论著

文章编号:1000-5404(2008)21-1980-04

# 高迁移率族蛋白B1对小鼠调节性T细胞Foxp3表达的影响

张 莹,姚咏明,董 宁,刘 峰,盛志勇 (解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所,北京 100037)

**摘 要:目的** 观察高迁移率族蛋白B1(high mobility group box-1 protein,HMGB1)对调节性T细胞(regulatory T cell,Treg)叉头翼状螺旋转录因子(forkhead/winged helix transcription factor p3,Foxp3)基因及蛋白表达的影响,并对其机制进行初步探讨。**方法** 免疫磁珠法分离正常BALB/c小鼠脾脏Treg。采用固相包被抗-CD3及可溶性CD28辅助活化,给予HMGB1刺激,观察HMGB1刺激与Foxp3基因及蛋白表达的时间-效应关系及剂量-效应关系。**结果** 经HMGB1刺激后的Treg Foxp3蛋白表达于24~72 h明显下调($P<0.05$,$P<0.01$),其中以作用48、72 h后表达下调尤为显著($P<0.01$);给予不同剂量HMGB1刺激72 h后,10、100、1 000 ng/ml的HMGB1均可诱导Foxp3表达减弱($P<0.05$,$P<0.01$),其中HMGB1的浓度在1 000 ng/ml时Foxp3表达下调最明显。Foxp3 mRNA表达呈现出与蛋白表达相同的时间、剂量依赖关系。**结论** HMGB1通过诱导Treg Foxp3 mRNA表达下调,进一步影响其蛋白产物合成,从而影响Treg免疫调节活性。

**关键词:** 高迁移率族蛋白B1;调节性T细胞;Foxp3;免疫调节

**中图法分类号:** R341; R392.12 **文献标识码:** A

# Effect of high mobility group box-1 protein on Foxp3 expression in spleen regulatory T cells in mice

ZHANG Ying, YAO Yong-ming, DONG Ning, LIU Feng, SHENG Zhi-yong (Burns Institute, First Affiliated Hospital of General Hospital of PLA, Beijing 100037, China)

**Abstract: Objective** Intranuclear forkhead/winged helix transcription factor p3 (Foxp3) plays a key role in T cell-mediated immunosuppression. The present study was performed to investigate the effects of high mobility group box-1 protein (HMGB1) on Foxp3 gene as well as protein expressions in splenic regulatory T cells (Tregs) and their potential regulating mechanisms in mice. **Methods** $CD4^+CD25^+$ Tregs isolated from the spleens of male BABL/c mice by magnetic beads were seeded on 96-well ($1\times10^5$ cells/well) cell culture plates coated with anti-CD3 (1 μg/ml) and soluble anti-CD28 (1 μg/ml), and the cells were stimulated with HMGB1 at various intervals or at different concentrations. After being stimulated, the Foxp3 mRNA/protein expressions in the Tregs were determined. The time-dependent and dose-dependent responses between HMGB1 and intranuclear Foxp3 expression were analyzed by flow cytometry, and the expressions of Foxp3 mRNA of Tregs were analyzed by quantitative PCR of SYBR GREEN. **Results** After stimulation with HMGB1, the intranuclear Foxp3 protein and mRNA expressions of splenic Tregs in mice were markedly down-regulated in 24 h to 72 h ($P<0.05$ or 0.01), and the expression levels of Foxp3 protein and Foxp3 mRNA were lowest at 72 h ($P<0.01$). When Tregs were cultured in the presence of 10, 100, and 1 000 ng/ml HMGB1 for 72 h, the expressions of Foxp3 protein and mRNA were significantly down-regulated ($P<0.05$ or 0.01), and values of this molecules were lowest in 1 000 ng/ml HMGB1-treated group ($P<0.01$). **Conclusion** These data indicate that HMGB1 stimulation can result in significant down-regulation of the Foxp3 mRNA and protein expressions in mouse splenic Tregs. HMGB1 appears to be a potential immunoregulatory signal that influences the function of Tregs by inhibiting $CD4^+CD25^+$ Treg activity.

