

研究论文

极化过程影响巨噬细胞的铁代谢

李云琴^{1, #}, 梁莉^{2, 3, #}, 甘振顺^{2, 3}, 汤学友^{2, 3}, 杜华华^{2, 3, *}浙江大学¹农环分析测试中心; ²动物分子营养学教育部重点实验室; ³动物科学学院, 杭州 310058

摘要: 本文旨在研究巨噬细胞极化过程对自身铁代谢调节的影响。用20 ng/mL γ 干扰素(interferon gamma, IFN- γ)刺激猪肺泡巨噬细胞(3D4/2细胞) 24 h, 诱导其为M1型巨噬细胞, 另外用10 ng/mL白细胞介素4 (interleukin-4, IL-4)联合10 ng/mL巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)共同刺激3D4/2细胞24 h, 诱导其为M2型巨噬细胞, 用实时定量PCR、免疫荧光染色法和Western bolt检测巨噬细胞炎症因子和铁代谢相关蛋白的表达。收集M1/M2型巨噬细胞培养液上清液与猪肠上皮IPEC-J2细胞共培养, 用CCK-8法检测IPEC-J2的增殖能力。给M1/M2型巨噬细胞外源添加柠檬酸铁铵(ammonium ferric citrate, FAC), 用异硫氰酸荧光素标记的葡聚糖(fluorescein isothiocyanate-dextran, FITC-dextran)及流式细胞术检测3D4/2细胞吞噬能力。结果显示, 和对照组相比, M1型巨噬细胞铁调素、铁蛋白重链、轻链和脂质运载蛋白-2 mRNA表达水平上调, 胞内铁含量增加, 显示出铁保留的表型, 并且铁可增强M1型巨噬细胞的吞噬能力; M2型巨噬细胞上述基因mRNA表达水平无显著变化, 而铁转运蛋白和转铁蛋白受体mRNA表达水平上调, 胞内铁含量减少, 显示出铁释放的表型, 并且其培养液上清液能促进IPEC-J2细胞增殖。上述结果提示, M1型巨噬细胞倾向于将铁保留在细胞内, 减少胞外铁含量, 从而抑制胞外菌的增殖; 而M2型巨噬细胞倾向于释放铁, 有助于周围细胞的增殖, 从而促进组织修复。

关键词: 铁代谢; M1/M2型巨噬细胞; 细胞增殖**中图分类号:** R392.1

Polarized activation affects iron metabolism in macrophages

LI Yun-Qin^{1, #}, LIANG Li^{2, 3, #}, GAN Zhen-Shun^{2, 3}, TANG Xue-You^{2, 3}, DU Hua-Hua^{2, 3, *}¹Analysis Center of Agrobiological and Environmental Science; ²Key Laboratory of Animal Molecular Nutrition, Ministry of Education; ³College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Abstract: The aim of this study was to investigate the effects of polarization program on the ability of macrophages to regulate iron metabolism. M1 and M2 macrophages were propagated *in vitro* from porcine alveolar macrophages 3D4/2 and polarized by cytokines. The 3D4/2 macrophages were treated with 20 ng/mL interferon gamma (IFN- γ) and 10 ng/mL interleukin-4 (IL-4) combined with 10 ng/mL macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) to induce polarization to M1 and M2, respectively. After incubation for 24 h, the expression levels of inflammatory factors and iron-metabolism genes were determined using real-time qPCR, Western blot and immunofluorescence. The M1/M2 macrophages culture media supernatant was collected and used to treat porcine intestinal epithelial cells IPEC-J2. The proliferation ability of IPEC-J2 was detected using CCK-8 assay kit. Following exogenous addition of ammonium ferric citrate (FAC) to M1/M2 macrophages, the phagocytic function of macrophages was detected using fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-dextran) and flow cytometry. The results showed that, compared with control, M1 macrophages had higher mRNA levels of iron storage proteins (ferritin heavy and light polypeptide, i.e. FtH and FtL), hepcidin and lipocalin-2, as well as iron content. Moreover, iron enhanced the ability of M1 macrophages to phagocytize FITC-dextran. There was no significant change in these mRNA expression levels in M2 macrophages, but the mRNA expression levels of ferroportin and transferrin receptor were up-regulated. In addition, the conditioned media supernatant from M2 macrophages promoted cell proliferation of IPEC-J2. These findings indicate

Received 2020-06-02 Accepted 2020-08-21

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31872363) and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province, China (No. LZ20C170004).

[#]These authors contributed equally to this work.^{*}Corresponding author. Tel: +86-571-88982131; E-mail: huahuadu@zju.edu.cn

that M1 macrophages tend to lock iron in the cell and reduce extracellular iron content, thereby inhibiting the proliferation of extracellular bacteria. While M2 macrophages tend to excrete iron, which contributes to the proliferation of surrounding cells and thus promotes tissue repair.

Key words: iron metabolism; M1 macrophage; M2 macrophage; cell proliferation

巨噬细胞是机体内一类重要的免疫细胞, 具有较强可塑性, 高度异质性和多种免疫功能。在参与免疫反应的过程中, 不同组织器官的巨噬细胞可随微环境的变化极化为经典激活的 M1 型巨噬细胞和替代激活的 M2 型巨噬细胞^[1]。在功能上, M1 型巨噬细胞具有很强的内吞能力和微生物杀伤作用, 从而促进炎症反应的发生并清除病原体, 而 M2 型巨噬细胞则抑制炎症反应, 并修复受损组织^[2]。早在 20 世纪 60 年代, 有学者发现小鼠在感染分枝杆菌或李斯特菌后, 巨噬细胞对微生物的抵抗能力得到提高, 这种变化是刺激依赖性的, 而非抗原特异性^[3]。随后研究显示, 上述巨噬细胞的活化是由特异性活化的自然杀伤细胞、辅助性 T 细胞(helper T cell, Th)、CD8⁺ T 细胞等的产物细胞因子 γ 干扰素(interferon γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 以及革兰氏阴性细菌外膜的组成成分脂多糖诱导引起的^[4]。巨噬细胞向 M1 型极化以后, 吞噬功能得到提高, 并分泌大量促炎因子, 包括一氧化氮、白细胞介素(interleukin, IL, 如 IL-6、IL-1 β 、IL-12、IL-8)、TNF- α 和大量趋化因子等^[5]。相反, M2 型巨噬细胞是机体消除炎症反应的特征细胞, Th2 细胞分泌的细胞因子 IL-4 能诱导产生 M2 型巨噬细胞, 具有这种诱导作用的还有 IL-10、转化生长因子、维生素 D 和糖皮质激素等^[6]。M2 型巨噬细胞除了具有较强的抗炎活性外, 还起到修复组织创伤、重建机体稳态、调节组织代谢的作用^[7]。

