

论著·临床研究

Foxp3 及 NFAT1 在再生障碍性贫血患儿中的检测及意义

曹祎明¹ 王西阁² 陈平³ 焉文海³ 赵晓明⁴

(1. 郑州市妇幼保健院儿科, 河南 郑州 450012;
2. 郑州大学第三附属医院小儿血液科, 河南 郑州 450052;
3. 郑州大学医学院病理生理教研室, 河南 郑州 450001;
4. 郑州大学第一附属医院小儿血液病实验室, 河南 郑州 450052)

[摘要] **目的** 研究再生障碍性贫血(简称再障)患儿治疗前后外周血中 Foxp3 及 NFAT1 蛋白表达水平的变化,探讨其在再障发病中的作用。**方法** 提取 60 例正常儿童(对照组)和 68 例治疗有效的再障患儿治疗前后外周血中的单个核细胞,采用免疫印迹法检测 Foxp3、NFAT1 蛋白的表达,并分析 Foxp3、NFAT1 蛋白表达的相关性及其与外周血血红蛋白(Hb)、白细胞(WBC)及血小板(PLT)数量的相关性。**结果** 再障组患儿治疗前(发病期)外周血中 Foxp3、NFAT1 蛋白的表达较对照组明显降低($P<0.05$);治疗后(恢复期)的表达较发病期明显升高($P<0.05$)。Foxp3 与 NFAT1 蛋白的表达呈正相关($r=0.812$, $P<0.05$)。再障组患儿治疗后恢复期的 Foxp3 和 NFAT1 蛋白表达水平均与外周血 Hb、WBC 及 PLT 数量呈正相关($P<0.05$)。**结论** 再障患儿外周血中 Foxp3、NFAT1 蛋白表达水平降低,提示其在再障的发病过程中起重要作用;外周血 Foxp3、NFAT1 蛋白表达水平在一定程度上可以提示病情的变化。

[中国当代儿科杂志, 2015, 17(3): 258-261]

[关键词] 再生障碍性贫血; Foxp3; NFAT1; 儿童

Measurement of Foxp3 and NFAT1 in children with aplastic anemia

CAO Yi-Ming, WANG Xi-Ge, CHEN Ping, YAN Wen-Hai, ZHAO Xiao-Ming. Department of Pediatrics, Women and Child Health Care Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450012, China (Email: 53001589@qq.com)

Abstract: Objective To study the expression of Foxp3 and NFAT1 protein in peripheral blood (PB) in children with aplastic anemia (AA) and their roles in the pathogenesis of AA. **Methods** The expression levels of Foxp3 and NFAT1 protein of mononuclear cells in PB were measured by Western blot in 68 children with AA before and after treatment and in 60 normal children (control group). The correlation between Foxp3 and NFAT1 protein expression and the correlation of the Foxp3 and NFAT1 protein expression with blood Hb, WBC and platelet levels were analyzed. **Results** The expression levels of Foxp3 and NFAT1 protein in PB in the acute phase in the AA group were significantly lower than in the control group ($P<0.05$). After treatment (recovery phase) the expression levels of Foxp3 and NFAT1 protein increased obviously compared with those in the acute phase ($P<0.05$). The Foxp3 protein level was positively correlated with the NFAT1 protein level ($r=0.812$, $P<0.05$). Both the Foxp3 and NFAT1 protein levels were positively correlated with blood Hb, WBC and platelet levels in children with AA in the recovery phase ($r=0.537$, 0.579 , 0.655 respectively; $P<0.05$). **Conclusions** The Foxp3 and NFAT1 protein levels in PB are reduced in children with AA, suggesting that they are involved in the pathogenesis of AA. The measurement of Foxp3 and NFAT1 protein levels may be useful in the severity evaluation of AA.

[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(3): 258-261]

Key words: Aplastic anemia; Foxp3; NFAT1; Child

[收稿日期] 2014-08-16; [接受日期] 2014-11-04

[作者简介] 曹祎明,女,硕士,住院医师。

再生障碍性贫血 (aplastic anemia, 简称再障) 是由免疫机制介导为主的、多因素综合作用引起的骨髓造血功能衰竭、全血细胞减少为特征的血液系统疾病, 已研究证实调节性 T 细胞 (Treg) 表达紊乱参与了再障的发病及转归^[1], 而转录因子 Foxp3 及活化的 T 细胞核因子 (NFAT) 在 Treg 的发育和分型中起重要作用, Foxp3 可能通过翻译水平来改变 Treg 的抑制功能, Foxp3 与 NFAT1 之间相互依存, 两者在自身免疫性疾病中的作用逐渐成为研究热点, 但有关 Foxp3 与 NFAT1 在再障发病中的作用目前尚不清楚, 且两者联合检测在国内外尚较少。本研究采用免疫印迹试验 (Western blot) 方法检测再障患儿外周血中 Foxp3 及 NFAT1 在蛋白水平的表达, 并分析其与外周血血红蛋白 (Hb)、白细胞 (WBC) 及血小板 (PLT) 数量的相关性, 探讨它们之间的相互关系及在再障免疫学发病机制中的作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象

