文章编号:1000-5404(2010)04-0353-04

论著

Foxp3基因及调节性T细胞在重症肌无力被动转移幼鼠发病中的作用机制

魏秀丽[1],黄 志[1],李 欣[2],刘 玮[2] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院:神经内科[1],儿科研究所[2])

[摘要] **目的** 探讨 $Foxp3^+CD4^+CD25^+$ 调节性T细胞、Foxp3 mRNA在重症肌无力被动转移模型(passive transferred myasthenia gravis,PTMG)发病中的作用机制。**方法** 将16只幼年雌性C57BL/6小鼠随机分为2组:模型组和对照组,模型组经腹腔注射含1.0 mg/kg mAb35的Ringer's液0.2 ml建立PTMG模型,正常对照组注射不含mAb35的Ringer's液0.2 ml。采用流式细胞技术检测小鼠脾细胞中 $CD4^+CD25^+$ T细胞及 $Foxp3^+CD4^+CD25^+$ Tregs含量,实时荧光定量聚合酶链反应(RT-FQ-PCR)分析2组小鼠脾细胞中Foxp3 mRNA的表达,ELISA法检测2组小鼠血清白介素-2和干扰素-γ的水平。**结果** ①模型组小鼠脾细胞中 $CD4^+CD25^+$ T细胞与 $CD4^+$ T细胞含量的比例与对照组比较有统计学差异[(8.82±0.74)% *vs* (9.89±0.88)%,$P<0.05$];模型组 $Foxp3^+CD4^+CD25^+$ Tregs与 $CD4^+CD25^+$ T细胞含量的比例与对照组比较显著降低[(6.83±1.18)% *vs* (8.38±0.76)%,$P<0.01$];脾细胞悬液中Foxp3 mRNA表达量模型组低于对照组[(0.47±0.30) *vs* (1.53±1.19),$P<0.05$];模型组小鼠血清IL-2、IFN-γ水平分别为(24.41±13.83) ng/L、(142.31±6.05) ng/L,高于对照组小鼠[(12.09±2.96) ng/L、(109.36±3.64) ng/L]($P<0.05$)。②模型组小鼠 $Foxp3^+CD4^+CD25^+$ Tregs数量变化与 $CD4^+CD25^+$ T细胞数量呈正相关($r=0.864$,$P<0.01$),对照组小鼠 $Foxp3^+CD4^+CD25^+$ Tregs数量变化与 $CD4^+CD25^+$ T细胞数量亦呈正相关($r=0.977$,$P<0.01$)。**结论** Foxp3 mRNA表达下调,导致 $Foxp3^+CD4^+CD25^+$ Tregs细胞亚群表达降低,并通过上调的IL-2和IFN-γ介导了Foxp3及Tregs在重症肌无力发病机制中的作用。

[关键词] 重症肌无力;调节性T细胞;Foxp3;IL-2;荧光定量聚合酶链反应;小鼠,近交CSTBL
[中图法分类号] R593.202;R392.12;R-332 **[文献标志码]** A

Role of Foxp3 and regulatory T cells in pathogenesis of passive transferred myasthenia gravis in young mice

Wei Xiuli[1], Huang Zhi[1], Li Xin[2], Liu Wei[2] ([1]Department of Neurology, Children's Hospital, [2]Hnstitute of Pediatrics, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, china)

[Abstract] **Objective** To study the role of $Foxp3^+CD4^+CD25^+$ regulatory T cells ($Foxp3^+CD4^+CD25^+$ Tregs) and Foxp3mRNA in pathogenesis of passive transferred myasthenia gravis (PTMG) by detecting their expression in a PTMG model. **Methods** Sixteen C57BL/6 young female mice were divided into model group and control group. A PTMG model was established by injecting Ringer's solution containing 1.0 mg/kg mAb35 into abdominal cavity. Mice in control group were injected with Ringer's solution not containing mAb35. Levels of $CD4^+CD25^+$ T cells and $Foxp3^+CD4^+CD25^+$ Tregs in spleen cells were measured by flow cytometry. Expression of Foxp3 mRNA in spleen cells was detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-FQ-PCR). Serum level of interleukin-2 and interferon-γ was detected by ELISA. **Results** The ratio of $CD4^+CD25^+$ T cells and $CD4^+$ T cells was higher in model group [(8.82±0.74)%] than in control group [(9.89±0.88)%] ($P<0.05$). The ratio of $Foxp3^+CD4^+CD25^+$ Tregs and $CD4^+CD25^+$ T cells was significantly lower in model group [(6.83±1.18)%] than in control group [(8.38±0.76)%], ($P<0.01$). The expression level of Foxp3 mRNA in spleen cells was significantly lower in model group (0.47±0.30) than in control group (1.53±1.19) ($P<0.05$). The serum level of IL-2 and IFN-γ was higher in model group (24.41±13.83 and 142.31±6.05 ng/L) than in control group (12.09±2.96 and 109.36±3.64 ng/L) ($P<0.05$). The change in the number of $Foxp3^+CD4^+CD25^+$ Tregs was positively correlated

[基金项目] 重庆市卫生局科研基金(2008-2-169)
[通信作者] 黄 志,电话:(023)63622714,E-mail:huangzhi3500@yahoo.com.cn

with that of $CD4^+CD25^+$ T cells between model and control groups ($r = 0.864$ *vs* $r = 0.977$, $P < 0.01$). **Conclusion** Down-regulation of Foxp3 expression can decrease the expression of $Foxp3^+CD4^+CD25^+$ Tregs subgroups, and up-regulation of IL-2 and IFN-γ plays an important role in the pathogenesis of Foxp3-mediated PTMG.

