

文章编号:2095-7386(2022)02-0033-05

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2022.02.006

昼夜节律异常对小鼠脾脏免疫功能的影响

张世杰,余佳乐,刘志国

(武汉轻工大学 生命科学与技术学院,武汉 430023)

摘 要:研究昼夜节律异常对小鼠脾脏免疫功能的影响。采用 14 月龄的节律基因 *Per1/Per2* 双敲除(*Per1*^{-/-}/*Per2*^{-/-})雄性 C57BL/6 小鼠(双敲除组,DKO)与野生型的雄性 C57BL/6 小鼠(野生组,WT),测量体重、脾脏重量,同时,对脾脏组织进行 HE 染色、免疫组化、转录组测序以及脾脏 B 细胞和 T 细胞的流式细胞检测,分析节律基因敲除所导致的节律异常对小鼠脾脏免疫功能的影响。结果显示:与野生型相比,双敲除组脾脏指数增加,HE 染色显示脾脏白髓变薄,动脉周围淋巴鞘消失且边缘区消失;流式细胞检测结果显示,双敲除组的 B 细胞和 T 细胞的比例都显著下降。TFR1 免疫组化显示 DKO 小鼠出现铁死亡表现,转录组测序结果显示双敲除组铁死亡途径显著激活,其中参与脂质过氧化的 *Acs14*、*Lpcat3* 基因表达显著上调,及谷胱甘肽合成的 *Gclm*、*Gclc* 基因表达显著上调。所得结论:*Per1/Per2* 双敲除节律异常小鼠脾脏免疫功能降低,可能涉及铁死亡途径。

关键词:节律;铁死亡;免疫力;转录组测序

中图分类号:R 318.12

文献标识码:A

Effect of abnormal circadian rhythm on spleen immune function in mice

ZHANG Shi-jie, YU Jia-le, LIU Zhi-guo

(School of Life Science and Technology, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: To study the effect of abnormal circadian rhythm on spleen immune function of mice. Body weight, spleen weight and tissue morphology of 14-month-old male C57BL/6 mice with *Per1/Per2* double knockout (DKO) and wild-type male C57BL/6 mice (wild group) were measured by HE staining, immunohistochemistry and transcriptome sequencing. At the same time, flow cytometry were performed on spleen B cells and T cells. To analyze the effect of abnormal rhythm induced by rhythm gene knockout on spleen immune function of mice. The results showed that compared with the wild type, spleen index was higher in the double knockout group, the spleen white pulp was thinner, the periarterial lymphatic sheath disappeared and the marginal area disappeared. Flow cytometry results showed that the proportions of B cells and T cells in the double knockout group were significantly decreased. TFR1 immunohistochemistry showed ferroptosis in DKO mice spleen. Transcriptome sequencing results showed that *Acs14*, *Lpcat3*, *Gclm* and *Gclc* genes were significantly up-regulated, promoting lipid peroxidation and glutathione synthesis. **Conclusion:** The spleen function of *Per1/Per2* double knockout mice with abnormal rhythm decreased, which might be involved in ferroptosis.

Key words: rhythm; ferroptosis; immunity; transcriptome sequencing

收稿日期:2022-03-24.

作者简介:张世杰(1995-),男,硕士研究生,1758082883@qq.com.

通信作者:刘志国(1963-),男,教授,博士,zhiguo_1@126.com.

1 引言

免疫系统是机体生理系统的一部分。与其他生理节律一样,免疫节律受到各级内源性中枢和外周机制的调节。这主要包括视交叉神经上核(SCN)以及神经和内分泌的调节^[1]。Bourin P 等人发现,人类的淋巴细胞数量,包含 T 细胞以及 B 细胞,均是白天较低,夜间升高^[2],具有昼夜节律。同时,生物钟基因(*Bmal1*, *Clock*, *Cry*, *Per*)广泛存在于机体各免疫器官、组织和细胞中,使免疫细胞功能及多种免疫参数呈现显著的昼夜节律性变化,从而在维持免疫稳态中发挥重要作用^[3]。杨红莲等人通过研究轮班作业引起的昼夜节律紊乱对机体免疫能力的影响,证明了节律基因会影响血清细胞因子的表达进而影响机体的免疫调控功能^[4]。