研究对象为郑州市妇幼保健院、郑州大学一附院及三附院 2012 年 6 月至 2013 年 12 月确诊并治疗有效达缓解标准的 68 例再障患儿, 其中男 33 例, 女 35 例, 年龄 2~13 岁, 中位年龄 7 岁; 诊断及疗效标准均符合《小儿再障诊疗建议》^[2]。均为初治患儿, 既往均未给予输血及免疫抑制剂治疗。入院后均给予免疫抑制剂、小剂量皮质激素、雄性激素及预防出血、贫血及感染等一般对症支持治疗, 治疗 6 个月后均达缓解标准 (恢复期)。

郑州市妇幼保健院同期体检的 60 例健康儿童作为对照组, 其中男 30 例, 女 30 例, 年龄 1~13 岁, 中位年龄 6 岁, 其体检各项指标均在正常范围内。对照组与再障组年龄、性别差异无统计学意义 ($P>0.05$)。该研究获得两组儿童家长知情同意。

1.2 标本的采集

对照组于清晨空腹抽取外周静脉血 5 mL, 再障组于发病期及治疗 6 个月达恢复期清晨空腹抽取外周静脉血 5 mL, 用 EDTA 抗凝, 其中 1 mL 用于检测外周血 Hb、WBC 及 PLT 数量, 其余 4 mL 采用密度梯度离心法分离单个核细胞, 保存于 -80°C 冰箱, 用于 Western blot 检测。

1.3 Foxp3 和 NFAT1 蛋白的检测

采用 Western blot 法检测 Foxp3 和 NFAT1 蛋白的表达。提取细胞样品的蛋白质, 采用 BCA 法测定蛋白质含量, 将提取好的蛋白质样品在 Bio-Rad 电泳槽中进行电泳, Foxp3 蛋白采用半干转膜法、NFAT1 蛋白采用不连续转膜法分别进行转膜, 用封闭液封闭后洗膜 3 次, 一抗鼠抗人 NFAT1 蛋白单克隆抗体 (1:100 稀释)、一抗兔抗人 Foxp3 蛋白多克隆抗体 (1:200 稀释)、一抗鼠抗人 β -actin 蛋白单克隆抗体 (1:1000 稀释) 分别于 4°C 摇床孵育至少 12 h, PBST 洗膜 3 次, 用 HRP 标记的山羊抗鼠及山羊抗兔 IgG 抗体 (稀释比例均为 1:10000), 室温摇床孵育 1 h, PBST 洗膜 3 次, 用 ECL 化学发光试剂作用后于暗室内压 X 光片曝光、显影、定影, 水洗胶片晾干后保存。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 15.0 统计软件进行数据处理与分析, 计量数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多样本均数比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 LSD 法, 变量间的相关性分析采用 Pearson 积矩相关分析法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 再障组与对照组外周血 Foxp3 及 NFAT1 表达的比较

再障组发病期患儿外周血中 Foxp3、NFAT1 蛋白的表达水平较对照组明显降低 ($P<0.05$); 再障组恢复期的表达水平较发病期明显升高 ($P<0.05$), 与对照组比较差异无统计学意义 (表 1)。

表 1 两组中 Foxp3 及 NFAT1 蛋白的表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Foxp3 平均灰度值的比值	NFAT1 平均灰度值的比值
对照组	60	1.19 ± 0.03	1.25 ± 0.04
再障组			
发病期	68	0.87 ± 0.05^a	0.93 ± 0.07^a
恢复期	68	1.12 ± 0.06^b	1.17 ± 0.08^b
F 值		149.05	69.06
P 值		0.0016	0.0023