[Key words] myasthenia gravis; regulatory T cell; Foxp3; interleukin-2; real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction; mice, inbred C57BL

Supported by the Scionce Re Foundation of Chongqing Municipal Health Bureall (2008-2-169). Corresponding author: Huang Zhi, Tel: 86-23-63622714, E-mail: huangzhi3500@yahoo.com.cn

重症肌无力(myasthenia gravis, MG)是主要由乙酰胆碱受体抗体(AChR-Ab)介导、T细胞免疫依赖、补体参与的一种自身免疫性疾病(autoimmune disease, AID)。至今尚未找到特异而有效的治疗方法。目前免疫学研究的一个热点和重点是通过外周免疫耐受的方法来治疗AID。研究发现$CD4^+CD25^+$调节性T细胞在机体的免疫耐受中发挥着重要的作用,组成型的表达IL-2受体α链(CD25)是重要特征之一。而新近认为叉状头转录因子(forkhead transcription factor 3, Foxp3)是目前鉴别$Foxp3^+CD4^+CD25^+$Tregs较为特异的分子标志物,也是其发育成熟和实现生物学功能的必需因子[1]。重症肌无力被动转移模型(passive transferred myasthenia gravis, PTMG)是研究MG发病机制和治疗的理想动物模型之一[2],因此本实验通过构建PTMG模型,检测PTMG小鼠脾细胞悬液$Foxp3^+CD4^+CD25^+$Tregs的数量、Foxp3 mRNA、IL-2及IFN-γ的表达水平,以探讨$Foxp3^+CD4^+CD25^+$Tregs、Foxp3 mRNA、IL-2及IFN-γ与MG发生、发展的关系及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

健康清洁级雌性C57BL/6小鼠16只,3~4周龄,体质量11~13 g(重庆医科大学实验动物中心提供)。大鼠乙酰胆碱受体单克隆抗体mAb35购自美国Sigma公司;Ringer's缓冲液(140 mmol/L NaCl, 5.4 mmol/L KCl, 1 mmol/L $CaCl_2$, 2.4 mmol/L $NaHCO_3$, pH=7.4);Mouse Regulatory T cell Staining Kit购自美国eBioscience公司;流式细胞仪(型号FACSC alibur)为BD公司产品;总RNA提取试剂盒(TIANGEN公司),Prime Script™ RT reagent Kit(Perfert Real Time, TaKaRa);SYBR® Premix Ex *Taq*™ Ⅱ(Perfert Real Time, TaKaRa),引物均由上海Invitrogen公司合成,并分装为1 OD/管,-20 ℃存放,用时取1管,用高压灭菌的三蒸水融解,并调整浓度为10 nmol/L;Mouse IL-2 ELISA KIT、Mouse IFN-γ、ELISA KIT购自北京四正柏生物科技有限公司。

1.2 PTMG小鼠模型的建立

将16只C57BL/6小鼠分为2组,模型组和对照组,每组8只,参照本课题组前期研究所成功建立的EAMG动物模型的剂量(1.0 mg/kg)[2],模型组经腹腔注射含mAb35的Ringer's液0.2 ml,对照组注射不含mAb35 Ringer's液0.2 ml。

1.3 指标检测

1.3.1 症状观察 小鼠致敏后,每12小时由2名观察者采用双盲法对小鼠测量体质量,并每6~8小时观察动物毛色、步态及摄食情况。按Lennon等[3]临床评分法,电生理及AChR-Ab检测判断动物是否成模。

1.3.2 药理学试验 模型组小鼠出现临床症状后,予注射用甲基硫酸新斯的明(上海信宜制药厂,用量37.5 μg/kg)腹腔注射,观察10~15 min后其症状有无改善,同时给予阿托品(上海和丰制药厂,用量15 μg/kg)以对抗甲基硫酸新斯的明可能产生的副作用。

1.3.3 血清抗AChRAb(IgG)水平的检测 致敏48 h后,摘眼球取血并分离血清,用间接ELISA法测定小鼠血清AChRAb滴度(nAChR抗原由第二军医大学长海医院提供),以mAb35(5 mg/ml)作为阳性标准品,并设阴性对照和空白对照。

