

铁过载对小鼠外周血 T 淋巴细胞数量及功能的影响

陈洁 赵明峰 曹小立 孟娟霞 邢艺 贺小圆 金鑫 徐萍 江嫣雨

Effects of iron overload on the peripheral blood T cells in mice Chen Jie, Zhao Mingfeng, Cao Xiaoli, Meng Juanxia, Xing Yi, He Xiaoyuan, Jin Xin, Xu Ping, Jiang Yanyu
Corresponding author: Zhao Mingfeng, Department of Hematology, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China. Email: mingfengzhao@sina.com

铁是血红蛋白与红细胞的重要组成部分,在机体氧运输、DNA 合成和细胞代谢中发挥重要作用^[1-2]。但是,多种因素可导致机体铁沉积量过多,造成机体铁过载,对心脏、骨髓、垂体等多脏器造成不同程度的损伤^[3-4]。前期我们的研究已经证实铁过载可通过升高活性氧物质(ROS)损伤骨髓造血功能,影响造血干细胞及间充质细胞的数量和功能^[5-7]。

由于免疫因素的介入会加剧铁过载的危害,近年来铁过载和机体免疫力的关系受到越来越多的关注^[8-9]。T 淋巴细胞是机体的免疫系统至关重要的免疫细胞,根据表面分子表达不同又可分为 CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞。CD4⁺T 淋巴细胞接受抗原刺激后可分化为辅助性 T 细胞(Th 细胞)以及调节性 T 细胞(Treg),其自身可诱导 CD8⁺T 淋巴细胞的成熟分化,而 CD8⁺T 淋巴细胞又通过分化为细胞毒性 T 细胞(Tc 细胞)参与机体免疫功能^[10]。本研究中,我们通过小鼠铁过载模型进一步研究铁过载对小鼠免疫系统的影响。

对象与方法

1. 研究对象: C57BL/6 纯系雄性小鼠(体重 19~20 g)购自中国科学院动物研究所,合格号为 SCXK(京)2010-0014。所有小鼠均饲养于中国医学科学院放射研究所 SPF 级动物实验室。

2. 主要试剂及仪器: 右旋糖酐铁注射液购买于丹麦 Pharmacosmos 公司; N-乙酰半胱氨酸(NAC)、地拉罗司购自瑞士诺华公司; 兔抗小鼠 CD8-PE、CD8-perCP、CD3-APC、CD3-perCP、CD25-PE、FoxP3-APC、CD4-FITC、B220-APC、IFN- γ -FITC、IL-4-APC 均购自美国 eBioscience 公司; 钙黄绿素乙酰氧基甲酯(Calcein-AM)购自美国 Sigma 公司; 活性氧

检测试剂盒购自江苏碧云天生物技术有限公司; Annexin V/碘化丙锭(PI)凋亡试剂盒购自美国 BD 公司; RPMI 1640 购自美国 Gibco 公司; FACS Calibur™ 流式细胞仪为美国 BD 公司产品。

3. 小鼠模型的建立: 取 40 只小鼠随机分为 4 组, 每组 10 只, 分别设为铁过载组、祛铁组、抗氧化组及对照组。①铁过载组予 25 mg/ml 右旋糖酐铁腹腔注射, 第 1 天起给药, 3 d 1 次, 每次 200 μ l。②祛铁组予 25 mg/ml 右旋糖酐铁腹腔注射(第 1 天起给药, 3 d 1 次, 每次 200 μ l)及地拉罗司灌胃(第 2 天起给药, 3 d 2 次, 每次 200 μ l)。③抗氧化组予小鼠予 25 mg/ml 右旋糖酐铁腹腔注射(第 1 天起给药, 3 d 1 次, 每次 200 μ l)及 NAC 灌胃(第 2 天起给药, 3 d 1 次, 每次 200 μ l)。④对照组每 3 d 腹腔注射 200 μ l 生理盐水。给药 4 周后处死小鼠, 摘除眼球取外周血(肝素抗凝)并分离脾脏, 用于后续实验。