注: a 示与对照组比较, $P<0.05$; b 示与发病期比较, $P<0.05$ 。

2.2 再障组发病期患儿外周血中 Foxp3 和 NFAT1 蛋白表达的相关性

再障组发病期患儿外周血中 Foxp3 和 NFAT1 蛋白的表达呈正相关性 ($r=0.812$, $P<0.05$) (图1)。

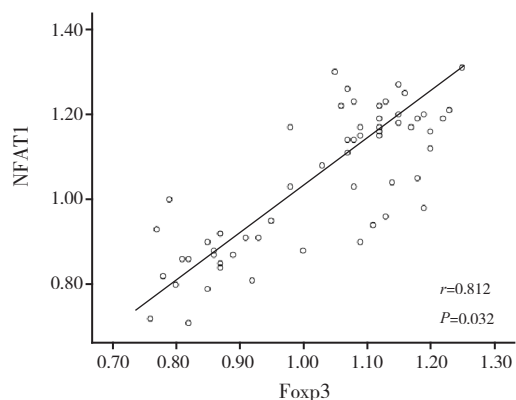


图1 再障组发病期患儿外周血中 Foxp3 和 NFAT1 蛋白表达的相关性

2.3 再障组恢复期患儿 Foxp3 和 NFAT1 蛋白表达水平与外周血细胞数量的相关性

再障组恢复期患儿 Foxp3 蛋白表达水平与外周血 Hb、WBC 及 PLT 数量均呈正相关关系 (r 分别为 0.537、0.579、0.655; $P<0.05$); NFAT1 蛋白表达水平与外周血 Hb、WBC 及 PLT 数量亦均呈正相关关系 (r 分别为 0.497、0.524、0.623; $P<0.05$)。

3 讨论

细胞免疫异常在再障的发病中起主导作用。新近研究证明,再障患者外周血中存在 Treg 数量和功能的异常^[3-4],而 Foxp3 特异性地表达在 CD4⁺CD25⁺ Treg 中,参与了 Treg 的发育、分化及免疫抑制功能^[5]。研究发现, Foxp3 基因缺陷的小鼠体内 CD4⁺CD25⁺ Treg 数量减少或调节功能缺失,可诱发严重的自身免疫性疾病,因此 Foxp3 对机体免疫稳态的调节起决定性作用^[6]。Foxp3 的蛋白表达水平在 T 细胞抗原受体 (TCR) 刺激后有所上升,且上升幅度与 Treg 的抑制功能呈明显正相关,提示 Foxp3 可能通过翻译水平来改变 Treg 的抑制功能^[7]。NFAT 是 TCR 介导的信号转导通路中非常关键的转录因子,可与人 IL-2 启动子的末梢抗原受体应答元件结合,并能产生快速诱导作用的核

因子^[8]。Solomou 等^[3]研究证实,再障患儿外周血中 Treg 表达水平降低, Foxp3 在蛋白水平和 mRNA 水平均明显降低,同时 NFAT1 蛋白的表达亦降低,且 NFAT1 蛋白的低表达可能可以解释 Treg 的减少频率和 Foxp3 的低表达,提示 Treg 缺乏及 Foxp3、NFAT1 表达降低与再障的发病有关。

本研究用 Western blot 方法检测 68 例再障患儿治疗前后及 60 例健康儿童的外周血中 Foxp3、NFAT1 蛋白的表达水平的变化,发现再障患儿发病期 (治疗前) 较对照组明显降低,与 Solomou 等^[3]研究结果一致,提示再障患儿体内 Foxp3 与 NFAT1 蛋白在外周血中表达是降低的,且发病期表达低于恢复期,由此可能导致了机体免疫耐受被打破,并启动自身免疫应答,促进了再障的发生,提示 Foxp3 与 NFAT1 蛋白的低表达可能参与了再障的发病。经治疗有效后外周血中 Foxp3 与 NFAT1 蛋白的表达水平上升,且与外周血 Hb、WBC 及 PLT 数量均呈正相关性,说明经免疫调节剂治疗有效后,机体免疫功能恢复,随之血象也逐渐恢复正常。因此,本研究认为 Foxp3 与 NFAT1 蛋白在一定程度上可以提示病情的变化。

转录因子 Foxp3 及 NFAT 均在 Treg 的发育和分型中起重要的作用。Bettelli 等^[9]研究发现: Foxp3 通过抑制 NFAT 的活性发挥它强有力的免疫抑制作用,它们之间相互联系,并且 Foxp3 可以阻断 NFAT 调控的基因表达。NFAT 蛋白的一部分片段定位于 Treg 的核心,在此处选择性地与 Foxp3 蛋白结合,从而控制 Treg 的抑制功能^[10]。当 NFAT 家族成员缺失时, CD4 T 细胞向 Treg 转化的能力也会明显降低, NFAT 的数量也决定了 TGF- β 诱导的 Treg 的表达量^[11]。本研究显示,再障患儿外周血单个核细胞内 Foxp3、NFAT1 蛋白的表达呈正相关性,说明两者在 Treg 的发育和分化中可能起协同作用。

