文章编号:1000-5404(2007)09-0767-03

论著

重症肌无力胸腺 Foxp3 基因转录表达水平及其临床意义

马　铮,王如文,蒋耀光,邹志强,赵云平,龚太乾　(第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军胸外科中心,重庆 400042)

提　要: 目的　探讨抑制性转录调节因子 Foxp3 在重症肌无力(myasthenia gravis, MG)胸腺内表达及其临床意义。**方法**　收集本科 2003 年 1 月至 2006 年 6 月手术切除的 MG 胸腺组织 50 例,采用免疫组织化学、Western blot 以及 RT-PCR 技术,检测 Foxp3 在胸腺内组织定位,蛋白及 mRNA 转录表达水平以及与 MG 胸腺病理、临床特征间关系。**结果** Foxp3 阳性细胞主要位于胸腺内髓质及血管周围间质,少量见于皮质区;MG 胸腺组织中 Foxp3 显著低于对照胸腺组织;其中胸腺瘤组织中仅有少量表达,与增生胸腺差异显著;Foxp3 表达水平与 MG 临床分型负相关。**结论**　MG 胸腺 Foxp3 基因转录与表达异常,可能参与 MG 自身免疫的发生。

关键词: Foxp3;重症肌无力;胸腺瘤
中图法分类号: R322.53; R394.2; R746.102　　**文献标识码**: A

Decreased expression of Foxp3 in myasthenic thymus and thymoma

MA Zheng, WAN Ru-wen, JIANG Yao-guang, ZOU Zhi-qiang, ZHAO Yun-ping, GONG Tai-qian (Thoracic and Cardiovascular Surgery Research Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective**　To explore the changes of Foxp3 expression in myasthenic thymus and thymoma. **Methods**　Thymic specimens and clinical data of 50 myasthenia gravis (MG) patients who underwent thymectomy from January 2003 to June 2006 were collected, classified into three types according to MGFA clinical classification: hyperplastic thymus, atrophic thymus and thymoma. The thymic tissues collected near the thymoma served as thymic specimens near thymoma. The normal thymic tissues excised in cardiac surgery were used as control. The levels of Foxp3 mRNA and protein, as well as their relationship with clinical characteristics, were examined by immunohistochemistry, Western blotting and RT-PCR. **Results**　Foxp3 positive cells mainly located in the medulla of myasthenic thymus and mesenchyma around blood vessels, less in cortical area. The levels of Foxp3 mRNA and protein were significantly lower in myasthenic thymus than that of non-myasthenic control specimens, much less in the specimens of thymoma with a significant difference between them and that of hyperplastic thymus. The levels of Foxp3 mRNA and protein were negatively associated with MGFA clinical classification. **Conclusion**　Foxp3 expression decreased in myasthenic thymus and thymoma, indicating a role of Foxp3 in etiology of MG.

Key words: Foxp3; myasthenia gravis; thymoma

重症肌无力(myasthenia gravis, MG)系 T 细胞辅助、抗乙酰胆碱受体(AchR)抗体介导、累及神经肌肉接头的一种自身免疫性疾病,患者多数伴有胸腺病理改变。现已发现 MG 胸腺内存在大量活化的 AchR 特异性 T、B 淋巴细胞,提示胸腺异常可能是 MG 发生、发展的重要原因。但是,对于胸腺内自身免疫产生、免疫稳态破坏的机制尚不清楚。Treg 细胞(regulatory T cell)系胸腺产生的一种免疫抑制性调节细胞,在维持免疫平衡、抑制自身免疫中起重要作用。Foxp3 为 Treg 特异性表达的核转录抑制因子,参与 Treg 免疫抑制功能的实现。本研究采用 RT-PCR、Western blot、免疫组化方法,检测 MG 胸腺病理组织中 Foxp3 基因表达与转录,以期进一步探讨 MG 胸腺中自身免疫的发生机制。