在机体的免疫系统中,脾脏是人体最大的周围淋巴器官,其按结构和功能可分为红髓、白髓和介于二者之间的边缘区,红髓内含中性粒细胞,单核细胞,树突状细胞(DC), γ - δ T 细胞和巨噬细胞等多种免疫细胞,白髓含有 T 细胞区和 B 细胞区,边缘区对抗原起到识别、吞噬、呈递作用^[5]。同时,脾脏免疫系统的功能也具有节律性,随着昼夜的交替而发生振荡,免疫功能节律的紊乱会导致疾病的发生^[6]。在近些年的研究中,对于节律与机体整体免疫的关系都有所研究,但对于脾脏免疫功能与节律的联系并没有提及。

因此在本文中,主要观察节律基因 *Per1/Per2* 敲除后,小鼠节律紊乱对于脾脏免疫功能的影响,以及脾脏免疫功能降低与铁死亡的关系。

2 材料与方法

2.1 实验动物与处理

选取 14 月龄的野生型与 *Per1/Per2* 双敲除雄性 C57BL/6 小鼠(本实验室的保种繁育小鼠^[7]),随机分为野生组(Wild type, WT)和 *Per1/Per2* 双敲除组(Double knockout, DKO),每组 10 只。按常规正常饲料喂养^[7],自由饮水。

2.2 实验仪器与试剂

微量移液器(Eppendorf, 美国),电子天平(BW3200S, 上海精密仪器仪表有限公司, 中国),台式高速冷冻离心机(D-37520, Centrifuge, 德国),漩涡振荡器(Vortex-2, 上海沪析实业有限公司, 中

国),实时荧光定量 PCR 仪(CFX96, Bio-rad, 美国),超微量分光光度计(Nanodrop-721, Thermo, 美国),倒置光学显微镜(ECLIPSE E200, NIKON, 日本),流式细胞仪(CytoFLEX, Beckman Coulter, USA)。

FITC 抗鼠 CD³⁺ 单克隆抗体(北京四正柏生物科技有限公司), APC 抗鼠 CD¹⁹ 单克隆抗体(Biolegend, USA), 脾脏淋巴细胞分离液(北京索莱宝科技有限公司), RIPA 细胞培养基(北京索莱宝科技有限公司), iTaq Universal SYBR © Green Supermix (Bio-rad, 美国)。

2.3 脾脏指数测定与脾脏组织学观察

小鼠采用 CO₂ 麻醉后引颈处死,处死前禁食 12 h, 称重。取小鼠脾脏称重, 计算脾脏指数。加 4% 多聚甲醛固定脾脏组织, 乙醇梯度脱水后浸蜡包埋, 修块并使用石蜡切片机切片。制片后, HE 染色使用苏木精和伊红染色, 脱水透明用中性树胶封存。免疫组化采用 60% 异丙醇浸洗, 之后使用山羊血清封闭, 室温孵育清洗后加入铁蛋白结合受体(TFR1)工作液, 过夜冲洗后加入二抗工作液, 孵育后冲洗, 加入辣根酶工作液, 孵育冲洗后, 显色剂 DAB 显色后脱水, 封片。HE 染色和免疫组化分别在光学显微镜物镜 100 倍和 400 倍下观察并拍照。

2.4 转录组测序

使用 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂针对小鼠脾脏中的总 RNA 进行提取, Oligo(dT) 磁珠富集总 RNA 中带有 polyA 结构的 mRNA, RNA 样品检测使用生物分析仪 Agilent2100 进行检测及文库建立。每组每 3 只小鼠脾脏 RNA 作为一个混样, 每组 3 个混样建库。采用第二代测序技术(Next-Generation Sequencing, NGS), 基于 Illumina HiSeq 测序平台进行双末端(Paired-end, PE)测序。参考基因组的数据来源为 NCBI 数据库(<http://ncbi.nlm.nih.gov/>)。测序工作委托深圳华大基因科技有限公司。