巨噬细胞在机体铁代谢的调节中起着不可或缺的作用。一方面, 巨噬细胞吞噬衰老或受损的红细胞并分解血红素, 重新回收利用红细胞中的铁^[8]。另一方面, 巨噬细胞调控胞内铁的可使用性, 通过限制铁抑制病原体的生长^[9,10]。巨噬细胞不仅可以识别和吞噬细菌, 还可以产生螯合铁的蛋白, 如乳铁蛋白和脂质运载蛋白-2 (lipocalin-2, Lcn2) 等, 削弱细菌与铁的接触, 从而抑制细菌的生长^[11,12]。因此阐明巨噬细胞的极化过程对其自身铁代谢的影响对于理解机体如何对抗细菌入侵或炎症具有重要意义。

铁是机体必需的营养素, 也是细胞许多基本功能的重要辅助因子, 因此胞内铁稳态和体内铁平

衡被严格调节。铁代谢涉及铁的吸收、储存和排出等过程, 主要受铁调素、铁调节蛋白(iron regulatory protein, IRP) 和铁反应元件系统调控^[13-15]。本课题组前期结果显示, 铁可通过抑制信号转导及转录激活蛋白 1 (signal transducer and activator of transcription 1, STAT-1) 来降低 M1 型巨噬细胞的极化^[16]。本研究以细胞因子刺激巨噬细胞极化, 探讨 M1/M2 型巨噬细胞的铁代谢与其功能的变化, 进一步研究不同极化类型巨噬细胞对应的铁代谢表型的生理意义。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 Trizol 试剂、柠檬酸铁铵(ammonium ferric citrate, FAC)、荧光素异硫氰酸酯-葡聚糖(fluorescein isothiocyanate-dextran, FITC-dextran) 购自 Sigma 公司; cDNA Achieve Kit 试剂盒购自 Thermo 公司; 荧光定量 PCR 试剂盒购自罗氏公司; 诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、精氨酸酶-1 (arginase-1, Arg-1)、 β -actin 单克隆抗体购自 Abcam 公司; 山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗购自华安生物公司; Cy3 荧光二抗、4' 6-二脒基-2-苯基吲哚(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色液、细胞裂解液购自凯基公司; 增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL) 底物购自 Biosharp 公司; CCK-8 试剂盒购自 Dojindo 公司; IFN- γ 、IL-4、巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) 购自 PeproTech 公司; 荧光定量 PCR 引物由擎科生物公司合成。

1.2 细胞培养与极化处理 猪肺泡巨噬细胞(3D4/2 细胞) 购自中国科学院细胞库(上海), 培养在 RPMI-1640 中, 培养液含 10% 胎牛血清, 青霉素(100 IU/mL) 和链霉素(100 μ g/mL)。细胞消化传代后, 按每孔 1×10^6 个接种至 6 孔板, 加入完全培养基, 过夜生长直到 80% 融合更换为无血清培养基。3D4/2 细胞随机分组: 对照组(RPMI-1640 培养基培养, 不添加任何细胞因子)、M1 组(RPMI-1640 培养基培养, 添加 20 ng/mL IFN- γ)、M2 组(RPMI-1640 培养基培养, 添加 10 ng/mL IL-4 和 10 ng/mL M-CSF)。用 20 ng/mL IFN- γ 诱导巨噬细胞向 M1 型

极化, 10 ng/mL IL-4 联合 10 ng/mL M-CSF 共同诱导巨噬细胞向 M2 型极化^[17]。收集 M1 和 M2 诱导 6 h、12 h、24 h 时的细胞, 通过检测 M1 和 M2 标识因子的表达来验证巨噬细胞的极化, 使用极化诱导 24 h 的 3D4/2 细胞用于后续实验。用于检测 M1 型巨噬细胞的细胞因子是 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和 iNOS, 用于检测 M2 型巨噬细胞的细胞因子是 Arg-1、甘露糖受体-1 (mannose receptor-1, Mrc-1)、STAT-6^[6, 18, 19]。

1.3 RNA 提取及实时定量 PCR 用 Trizol 试剂提取 3D4/2 细胞总 RNA, 并用超微量分光光度计 (NanoDrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, 美国) 测定浓度。使用 cDNA Achieve Kit 进行反转录。实时定量 PCR 使用 FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) 染料和实时定量 PCR 仪 (ABI 7500, Applied Biosystems, 美国) 进行。以 β -actin 为内参, 目的基因 mRNA 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行计算, 相关引物信息见表 1。

1.4 巨噬细胞铁含量测定 将细胞样品于混合酸 (浓盐酸: 浓硝酸 = 1:3) 中消化, 并将 1 000 μ g/mL 的铁储备液 (国家标准样品, 购自浙江大学设备科) 稀释成 1、2 和 3 μ g/mL 三个梯度的标准液作为对照,

通过原子吸收光谱分析仪 (ZEE nit700, Analytik Jena, 德国) 检测样品中的铁含量, 每个样品至少含有 1×10^{10} 个细胞。

1.5 免疫荧光染色法 将 3D4/2 细胞与 iNOS 抗体 (1:500) 或 Arg-1 抗体 (1:500) 在室温下孵育 1 h, 随后与 Cy3 荧光二抗避光孵育 1 h。用 PBS 洗涤后, 将细胞在含有 40 mg/mL DAPI 的培养基中孵育 5 min, 随后在激光共聚焦显微镜 (LSM710, Zeiss, 德国) 下采集图像, 用 Image-Pro Plus 6.0 对图像进行相对定量分析。

