIRP α 与 p38MAPK/NF- κ B 通路机制, 但是此研究是在特定的巨噬细胞环境, 可能存在一定差异; 没有检测 SIRP α 下游 SHP-1、SHP-2 因子的表达水平, 虽然 SHP-1、SHP-2 在 SIRP α 调控免疫机制中是必不可少的^[34], 但三者之间相互调节机制仍不明朗, 有人认为 SHP-1 可能是 SIRP α 介导的负调控中的一种协同事件, 本质上是 SHP-2 的拮抗剂, 当 SIRP α 水平降

低导致 SHP-2 与 SIRP α 的解离, SHP-2 才能发挥作用^[27], 这有待在完整免疫系统环境中进一步验证。另外, 一部分人认为 CD1d 下调会导致疾病发生。例如肿瘤通过下调 CD1d 和扰乱细胞信号通路损害 CD1d/NKT 细胞轴的途径实现免疫逃逸^[35]。另一部分人则认为 CD1d 的过度表达与某些疾病相关, 如乳腺癌的进展阶段被证实与 CD1d 的表达呈正相关^[36], 所以对于上调 CD1d 在临床患者治疗中的收益问题仍存在争议, 有待更完善的机制研究和下一步的临床试验予以佐证。最后, CD1d 与 SIRP α 的相互作用是否为引起 NLRP3、pro-IL-1 β 以及 pro-IL-18 表达变化的必要条件, 还需进一步研究。如果能在本研究基础上, 阻断两者结合, 再观察下游炎症因子表达, 这将能说明 CD1d 与 SIRP α 的结合是否为引起 NLRP3、pro-IL-1 β 以及 pro-IL-18 表达变化的必要条件。

综上所述, 研究发现 CD1d 能显著抑制 NLRP3 炎症因子的表达, 并验证了其具体机制是通过与 SIRP α 结合抑制 p38MAPK/NF- κ B 信号通路而下调下游相关性炎症因子的表达。虽然抑制 NLRP3 炎症因子靶点被大量发现, 但是存在不稳定、位点难调控等各种问题。关于免疫细胞分泌的 MHC I 类 CD1d 分子的研究相对成熟^[37-38], 更容易找到调控细胞分泌的方式, 同时 SIRP α 在该通路起着至关重要的作用, 这都将为 NLRP3 相关性疾病的治疗提供更多思路。

作者贡献: 实验设计为刁波、刘跃平、向明芝, 实验实施为向明芝、袁紫林、王刚、程洁, 实验评估为刁波、刘跃平。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金项目(81971478, 81771691)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验用 239T 细胞购自武汉大学细胞库, 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 购自北京百奥赛科生物技术有限公司, 该研究为体外细胞基础实验, 未涉及伦理学问题。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过武汉科技大学生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

[1] KELLEY N, JELTEMA D, DUAN Y, et al. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13):3328.

[2] ZHANG T, DU H, FENG S, et al. NLRP3/ASC/Caspase-1 axis and serine protease activity are involved in neutrophil IL-1 β processing during Streptococcus pneumoniae infection. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;513(3):675-680.

[3] THEOFANI E, SEMITEKOLOU M, MORIANOS I, et al. Targeting NLRP3 Inflammasome Activation in Severe Asthma. *J Clin Med.* 2019;8(10):1615.

[4] YAO ST, CAO F, CHEN JL, et al. NLRP3 is Required for Complement-Mediated Caspase-1 and IL-1 β Activation in ICH. *J Mol Neurosci.* 2017;61(3):385-395.

[5] ZHEN Y, ZHANG H. NLRP3 Inflammasome and Inflammatory Bowel Disease. *Front Immunol.* 2019;10:276.

[6] GUO S, YANG C, DIAO B, et al. The NLRP3 Inflammasome and IL-1 β Accelerate Immunologically Mediated Pathology in Experimental Viral Fulminant Hepatitis. *PLoS Pathog.* 2015;11(9):e1005155.

[7] MELUM E, JIANG X, BAKER KD, et al. Control of CD1d-restricted antigen presentation and inflammation by sphingomyelin. *Nat Immunol.* 2019;20(12):1644-1655.

[8] INUKI S, HIRATA N, KASHIWABARA E, et al. Polar functional group-containing glycolipid CD1d ligands modulate cytokine-biasing responses and prevent experimental colitis. *Sci Rep.* 2020;10(1):15766.

[9] LEE C, HONG SN, KIM YH. A glycolipid adjuvant, 7DW8-5, provides a protective effect against colonic inflammation in mice by the recruitment of CD1d-restricted natural killer T cells. *Intest Res.* 2020;18(4):402-411.

[10] CUI S, WANG C, BAI W, et al. CD1d1 intrinsic signaling in macrophages controls NLRP3 inflammasome expression during inflammation. *Sci Adv.* 2020;6(43):eaaz7290.

[11] BARCLAY AN, BROWN MH. The SIRP family of receptors and immune regulation. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(6):457-464.

[12] DE VOS AF, VAN DER POLL T. SIRP- α instructs alveolar macrophages to stop eating after pneumonia. *Nat Immunol.* 2020;21(6):601-603.

[13] ZHANG W, HUANG Q, XIAO W, et al. Advances in Anti-Tumor Treatments Targeting the CD47/SIRP α Axis. *Front Immunol.* 2020;11:18.

