

文章编号:2095-7386(2023)03-0046-06

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2023.03.007

高脂饮食及昼夜颠倒对小鼠脾脏免疫功能的影响

余佳乐,邱 熠,周文汀,刘志国

(武汉轻工大学 生命科学与技术学院,武汉 432023)

摘 要:探究高脂饮食以及昼夜节律颠倒对于小鼠脾脏免疫功能的影响。将 6~7 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠分为正常膳食组(CON)和高脂膳食组(HFD),每组根据进食时间又分为白天进食(D)和夜间进食(N),总计 4 组,每组 10 只,即:颠倒饮食组(DC)、白天进食高脂组(DH)、正常节律正常饮食组(NC)和高脂进食组(NH)。小鼠饲养 18 周后,取脾脏组织及血液分别进行 B 淋巴细胞分离、流式细胞检测。结果显示:与夜间正常膳食组小鼠脾脏系数 0.37 相比,颠倒饮食组小鼠脾脏指数为 0.4,高脂进食组小鼠脾脏指数为 0.41,指数增加,流式细胞检测结果显示正常节律正常饮食组小鼠脾脏 B 细胞水平显著高于颠倒饮食组小鼠脾脏 B 细胞水平($P<0.001$),正常节律正常饮食组小鼠脾脏 B 细胞水平也显著高于高脂进食组小鼠脾脏 B 细胞水平($P<0.01$),提示昼夜颠倒饮食以及高脂饮食均会导致小鼠免疫系统发生紊乱。因此,颠倒饮食和高脂饮食小鼠 B 淋巴细胞水平均显示节律性波动,但和正常小鼠相比,波动性较为紊乱或颠倒。这些结果表明,高脂饮食以及颠倒饮食均会导致 B 淋巴细胞水平的降低和免疫功能的损害,对免疫系统产生不利影响。

关键词:节律;高脂饮食;免疫;流式

中图分类号:R 151.4⁺1

文献标识码:A

Effects of high-fat diet and circadian reversal on immune function in mice

YU Jiale, QIU Yi, ZHOU Wenting, LIU Zhiguo

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

Abstract: The effects of high fat diet and reversed circadian rhythm on spleen immune function in mice were investigated. Male C57BL/6J mice aged 6—7 weeks were divided into normal diet group (CON) and high fat diet group (HFD), and each group was further divided into daytime diet group (D) and night diet group (N) according to eating time, with a total of 4 groups and 10 mice in each group, namely: Inverted diet group (DC), high-fat daytime diet group (DH), normal rhythm normal diet group (NC), and high-fat diet group (NH). After feeding for 18 weeks, spleen tissue and blood were collected for B lymphocyte isolation and flow cytometry. The results show that: compared with 0.37 in the normal diet group at night, the spleen index of mice in the reversed diet group was 0.4, and that in the high-fat diet group was 0.41. Flow cytometry showed that the spleen B cell level of mice in the normal diet group with normal rhythm was significantly higher than that in the reversed diet group ($P<0.001$). The level of B cells in spleen of mice in normal rhythm diet group was significantly higher than that in high fat diet group ($P<0.01$), suggesting

收稿日期:2023-04-15.

作者简介:余佳乐(1998-),女,硕士研究生,E-mail:1441357470@qq.com.

通信作者:刘志国(1963-),男,教授,E-mail:zhiguo_liu@126.com.

that circadian reversal diet and high fat diet could lead to immune turbulence in mice. Thus, both the inverted diet and the high-fat diet mice showed rhythmic fluctuations in B-lymphocyte levels, but the fluctuations were more disordered or reversed than in normal mice. These results suggest that both a high-fat diet and an inverted diet can adversely affect the immune system by reducing B-lymphocyte levels and impacting immune function.