1　材料与方法

1.1　标本与分组

收集本科 2003 年 1 月至 2006 年 4 月手术切除之 MG 胸腺共 50 例。男性 22 例,女性 28 例;年龄 9 ~ 74(26.66 ± 16.29)岁;MGFA 临床分型: Ⅰ型 22 例, $Ⅱ_a$ 型 10 例, $Ⅱ_b$ 型 11 例, Ⅲ型 7 例($Ⅲ_a$ 2 例, $Ⅲ_b$ 4 例)。将胸腺标本按常规病理分组:增生胸腺组 37 例(hyperplatic thymus, HT)、萎缩胸腺组 6 例(atrophy thymus, AT)、胸腺瘤组 7 例(thymoma, Tm),同时取胸腺瘤旁胸腺组织作为瘤旁胸腺组(thymus near thymoma, Tnt)7 例。

对照胸腺组织(control group, CG)20 例,取自本院心外科手

作者简介:马　铮(1971 -),男,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事胸部疾病与重症肌无力外科治疗方面的研究,发表论文 5 篇。电话:(023)68757241,E-mail: mazheng@mail.dph-fsi.com
通讯作者:王如文,电话:(023)68757234
收稿日期:2006-12-12;修回日期:2007-01-11

术为暴露心包而切除的胸腺组织(排除急性感染患者),男性9例,女性11例;年龄3~45(25.37±12.32)岁;与MG组比较性别($\chi^2=0.006$,$P=0.94$)、年龄($t=1.99$,$P=0.75$)无显著差异。

1.2 MG胸腺Foxp3表达

免疫组化染色操作按试剂盒(由北京中杉公司提供)说明书。抗原修复采用Tris-EDTA修复液,于普通微波炉煮沸5 min,冷却至室温;小鼠抗人Foxp3单克隆抗体(eBioscience公司)稀释度为1:50;采用DAB显色。阳性判断:Foxp3定位于细胞核,阳性表达为细胞核呈棕色或棕褐色着色。在高倍视野下计数,阳性细胞数占同视野细胞数比较:<10%为阴性,以"-"表示;"+":≥10%;"++":≥30%。

1.3 MG胸腺Foxp3蛋白表达

采用Western blot方法。常规方式提取组织蛋白,Bradford法测定总蛋白浓度。各蛋白样本经SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳约2 h后,电转印至PVDF膜(120 V,2.5 h),PVDF膜封闭液(1% BSA、0.02 mol/L PBS)内封闭,4 ℃过夜;一抗(anti-Foxp3 1:500稀释)室温孵育2 h,洗涤后,加入辣根过氧化物酶标记抗体二抗,同样37 ℃孵育1 h及PBST洗膜。最后硫酸镍铵增强法(0.06% DAB、2.5%硫酸镍铵、0.1 mol/L乙酸钠、0.1% 30% H_2O_2)显色。凝胶成像分析仪行灰度值测定。以Foxp3与β-actin灰度值的比值为Foxp3蛋白的相对表达量。

1.4 MG胸腺Foxp3基因RT-PCR检测

使用Trizol试剂提取组织总RNA。逆转录:RNA与Oligo(dT) 15及各种反应混合物42 ℃孵育1 h,90 ℃孵育5 min后冰上冷却备用。PCR扩增反应:采用软件Premier 5.0设计、合成Foxp3引物,上游5′-GGAGTTCCGCAAGAAACGG-3′,下游5′-CTGAAGTAATCTGTGCGAGC-3′;扩增片段分别为629、661 bp。反应条件:95 ℃变性60 s,60 ℃退火60 s,72 ℃延伸90 s,30个循环,最后72 ℃延伸5 min。产物于1.5%的琼脂糖凝胶电泳,自动电泳凝胶成像分析仪采集并测定灰度值。以目的条带与β-actin灰度值比值反映Foxp3 mRNA相对表达水平。

