

论著 · 临床研究

调节性 T 细胞及 Foxp3 基因在再生障碍性贫血 患儿外周血中的变化及意义

王西阁 王晓格 栾斌 胡姬婷

(郑州大学第三附属医院,河南 郑州 450052)

[摘要] 目的 研究 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}调节性 T 细胞(Treg)及 Foxp3 基因在再生障碍性贫血(简称再障)患儿外周血中的表达水平,探讨其在再障发病机制中的作用。**方法** 采用流式细胞术分别检测 21 例慢性再障(CAA)、9 例急性再障(SAA)和 15 例健康儿童(对照组)外周血 Treg 细胞的比例变化,并用 RT-PCR 方法检测其外周血中 Foxp3 mRNA 的表达水平。**结果** SAA 和 CAA 组患儿外周血中 CD4⁺T 细胞百分比、CD4⁺CD25⁺、CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞占 CD4⁺T 细胞百分比均低于对照组($P < 0.05$),且 SAA 组低于 CAA 组($P < 0.05$);相关基因 Foxp3 mRNA 在 SAA 患儿外周血中呈低表达(0.47 ± 0.08)%,明显低于对照组(0.71 ± 0.12)%和 CAA 组(0.68 ± 0.14)%, $P < 0.05$ 。**结论** 再障患儿外周血 Treg 细胞和 Foxp3 mRNA 表达减低,可能在再障的发病过程中有重要作用,且 SAA 表达低于 CAA,有望用于再障病情严重程度的评估。

[中国当代儿科杂志,2010,12(4):241-243]

[关键词] 再生障碍性贫血;调节性 T 细胞;流式细胞术;Foxp3;儿童

[中图分类号] R556.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)04-0241-03

Expression of regulatory T cells and Foxp3 gene in peripheral blood of children with aplastic anemia

WANG Xi-Ge, WANG Xiao-Ge, LUAN Bin, HU Ji-Ting. Third Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Email:wxcg666@163.com)

Abstract: **Objective** To investigate the levels of CD4⁺CD25⁺CD127^{low} regulatory T cells (Tregs) and the expression of Foxp3 gene in peripheral blood of children with aplastic anemia (AA) and to study their roles in the pathogenesis of AA. **Methods** Twenty-one children with chronic AA, 9 with acute AA and 15 healthy children were enrolled. The proportion of CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Tregs in CD4⁺T cells was evaluated by flow cytometric analysis. The level of Foxp3 mRNA was ascertained by RT-PCR. **Results** The percentage of peripheral blood CD4⁺T cells and CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Tregs in CD4⁺T cells in both the acute and chronic AA groups was significantly lower than that in the normal control group ($P < 0.05$). The acute AA group had more decreased CD4⁺T cells and CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Tregs percentage compared with the CAA group ($P < 0.05$). The expression of Foxp3 mRNA in peripheral blood decreased obviously in the acute AA group ($0.47 \pm 0.08\%$) compared with that in the normal control ($0.71 \pm 0.12\%$) and the CAA groups ($0.68 \pm 0.14\%$) ($P < 0.05$). **Conclusions** The low expression of Tregs and Foxp3 mRNA in peripheral blood may be involved in pathogenesis of AA. The more decreased Tregs and Foxp3 mRNA expression in acute AA than chronic AA suggests their possible roles in the assessment of the severity of AA.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (4):241-243]

Key words: Aplastic anemia; Regulatory T cell; Flow cytometry; Foxp3; Child

再生障碍性贫血(aplastic anemia, AA)简称再障,是由于骨髓造血衰竭导致全血细胞生成减少的一种疾病,研究发现免疫系统紊乱与再障的发生密切相关,多数再障是 T 淋巴细胞介导的自身免疫性疾病^[1]。因此,深入研究再障患儿的免疫功能有利于新的免疫治疗策略。近年来发现,CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(Treg 细胞)是具有维持自身免疫自稳作用的 T 细胞亚群,转录因子 Foxp3 (Forkhead box p3) 特异性表达于 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞上,对 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞发育成熟和功能完善发挥重