2.5 脾脏淋巴细胞分离以及 B 细胞与 T 细胞的流式检测

将小鼠脾脏取出后放入生理盐水中, 使用注射器柄进行研磨, 之后将研磨液加入 200 目一次性细胞滤网中过筛, 并将滤液加至淋巴细胞分离液上层, 1 000 g 离心后取中层, 加入 PBS 洗涤后 300 g 离心, 之后分别吸取 10⁶ 个细胞使用 proteintech 公司的 CD19(APC), CD3(FITC) 抗体进行孵育, 在洗涤后, 使用流式细胞仪检测并记录数据。

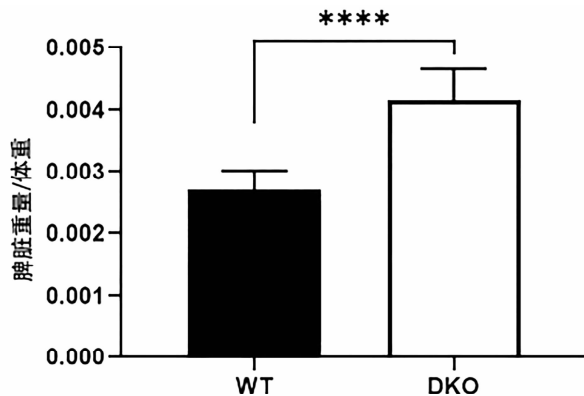
2.6 统计学分析

所有数据采用 t 检验分析统计显著性。数据表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$, $P < 0.05$ 时差异被认为具有统计学意义。

3 结果分析

3.1 脾脏指数

如图 1 所示,14 月龄 DKO 组小鼠脾脏指数较 WT 组小鼠显著增加,且组间差异具有统计学意义 ($P < 0.0001$)。这表明 DKO 小鼠脾脏存在水肿,充血,增生肥大等问题。

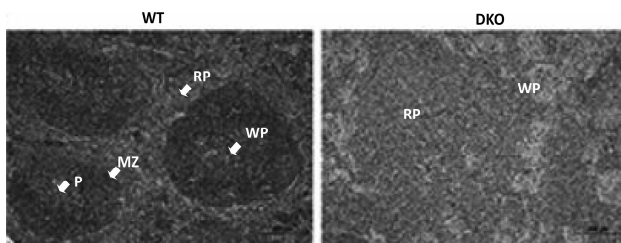


数据均以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, $n = 20$; *, **, ***, **** 分别代表着 $P < 0.05, 0.01, 0.001, 0.0001$

图 1 WT 组与 DKO 组小鼠脾脏指数的差别

3.2 小鼠脾脏 HE 染色结果

小鼠脾脏 HE 染色结果显示:DKO 小鼠脾脏白髓变少,且分界模糊。如图 2 所示。

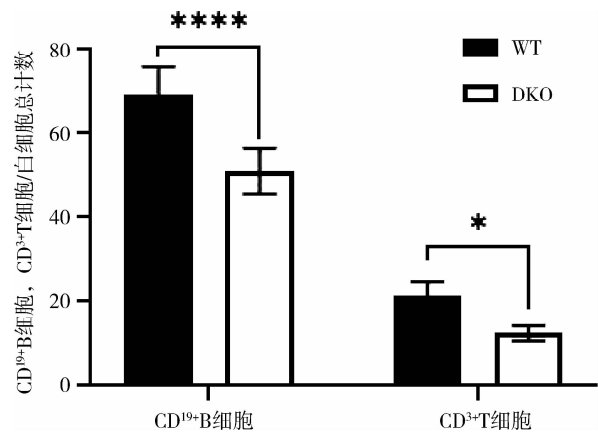


WP:白髓;RP:红髓;P:动脉周围淋巴鞘;MZ:边缘区

图 2 脾脏组织 HE 染色 ($\times 100$)