Key words: rhythm; high fat diet; immunity; flow cytometer

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)以及神经和内分泌系统的调节。昼夜节律紊乱导致机体整体免疫应答能力下降、体液免疫能力亢进等,可能增加自身免疫性疾病发生的风险^[1]。Bourin 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,具有昼夜节律特征^[2]。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,证明了节律相关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^[4-6]。

高脂饮食及其所导致的肥胖常与昼夜节律紊乱相伴随,都会影响机体的免疫系统及免疫功能。大量临床及流行病学资料显示,肥胖患者细胞免疫功能低下,体液免疫有不同程度的紊乱,易感性增加,影响整体循环系统炎症因子水平^[7-9],还潜在威胁多种器官和组织的功能^[10]。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^[11,12],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^[13]。脾脏组织是 T 细胞和 B 细胞定居的场所,T 细胞占 40%,B 细胞占 60%,B 细胞在肿瘤抗原刺激下转化为浆细胞,继而分泌特异性抗肿瘤的免疫球蛋白 IgG,且具有抗原提呈能力^[14]。B 淋巴细胞在机体的适应性免疫反应中发挥着重要作用,主要通过产生抗体、提呈抗原和产生细胞因子(如 IL-4、IL-6 等)发挥免疫调节作用^[15],B 淋巴细胞的含量高低与炎症与免疫能力有关。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^[16]。

昼夜颠倒进食或伴随高脂饮食如何影响机体的免疫功能,及对血液和脾脏免疫细胞数量的具体影响尚不清楚。因此,在本文中,我们通过对比研究昼夜颠倒进食及高脂饮食对小鼠 B 淋巴细胞的影响,为进一步采取临床干预措施提供依据。

2 材料与方法

2.1 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),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 CD4 单克隆抗体(北京四正柏生物科技有限公司),APC 抗鼠 CD9 单克隆抗体(Bioleg-end, 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)。

2.2 动物分组及饮食模型

野生型雄性 C57BL/6 小鼠(7 周龄),购买自湖北省疾病预防控制中心。所有小鼠的饲养、使用及处理过程均遵循相关管理规范条例。将小鼠饲养于动物房室内温度为 22 ± 1 °C,相对湿度为 $60 \pm 5\%$,严格设置 12 h 光照和 12 h 黑的明暗周期循环。

适应性饮食的小鼠可自由饮水,一周后(8 周龄)将它们由体重随机分为 4 组,每组 10 只($n=10$),即:颠倒饮食组(DC)、白天进食高脂组(DH)、正常节律正常饮食小鼠(NC)和高脂进食组(NH),用不同饲料饲养 18 周。

定制饲料常量营养素含量(每卡路里)为:对照组饲料为 10%脂肪,14%蛋白质和 76%碳水化合物(AIN-93M)脂肪来源是玉米油、豆油、猪油或鱼油。所有饮食都根据每卡路里的微量营养素含量、纤维

和抗氧化剂进行匹配。两种实验对照组(Control)和高脂组(HFD)饲料的组成如表 1 所示。实验动物的饲料能量构成如表 2 所示。

表 1 实验动物的饲料配方

Table 1 Diet formulation of experimental animals

原料/(g/kg)	Control	HFD
蔗糖	100	202
麦芽糊精	132	125
玉米淀粉	396	132
纤维素	50	62
玉米油	40	20
豆油	30	30
猪油	0	176
酪蛋白	200	175
L-胱氨酸	2	2
矿物质	35	61
维生素	12	12
酒石酸胆碱	3	3
叔丁基对苯二酚	0	0.045
总能量	1 000	1 000

表 2 实验动物的饲料能量构成

Table 2 Dietary energy composition of experimental animals

组成	Control	HFD
脂肪热量占比/%	10	45.0
蛋白质热量占比/%	14	14.1
碳水化合物热量占比/%	76	40.9
总能量/(kcal/g)	3.6	4.5

2.3 动物处理

小鼠分为四个组后,记录每天进食量(进食量=每天喂食饲料-剩余饲料)和每周体重。喂养 18 周后,小鼠造模完成后,解剖前 12 h 水饮用自由,饲料禁止食用 12 h 后处死小鼠;测量并记录每只小鼠的重量;采用眼球取血;打开腹腔,取出小鼠两侧脾脏组织;去除脂肪等组织后存放于 4 ℃生理盐水中暂存。