1.6 Western blot 收集细胞, 经 PBS 洗涤 3 次, 加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液中裂解细胞后, 12 000 g 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min。小心吸出上清液, 用 BCA 法进行蛋白质定量。用 4% 和 20% 聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白质样品, 湿转法将分离胶的蛋白转移至 PVDF 膜上, 随后分别加入抗 β -actin (1:1 000)、iNOS (1:1 000) 和 Arg-1 (1:1 000) 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 第二天二抗室温孵育 1 h, ECL 化学发光底物显影。以 β -actin 为内参蛋白, 用 ImageJ 软件对蛋白结果进行相对定量。

1.7 CCK-8 法检测细胞增殖 猪肠上皮 IPEC-J2 细胞购自中国科学院细胞库 (上海), 用含 10% 胎

表 1. 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1. Primer sequences for the real-time PCR amplification

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Product length
Hepcidin	TCTCCATCCCAGACAAGAC	AAGATGCAGATGGGGAAGTG	123 bp
IRP1	CTGTGGGAATGTTTCGGGAT	CCACTGCAGCAAGGCACTAC	100 bp
IRP2	TGGTCATTGCTGCCGTTATC	TGTAACCATCCCCTGCCTG	152 bp
IFN- γ	CAAAGCCATCAGTGAACATCA	TCTCTGGCCTTGGAAACATAGTCT	100 bp
IL-6	TGGCTACTGCCTTCCCTACC	AACAAACAAGCGTTGTGGGA	132 bp
STAT-6	TTCAGTTGCAGGTGTCGGAA	CAGAGATTTTGCCGAGGATG	254 bp
FPN	GGGTGGATAAGAATGCCAGACTT	GTCAGGAGCTCATTCTGTGTAGGA	121 bp
β -actin	CCACCATGTACCCAGGCATT	AGGGTGTAACACGCAGCTCA	253 bp
Mrc1	TACCCCTGCTCCTGGTTTTT	CAGCGCTTGTGATCTTCATT	97 bp
Arg-1	CCAGTCCATGGAGGTCTGTC	GTGTCTTCCCCAGAGATGGA	118 bp
TNF- α	GCCCTTCCACCAACGTTTTT	CCCAGGTTGCATCCAGGAAT	539 bp
IL-1 β	ACAAAAGCCCGTCTTCCTG	ATGTGGACCTCTGGGTATGG	105 bp
FtL	TGTTTGGACGGAACAGACCC	CTCATGGCTGGTCGGCAATA	168 bp
FtH	GAATTTGCGCTGCACGTGGT	AGAGATACTCGGCCATGCCA	208 bp
TFRC	TGCCAGATACTCTCCGACA	AGCCAGAGCCCCAGAAGATA	830 bp
iNOS	CAGCGTGGAGTTCACCCA	GACATTGATCTCCACGACAGC	415 bp
Lcn2	GGAAGAGCAAGGCCGTTTA	GTCCAACATGGAGTTGATGGC	133 bp

IRP, iron regulatory protein; IFN, interferon; IL, interleukin; STAT, signal transducer and activator of transcription; FPN, ferroportin; Mrc-1, mannose receptor-1; Arg-1, arginase-1; TNF- α , tumor necrosis factor α ; FtL, ferritin light polypeptide; FtH, ferritin heavy polypeptide; TFRC, transferrin receptor; iNOS, induced nitric oxide synthase; Lcn2, lipocalin-2.

牛血清的 RPMI-1640 培养基培养。IPEC-J2 细胞在对照组、M1 或 M2 型巨噬细胞的培养液上清液中生长 48 h, 通过 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖。

1.8 巨噬细胞吞噬功能测定 将 3D4/2 细胞在 25 $\mu\text{g/mL}$ FAC 存在下极化 24 h, 随后用 1 mg/mL FITC-dextran 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 h, 通过流式细胞仪 (MACS-Quant VYB, Miltenyi Biotec, 德国) 分析巨噬细胞对 FITC-dextran 的吞噬率。

1.9 统计学分析 数据以 mean \pm SEM 表示, 使用 SPSS 20.0 软件进行统计检验, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Tukey-Kramer HSD 法, $P < 0.05$ 时认为差异具统计学意义。

2 结果

2.1 细胞因子诱导猪肺泡巨噬细胞 3D4/2 极化

巨噬细胞诱导极化后, IFN- γ 处理的 3D4/2 细胞表现出典型的 M1 型基因转录谱, 而 IL-4 和 M-CSF 共同处理的 3D4/2 细胞具有典型的 M2 型基因转录谱。与对照组相比, M1 型巨噬细胞标识因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和 iNOS mRNA 表达水平显著上调 (图 1A~D), 其中 IL-6 (图 1A)、TNF- α (图 1C) 和 iNOS (图 1D) 的基因表达水平在刺激 12 h 后显著上调 ($P < 0.01$), IL-1 β (图 1B) 则在 24 h 后显著上调 ($P < 0.01$)。与对照组相比, M2 型巨噬细胞标识因子 Arg-1、Mrc-1 和 STAT-6 mRNA 表达水平显著上调 (图 1E~G), 其中 Arg-1 (图 1E) 在刺激 6 h 后显著上调 ($P < 0.01$), 而 Mrc-1 (图 1F) 和 STAT-6 (图 1G) 在刺激 12 h 时显著上调 ($P < 0.05$)。

为了进一步确认 3D4/2 细胞的极化类型, 使用免疫荧光染色检测 M1 型巨噬细胞标记物 iNOS 和 M2 型巨噬细胞标记物 Arg-1。免疫荧光染色检测结果显示, 与对照组相比, M1 组的 iNOS 表达显著上调, M2 组没有显著变化; 相反, M2 组的 Arg-1 表达显著上调, M1 组没有显著变化 (图 1H)。与免疫荧光染色检测结果一致, Western blot 结果显示, 和对照组相比, M1 组高表达 M1 标记物 iNOS, M2 组高表达 M2 标记物 Arg-1 (图 1I)。上述结果说明 M1 和 M2 型巨噬细胞极化诱导成功。