1.5 统计学方法

采用SPSS 10.0统计软件,双样本计量资料采用t检验,多组计量资料采用单因素方差分析,计数资料采用χ^2检验。

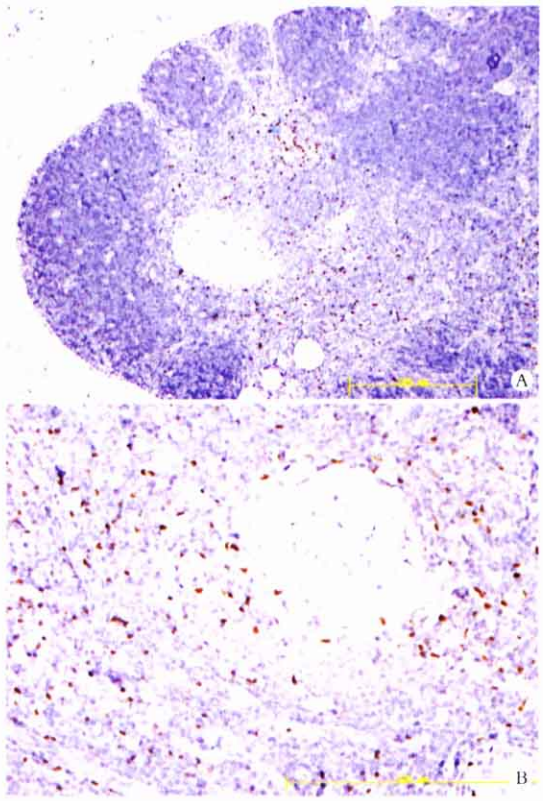
2 结果

2.1 MG胸腺中Foxp阳性细胞分布

免疫组织化学染色显示:Foxp3阳性细胞主要位于胸腺髓质区及小梁间隔,部分呈簇分布,胸腺皮质内可见散在少量阳性细胞(图1A)。与对照胸腺组织比较,MG增生胸腺、萎缩胸腺Foxp3阳性细胞分布定位基本相似,但阳性细胞比例显著低于对照;增生胸腺中,可见Foxp3阳性细胞围绕Hassall's Body、淋巴滤泡及生发中心(图1B),呈簇分布。胸腺瘤组织中,仅可见少量Foxp3阳性细胞;胸腺瘤旁胸腺组织以及萎缩胸腺中,亦可见相当数量的Foxp3阳性细胞,分布与对照及增生胸腺组织一致,但阳性比例显著降低。

2.2 MG胸腺Foxp3蛋白表达

HT、Tnt、AT中Foxp3蛋白表达水平显著低于CG($P<0.01$);与HT相比,Tnt及AT组均无显著差异($P>0.05$);而Tm中仅有少量Foxp3表达,差异非常显著($P<0.01$)(表1)。



A:Foxp3阳性细胞主要位于胸腺髓质 (S-P×100)
B:Foxp3阳性细胞围绕Hassall's Body (S-P×200)

图1 胸腺Foxp3表达

表1 MG胸腺Foxp3表达

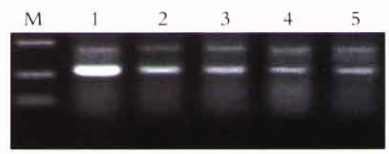
组别	n	Foxp3阳性细胞			Foxp3蛋白	Foxp3 mRNA
		(-)	(+)	(++)		
CG	20	0	7	13	3.73±0.57	4.14±0.66
HT	37	2[a]	26[a]	9[a]	2.98±0.62[b]	2.69±0.68[b]
AT	6	2[ac]	2[ac]	2[ac]	2.42±0.49[b]	2.42±0.43[b]
Tnt	7	1	4	2	2.23±0.35[b]	2.09±0.53[b]
Tm	7	7[bd]	0[bd]	0[bd]	0.90±0.41[bd]	1.18±0.13[bd]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与CG组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与HT组比较