4. 外周血淋巴细胞可变铁池(LIP)水平检测: 采用 Calcein-AM 标记小鼠淋巴细胞, 由于细胞内存在的 LIP 可以淬灭荧光探针 Calcein, 因此应用 Calcein 的平均荧光强度(MFI)可反映小鼠淋巴细胞的 LIP 水平。参照文献[11]方法检测小鼠淋巴细胞的 Calcein MFI。

5. ROS 的测定: 按试剂盒说明书进行操作。

6. 流式细胞术检测小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群及细胞凋亡: 采用流式细胞术检测 CD3 T 淋巴细胞、B220 淋巴细胞及 Treg 比例; 检测 CD4/CD8 比值、Th1/Th2 及 Tc1/Tc2 的比值; 检测细胞凋亡率。按试剂盒说明书进行操作。

7. 统计学处理: 上述实验设 2 个复管, 实验重复 3 次。所有资料用 SPSS 20.0 软件进行分析。两组比较采用完全随机设计资料的 *t* 检验, 多组组间比较采用单因素方差分析, 组内两两比较采用 Newman Keuls 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 小鼠模型的建立: 与对照组相比, 铁过载组小鼠淋巴细胞内 Calcein 荧光强度明显降低, 提示铁过载组小鼠淋巴细胞内 LIP 含量明显增高(2 735.28 \pm 473.46 对 5 729.69 \pm 601.27, P<0.01), 而祛铁组与铁过载组相比小鼠淋巴细胞内 LIP 含量明显减少(5 343.3 \pm 614.27 对 2 735.28 \pm 473.46, P<0.01), 而抗氧化组小鼠淋巴细胞内 LIP 含量仍高于对照组, 提示铁过载组、祛铁组以及抗氧化组铁过载模型构建成功。

2. 各组小鼠外周白细胞计数特征: 与对照组相比, 铁过载组小鼠外周血中性粒细胞比例明显上升(P<0.01), 但绝对数与对照组相比无明显变化; 与铁过载组相比抗氧化组中性

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.06.021

基金项目: 国家自然科学基金(81400092); 天津市自然科学基金(13JCYBJC23400); 天津市卫生局科技基金攻关项目(13KG106); 天津市卫计委重点项目(2015KR15)

作者单位: 300192 天津医科大学一中心临床学院, 天津市第一中心医院血液科

通信作者: 赵明峰, Email: mingfengzhao@sina.com

粒细胞比例有所降低($P<0.05$),与对照组相比差异无统计学意义。与对照组相比,铁过载组小鼠外周血淋巴细胞绝对数明显降低($P<0.05$)以及比例均明显降低($P<0.05$)(表1)。

3. 小鼠外周血细胞淋巴细胞比例:与对照组相比,铁过载组CD3⁺T占淋巴细胞比例明显减少($P<0.01$)而CD4/CD8比值明显升高($P<0.01$);与铁过载组相比,祛铁组CD3⁺T细胞比例明显上升($P<0.01$),且CD4/CD8比值明显降低($P<0.01$),抗氧化组与铁过载组相比CD3⁺T细胞比例明显上升($P<0.01$)及CD4/CD8比值明显下降($P<0.01$)。祛铁组及抗氧化组与对照组相比,CD3⁺T细胞比例仍有降低($P<0.05$)。B220⁺B细胞4组之间差异无统计学意义(表2)。

4. 小鼠外周血中T淋巴细胞的分化情况:与对照组相比铁过载组小鼠外周血中Treg占CD4⁺T细胞的比例明显上升($P<0.01$),而祛铁组以及抗氧化组Treg比例与铁过载组相比显著下降($P<0.05$),但祛铁组与对照组相比Treg比例仍有增加($P<0.01$)。与对照组相比铁过载组小鼠外周血Th1/Th2比值显著下降($P<0.01$),祛铁组以及抗氧化组Th1/Th2比值与铁过载组相比无明显改善。与对照组相比铁过载组小鼠外周血Tc1/Tc2比值显著下降($P<0.01$),抗氧化组与铁过载组相比Tc1/Tc2比值明显升高($P<0.01$),祛铁组Tc1/Tc2比值与铁过载相比无明显变化(表3);但无论祛铁组以及抗氧化组与对照组相比Tc1/Tc2比值仍然降低($P<0.01$)。