3.3 小鼠脾脏 B 细胞和 T 细胞的流式结果分析

小鼠脾脏单细胞悬液与抗体孵育后使用流式细胞仪分析并收集数据。结果显示:WT 小鼠脾脏 CD^{19+} B 与 CD^{3+} T 细胞水平显著高于 DKO 小鼠脾脏 ($P < 0.0001$; $P < 0.05$),这说明喂养 14 个月的 DKO 小鼠脾脏相较于 WT 小鼠脾脏免疫力明显降低。如图 3 所示。

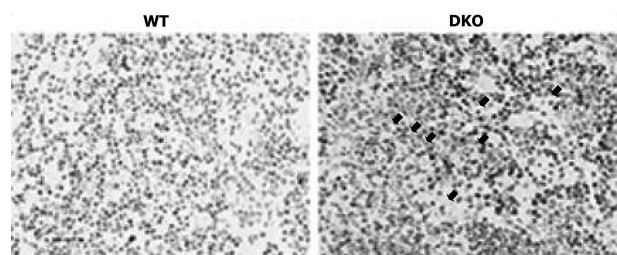


数据均以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, $n = 8$; *, **, ***, **** 分别代表着 $P < 0.05, 0.01, 0.001, 0.0001$

图 3 WT 组与 DKO 组脾脏 CD^{19+} B 细胞, CD^{3+} T 细胞水平的差别

3.4 脾脏 TFR1 免疫组化结果

TFR1 是铁代谢中跨膜糖蛋白,它对于细胞铁离子的摄入十分重要,因此可以作为铁死亡状态的一种评估指标^[8]。将小鼠脾脏切片使用 TFR1 抗体进行免疫组化染色分析,我们发现 DKO 组相比于 WT 组拥有更多的 TFR1 免疫组化印迹,这说明 DKO 小鼠 TFR1 的表达量更多,更易出现铁死亡倾向。如图 4 所示。



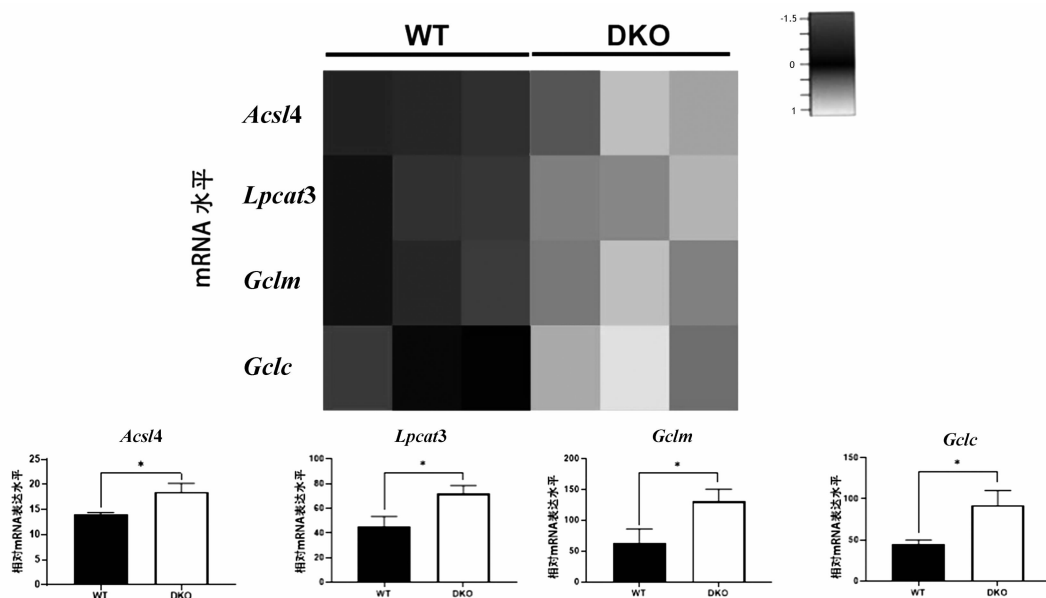
箭头所示为 TFR1 免疫组化印迹

图 4 WT 组与 DKO 组小鼠脾脏 TFR1 免疫组化结果 (400 倍物镜下观察)