2.2 M1/M2 型巨噬细胞的铁代谢

与对照组相比, M1 型巨噬细胞的铁调节蛋白 IRP1 (图 2A) 和 IRP2 (图 2B) 的 mRNA 水平显著下调 ($P < 0.05$), 铁稳态的主要调节者铁调素 (图 2C)、与铁储存有关的铁蛋白重链 (ferritin heavy polypeptide,

FtH, 图 2E) 和铁蛋白轻链 (ferritin light polypeptide, FtL, 图 2F) mRNA 水平显著上调 ($P < 0.01$)。相反, 上述基因 mRNA 表达水平在 M2 型巨噬细胞中无显著变化, 而胞内铁主要的出口——铁转运蛋白 (ferroportin, FPN) (图 2D) 和转铁蛋白受体 (transferrin receptor, TFRC) (图 2G) mRNA 水平显著提高 ($P < 0.05$)。与 M1 相比, M2 铁调素 (图 2C)、FtH (图 2E) 和 FtL (图 2F) 的 mRNA 表达水平较低 ($P < 0.05$), TFRC (图 2G) mRNA 表达水平较高 ($P < 0.01$)。此外, 与对照组相比, M1 型巨噬细胞 Lcn2 (图 2H) mRNA 表达水平显著上调 ($P < 0.01$)。以上结果表明, M1 型巨噬细胞倾向于将铁保留在细胞内, 而 M2 型巨噬细胞倾向于排出细胞内的铁。与 mRNA 结果一致, 原子吸收光谱结果 (图 2I) 显示, 与对照组相比, M1 型巨噬细胞的胞内铁含量显著增加 ($P < 0.05$), 而与 M1 型巨噬细胞相比, M2 型巨噬细胞的胞内铁含量显著降低 ($P < 0.01$)。

2.3 M1/M2 型巨噬细胞不同铁代谢表型影响细胞增殖

由于铁是 DNA 合成的重要辅助因子^[13], 所以本研究检测了外源铁存在的情况下巨噬细胞的增殖能力, 进一步了解 M1/M2 型巨噬细胞不同铁稳态调节的生理意义。当向培养基中添加小于 12.5 $\mu\text{mol/L}$ FAC 时, 巨噬细胞增殖表现出浓度依赖的趋势, 不过没有显著性变化 (图 3A), 而且一定浓度的环境铁 (小于 50 $\mu\text{mol/L}$ FAC) 不会对巨噬细胞的生长产生负面影响。此外, 用 M1/M2 型巨噬细胞上清液分别培养 IPEC-J2 细胞时, 与对照组培养基上清液培养的细胞相比, IPEC-J2 细胞在 M1 培养基上清中的活细胞数量减少 28%, 而在 M2 培养基上清中增加 25% (图 3B), 说明 M2 的铁代谢表型可以促进 IPEC-J2 细胞增殖。

2.4 铁增强 M1 型巨噬细胞的吞噬能力

为了确定 M1/M2 型巨噬细胞的铁代谢表型对自身吞噬作用的影响, 本研究通过流式细胞术检测外源铁对巨噬细胞吞噬 FITC-dextran 的影响。结果 (图 3C) 显示, 外源添加 FAC 显著提高 M1 型巨噬细胞对 FITC-dextran 的摄取, 但是对 M2 型巨噬细胞没有影响, 说明铁可以增强 M1 型巨噬细胞的吞噬能力。