[收稿日期]2009-11-03;[修回日期]2009-12-27
[基金项目]河南省科技厅基金资助项目(0624410046)。
[作者简介]王西阁,女,教授,主任医师。

要作用,其在自身免疫性疾病中的作用逐渐成为研究热点。但有关 Treg 细胞在再障发病中的作用目前尚不清楚,本研究通过检测再障患儿外周血 Treg 细胞及相关基因 Foxp3 的表达水平,探讨其在再障发病中的作用。

1 资料和方法

1.1 研究对象

收集郑州大学第三、第一附属医院 2008 年 6 月至 2009 年 6 月住院及门诊再障患儿 30 例,诊断标准参考小儿再障诊疗建议^[2],其中慢性再障(CAA)患儿 21 例,男 13 例,女 8 例,中位年龄 5.5 岁(2~14 岁),急性再障(SAA)患儿 9 例,男 6 例,女 3 例,中位年龄 6 岁(3~12 岁),既往均未输血及接受免疫抑制剂治疗。本院儿童保健中心同期正常体检儿童 15 例作为对照组,男 10 例,女 5 例,中位年龄 6 岁(3~14 岁)。各组之间性别、年龄差异无统计学意义,具有可比性。

1.2 主要试剂

荧光鼠抗人 CD4-FITC, CD25-APC, CD127-PE 单克隆抗体,阴性对照鼠抗人 IgG1-FITC, IgG1-APC, IgG1-PE, FACStation 流式细胞仪均为美国 Becton Dickinson (BD) 公司产品。RT-PCR 试剂盒购自 CALTAG 公司;Trizol 试剂、引物由上海生工有限公司合成。

1.3 流式细胞术检测外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg 细胞

所有对象均于清晨空腹,采集肘静脉血 10 mL (EDTA 抗凝),6 h 内用流式细胞仪检测。应用荧光免疫直接标记法及 FCM 检测外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg 细胞。流式管中各加入 100 μL 抗凝全血,然后每管中分别加入不同荧光标记的单克隆抗体 10 μL,同型对照分别为 IgG1-FITC, IgG1-APC, IgG1-PE,振荡混匀,室温避光孵育 20 min 后,每管各加入 1 mL 的红细胞裂解液(本实验室配制),振荡混匀,室温避光 10 min,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 PBS 液 1 mL,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 PBS 液 0.5 mL 混匀后,应用 FAC-Station 流式细胞仪检测,每管标本采集 10⁵ 个细胞进行分析,分析软件使用美国 BD 公司提供的 Cellquest 软件,以 CD4 阳性细胞设门,分析 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg 细胞所占的百分比。

1.4 RT-PCR 检测外周血 Foxp3 mRNA 表达水平

采用 Trizol 法常规提取细胞总 RNA,按照 Taq-

Man 逆转录试剂盒说明,将 2.0 μL 总 RNA 逆转录为 cDNA,以 β-actin 作为内参,Foxp3 mRNA 特异性引物作 PCR 反应,PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统扫描,以 Foxp3/β-actin 表示 Foxp3 mRNA 表达水平。Foxp3 引物:上游 5'-TCAGTC-CACTTCACCAAG-3',下游 5'-TTGAGGGAGAAGAC-CCCAGT-3';内参照 β-actin:上游 5'-CTGGGACGA-CATGGAGAAAA-3';下游 5'-AAGGAAGGCTG-GAAGACTGC-3'。PCR 反应条件:95℃ 5 min(95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s)35 个循环;72℃ 8 min;4℃ 延伸。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件分析,数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以单因素方差分析进行多组间比较,组间比较采用 LSD 法,相关分析采用 pearson 相关系数, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 再障患儿外周血 Treg 细胞的表达水平