3.5 铁死亡途径相关基因 mRNA 表达分析

采用转录组测序获得的相关基因表达的 FPKM 值(每千个碱基的转录每百万映射读取的碎片值)分析如图 4 所示,在铁死亡途径上,DKO 组相较于 WT 组, *Acsl4*, *Lpcat3*, *Gclm*, *Gclc* 基因表达显著上调 ($P < 0.05$)。该通路的 *Acsl4*, *Lpcat3*, *Gclm*, *Gclc* 涉及细胞内的脂质氧化与谷胱甘肽合成。

为了验证转录组差异表达基因 FPKM 分析的可靠性,对这些基因进行定量 RT-PCR 分析。结果表明,与 WT 组相比,DKO 组 mRNA 变化趋势与转录组检测变化基本一致。



(A): 浅色为基因上调, 深色为基因下调; (B): qRT-PCR 检测结果,

数据均以 mean $\pm$ SD 表示, $n = 5$; *, **, ***: 分别代表着 $P < 0.05, 0.01, 0.001$

图5 WT组和DKO组铁死亡途径基因表达热图和qRT-PCR检测结果

4 讨论

在本文中,通过观察正常饮食下,野生型(WT)小鼠和双敲除(DKO)小鼠脾脏结构与脾脏免疫细胞的变化,我们发现,DKO小鼠的脾脏指数增加,HE染色结果显示DKO组的骨髓稀薄,边缘区模糊,提示免疫细胞生发区出现衰减。同时铁蛋白结合受体(TFR1)免疫组化显示DKO组铁死亡标志性产物TFR1表达更多,表明存在铁死亡表现。

转录组测序揭示了Per1, Per2敲除对小鼠脾脏中基因表达量的影响。DKO组中,参与脂质过氧化的Acs14, Lpcat3基因及谷胱甘肽合成的Gclm, Gclc基因表达都显著上调,这说明在DKO小鼠中,谷胱甘肽合成以及氧化脂质合成都有所增加,证明脾脏中存在氧化应激反应的增加。同时,通过了流式细胞仪检测了脾脏CD19⁺B与CD3⁺T细胞水平,发现DKO小鼠T细胞和B细胞比例显著下降。同时, TFR1的免疫组化的结果表明,DKO小鼠脾脏B、T淋巴细胞水平减少可能与铁死亡有关。

铁死亡是一种依赖铁的细胞死亡形式,其特征是脂质过氧化物的积累。不仅如此,铁死亡在介导免疫细胞和免疫治疗的各种功能方面发挥着重要作用^[9]。本研究结果提示昼夜节律基因Per1/Per2的敲除使脾脏免疫细胞水平下降,这可能与铁死亡有关。一般情况下,通过抑制胱氨酸/谷氨酸反向转运

系统,导致脂质活性氧积累引发细胞铁死亡,主要包括胱氨酸/谷氨酸反向转运系统、转硫通路、甲羟戊酸通路等^[10-13],其中节律基因Bmal1的降解使非经典通路激活会引起时钟自噬进而引发铁死亡^[17]。另外,胱氨酸/谷氨酸反向转运系统将细胞内谷氨酸转运至胞外的同时,将胞外胱氨酸转运至胞内,半胱氨酸在转硫通路中合成谷胱甘肽^[14],而谷胱甘肽对于B、T细胞的氧化还原功能是非常重要的。同时,在免疫系统中,T细胞本身会发生铁死亡^[15]。B细胞的不同亚型包括B₁细胞、边缘区(MZ)B细胞、滤泡B细胞和调节性B细胞(Breg)细胞,对铁死亡^[16]也具有敏感性,而我们的研究证明了节律基因Per1/Per2敲除小鼠的T、B免疫细胞更易出现铁死亡,进而对脾脏免疫能力有所影响。

综上所述,Per1^{-/-}, Per2^{-/-}节律异常小鼠脾脏B细胞和T细胞减少,脾脏免疫功能减低,与铁死亡途径有关,这为研究节律基因Per1/Per2敲除小鼠免疫力下降的相关研究提供了依据,也为因节律而免疫紊乱的人群的预防治疗提供了思路。