**Key words:** high mobility group box-1 protein; regulatory T cells; forkhead/winged helix transcription factor p3; immunoregulation

**基金项目:** 国家重点基础研究发展计划(973计划)(2005CB522602);国家自然科学基金(30672178, 30872683);国家杰出青年科学基金(30125020)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China (973 Program, 2005CB522602), the National Natural Science Foundation of China (30672178, 30872683) and the National Science Fund for Outstanding Young Scholars of China (30125020)

**作者简介:** 张 莹,女,河北省涿州市人,硕士,主治医师,主要从事创伤感染与免疫方面的研究。电话:(010)66867394

**通信作者:** 姚咏明,电话:(010)66867394, E-mail: c_ff@sina.com

**收稿日期:** 2008-06-06;**修回日期:** 2008-07-28

高迁移率族蛋白 B1(high mobility group box-1 protein,HMGB1)作为一种新近发现的晚期炎症介质,在炎症、创伤脓毒症发病中具有重要作用,并参与介导了免疫功能障碍的病理生理过程,但其确切的分子作用机制尚未完全阐明[1]。近年来,调节性 T 细胞(regulatory T cell,Treg)尤其是 $CD4^+CD25^+$ Treg 作为具有成熟功能的独立 T 细胞亚群,在免疫调节中的作用日益受到重视,目前对其研究除涉及免疫耐受外,在炎症、感染及创伤应激中的免疫调节作用也正引起许多学者的关注[2]。近年来的研究表明,因 Foxp3 mRNA 及蛋白产物 Scurfy 的表达状况直接影响 Treg 表型及活性的发挥,界定 Treg 最可靠的依据仍属叉头翼状螺旋转录因子(forkhead/winged helix transcription factor p3,Foxp3)[3]。本实验拟观察 HMGB1 对 Treg Foxp3 基因及蛋白表达的影响,并对其机制进行初步探讨。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料

1.1.1　动物　　实验小鼠为健康清洁级 BALB/c 小鼠,购于中国医学科学院实验动物中心,均为雄性,体质量(20 ± 2) g。

1.1.2　主要试剂与仪器　　RPMI1640 培养基购自北京天润善达生物有限公司,胎牛血清购自天海生物有限公司,HMGB1 购自 Sigma 公司;功能纯化级抗小鼠-CD3/CD28、FITC 标记的抗小鼠 Foxp3 试剂盒购于 eBioscience 公司;总 RNA 抽提试剂盒、逆转录试剂盒购于 Promega 公司;RealMaster Mix 购于天根生物有限公司;缓冲液(PBS),pH 7.2,高压灭菌,溶血素过滤除菌(4 ℃保存)。MiniMACS 磁性分离仪购自德国 Miltenyi Biotec 公司;流式细胞仪 FACS Calibur 系美国 BD 公司生产,PCR 仪为 7500 Fast Real-Time PCR System 产品,紫外可见分光光度仪为美国 Beckman 公司 DU-800 产品。

### 1.2　方法

1.2.1　小鼠脾细胞的分离及单个核细胞制备　　小鼠断颈处死后无菌取脾脏,置于平皿中,加入 3 ~ 5 ml PBS,用 5 ml 注射器活塞研磨,过 400 钼滤网 2 次;收集细胞悬液,注入尖体离心管中;加入溶血素至 15 ml,混匀后静置 10 min。2 000 r/min 离心 10 min 后去上清,加入 15 ml PBS 离心洗涤 2 次,弃上清,取下层细胞。

1.2.2　磁珠孵育和磁性分选　　采用 MiniMACS 免疫磁性分离系统进行 2 步分离[4],每 $1\times10^7$ 细胞加入 10 μl Biotin 抗体 4 ℃孵育 10 min。加入 20 μl 抗-Biotin 磁珠,10 μl PE 标记的抗 CD25 抗体 4 ℃孵育 15 min,离心洗涤。细胞定容至 0.5 ml,经 LD 柱阴性选择后收集流出细胞悬液,离心洗涤弃上清获取 $CD4^+$ T 细胞。

每 $1\times10^7$ 细胞加入 10 μl 抗-PE 磁珠,4 ℃孵育 15 min,离心洗涤。经 MS 柱进行第 2 步分选,收集流出细胞悬液为 $CD4^+CD25^-$ T 细胞。将分离柱移出磁场,加压洗脱,收集细胞。依上法经 MS 柱再次分选获得 $CD4^+CD25^+$ T 细胞,计数细胞。用 10% FCS-RPMI1640 完全培养基重悬 Treg,调整细胞数为 $1\times10^5 ml^{-1}$,接种于 96 孔细胞培养板。