与对照组相比,SAA 和 CAA 组外周血 CD4⁺T 细胞百分比、CD4⁺CD25⁺及 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}占 CD4⁺T 细胞的百分比均降低($P < 0.05$),且 SAA 组低于 CAA 组($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 Treg 细胞和 Foxp3 mRNA 的表达					($\bar{x} \pm s, \%$)
组别	例数	CD4 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low}	Foxp3 mRNA
对照组	15	36.9 ± 3.2	6.99 ± 0.45	5.0 ± 1.5	0.71 ± 0.12
SAA	9	25.9 ± 4.1 ^{a, b}	3.41 ± 0.21 ^{a, b}	2.1 ± 0.8 ^{a, b}	0.47 ± 0.08 ^{a, b}
CAA	23	31.4 ± 3.8 ^a	5.16 ± 0.41 ^a	4.8 ± 2.1 ^a	0.68 ± 0.14
F 值		33.6	68.4	55.7	29.5
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与 CAA 组比较, $P < 0.05$

2.2 外周血 Foxp3 mRNA 的表达

SAA 组患儿外周血中 Foxp3 mRNA 的表达水平为(0.47 ± 0.08)%,而 CAA 组与对照组外周血中的表达水平分别为(0.68 ± 0.14)%和(0.71 ± 0.12)%,SAA 组的 Foxp3 mRNA 表达明显低于对照组和 CAA 组, $P < 0.05$,后两者比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1。

2.3 相关性分析

SAA 组患儿 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg 细胞与 Foxp3 mRNA 表达水平呈正相关($r = 0.76, P < 0.05$)。

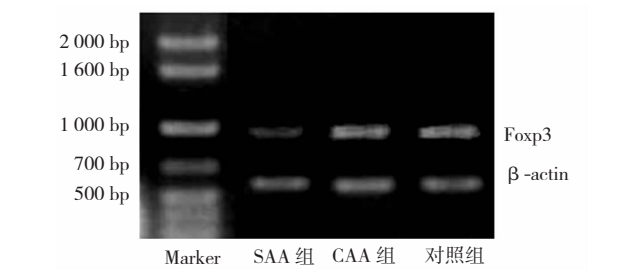


图1 外周血中 Foxp3 mRNA 的 RT-PCR 产物电泳图
SAA 组的 Foxp3 mRNA 表达明显低于对照组和 CAA 组。

3 讨论

有关再障的“免疫介导”发病机制,国内外已经基本达成共识,认为细胞免疫异常在再障的发病中起到极为重要的作用。Sakaguchi 等^[3]于1995年首先报道在人类和小鼠外周血 CD4⁺T 细胞中有一亚群细胞持续高表达 CD25 分子(IL-2 受体 α 链),即 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞。随着对这群细胞的深入研究,认识到 Treg 细胞的持续表达在机体免疫抑制反应和免疫耐受状态方面起重要作用,这种 Treg 细胞同时具有免疫无能和免疫抑制两大特点,约占外周血 CD4⁺T 细胞的 5%~10%,该细胞数量减少或功能丧失常导致自身免疫病的发生^[4]。其功能实现可通过细胞之间直接接触,也可通过分泌 IL-10 和转化生长因子 β(TGF-β)对局部免疫反应产生抑制,且这种免疫抑制不具有 MHC 限制性^[5]。