2.4 脾脏指数

将取出的脾脏组织去除血渍后称重计算脾脏指数(splenic index, SI),计算公式如下^[17]:

$$\text{脾脏指数(SI)} = \frac{\text{脾脏质量/g}}{\text{体质量/g}}$$

2.5 脾脏中淋巴细胞分离及 B 细胞流式检测

将小鼠另一侧脾脏取出后放入生理盐水中,使用注射器硅胶头进行研磨,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(磷酸

缓冲盐溶液)洗涤后 300 g 离心,用红细胞计数法细胞计数之后,用移液枪吸取不少于 10⁶个细胞使用 CD19(APC)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 mean±SD, $P < 0.05$ 时差异被认为具有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠基础生理指标

小鼠饲养期间,高脂饮食组小鼠进食量显著高于正常饮食小鼠进食量($P < 0.0001$),如图 1 所示。颠倒饮食组与正常节律小鼠组进食量结果如图 2 所示。结果显示:颠倒饮食小鼠对比正常节律小鼠,除去第 2 周,进食量显著增加,组间差异具有统计学意义($P < 0.0001$),且两组均出现波动性的情况,颠倒饮食组和正常节律组进食量最多分别在第 10 周和第 2 周,组间差异最明显是在第 10 周。

进食量的高低直接影响小鼠体重的高低,如图 3 所示,受高脂饮食的影响,高脂饮食小鼠体重显著高于正常饮食小鼠。而同等饮食类型情况下,颠倒进食虽然进食量比正常时间进食组显著增加,但体重尚未显著改变,反映出体重变化较为迟钝,或可理解为机体对维持体重稳定具有一定的调控能力。

DC 组和 NH 组对比结果如图 3 所示,除去第 1 周外,颠倒饮食小鼠对比高脂饮食组小鼠进食量显著增加($P < 0.0001$),两组均出现波动情况,颠倒饮食组进食量最多在第 10 周,高脂饮食组进食量最多在第 1 周,后逐渐下降,组间差异最明显显示在第 10 周。

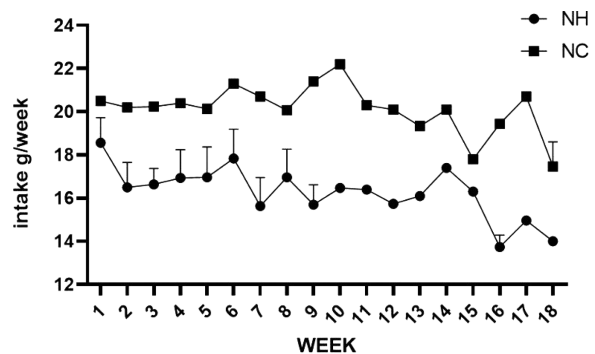
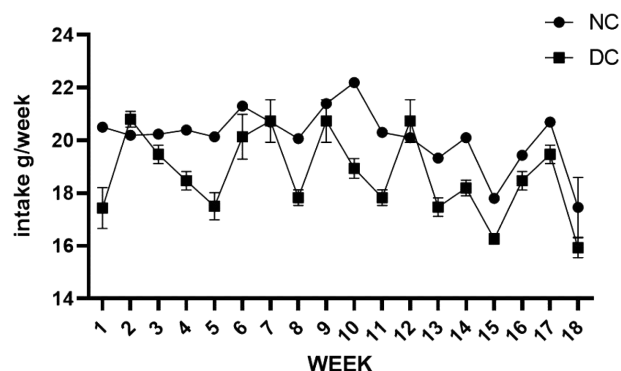


图 1 高脂进食组(NH)和正常节律正常饮食小鼠(NC)小鼠进食量对比

Fig. 1 Comparison of food intake between high-fat diet group (NH) and normal rhythm diet mice (NC)