[14] LOGTENBERG MEW, SCHEEREN FA, SCHUMACHER TN. The CD47-SIRP α Immune Checkpoint. *Immunity.* 2020;52(5):742-752.

[15] VEILLETTE A, TANG Z. Signaling Regulatory Protein (SIRP) α -CD47 Blockade Joins the Ranks of Immune Checkpoint Inhibition. *J Clin Oncol.* 2019;37(12):1012-1014.

[16] HE Y, ZENG MY, YANG D, et al. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature.* 2016;530(7590):354-357.

[17] BRIARD B, FONTAINE T, SAMIR P, et al. Galactosaminogalactan activates the inflammasome to provide host protection. *Nature.* 2020;588(7839):688-692.

[18] MAGUPALLI VG, NEGRO R, TIAN Y, et al. HDAC6 mediates an aggressive-like mechanism for NLRP3 and pyrin inflammasome activation. *Science.* 2020;369(6510):eaas8995.

[19] YOUM YH, NGUYEN KY, GRANT RW, et al. The ketone metabolite β -hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nat Med.* 2015;21(3):263-269.

[20] CAMILLI G, BOHM M, PIFFER AC, et al. β -Glucan-induced reprogramming of human macrophages inhibits NLRP3 inflammasome activation in cryopyrinopathies. *J Clin Invest.* 2020;130(9):4561-4573.

[21] YU X, LAN P, HOU X, et al. HBV inhibits LPS-induced NLRP3 inflammasome activation and IL-1 β production via suppressing the NF- κ B pathway and ROS production. *J Hepatol.* 2017;66(4):693-702.

[22] WARD R, LI W, ABDUL Y, et al. NLRP3 inflammasome inhibition with MCC950 improves diabetes-mediated cognitive impairment and vasoneuronal remodeling after ischemia. *Pharmacol Res.* 2019;142:237-250.

[23] LIU D, CHEN C, WANG D, et al. Effect of sericin on the p38MAPK signaling pathway and NLRP3 inflammasome in the kidney of type 2 diabetic rats. *Exp Ther Med.* 2020;20(6):267.

[24] SHAO BZ, XU ZQ, HAN BZ, et al. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. *Front Pharmacol.* 2015;6:262.

[25] RAMESH A, KUMAR S, NANDI D, et al. CSF1R- and SHP2-Inhibitor-Loaded Nanoparticles Enhance Cytotoxic Activity and Phagocytosis in Tumor-Associated Macrophages. *Adv Mater.* 2019;31(51):e1904364.

[26] RAY M, LEE YW, HARDIE J, et al. CRISPRed Macrophages for Cell-Based Cancer Immunotherapy. *Bioconjug Chem.* 2018;29(2):445-450.

[27] HAYAT SMG, BIANCONI V, PIRRO M, et al. CD47: role in the immune system and application to cancer therapy. *Cell Oncol (Dordr).* 2020;43(1):19-30.

[28] ORONSKY B, CARTER C, REID T, et al. Just eat it: A review of CD47 and SIRP- α antagonism. *Semin Oncol.* 2020;47(2-3):117-124.

[29] HUANG CY, YE ZH, HUANG MY, et al. Regulation of CD47 expression in cancer cells. *Transl Oncol.* 2020;13(12):100862.

[30] KONG XN, YAN HX, CHEN L, et al. LPS-induced down-regulation of signal regulatory protein (alpha) contributes to innate immune activation in macrophages. *J Exp Med.* 2007;204(11):2719-2731.

[31] LI XJ, GOODWIN CB, NABINGER SC, et al. Protein-tyrosine phosphatase Shp2 positively regulates macrophage oxidative burst. *J Biol Chem.* 2015;290(7):3894-3909.

[32] LI X, ZHOU W, LIANG Y, et al. The Immunotherapeutic Effect of SIRP α -Silenced DCs against Cervical Cancer. *J Immunol.* 2020;2020:1705187.

[33] KRISHNAN SM, SOBEY CG, LATZ E, et al. IL-1 β and IL-18: inflammatory markers or mediators of hypertension? *Br J Pharmacol.* 2014;171(24):5589-5602.

[34] HARA K, SENGU T, BISWAS MH, et al. Recovery of anoikis in Src-transformed cells and human breast carcinoma cells by restoration of the SIRP α 1/SHP-2 signaling system. *Cancer Res.* 2011;71(4):1229-1234.

[35] BRUTKIEWICZ RR, YUNES-MEDINA L, LIU J. Immune evasion of the CD1d/NKT cell axis. *Curr Opin Immunol.* 2018;52:87-92.

[36] SHYANTI RK, SEHRAWAT A, SINGH SV, et al. Zerbubone modulates CD1d expression and lipid antigen presentation pathway in breast cancer cells. *Toxicol In Vitro.* 2017;44:74-84.

[37] NI C, WU P, WU X, et al. Thymosin α 1 enhanced cytotoxicity of iNKT cells against colon cancer via upregulating CD1d expression. *Cancer Lett.* 2015;356(2 Pt B):579-588.

[38] KOHLGRUBER AC, DONADO CA, LAMARCHE NM, et al. Activation strategies for invariant natural killer T cells. *Immunogenetics.* 2016;68(8):649-663.

(责任编辑: MZH, ZN, ZJP)