3 讨论

本研究结果显示, IFN- γ 诱导的 M1 型巨噬细

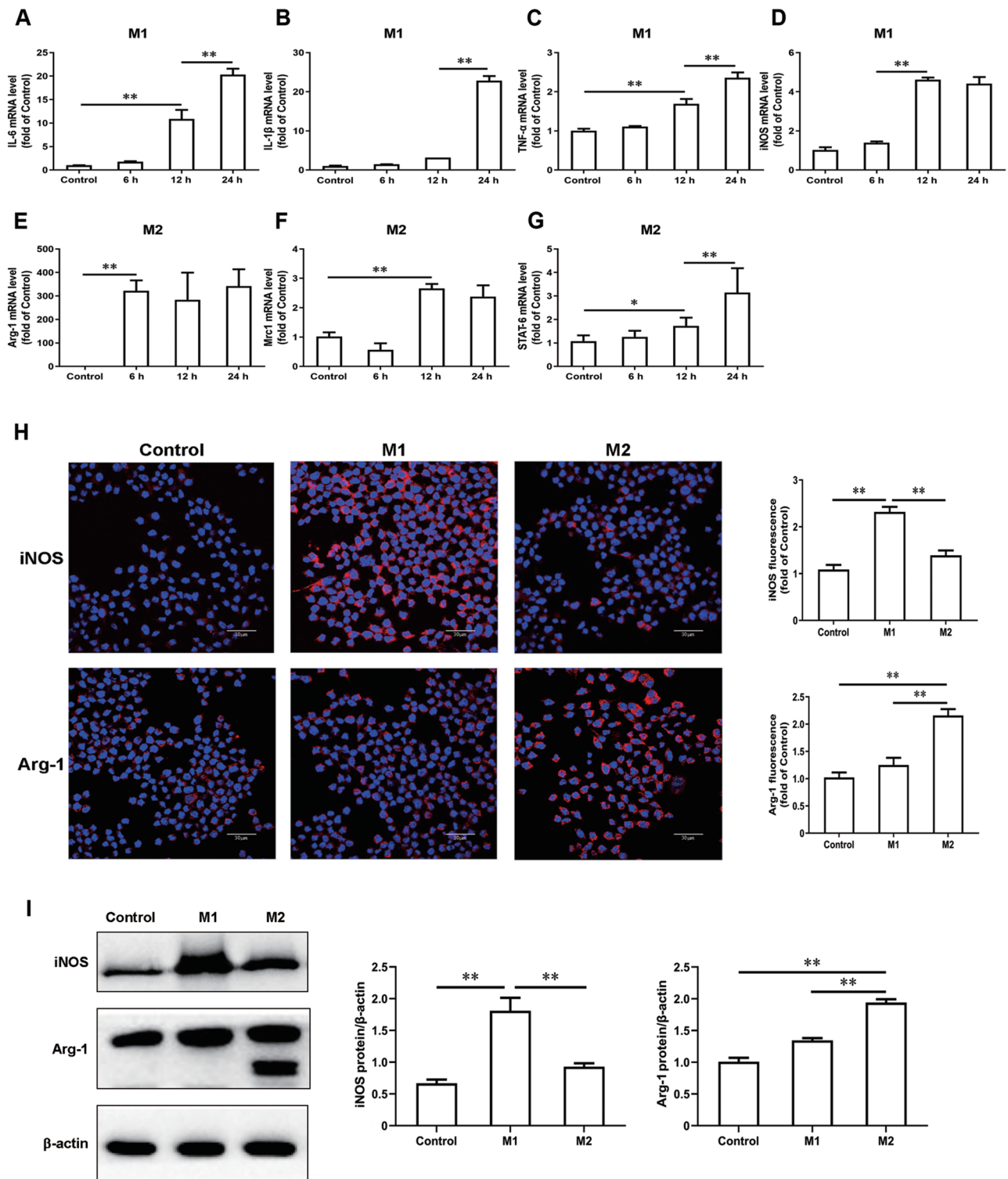


图 1. M1/M2型巨噬细胞标识因子的表达

Fig. 1. Expression of macrophage polarized markers. The 3D4/2 cells were cultured with IFN- γ (20 ng/mL) to generate M1 macrophages, or with IL-4 (10 ng/mL) and M-CSF (10 ng/mL) to generate M2 macrophages. A–G: Interleukin-6 (IL-6, A), IL-1 β (B), tumor necrosis factor α (TNF- α , C), inducible nitric oxide synthase (iNOS, D), arginase-1 (Arg-1, E), mannose receptor-1 (Mrc-1, F), and signal transducer and activator of transcription 6 (STAT-6, G) mRNA expression levels assessed by real-time PCR. H, I: Protein expression levels of iNOS (red) and Arg-1 (red) detected by immunofluorescence (H) and Western blot (I). Cell nuclei were labeled with DAPI (blue). Scale bar, 30 μ m. Data are mean \pm SEM from three independent experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01.

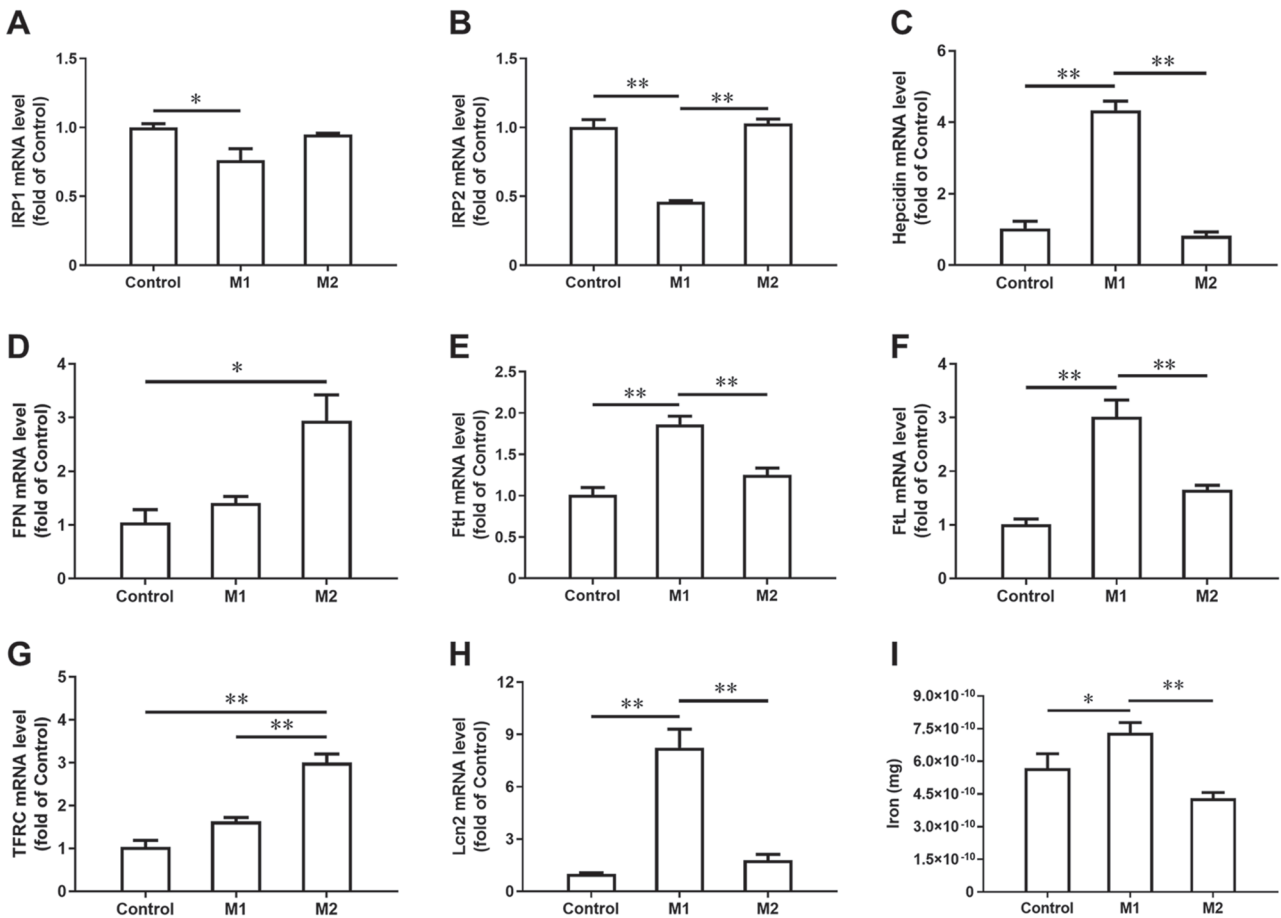


图 2. 铁代谢相关因子在M1/M2型巨噬细胞中的表达及细胞内铁含量的变化
 Fig. 2. Expression of iron metabolism-related factors and change of intracellular iron contents in polarized macrophages. A-H: Iron regulatory protein 1 (IRP1, A), IRP2 (B), Hepcidin (C), ferroportin (FPN, D), ferritin heavy polypeptide (FtH, E), ferritin light polypeptide (FtL, F), transferrin receptor (TFRC, G) and lipocalin-2 (Lcn2, H) mRNA expression levels assessed by real-time qPCR. The mRNA expression levels were represented as fold-change compared to control group. I: Intracellular iron contents were measured by an atomic absorption spectrometer. Data are mean ± SEM from three independent experiments. **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