1.2.3　流式细胞仪检测 Treg 核内 Foxp3 表达情况　　收集细胞,用预冷的 PBS 洗涤细胞,按 Foxp3 试剂盒操作说明将细胞破膜(破膜时间选为 2 h)。破膜缓冲液洗涤 2 次后加入 100 μl PBS 重悬细胞。然后加入 FITC 标记抗小鼠 Foxp3,4 ℃孵育 30 min 后 PBS 洗涤 2 次,所得细胞悬浮于 PBS 中通过流式细胞仪(FACS Calibur)检测,结果以 $CD4^+CD25^+$ Foxp3 表达的百分率表示。

1.2.4　SYBR GREEN 法检测 Treg Foxp3 mRNA 的表达　　收集细胞,按试剂盒操作说明采取异硫氢酸胍一步法提取总 RNA。将总 RNA 稀释后在紫外可见分光光度仪上进行纯度检测,$D(260)/D(280)$ 值在 1.8 ~ 2.0,分别计算出含 2 μg RNA 的标本量。按试剂盒说明进行逆转录。聚合酶链反应(PCR)采用 20 μl 体系,一次性加入 Mix、正向引物、反向引物、DNA 模板。选取条件:起始模板变性 95 ℃,1 min;PCR 循环中模板变性 95 ℃,15 s,退火/延伸 60 ℃,40 s。循环数为 40 个。引物序列:Foxp3 上游:5′-CAGCTGCCTACAGTGCCCCTAG-3′;下游:5′-CATTTGCCAGCAGTGGGTAG-3′;GAPDH:上游:5′-TTCACCAC-CATGGAGAAGGC-3′;下游:5′-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3′。

1.2.5　HMGB1 对 Treg Foxp3 蛋白及 mRNA 表达的时间-效应关系　　96 孔板固相包被抗-CD3(1 μg/ml),加入抗可溶性抗-CD28(1 μg/ml)。24 孔细胞分为 3 组,加入 HMGB1 刺激。依 HMGB1(100 ng/ml)刺激时间不同设为 24 h 组、48 h 组、72 h 组,各 4 孔,各余 4 孔设为正常对照。流式细胞仪分析 Foxp3 表达情况。同法分别收集刺激后细胞,提取总 RNA 后逆转录,经 SYBR GREEN 法检测 Treg Foxp3 mRNA 的表达情况。

1.2.6　HMGB1 对 Treg Foxp3 蛋白及 mRNA 表达的剂量-效应关系　　96 孔板固相包被抗-CD3(1 μg/ml),加入抗-CD28(1 μg/ml)。16 孔细胞依 HMGB1 浓度不同设为 0 ng/ml 组(正常对照组)、10 ng/ml 组、100 ng/ml 组、1 000 ng/ml 组各 4 孔,72 h 后用流式细胞仪分析 Foxp3 表达情况。同法分别收集刺激后细胞,提取总 RNA 后逆转录,经 SYBR GREEN 法检测 Treg Foxp3 mRNA 的表达情况。

### 1.3　统计学处理

采用 CellQuest 数据分析软件进行分析。各组标准化的样本数值用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件对数据进行单因素方差分析。

## 2　结果

### 2.1　小鼠 $CD4^+CD25^+$ Treg 纯度分析

正常小鼠脾脏单个核细胞经过 MACS 2 次分选后,$CD4^+CD25^+$ T 细胞纯度平均可达到 96%,其中 $CD25^-$ 细胞 < 3%;$CD4^+CD25^-$ T 细胞纯度平均可达 92%,其中 $CD25^+$ 细胞 < 1%。所获得的 $CD4^+CD25^+$ T 细胞经台盼蓝检测活性 > 97%。