5. 小鼠外周血T淋巴细胞凋亡情况:用Annexin V⁺/PI⁺代表凋亡细胞,实验提示:与对照组相比铁过载组小鼠外周血CD3⁺CD8⁺T淋巴细胞凋亡细胞比例显著上升[(7.37±1.59)%对(19.85±1.44)%, $P<0.01$],而祛铁组[(11.24±0.45)%对(19.85±1.44)%, $P<0.01$],以及抗氧化组[(11.86±2.22)%对(19.85±1.44)%, $P<0.01$]与铁过载组相比凋亡比例明显下降,但与对照组相比祛铁组以及抗氧化组凋亡细胞所占比例仍增加($P<0.05$)。祛铁组与抗氧化组相比,两组小鼠外周血CD3⁺CD8⁺T淋巴细胞凋亡细胞比例无明显变化。与对照组相比铁过载组小鼠外周血CD3⁺CD8⁻T淋巴细胞凋亡细胞比例明显上升[(2.29±0.15)%对(5.06±0.38)%, $P<0.01$],而祛铁组[(3.21±0.35)%对(5.06±0.38)%, $P<0.01$]以及抗氧化组[(3.29±0.09)%对(5.06±0.38)%, $P<0.01$]与铁过载相比凋亡比例明显下降,但与对照组相比祛铁组以及抗氧化组凋亡细胞所占比例仍增加($P<0.05$)。祛铁组与抗氧化组相比,两组小鼠外周血CD3⁺CD8⁻T淋巴细胞凋亡细胞比例无明显变化。

表2 各组小鼠外周血CD3⁺T、B220⁺B淋巴细胞比例以及CD4/CD8比值变化($n=10, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | CD3 ⁺ T淋巴细胞 比例(%) | CD4/CD8 比值 | B220 ⁺ B淋巴细胞 比例(%) |
|------|---------------------------------|------------------------|----------------------------------|
| 对照组 | 25.57±3.56 | 1.27±0.15 | 59.54±6.21 |
| 铁过载组 | 11.09±1.84 ^a | 2.07±0.44 ^a | 57.33±4.16 |
| 祛铁组 | 20.00±1.17 ^{ab} | 1.43±0.27 ^b | 57.98±2.29 |
| 抗氧化组 | 20.55±2.16 ^{ab} | 1.09±0.16 ^b | 57.72±3.64 |

注:与对照组相比,^a $P<0.01$;与铁过载组相比,^b $P<0.01$ 。实验设2个复管,实验重复3次

表3 各组小鼠外周血T淋巴细胞的分化情况($n=10, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | Treg比例(%) | Th1/Th2比值 | Tc1/Tc2比值 |
|------|-------------------------|------------------------|--------------------------|
| 对照组 | 6.28±1.04 | 1.06±0.49 | 1.17±0.12 |
| 铁过载组 | 10.09±0.82 ^a | 0.41±0.05 ^a | 0.34±0.11 ^a |
| 祛铁组 | 7.25±0.62 ^{ab} | 0.71±0.12 | 0.48±0.18 ^a |
| 抗氧化组 | 8.95±0.56 ^{bc} | 0.75±0.08 | 0.80±0.20 ^{abc} |

注:Treg:调节性T细胞;Th:辅助性T细胞;Tc:细胞毒性T细胞;与对照组相比,^a $P<0.01$;与铁过载组相比,^b $P<0.05$;与祛铁组相比,^c $P<0.01$ 。实验设2个复管,实验重复3次

6. 小鼠外周血T细胞ROS:与对照组相比铁过载组小鼠外周血CD3⁺T细胞的ROS MFI明显升高(168.32±10.27对140.48±6.11, $P<0.01$);与铁过载组相比祛铁组(150.30±5.27对168.32±10.27, $P<0.01$)以及抗氧化组(145.25±2.50对168.32±10.27, $P<0.01$)小鼠CD3⁺T细胞的ROS MFI明显降低。