胞高表达促炎细胞因子 (IL-6、IL-1β、TNF-α)，并产生大量促进氧和氮自由基生成的酶 (iNOS)，以增加其对病原体的杀伤力。相反，IL-4 和 M-CSF 共同诱导的 M2 型巨噬细胞的特征是 Arg-1、Mrc-1 和 STAT-6 表达显著增加。巨噬细胞极化后基因的表达谱与细胞因子、趋化因子和生长因子有关^[15]。本研究结果表明，与铁稳态相关的基因表达在巨噬细胞 M1 和 M2 型中存在较大的差异。铁一般通过两种方式进入巨噬细胞。一方面，铁离子先被还原为二价亚铁离子，通过二价金属转运蛋白 1 (divalent metal transporter, DMT1) 转运至细胞内^[20]。另一方面，铁离子与转铁蛋白结合，随后与巨噬细胞表面的受体 TFRC 结合^[21]。该复合物通过内吞作用进入细胞内。铁进入细胞后首先会贮存在可变铁池 (labile

iron pool, LIP) 中，一部分用于细胞中某些酶的合成，另一部分铁以 FtH 或 FtL 被储存起来，或通过 FPN 转运至巨噬细胞外^[22]。上述过程大部分情况下是在基因的转录和转录后水平调控进行的^[15]，因此本研究检测了巨噬细胞铁相关基因的 mRNA 水平，观察细胞铁代谢的变化。结果显示，M1 型巨噬细胞高表达铁调素、FtH、FtL 和 Lcn2，低表达 IRPs 和 FPN。上调的铁调素会将结合的 FPN 降解，限制胞内铁的释放，从而抵御入侵机体的胞外病原体。与此同时，通过上调 FtH、FtL 和下调 IRP，M1 型巨噬细胞可保护自身免受氧化损伤并进一步限制微生物对铁の利用。此外，上调的 Lcn2 可以通过螯合细菌的铁载体争夺铁来限制其生长^[23]。铁相关基因在 M2 型巨噬细胞中的表达谱与 M1 相反，M2 低表