### 2.2　HMGB1 刺激与 $CD4^+CD25^+$ Treg Foxp3 表达的时间-效应关系

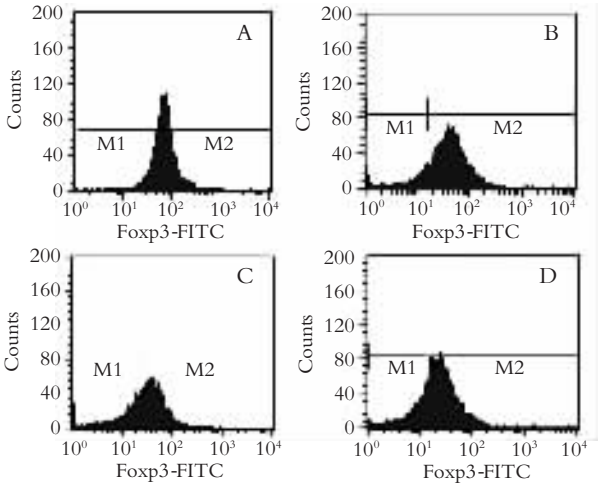
由表 1、图 1 可见,正常对照组小鼠 $CD4^+CD25^+$ Treg 高表达 Foxp3。与正常对照组比较,HMGB1 刺激后 24 ~ 72 h Foxp3 表达的百分率均显著降低($P<0.05$,$P<0.01$),其中 48、72 h 下降尤为明显($P<0.01$)。同样,以未刺激小鼠 $CD4^+CD25^+$ Treg Foxp3 mRNA 表达值(RQ 值)作为对照组,其表达水平较高。与正常对照组比较,HMGB1 刺激后 24 ~ 72 h,Treg Foxp3

mRNA 表达均明显下降($P<0.05$,$P<0.01$),并于刺激 72 h 下降更显著($P<0.01$,表 1)。

**表 1 HMGB1 刺激对 CD4$^+$CD25$^+$Treg Foxp3 表达的时间-效应关系($\bar{x}\pm s$)**

| 组别 | Foxp3 表达百分率(%) | Foxp3 mRNA(RQ 值) |
|---|---|---|
| 正常对照组 | 68.48 ± 1.65 | 0.963 5 ± 0.013 1 |
| 24 h 组 | 61.67 ± 4.04[a] | 0.904 1 ± 0.039 8[a] |
| 48 h 组 | 53.20 ± 3.37[b] | 0.845 2 ± 0.024 7[b] |
| 72 h 组 | 47.84 ± 1.08[b] | 0.806 9 ± 0.053 2[b] |

a: $P<0.05$,b: $P<0.01$,与正常对照组比较

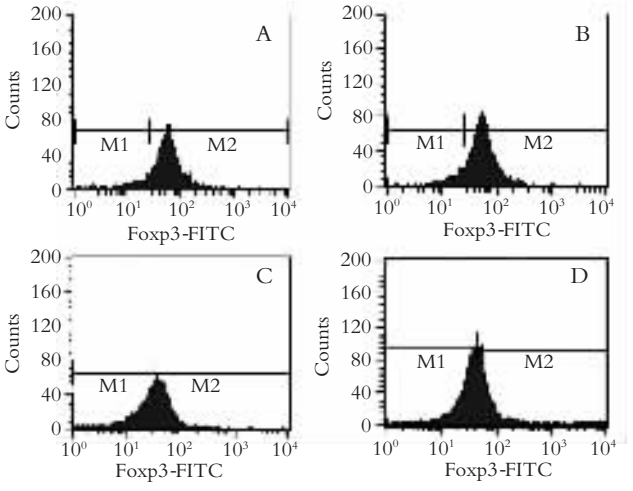



A:正常对照组;B:24 h 组;C:48 h 组;D:72 h 组

**图 1 不同作用时间 HMGB1 对 Treg Foxp3 蛋白表达的影响**

### 2.3 HMGB1 与 CD4$^+$CD25$^+$Treg Foxp3 表达的剂量-效应关系

加入 HMGB1 刺激,72 h 后测定 Foxp3 蛋白表达百分率,与正常对照组相比,不同剂量 HMGB1(10、100、1 000 ng/ml)刺激均可显著下调 Foxp3 表达($P<0.05$,$P<0.01$),其中以1 000 ng/ml 时下调更明显($P<0.01$)(图 2、表 2)。同样,与正常对照组相比,不同剂量 HMGB1(10、100、1 000 ng/ml)刺激均可显著下调 Foxp3 mRNA 表达($P<0.05$,$P<0.01$),并于 HMGB1 剂量为 1 000 ng/ml 时降低更明显($P<0.01$,表 2)。