讨 论

近来研究提示,铁过载会导致机体免疫的紊乱,增加细菌和真菌的感染风险^[11-12],但具体影响以及作用机制仍不明确。本实验中我们利用构建的铁过载小鼠模型,并建立祛铁以及抗氧化小鼠模型,初步的探索小鼠铁超负荷对外周血淋巴细胞的作用及其机制。本组铁过载组小鼠外周血淋巴细胞内LIP明显上升提示小鼠铁过载模型成功建立,而祛铁组小鼠外周血淋巴细胞内LIP较铁过载组均有明显改善提示祛铁治疗有效。在此基础上,我们首先对外周血白细胞进行计数。结果提示铁过载小鼠外周血淋巴细胞绝对数以及比

表1 各组小鼠外周血白细胞计数特征($n=10, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | WBC($\times 10^6/ml$) | ANC计数($\times 10^6/ml$) | ALC计数($\times 10^6/ml$) | ANC% | ALC% |
|------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 对照组 | 10.66±1.51 | 0.96±0.31 | 9.67±1.30 | 9.02±2.29 | 90.88±2.28 |
| 铁过载组 | 9.34±0.96 | 1.20±0.11 | 8.06±0.85 ^a | 12.98±1.59 ^a | 86.46±2.75 ^a |
| 祛铁组 | 9.96±0.53 | 1.12±0.11 | 8.81±0.54 | 11.38±1.11 | 88.43±1.15 |
| 抗氧化组 | 10.50±0.83 | 1.07±0.08 | 8.99±0.50 | 10.41±0.80 ^b | 89.47±0.83 |

注:ANC:中性粒细胞;ALC:淋巴细胞;与对照组相比,^a $P<0.05$;与铁过载组相比,^b $P<0.05$ 。实验设2个复管,实验重复3次

例明显下降,而中性粒细胞比例上升但绝对数无明显变化。该结果提示铁过载可能对淋巴细胞作用明显,于是我们进一步对小鼠外周血淋巴细胞亚群进行分析。结果显示铁过载组小鼠外周血中 CD3⁺T 淋巴细胞的比例与对照组相比显著下降且 CD4/CD8 比值明显上升,而 B220⁺B 淋巴细胞比例与对照组相比则无明显变化;而祛铁组较铁过载组 CD3⁺T 淋巴细胞比例上升、CD4/CD8 比值下降。提示铁过载可能对外周血 T 细胞影响更大,因此我们进一步分析了小鼠外周血中 T 淋巴细胞的分化情况。结果显示铁过载组小鼠外周血中 Treg 显著升高, Th1/Th2、Tc1/Tc2 比值明显下降;祛铁组小鼠外周血中 Treg 相比铁过载组明显下降且与对照组差异无统计学意义, Th1/Th2 比值较铁过载组明显上升,但 Tc1/Tc2 比值与铁过载组比较差异无统计学意义。提示铁过载可导致小鼠外周血中 Treg 细胞显著升高,而 Treg 细胞具有抑制异常或过度免疫应答的作用, Treg 细胞表达上升可以发挥免疫负调控作用;铁过载引起外周血 CD3⁺CD8⁻T 淋巴细胞向 Th2 细胞分化以及 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞向 Tc2 细胞分化,引起外周血 Th1/Th2 以及 Tc1/Tc2 比值的失衡。最后我们检测了外周血 T 细胞亚群的凋亡情况,结果显示铁过载组小鼠无论 CD3⁺CD8⁻ 还是 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞凋亡率均增加,祛铁组该诱导凋亡作用有所缓解。结果显示:①铁过载会引起外周血 T 淋巴细胞亚群不同程度的凋亡增加,导致外周血中 CD3⁺T 淋巴细胞比例下降, CD4/CD8 比值上升;②铁过载会引起 Treg 比例显著升高,导致 CD3⁺CD8⁻T 淋巴细胞向 Th2 细胞分化以及 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞向 Tc2 细胞分化。