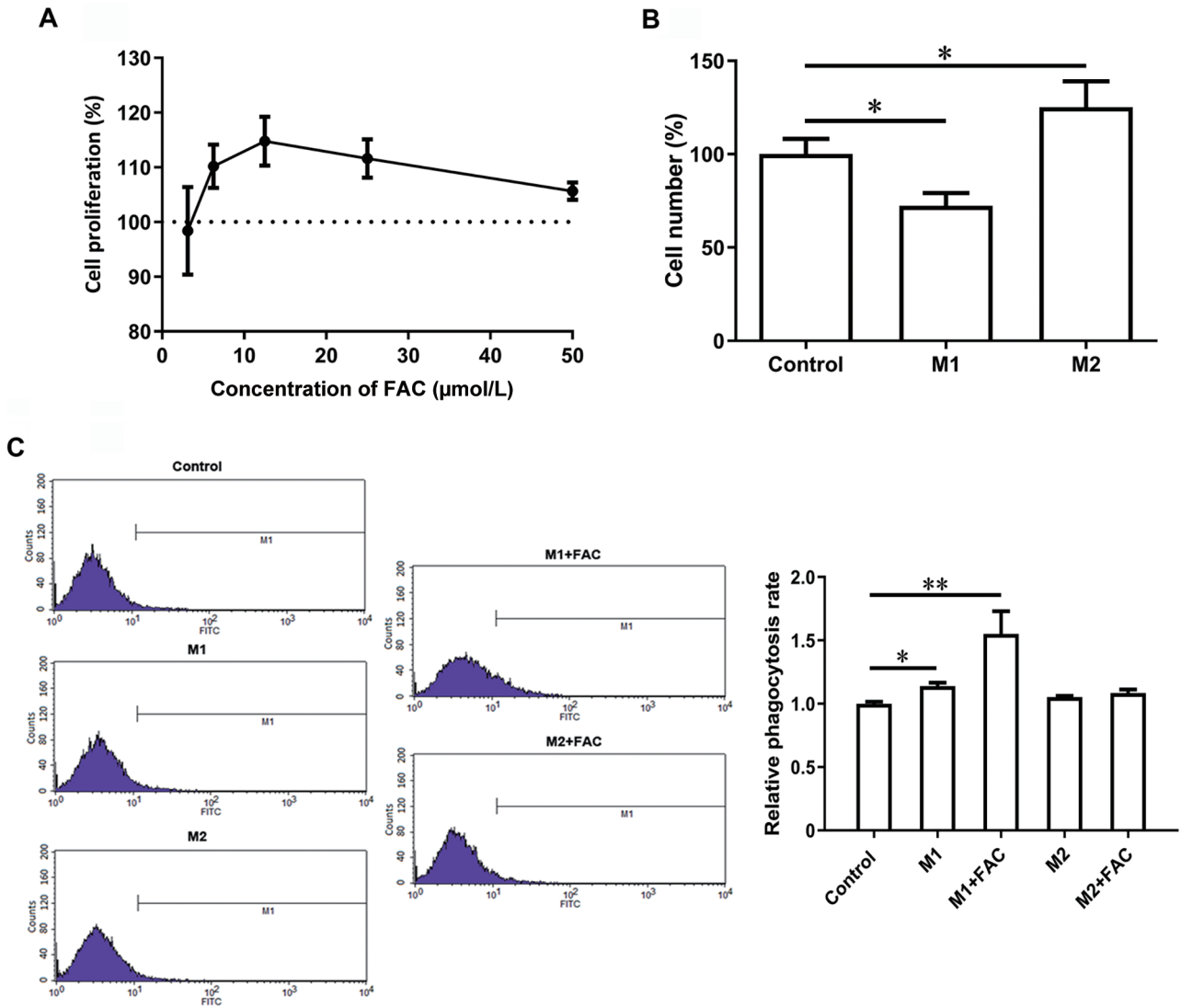


图 3. 巨噬细胞铁释放表型对IPEC-J2增殖及外源铁对巨噬细胞吞噬能力的影响
 Fig. 3. Iron release affects the capacity of conditioned medium of polarized macrophages to sustain cell proliferation and macrophages phagocytosis activity. *A*: Proliferation of 3D4/2 cells treated with FAC (0–50 μmol/L) for 24 h evaluated by CCK-8 assay. *B*: Proliferation of IPEC-J2 cells after incubation with conditioned media supernatant from control, M1 and M2 macrophages 48 h after polarization. *C*: Phagocytosis rates of different groups. 3D4/2 cells were polarized to M1 or M2 phenotype in the absence (control) or presence of 25 μg/mL FAC, and then incubated with FITC-dextran at 37 °C for 1 h. The intracellular FITC-dextran was measured by FACS. Data are mean ± SEM from three independent experiments. **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

达铁调素、FtH、FtL 和 Lcn2，高表达 IRP2、FPN、TFRC。M2 通过增加 TFRC 的表达量来提高对铁的吸收，而低含量的 FtH 和 FtL 无法储存铁，上调的 FPN 增强了铁的释放，这些结果与人外周血单核细胞和小鼠巨噬细胞的研究结果一致 [24, 25]。巨噬细胞铁调节基因表达的变化会引起胞内铁含量的变化，本研究结果显示 M1 型巨噬细胞胞内铁含量较高，而 M2 型巨噬细胞胞内铁含量较低。

铁几乎是所有活细胞必需的微量营养素。在感

染性疾病中，无论是入侵的病原体还是哺乳动物细胞，都需要铁来维持它们的功能、新陈代谢和增殖 [26]。本研究结果显示，在培养基中添加 50 μmol/L 以内浓度的 FAC 不会对细胞的增殖产生负面影响，而且在较低铁浓度范围 (3.125~12.5 μmol/L) 内，细胞增殖显示出浓度依赖性的趋势，这说明低浓度的环境铁能维持细胞的生长。同时，M2 的铁代谢表型可促进猪肠道上皮 IPEC-J2 细胞的增殖。在巨噬细胞的极化过程中，本研究没有额外添加铁，所以

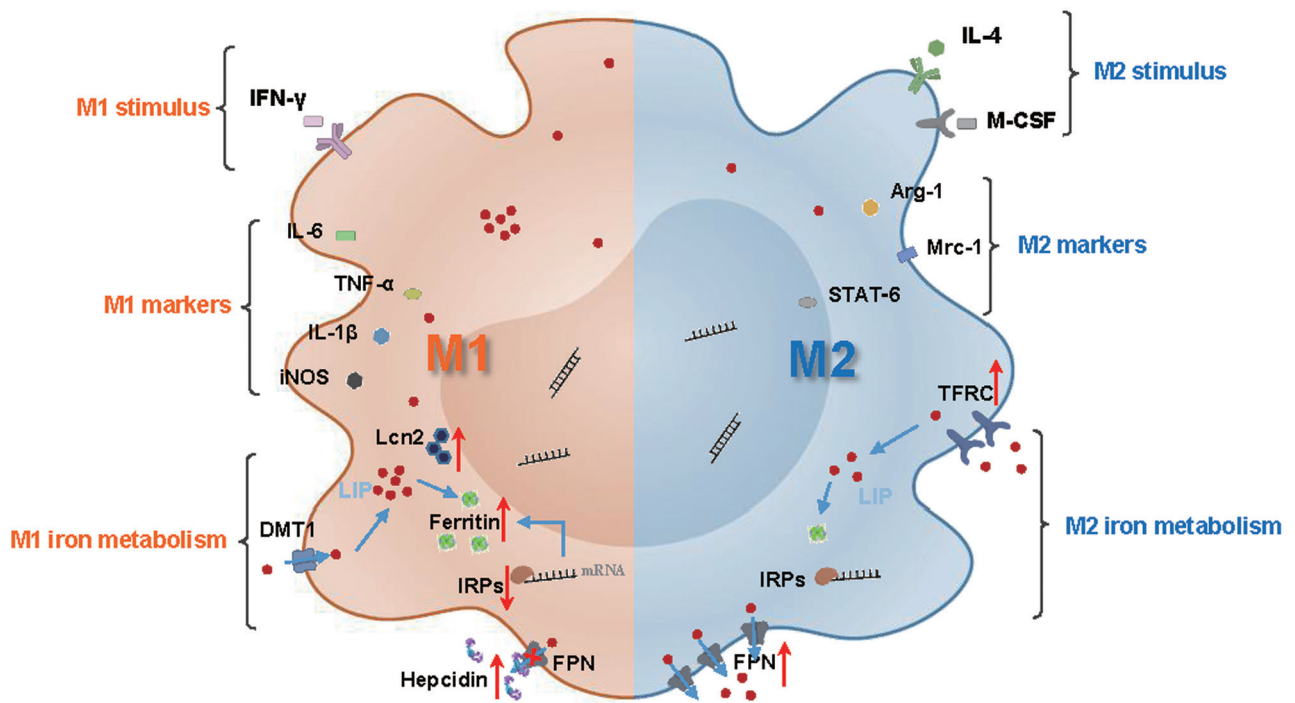


图 4. M1/M2型巨噬细胞的铁处理模式

Fig. 4. Proposed model for iron metabolism in M1 and M2 polarized macrophages. Under different stimuli, macrophages differentiate into M1 and M2 types, and express their characterized markers. M1 macrophages tend to lock iron in the cells, while M2 macrophages tend to excrete iron extracellularly. IFN- γ , interferon γ ; IL-6, interleukin-6; TNF- α , tumor necrosis factor α ; IL-1 β , interleukin 1 β ; iNOS, inducible nitric oxide synthase; Lcn2, lipocalin-2; DMT1, divalent metal transporter 1; IRPs, iron regulatory proteins; FPN, ferroportin; IL-4, interleukin-4; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; Arg-1, arginase-1; Mrc-1, mannose receptor 1; STAT-6, signal transducer and activator of transcription 6; TFRC, transferrin receptor.