新近研究表明,再障患者外周血亦存在 Treg 细胞数量和功能的异常。Solomou 等^[6]研究证实再障患者 CD4⁺CD25⁺ Foxp3 Treg 细胞显著低于正常人群,说明 Treg 细胞缺乏与再障发病有关;Chen 等^[7]用抗原 H60 免疫介导的再障小鼠模型中,亦证实 CD4⁺CD25⁺ Foxp3 Treg 细胞与再障的发生密切相关。最近 Hartigan-O'Connor 等^[8]用 CD4、CD25、CD127 三色抗体标记,发现 CD127 在具有免疫抑制活性的 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞中呈现低表达,因而认为 CD127 是 Treg 细胞目前最理想的表面标志物。本研究用 CD127 标记 Treg 细胞,采用流式细胞术检测了 30 例再障患儿及 15 例健康儿童外周血中 Treg 细胞占 CD4⁺T 细胞的比例变化,发现急、慢性再障患儿外周血中 CD4⁺、CD4⁺CD25⁺、CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg 细胞比例均低于对照组,与 Solomou 等^[6]研究结果一致,提示再障患儿外周血存在 T 淋巴细胞异常,即 CD4⁺CD25⁺、CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg 细胞在外周血比例是降低的,且在 SAA 中 Treg 细胞比例进一步降低,由此可能导致细胞免疫抑制功能缺陷,自身反应性 T 细胞活化,机体免疫耐受被打破,免疫效应细

胞增多,骨髓造血障碍的发生,提示 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞可能参与了再障的发病。

转录因子 Foxp3 主要作用是抑制转录,研究发现 Foxp3 基因敲除或突变的小鼠体内 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞数量减少,调节功能缺陷,可诱发严重的自身免疫反应,因此 Foxp3 对机体免疫自稳起决定性作用,目前作为 Treg 细胞内的特征性标志物已得到公认^[9]。本研究发现在 SAA 患儿外周血中 Foxp3 mRNA 的表达明显低于对照组和 CAA 组,而后两者比较差异无统计学意义,提示在 SAA 免疫发病机制中可能存在 Foxp3 表达降低从而导致 Treg 细胞免疫抑制功能不能正常发挥,而 CAA 虽然与正常对照组相比差异无统计学意义,但均值低于对照组,推测随病情严重程度不同 Foxp3 基因表达下调,提示 Foxp3 基因在再障的发病中可能发挥了作用。

总之,本研究表明,在再障患儿外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg 细胞比例下降,基因 Foxp3 mRNA 表达水平亦明显低于正常对照,提示 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞及其在 mRNA 水平的异常表达可能参与了再障的发生发展,深入研究 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg 细胞在再障发病机制中的作用,可能为再障免疫发病机制提供新的思路,并可能为再障的免疫调控治疗策略提供有益的启示。

[参 考 文 献]

- [1] Brodsky RA, Jones RJ. Aplastic anemia[J]. Lancet, 2005, 365 (9471):1647-1656.
- [2] 中华医学会儿科学分会血液组,中华儿科杂志编委会. 小儿再生障碍性贫血的诊疗建议[J]. 中华儿科杂志, 2001, 39(7): 422-423.
- [3] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases[J]. J Immunol, 1995, 155(3):1151-1164.
- [4] Costantino CM, Baecher-Allan CM, Hafler DA. Human regulatory T cells and autoimmunity[J]. Eur Immunol, 2008, 38(4):921-924.
- [5] Sakaguchi S. The origin of FOXP3-expressing CD4⁺ regulatory T cells: thymus or periphery[J]. J Clin Invest, 2003, 112(9): 1310-1322.
- [6] Solomou EE, Rezvani K, Mielke S, Malide D, Keyvanfar K, Visconte V, et al. Deficient CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺T regulatory cells in acquired aplastic anemia[J]. Blood, 2007, 110(5):1603-1606.
- [7] Chen J, Ellison FM, Eckhaus MA, Smith AL, Keyvanfar K, Calado RT, et al. Minor antigen H60-mediated aplastic anemia is ameliorated by immunosuppression and the infusion of regulatory T cells[J]. J Immunol, 2007, 178(7):4159-4168.
- [8] Hartigan-O'Connor DJ, Poon C, Sinclair E, McCune JM. Human CD4⁺ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells[J]. J Immunol Methods, 2007, 319(1-2): 41-52.
- [9] Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3[J]. NAT Immunol, 2005, 6(4): 331-337.

(本文编辑:黄 榕)