A:正常对照组;B:10 ng/ml 组;C:100 ng/ml 组; D:1 000 ng/ml 组

**图 2 不同剂量 HMGB1 对 Treg Foxp3 蛋白表达的影响**

**表 2 HMGB1 对 Treg Foxp3 表达的剂量-效应关系($\bar{x}\pm s$)**

| 组别 | Foxp3 表达百分率(%) | Foxp3 mRNA (RQ 值) |
|---|---|---|
| 正常对照组 | 60.36 ± 2.15 | 0.883 6 ± 0.060 3 |
| 10 ng/ml 组 | 56.27 ± 3.72[a] | 0.802 4 ± 0.041 5[a] |
| 100 ng/ml 组 | 49.04 ± 1.14[b] | 0.731 9 ± 0.035 6[b] |
| 1 000 ng/ml 组 | 42.27 ± 2.60[b] | 0.659 2 ± 0.024 1[b] |

a: $P<0.05$,b: $P<0.01$,与正常对照组比较

## 3 讨论

近年来,Treg 在感染免疫中的意义备受关注,其作用机制的研究已成为揭示感染演变规律的 1 条可能途径。目前了解最为深入的仍是 CD4$^+$CD25$^+$Treg,这群细胞已被公认为是具有成熟功能的 1 个独立 T 细胞亚群,最初由 Sakaguchi 等[5]详细描述。尽管这群细胞在正常人和小鼠的外周血、脾组织的 CD4$^+$T 细胞中仅占 5% ~10%,但因其具有特殊的免疫无反应性及免疫抑制性而尤显不同[6]。如何通过体内外实验进一步探讨及验证这类细胞的功能是许多免疫学者都很关注的问题。

HMGB1 是一种新近发现的调节机体晚期炎症反应的重要细胞因子,在炎症及创伤脓毒症的发生、发展过程中发挥着重要作用[1]。HMGB1 广泛分布于高等真核生物细胞核内,主要参与调节类固醇受体活性及参与细胞分化及 DNA 复制、转录等多种细胞生命活动。新近的研究证实在脓毒症病理过程中,HMGB1 还可分泌至细胞外,并诱导多种炎性细胞如单核/巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、上皮细胞等发生异常改变[7],且与严重创伤后机体细胞免疫功能障碍密切相关,但其是否参与 Treg 的免疫调节过程尚不清楚[8,9]。本研究通过外源性 HMGB1 刺激,旨在初步观察这一晚期炎症介质对 Treg 标志性分子 Foxp3 蛋白及基因表达的影响,从而进一步探讨其在机体免疫功能紊乱中的作用及其机制。

本实验通过流式细胞术检测细胞核内 Foxp3 蛋白的表达是一种非常敏感的方法,而采用 SYBR GREEN 相对定量的方法测定基因水平的变化较传统的方法更能准确地反映不同刺激条件下 Foxp3 mRNA 表达的变化规律。本组资料显示,正常小鼠近 70% CD4$^+$CD25$^+$Treg 表达 Foxp3,HMGB1 刺激后 Foxp3 蛋白的表达则明显下调,且随作用时间延长及 HMGB1 刺激剂量的增加,其 Foxp3 表达降低更为明显。进一步分析可见,Foxp3 mRNA 的测定结果与蛋白表达呈现出一致的趋势,即呈现相似的效应与时间、剂量依赖关系。该结果证实,HMGB1 可能是通过下调 Foxp3 mRNA 的表达进而影响其蛋白表达这一途径,从而进一步调节 Treg 的功能,这与 Valencia 等[10]观察肿瘤坏

死因子-α 对 Foxp3 表达的影响趋势相近。

已有资料证实,在绝大部分 $CD4^+CD25^+$ Treg 及转基因鼠体内的 $CD4^+CD25^-$ T 细胞及 $CD8^+$ T 细胞都表达高水平 Foxp3,并呈现出免疫抑制活性,可见 $Foxp3^{+/-}$ 决定着细胞是否具有调节性 T 细胞的功能,而不是其他细胞因子。因此,在一定程度上对 Treg 更确切的定位应是 $Foxp3^+$ 细胞[11,12]。尽管既往一些实验通过包括转化生长因子 β 或肿瘤细胞培养上清等可诱导 $CD4^+CD25^-$ T 细胞转化为 $CD4^+CD25^+$ T 细胞并获得抑制功能[13,14],但本实验中我们采用同样活化刺激条件却未能诱导 $CD4^+CD25^-$ T 细胞 Foxp3 表达改变及向 $CD25^+$ 细胞转化的现象。这也说明 HMGB1 在体外实验中不是通过这种所谓"传染耐受"机制影响机体免疫抑制状态。诚然,HMGB1 对 Treg 的作用可能是多方面、多途径的,远非一种机制能完全解释。一些研究也显示刺激因素不同、体内外环境改变常导致相异的结果出现,这说明对 Treg 调节的分子机制非常复杂,许多问题仍处于进一步探寻中[15],有关 HMGB1 对 Treg 的确切作用及其在机体免疫功能异常中的意义有待于深入研究。在临床患者或动物实验中已初步证实,Treg 的移除或过继转移可直接影响严重感染的结局[16]。相信通过对 Treg 活性、功能状态及相关细胞因子进行有效调节,将为感染、炎症、肿瘤、自身免疫及其他免疫疾病的治疗开辟一条新途径。

**参考文献:**


[1] 姚咏明, 刘　辉. 对高迁移率族蛋白 B1 作用的新认识[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(7):385 - 387.