Foxp3蛋白表达与临床特征的关系(表2):胸腺组织中Foxp3蛋白表达水平与年龄、性别无关;但与MGFA临床分型有相关性($r=0.506$,$P<0.01$),临床症状较轻者,Foxp3蛋白表达水平较高。

2.3 MG胸腺Foxp3 mRNA RT-PCR检测

HT、AT、Tnt中Foxp3 mRNA水平均显著低于CG($P<0.01$)(图2,表1);胸腺瘤组织中Foxp3 mRNA仅有少量表达,与增生胸腺相比,差异非常显著($P<0.01$);HT与TNT、AT间无显著差异($P>0.05$)。



M:标准;1:CG;2:HT;3:AT;4:Tnt;5:Tm

图2 不同胸腺组织Foxp3 mRNA水平

与 MG 患者临床特征比较分析，胸腺组织中 Foxp3 mRNA 转录与性别、年龄无关，但与其蛋白表达相似，与 MGFA 临床分型有关（$r=0.430$，$P<0.01$），临床分型重者，mRNA 转录水平显著降低（表 2）。

表 2　MG 胸腺 Foxp3 蛋白、mRNA 表达与临床特征的关系

项目	n	Foxp3 蛋白		Foxp3 mRNA	
		R 值	P 值	R 值	P 值
性别					
男	22	2.91 ± 0.69	$P>0.05$	2.76 ± 0.58	$P>0.05$
女	28	2.72 ± 0.59		2.42 ± 0.71	
年龄（岁）					
<40	40	2.78 ± 0.68	$P>0.05$	2.59 ± 0.65	$P>0.05$
≥40	10	2.94 ± 0.43		2.51 ± 0.76	
MGFA 分型					
Ⅰ	22	3.14 ± 0.34	$F=8.11$	2.89 ± 0.35	$F=5.52$
Ⅱ	21	2.65 ± 0.38	$P<0.01$	2.40 ± 0.45	$P<0.01$
Ⅲ	7	2.23 ± 0.10		2.11 ± 0.33	

3　讨论

研究显示，Treg 的发育以及免疫抑制功能的实现依赖于转录调节因子 Foxp3 的表达，后者功能异常与多种自身免疫性疾病有关[1]。Foxp3 表达出现于单阳性胸腺细胞发育阶段，即在 $CD4^+CD8^+$ 双阳性胸腺细胞离开皮质进入胸腺髓质区之后[1,2]；位于髓质的胸腺上皮细胞以及树突状细胞提供 MHC-抗原，与 TCR 高亲和力作用，促进 Foxp3 与 CD25 表达，从而选择出具有免疫调节功能的 $CD4^+CD25^+$ Treg[2,3]。胸腺髓质内的 Hassall's Body 亦被认为与 $CD4^+CD25^+$ Treg 表达 Foxp3、获得抑制性调节功能关系密切[4]。本实验结果显示，Foxp3 阳性细胞在对照及 MG 胸腺均有表达，定位分布较为一致；主要位于胸腺髓质以及小梁间隔，并在 Hassll's Body 四周成簇分布，少量见于胸腺皮质，进一步证实 Foxp3 表达于单阳性胸腺细胞阶段。增生胸腺是 MG 患者最常见的病理类型，组织学表现为淋巴滤泡增生、伴有大量生发中心形成，反映出 AchR 特异性 T、B 淋巴细胞可能在胸腺内活化并致病[5]。本组 MG 胸腺 Foxp3 阳性细胞亦于淋巴滤泡副皮质区，以及生发中心周围分布，提示其可能参与调节胸腺内活化的特异性 T、B 淋巴细胞[6]。此外，尽管萎缩胸腺以及瘤旁胸腺组织皮质明显变薄，但其髓质相对增宽，仍可见成簇或散在的 Foxp3 阳性细胞；而胸腺瘤中，则罕见 Foxp3 阳性细胞。