M1/M2 型巨噬细胞的铁总量是一致的，而 M1 型巨噬细胞胞内铁高于 M2 型巨噬细胞，我们推测 M2 型胞外铁即培养基中的铁含量要高于 M1 型，从而促进了细胞的增殖，这有助于组织的修复与再生^[7]。吞噬作用在巨噬细胞介导的宿主防御中可以清除入侵病原体^[27]，本研究结果显示铁可以增强 M1 型巨噬细胞的吞噬能力。

综上所述，在不同的刺激下巨噬细胞主要被极化为 M1 或 M2 两种表型，并具有不同的铁处理模式 (图 4)。IFN- γ 诱导的 M1 型巨噬细胞高表达铁存储相关基因，显示出铁保留的表型，有助于炎症的发生，也可能通过扣压铁而抑制胞外细菌的增殖。相反，IL-4 和 M-CSF 诱导的 M2 型巨噬细胞高表达铁排出相关基因，显示出铁释放的表型，有助于周围细胞的增殖，从而促进组织修复。本研究从铁代谢的角度探究 M1/M2 型巨噬细胞的生理功能，为巨噬细胞极化在细菌入侵机体或发生炎症时发挥的作用提供理论依据。

参考文献

- Mantovani A, Sica A, Locati M. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol* 2007; 37(1): 14–16.
- Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 2008; 13: 453–461.
- Mackness GB. The immunological basis of acquired cellular resistance. *J Exp Med* 1964; 120(1): 105–120.
- Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 2003; 73(2): 209–212.
- Benoit M, Desnues B, Mege JL. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* 2008; 181(6): 3733–3739.
- Fang WQ, Deng ZY, Benadjaoud F, Yang DF, Yang CZ, Shi GP. Regulatory T cells promote adipocyte being in subcutaneous adipose tissue. *FASEB J* 2020; 34(7): 9755–9770.
- Jung M, Mertens C, Brüne B. Macrophage iron homeostasis and polarization in the context of cancer. *Immunobiology* 2015; 220(2): 295–304.
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism. *Cell*

- 2010; 142(1): 24–38.
- 9 Ong ST, Ho JZ, Ho B, Ding JL. Iron-withholding strategy in innate immunity. *Immunobiology* 2006; 211(4): 295–314.
- 10 Gan ZS, Tang XY, Wang ZJ, Li JH, Wang Z, Du HH. Regulation of macrophage iron homeostasis is associated with the localization of bacteria. *Metallomics* 2019; 11(2): 454–461.
- 11 Cassat JE, Skaar EP. Iron in infection and immunity. *Cell Host Microbe* 2013; 13(5): 509–519.
- 12 Soares MP, Weiss G. The iron age of host-microbe interactions. *EMBO Rep* 2015; 16(11): 1482–1500.
- 13 Wilkinson N, Pantopoulos K. The IRP/IRE system *in vivo*: insights from mouse models. *Front Pharmacol* 2014; 5: 176.
- 14 Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004; 306(5704): 2090–2093.
- 15 Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol* 2006; 177(10): 7303–7311.
- 16 Gan ZS, Wang QQ, Li JH, Wang XL, Wang YZ, Du HH. Iron reduces M1 macrophage polarization in RAW264.7 macrophages associated with inhibition of STAT1. *Mediators Inflamm* 2017; 2017: 8570818.
- 17 Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 2010; 32(5): 593–604.
- 18 Xu Y, Cui KX, Li J, Tang XY, Lin JQ, Lu X, Huang R, Yang BY, Shi YX, Ye D, Huang JJ, Yu SS, Liang XL. Melatonin attenuates choroidal neovascularization by regulating macrophage/microglia polarization via inhibition of RhoA/ROCK signaling pathway. *J Pineal Res* 2020; 69(1): e12660.
- 19 Lu XX, Li N, Zhao L, Guo D, Yi HF, Yang LY, Liu X, Sun DM, Nian H, Wei RH. Human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate ongoing autoimmune dacryoadenitis in rabbits via polarizing macrophages into an anti-inflammatory phenotype. *Exp Eye Res* 2020; 191: 107905.
- 20 Andrews NC. The iron transporter DMT1. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31(10): 991–994.
- 21 Kühn LC. The transferrin receptor: a key function in iron metabolism. *Schweiz Med Wochenschr* 1989; 119(39): 1319–1326.
- 22 Soares MP, Hamza I. Macrophages and iron metabolism. *Immunity* 2016; 44(3): 492–504.
- 23 Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, Akira S, Aderem A. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 2004; 432(7019): 917–921.
- 24 Corna G, Campana L, Pignatti E, Castiglioni A, Tagliafico E, Bosurgi L, Campanella A, Brunelli S, Manfredi AA, Apostoli P, Silvestri L, Camaschella C, Rovere-Querini P. Polarization dictates iron handling by inflammatory and alternatively activated macrophages. *Haematologica* 2010; 95(11): 1814–1822.
- 25 Recalcati S, Locati M, Marini A, Santambrogio P, Zaninotto F, De Pizzol M, Zammataro L, Girelli D, Cairo G. Differential regulation of iron homeostasis during human macrophage polarized activation. *Eur J Immunol* 2010; 40(3): 824–835.
- 26 Nairz M, Weiss G. Iron in infection and immunity. *Mol Aspects Med* 2020; 75: 100864.
- 27 Uribe-Querol E, Rosales C. Phagocytosis: Our current understanding of a universal biological process. *Front Immunol* 2020; 11: 1066.