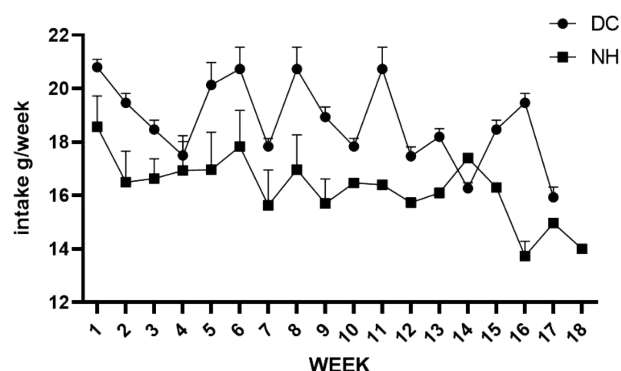


数据服从 t 检验; * * * * : $P < 0.0001$

图 2 颠倒饮食(DC)和正常节律

正常饮食小鼠(NC)小鼠进食量对比

Fig. 2 Comparison of food intake in mice with reversed diet (DC) and normal rhythm diet (NC)



数据服从 t 检验; * * * * : $P < 0.0001$

图 3 颠倒饮食(DC)和

高脂饮食(NH)小鼠进食量对比

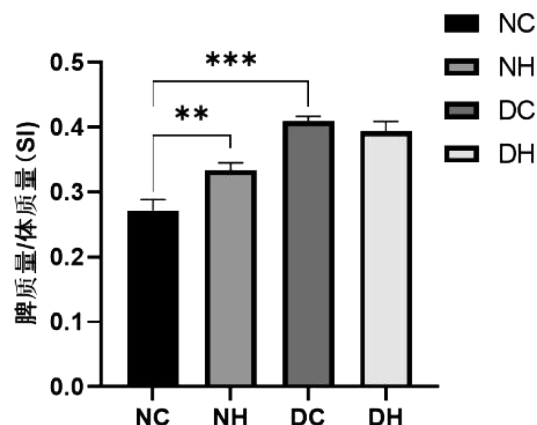
Fig. 3 Comparison of food intake between reversal diet (DC) and high-fat diet (NH) mice

3.2 小鼠脾脏指数

如图 4 所示,对比正常节律正常饮食小鼠(NC)脾脏指数,高脂饮食(NH)小鼠脾脏指数显著增加($P < 0.0001$),颠倒饮食(DC)小鼠的脾脏指数也显著增加($P < 0.01$)。这表明小鼠分别受高脂饮食和昼夜节律紊乱的影响后,小鼠脾脏组织结构受到影响,产生增生肥大等问题。此外,白天进食高脂组(DH)组小鼠节律颠倒且食用高脂饲料,其脾脏指数也升高。

3.3 小鼠脾脏 B 细胞的流式结果分析

将 4 组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。结果如图 5 所示:正常饮食组小鼠脾脏 B 细胞水平显著高于颠倒饮食组小鼠脾脏 B 细胞水平($P < 0.001$),正常饮食组小鼠脾脏 B 细胞水平也显著高于正常节律高脂饮食



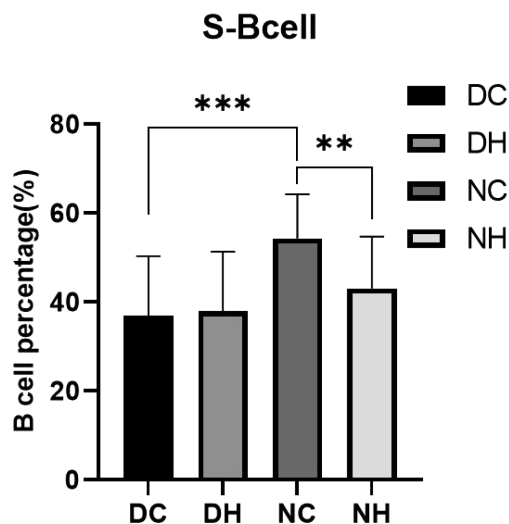
数据均以 mean+SD 表示; $n=20$;

* * * * : 分别代表着 $P < 0.01$, $P < 0.001$

图 4 各组脾脏指数比较

Fig. 4 Comparison of spleen index in each group of mice

组小鼠脾脏 B 细胞水平($P < 0.01$)。结果显示,颠倒饮食以及高脂饮食会导致较低的免疫细胞水平,这说明在高脂饮食和异常昼夜节律的干预下,小鼠的免疫力降低。