[2] Belkaid Y, Rouse B T. Natural regulatory T cells in infectious disease [J]. Nat Immunol, 2005, 6(4): 353 - 360.

[3] Becker C, Stoll S, Bopp T, *et al*. Regulatory T cells: present facts and future hopes[J]. Med Microbiol Immunol, 2006, 195(3): 113 - 124.

[4] 张　莹,姚咏明,常　青,等. 不同细胞刺激剂对小鼠调节性 T 细胞功能活化的影响[J]. 中国危重急救医学, 2007, 19(3): 142 - 145.

[5] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, *et al*. Immunologic tolerance maintained by $CD25^+CD4^+$ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance[J]. Immunol Rev, 2001,182:18 - 32.

[6] Thompson C, Powrie F. Regulatory T cells[J]. Curr Opin Pharmacol, 2004, 4(4): 408 - 414.

[7] Yamada S, Maruyama I. HMGB1, a novel inflammatory cytokine[J]. Clin Chim Acta, 2007, 375(1 - 5):36 - 42.

[8] 徐　姗, 姚咏明, 董　宁, 等. 高迁移率族蛋白 B1 对大鼠脾脏树突状细胞表面共刺激分子表达的影响[J]. 中华创伤杂志, 2006, 22(8): 579 - 583.

[9] 董月青, 姚咏明, 董　宁, 等. 烫伤大鼠高迁移率族蛋白 B1 的变化及其对脾淋巴细胞免疫反应的影响[J]. 创伤外科杂志, 2007, 9(1): 24 - 27.

[10] Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, *et al*. TNF downmodulates the function of human $CD4^+CD25hi$ T-regulatory cells[J]. Blood, 2006, 108(1): 253 - 261.

[11] Wan Y Y, Flavell R A. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression[J]. Nature, 2007, 445(7129): 766 - 770.

[12] 吴　奎,毕玉田,王耀丽,等. Foxp3 基因对人 $CD4^+CD25^-$ T 细胞表型和功能的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(3): 186 - 188.

[13] Liu V C, Wong L Y, Jang T, *et al*. Tumor evasion of the immune system by converting $CD4^+CD25^-$ T cells into $CD4^+CD25^+$ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta[J]. J Immunol, 2007, 178(5): 2883 - 2892.

[14] Wang Z, Hong J, Sun W, *et al*. Role of IFN-gamma in induction of Foxp3 and conversion of $CD4^+$ $CD25^-$ T cells to $CD4^+$ Tregs[J]. J Clin Invest, 2006, 116(9): 2434 - 2441.

[15] Banham A H, Powrie F M, Suri-Payer E. $FOXP3^+$ regulatory T cells: current controversies and future perspectives[J]. Eur J Immunol, 2006, 36(11): 2832 - 2836.

[16] 张　莹, 姚咏明, 盛志勇. 调节性 T 细胞研究进展[J]. 生理科学进展, 2007, 38(1): 83 - 88.


(编辑　吴培红)


## 《乐山师范学院学报》征稿启事

《乐山师范学院学报》是经国家新闻出版总署批准面向国内外公开发行的学术期刊,国内刊号:CN51 - 1610/G4;国际刊号:ISSN 1009 - 8666。为推动基础教育研究,我刊决定组织编辑出版下半年"基础教育专辑",欢迎广大教师积极赐稿。我刊曾荣获第二届全国高校人文社科学报质量进步奖,首届、第三届全国优秀社科学报奖。

投稿请注意:①文章一律交打印稿和电子文件一份。②请附作者简介(作者姓名、出生年、性别、籍贯、工作单位和职称)和联系电话。特殊要求视情况而定。

**联系人**:寥传江　　**电　话**:(0833)3838132

**手　机**:13980816550　　E-mail: lsdxbjb@126.com　　QQ:737813595