在上述实验的基础上,我们初步探索铁过载对淋巴细胞作用的可能机制。ROS 可通过 NADPH 氧化酶和线粒体电子传递链产生的。在正常情况下,低水平的 ROS 在氧化还原系统参与酶的活性调节。然而,过度的 ROS 积累可能会导致蛋白和基因氧化损伤,进一步导致细胞的衰老和凋亡^[13-14]。已有研究显示 ROS 在 T 淋巴细胞的激活、活化、分化都起重要的调节作用^[15-16]。我们用 NAC 向铁过载小鼠模型灌胃建立抗氧化组来抑制 ROS,研究 ROS 在其中的发挥作用。实验结果提示在抗氧化组与铁过载组相比小鼠外周血淋巴细胞凋亡、分化都有不同程度的逆转。说明铁过载可能通过升高 ROS 来调节外周血免疫细胞。

本研究我们系统分析了铁过载对小鼠淋巴细胞数量及亚群比例的影响,祛铁治疗及抗氧化治疗可缓解这种影响。对铁过载的基础性研究有理论意义。

参考文献

- [1] Dunn LL, Suryo RY, Richardson DR. Iron uptake and metabolism in the new millennium [J]. *Trends Cell Biol*, 2007, 17(2): 93-100. doi: 10.1016/j.tcb.2006.12.003.
- [2] Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism [J]. *Cell*, 2004, 117(3):285-297.
- [3] Shenoy N, Vallumsetla N, Rachmilewitz E, et al. Impact of iron overload and potential benefit from iron chelation in low-risk myelodysplastic syndrome [J]. *Blood*, 2014, 124(6):873-881. doi: 10.1182/blood-2014-03-563221.
- [4] Porter JB, Garbowski M. The pathophysiology of transfusional iron overload [J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2014, 28(4): 683-701, vi. doi: 10.1016/j.hoc.2014.04.003.
- [5] 谢芳, 赵明峰, 朱海波, 等. 氧化应激对铁过载造血干细胞造血功能的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2011, 91(46):3284-3288. doi: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2011.46.014.
- [6] 柴笑, 赵明峰, 李德冠, 等. 铁过载对骨髓损伤小鼠造血功能的作用及机制研究 [J]. *中华血液学杂志*, 2014, 35(11): 1000-1004. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2014.11.011.
- [7] Zhang Y, Zhai W, Zhao M, et al. Effects of iron overload on the bone marrow microenvironment in mice [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3):e0120219. doi: 10.1371/journal.pone.0120219.
- [8] Costa M, Cruz E, Oliveira S, et al. Lymphocyte gene expression signatures from patients and mouse models of hereditary hemochromatosis reveal a function of HFE as a negative regulator of CD8⁺T-lymphocyte activation and differentiation in vivo [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4):e0124246. doi: 10.1371/journal.pone.0124246.
- [9] Van Den Ham KM, Shio MT, Rainone A, et al. Iron prevents the development of experimental cerebral malaria by attenuating CXCR3-mediated T cell chemotaxis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3):e0118451. doi: 10.1371/journal.pone.0118451.
- [10] Dzielak DJ. The immune system and hypertension [J]. *Hypertension*, 1992, 19(1 Suppl):136-44.
- [11] 柴笑, 赵明峰, 李德冠, 等. 小鼠铁过载模型的建立及其对骨髓造血功能的影响 [J]. *中国医学科学院学报*, 2013, 35(5):547-552. doi: 10.3881/j.issn.1000-503X.2013.05.012.
- [12] Toma A, Fenaux P, Dreyfus F, et al. Infections in myelodysplastic syndromes [J]. *Haematologica*, 2012, 97(10):1459-1470. doi: 10.3324/haematol.2012.063420.
- [13] Mencacci A, Cenci E, Boelaert JR, et al. Iron overload alters innate and T helper cell responses to *Candida albicans* in mice [J]. *J Infect Dis*, 1997, 175(6):1467-1476.
- [14] Rahal A, Kumar A, Singh V, et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 761264. doi: 10.1155/2014/761264.
- [15] Jang YY, Sharkis SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche [J]. *Blood*, 2007, 110(8):3056-3063. doi: 10.1182/blood-2007-05-087759.
- [16] Lam GY, Huang J, Brumell JH. The many roles of NOX2 NADPH oxidase-derived ROS in immunity [J]. *Semin Immunopathol*, 2010, 32(4):415-430. doi: 10.1007/s00281-010-0221-0.

(收稿日期:2016-01-24)

(本文编辑:刘爽)