数据均以 mean+SD 表示; $n=20$;

* * * * : 分别代表着 $P < 0.01$, $P < 0.001$

图 5 不同分组小鼠脾脏 B 细胞水平

Fig. 5 Splenic B cell levels in Different groups of Mice

4 讨论

昼夜节律异常和高脂饮食均可导致免疫系统的损害和功能异常,本实验结果表明:昼夜颠倒进食和高脂饮食可降低脾脏 B 淋巴细胞数量,从而影响免疫功能。

在本文中,通过观察颠倒饮食小鼠(DC)和高脂进食组(NH)与正常节律正常饮食小鼠(NC)相比较,其脾脏结构及脾脏免疫细胞的变化,我们发现,DC小鼠和NH小鼠脾脏指数增加。流式结果表明,和NC小鼠相比,DC小鼠和NH小鼠B细胞水平均显著下降。高脂饮食以及饮食颠倒均会对免疫系统产生不利影响,提示其中存在相关内在联系。新的研究表明,昼夜节律的长期异常会导致小鼠脾脏的DNA损伤和铁死亡,昼夜节律紊乱会使脾脏淋巴细胞中GPX14(铁死亡的关键调节因子)水平明显降低,且大多数铁死亡激活剂,包括*Prkaa1*, *Prkab1*, *Prkag1*, *Cd36*, *Acs11*, *Dhfr*, *Gch1*, *Rb1*, *Mdm2*和*Atm*降低^[18]。昼夜节律的变化会影响细胞因子与趋化因子的合成与释放,间接性影响着免疫环境的变化^[19]。免疫细胞周期性地募集到组织中会影响疾病的产生^[16,20]。促炎细胞因子(如白细胞介素-12(IL-12))的产生在夜间达到峰值,而细胞毒性效应白细胞和抗炎细胞因子IL-10的产生在白天达到峰值^[21]。说明昼夜节律与免疫关系紧密,且节律的变化会导致免疫系统的紊乱与免疫能力的缺失。

小鼠在昼夜颠倒进食和高脂饮食干预下,体重均上升,提示昼夜颠倒进食也会导致小鼠脂肪代谢紊乱。最近的研究表明,高脂饮食(HFD)会导致循环游离脂肪酸的过量产生和全身炎症^[22,23]。肥胖已被证明会增加炎症因子的水平,包括肥胖动物血清中的C反应蛋白(CRP)、血清淀粉样蛋白A(SAA)、半乳糖凝集素-3、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、IL-6、IFN- γ 、MCP(单核细胞化学引诱蛋白)-1/CCL2、巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)、IL-8、瘦素和白三烯(LT)-B₄^[24-26],在CD4+T细胞亚群中,Th2细胞效应细胞因子IL-4和IL-13阳性的T细胞没有显著增加,Th17细胞效应细胞因子IL-17A和IL-17F阳性的T细胞则分别增加了6.5倍和11.5倍($P<0.01$),这表明肥胖可能使得原本应由Th2介导的炎症转变为由Th17主导的炎症反应^[27]。最近的研究称,肥胖会重塑机体免疫状态,改变机体对免疫治疗药物的反应,有很多临床研究表明,对于特应性皮炎和哮喘在内的多种免疫性炎症疾病,肥胖患者症状相对更加严重,并对正常体重患者有效的治疗方式表现出抵抗性^[27],但潜在的机制尚不清楚。因此,高脂饮食以及颠倒饮食在免疫功能方面具有一定的影响力,高脂饮食引起的肥胖会在一定程度上产生炎症环境,对免疫能力产生

影响。

总之,昼夜颠倒进食和高脂饮食可降低脾脏B淋巴细胞数量,从而影响免疫功能。大量研究提供了昼夜节律和肥胖与免疫系统之间的密切联系,然而,关于临床上应用这些研究结果,以及将昼夜节律与肥胖的影响应用到多方面的免疫反应中,仍有许多工作要做。从机制上阐明关联后,我们可利用其规律确定治疗最佳时机,以及发现新的治疗靶点。

参考文献:

- [1] 黄智炜,陈胜良. 昼夜节律与肠-脑轴的互动[J]. 胃肠病学,2021,26(07):438-440.
- [2] Bourin P, Ledain A F, 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] 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.
- [5] Feng H, Schorpp K, Jin J, et al. Transferrin Receptor Is a Specific Ferroptosis Marker[J]. Cell Rep,2020,30(10):3411-3423.
- [6] 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]. 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,2019:1.
- [7] 甘霖莉,万涛梅,左之才,等. 肥胖对致死性肺炎小鼠脾脏炎症反应的影响[J]. 免疫学杂志,2016,32(11):941-946.
- [8] 沙莎,Rahman C S,陈丽,et al. 利拉鲁肽对高脂诱导肥胖小鼠瘦素、脂肪分布及含量的影响[J]. 山东大学学报(医学版),2016,54(08):22-27.
- [9] 王庆敏,李科华,唐瑛,等. 生物钟基因**bm11**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.
- [10] 伍静. 妊娠肥胖和妊娠期糖尿病患者血清脂肪因子水平变化及其影响因素分析[J]. 中国妇幼保健,2018,33(24):5749-5752.
- [11] Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and

- its impact on metabolic syndrome[J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(12):1752-61.
- [12] Zouali M, Sarmay G. B lymphocyte signaling pathways in systemic autoimmunity: implications for pathogenesis and treatment[J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(9):2730-41.
- [13] Youinou P, Jamin C, Pers J O, et al. B lymphocytes are required for development and treatment of autoimmune diseases[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1050:19-33.
- [14] 蒋童, 郑仁东, 刘超. T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞在糖尿病肾病发病机制中的作用[J]. *临床医学研究与实践*, 2022, 7(09):191-195.
- [15] 吴越人. B 淋巴细胞刺激因子及其免疫调节作用进展[J]. *中西医结合心血管病电子杂志*, 2017, 5(33):10.
- [16] Haus E, Smolensky M H. Biologic rhythms in the immune system[J]. *Chronobiol Int*, 1999, 16(5):581-622.
- [17] 陈非玥, 洪龙胜, 李婉雁, 等. 白术多糖对小鼠胸腺与脾脏指数、组织结构及 p38/MAPK 信号通路的影响[J]. *动物医学进展*, 2021, 42(12):43-49.
- [18] He R, Zhang S, Yu J, et al. Per1/Per2 knockout Affects Spleen Immune Function in Elderly Mice via Inducing Spleen Lymphocyte Ferroptosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21).
- [19] 赵国杰, 崔博, 余晓俊, 等. 昼夜节律调控免疫系统功能的研究进展[J]. *军事医学*, 2022, 46(08):621-626+641.
- [20] Dimitrov S, Benedict C, Heutling D, et al. Cortisol and epinephrine control opposing circadian rhythms in T cell subsets[J]. *Blood*, 2009, 113(21):5134-43.
- [21] Lange T, Dimitrov S, Born J. Effects of sleep and circadian rhythm on the human immune system[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1193:48-59.
- [22] Liu J, Yang M, Kang R, et al. Autophagic degradation of the circadian clock regulator promotes ferroptosis[J]. *Autophagy*, 2019, 15(11):2033-2035.
- [23] Keshk W A, Ibrahim M A, Shalaby S M, et al. Redox status, inflammation, necroptosis and inflammasome as indispensable contributors to high fat diet (HFD)-induced neurodegeneration; Effect of N-acetylcysteine (NAC) [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2020, 680:108227.
- [24] Xie Y L, Chu J G, Jian X M, 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.
- [25] Monteiro R, Azevedo I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome [J]. *Mediators Inflamm*, 2010, 2010.
- [26] Li P, Liu S, Lu M, et al. Hematopoietic-Derived Galectin-3 Causes Cellular and Systemic Insulin Resistance[J]. *Cell*, 2016, 167(4):973-984. e12.
- [27] Bapat S P, Whitty C, Mowery C T, et al. Obesity alters pathology and treatment response in inflammatory disease[J]. *Nature*, 2022, 604(7905):337-342.