综上所述,本研究表明,再障患儿外周血单个核细胞中 Foxp3、NFAT1 蛋白表达明显降低,两者的表达水平呈正相关性,且与外周血 Hb、WBC 及 PLT 数量均呈正相关性,提示 Foxp3、NFAT1 蛋白的低表达可能参与了再障的发生发展,而且在一定程度上可以提示病情的变化,此发现可作为再障免疫治疗的新靶点之一进行深入研究。

[参考文献]

- [1] 王西阁, 王晓格, 栾斌, 等. 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[J]. 中国当代儿科杂志, 2010, 12(4): 241-243.
- [2] 中华医学会儿科分会血液组, 中国小儿血液与肿瘤编委会. 小儿再生障碍性贫血的诊疗建议[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2007, 12(5): 236-240.
- [3] Solomou EE, Rezvani K, Mielke S, et al. Deficient CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T regulatory cells in acquired aplastic anemia[J]. Blood, 2007, 110(5): 1603-1606.
- [4] Chen J, Ellison FM, Eckhaus MA, 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.
- [5] Park JH, Ko JS, Shin Y, et al. Intranuclear interactomic inhibition of Foxp3 suppresses functions of Treg cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 451(1): 1-7.
- [6] 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.
- [7] Sakaguchi S. Regulatory T cells: history and perspective[J]. Methods Mol Biol, 2011, 707(10): 3-17.
- [8] Ghosh S, Koralov SB, Stevanovic I, et al. Hyperactivation of nuclear factor of activated T cells 1 (NFAT1) in T cells attenuates severity of murine autoimmune encephalomyelitis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(34): 15169-15174.
- [9] Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-κB to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(14): 5138-5143.
- [10] Li Q, Shakya A, Guo X, et al. Constitutive nuclear localization of NFAT in Foxp3⁺ regulatory T cells independent of calcineurin activity[J]. J Immunol, 2012, 188(9): 4268-4277.
- [11] Vaeth M, Schliesser U, Muller G, et al. Dependence on nuclear factor of activated T-cells (NFAT) levels discriminates conventional T cells from Foxp3⁺ regulatory T cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(40): 16258-16263.

(本文编辑: 邓芳明)

· 消息 ·

2015年国际新生儿重症监护学高峰论坛征文通知

由南京医科大学附属南京儿童医院、复旦大学附属儿科医院和浙江大学附属儿童医院联合主办、湖北省妇幼保健院承办的“2015年国际新生儿重症监护学高峰论坛”拟于2015年6月11日至14日在中国武汉召开。本次会议是经国家继续教育委员会批准的国家级继续医学教育项目(编号: 2015-06-03-031), 突出“新生儿危重病与重症监护”的主题, 旨在交流新生儿危重病与重症监护学领域的新理论、新知识和新技术, 分享新生儿危重病救治和NICU管理经验, 促进新生儿危重病与新生儿重症监护、诊断、治疗和护理技术的普及、推广和提高, 不断提高危重新生儿抢救水平。现将会议征文有关事项通知如下, 欢迎大家踊跃投稿和参加会议。

一、征文内容

1. 新生儿危重病的基础与临床研究; 2. 新生儿重症监护、诊断与治疗技术的临床应用; 3. 新生儿疑难病、罕见病的诊断与治疗; 4. NICU的护理; 5. NICU的建设与管理。

二、征文要求

1. 未在国内外公开刊物上发表的论著、综述和讲座等; 2. 中英文摘要各1份, 1000字以内, 编排顺序为: 文题、单位、邮编、姓名、正文。摘要正文格式必须包括: 目的、方法、结果和结论四部分; 3. 来稿请发至电子信箱: nanjingnicu@163.com, 发稿时务必注明“2015年国际新生儿重症监护学高峰论坛”字样; 4. 征文截止期: 2015年4月30日; 5. 收到您的投稿论文, 会议秘书处会给您寄发书面的论文录用和会议报到通知。

三、无论文欲参加会议者可来电、来函索取会议通知, 会议通知和注册表可在南京医科大学附属南京儿童医院官方网站(www.njch.com.cn)下载。

联系人及电话: 李菡 13439968225; 戴峰 15951722599; 电子邮箱: 13439968225@126.com; nanjingnicu@163.com

南京医科大学附属南京儿童医院
复旦大学附属儿科医院
浙江大学附属儿童医院
2015年2月1日