现已发现在多种自身免疫性疾病中存在 Foxp3 基因转录与表达异常。大约 60% IPEX（人类免疫失调-多发性内分泌腺病-肠病-X 连锁综合征）患者存在 Foxp3 编码区突变，10% 表现为 Foxp3 mRNA 显著降低[7]。系统性红斑狼疮、多发性硬化等患者亦发现 Foxp3 mRNA 异常[8,9]。Balandina 等[10]报道，MG 患者 $CD4^+CD25^+$ 胸腺细胞 Foxp3 mRNA 水平低于对照，伴免疫抑制功能降低。但亦有研究表明，Foxp3 不仅表达于 $CD4^+CD25^+$ 胸腺细胞，亦见于 $CD8^+CD25^+$ 胸腺细胞，后者同样具有抑制性免疫调节功能[11]。因此，对于后者以及胸腺内总体 Foxp3 表达水平是否存在异常，目前还不明确。本研究表明 MG 患者胸腺 Foxp3 mRNA 及蛋白均较对照胸腺组织显著降低，提示其存在转录调控异常。胸腺瘤则极少 Foxp3 阳性表达，可能与文献[12]报道 MG 相关胸腺瘤 Treg 细胞功能与数量异常有关。研究结果还提示，Foxp3 表达的下降与 MG 患者性别、年龄无关，而与 MGFA 临床分型呈负相关，临床症状较重者，Foxp3 表达水平较低，提示 MG 胸腺 Foxp3 转录表达改变可能在 MG 发病中起着重要作用，对其作用机制有待进一步研究。

参考文献：

[1] Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing $CD25^+CD4^+$ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self [J]. Nat Immunol, 2005, 6(4): 345 - 352.

[2] Ziegler S F. FOXP3: of mice and men [J]. Annu Rev Immunol, 2006, 24: 209 - 226.

[3] Fontenot J D, Gavin M A, Rudensky A Y. Foxp3 programs the development and function of $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells [J]. Nat Immunol, 2003, 4(4): 330 - 336.

[4] Watanabe N, Wang Y H, Lee H K, *et al*. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells in human thymus [J]. Nature, 2005, 436(7054): 1181 - 1185.

[5] Suto Y, Araga S, Sakuma K, *et al*. Myasthenia gravis with thymus hyperplasia and pure red cell aplasia [J]. J Neurol Sci, 2004, 224(1 - 2): 93 - 95.

[6] Bluestone J A, Tang Q. How do $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells control autoimmunity? [J]. Curr Opin Immunol, 2005, 17(6): 638 - 642.

[7] Ochs H D, Ziegler S F, Torgerson T R. FOXP3 acts as a rheostat of the immune response [J]. Immunol Rev, 2005, 203: 156 - 164.

[8] Alvarado-Sanchez B, Hernandez-Castro B, Portales-Perez D, *et al*. Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus [J]. J Autoimmun, 2006, 27(2): 110 - 118.

[9] Venken K, Hellings N, Hensen K, *et al*. Secondary progressive in contrast to relapsing-remitting multiple sclerosis patients show a normal $CD4^+CD25^+$ regulatory T-cell function and FOXP3 expression [J]. J Neurosci Res, 2006, 83(8): 1432 - 1446.

[10] Balandina A, Lecart S, Dartevelle P, *et al*. Functional defect of regulatory $CD4^+CD25^+$ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis [J]. Blood, 2005, 105(2): 735 - 741.

[11] Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, *et al*. Human $CD8^+CD25^+$ thymocytes share phenotypic and functional features with $CD4^+CD25^+$ regulatory thymocytes [J]. Blood, 2003, 102(12): 4107 - 4114.

[12] Luther C, Poeschel S, Varga M, *et al*. Decreased frequency of intrathymic regulatory T cells in patients with myasthenia-associated thymoma [J]. J Neuroimmunol, 2005, 164(1 - 2): 124 - 128.

（编辑　邓强庭）