参考文献:

- [1] 童建. 免疫系统的生物节律[J]. 国外医学(免疫学分册), 1999, (01): 32-35.
- [2] Bourin P, Ledain AF, Beau J, et al. In-vitro circadian rhythm of murine bone marrow progenitor production [J]. Chronobiol Int. 2002, 19 (1):

- 57-67.
- [3] 邢陈,宋伦.昼夜节律在调控免疫系统功能中的作用[J].军事医学,2017,41(03):233-236.
- [4] 杨红莲,刘焕亮,余晓俊,等.昼夜节律紊乱对免疫系统的影响[C]//中国生理学会.2019中国生理学会学术年会暨张锡钧基金第十五届全国青年优秀生理学学术论文交流会及第十三届全国青年生理学工作者学术会议论文摘要.中国生理学会,2019:437.
- [5] 姜洪池,周孟华.脾脏外科临床研究进展与展望[J].中国实用外科杂志,2020,40(01):53-57+61.
- [6] 王庆敏,李科华,唐瑛,等.生物钟基因 *bmal1* 与 *per1* 在小鼠胸腺、脾脏及外周血中表达的近日节律性研究[J].华南国防医学杂志,2019,33(04):228-231.
- [7] 阮梦成. *Per1/Per2* 双敲除对正常与高脂饲喂小鼠肠道菌群昼夜节律影响[D].武汉:武汉轻工大学,2020.
- [8] Feng H, Schorpp K, Jin J, et al. Transferrin receptor is a specific ferroptosis marker[J]. Cell Rep. 2020,30(10):3411-3423. e7.
- [9] 徐杉,闵军霞,王福娣.铁死亡:免疫细胞及免疫治疗中的璀璨新星(英文)[J]. Science Bulletin, 2021,66(22):2257-2260.
- [10] Dixon S J, Lemberg K M, Lamprecht M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of non-apoptotic cell death[J]. Cell, 2012,149(5):1060-1072.
- [11] Yagoda N, Von Rechenberg M, Zaganjor E, et al. RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels[J]. Nature. 2007,447(7146):864-868.
- [12] Angeli J P F, Schneider M, Proneth B, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator *gpx4* triggers acute renal failure in mice[J]. Nat Cell Biol. 2012,4,16(12):1180-1191.
- [13] Yang W S, Sriramaratnam R, Welsch M E, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by *gpx4*[J]. cell, 2014,156(1-2):317-331.
- [14] Bridges R J, Natale N R, Patel S A. System Xc-cystine/glutamate antiporter. an update on molecular pharmacology and roles within the CNS[J]. Br J Pharmacol, 2012,165(1):20-34.
- [15] Muri J, Thut H, Bornkamm GW, et al. B1 and marginal zone B cells but not follicular B2 cells require GPX4 to prevent lipid peroxidation and ferroptosis[J]. Cell Rep 2019,29:2731 - 44.
- [16] Jung Hoon Woo, Yishai Shimoni, Wan Seok Yang, et al. Elucidating Compound Mechanism of Action by Network Perturbation Analysis[J]. Cell. 2015,162(2):441-451.
- [17] Liu J, Yang M, Kang R, Klionsky DJ, et al. Autophagic degradation of the circadian clock regulator promotes ferroptosis[J]. Autophagy. 2019,15(11):2033-2035.

(上接第 32 页)

- [24] Wu P, Huang R, Xiong YL, et al. Protective effects of curcumin against liver fibrosis through modulating DNA methylation[J]. Chin J Nat Med. 2016,14(4):255-264.
- [25] 安晓敏,凯赛尔·托呼提,张翠丽,等.二烯丙基二硫对 D-氨基半乳糖/脂多糖所致小鼠急性肝损伤的保护作用[J].毒理学杂志,2021,35(02):135-139.
- [26] Xie YL, Chu JG, Jian XM, et al. Curcumin attenuates lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver injury by activating Nrf2 nuclear translocation and inhibiting NF- κ B activation[J]. Biomed Pharmacother, 2017,91:70-77.