1.3.4 $Foxp3^+CD4^+CD25^+$Treg细胞含量测定 致敏48 h后,将小鼠颈椎脱臼处死,取小鼠脾脏,用200目铜网研磨制备单个脾细胞悬液,离心弃上清后冷PBS洗3遍,然后加入5 ml红细胞裂解液室温作用5 min,PBS调整细胞浓度为1×10^7个/ml,设复孔,分别加入20 μl荧光标记的抗小鼠单抗(FITC-Foxp3、PE-CD25、PerCP-CD4),并作阴性对照。经孵育、洗涤和固定后,24 h内用流式细胞仪(FACS Caliber, BD公司)检测,Cell Quest软件分析数据。结果以$Foxp3^+CD4^+CD25^+$Tregs、$CD4^+CD25^+$T细胞占$CD4^+$细胞的百分比表示。

1.3.5 脾细胞悬液中Foxp3 mRNA定量检测 根据GeneBank提供小鼠FOXP3 mRNA和参照基因β-actin序列,遵循RT-FQ-PCR引物设计原则设计引物(由Invitrogen公司合成)。FOXP3引物,上游:5′-TCGCATGTTCGCCTACTTCAGAAAC-3′;下游:5′-TTGGCTCCTCTTCTGCGAAACTC-3′。β-actin,上游:5′-GATTACTGCTCTGGCTCCTAGC-3′;下游:5′-GACTCATCGTACTCCTGCTTGC-3′。提取脾细胞悬液中总RNA,以其中mRNA为模板合成cDNA,并纯化制备标准品。以cDNA为模板,加入FOXP3或β-actin引物,利用CFX96™ Real-Time System Bio-Rad公司,美国)进行RT-FQ-PCR检测,同时扩增各自标准品。PCR反应条件:94 ℃、2 min,94 ℃、10 s,55 ℃、10 s,39个循环。为消除样本提取、逆转录和反应过程造成的差异,以FOXP3 mRNA和β-ACTIN mRNA比值作为评价FOXP3 mRNA表达的

指标。

1.3.6 血清细胞因子IL-2、IFN-γ水平测定 摘眼球取小鼠血,离心取血清,用双抗体夹心ELISA法检测。试剂购自北京四正柏生物科技有限公司,严格按照试剂说明书操作。

1.4 统计学分析

所有原始数据建立数据库,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 16.0统计软件进行分析。不同时间点体质量变化的比较采用重复测量资料的方差分析,2组独立样本的比较用 t 检验,两变量的相关程度用直线相关分析法。

2 结果

2.1 症状观察及体质量变化

症状观察:模型组小鼠致敏后6~8 h时部分出现临床症状,表现为摄食、运动减少,毛皱、易脱落失去光泽;24 h均表现轻重不等的实验性自身免疫性重症肌无力(experimental autoimmune myasthenia gravis, EAMG)症状:不能咀嚼,被动翻转不能复位等。而对照组摄食、活动如常,无1例有肌无力症状发生。

体质量变化:致敏前2组小鼠体质量比较差异无统计学意义($P>0.05$)。致敏后模型组小鼠体质量呈下降趋势。在36、48 h时点与对照组比较有显著性差异($P<0.01$),见表1。

表1 各组小鼠腹腔注射Ringer's液后各时间点体质量的比较 ($n=8$, g, $\bar{x} \pm s$)

组别	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h
模型组	12.40±0.33	12.19±0.50	12.06±0.55	11.63±0.71[a]	11.41±0.70[a]
对照组	12.45±0.38	12.47±0.39	12.53±0.41	12.57±0.40	12.67±0.36

a:$P<0.01$,与对照组比较

2.2 药理学试验

模型组各小鼠于致敏后12~24 h出现临床症状,经腹腔注射甲基硫酸新斯的明10~15 min后,其症状均有不同程度的改善。

2.3 血清抗AChRAb水平的检测

对小鼠血清中的AChRAb水平进行ELISA法定量检测,模型组明显高于对照组,对照组仅有低水平的AChRAb存在,结果见表2。统计分析显示,2组比较有显著性差异($P<0.01$)。

表2 各组小鼠血清AChRAb及IL-2、IFN-γ的比较 ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	AChRAb(μg/ml)	IL-2(pg/ml)	IFN-γ(pg/ml)
模型组	21.74±6.97[a]	24.41±13.83[a]	142.31±6.05[a]
对照组	2.15±1.10	12.09±2.96	109.36±3.64

a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与对照组比较

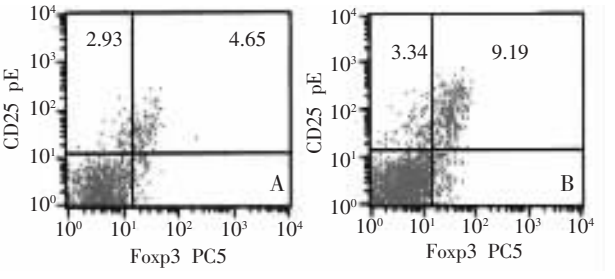
2.4 $Foxp3^+CD4^+CD25^+$ Treg细胞含量测定

2.4.1 2组小鼠脾细胞中$CD4^+CD25^+$T细胞、$Foxp3^+CD4^+CD25^+$Tregs含量的比较 如表3所示,模型组小鼠脾细胞中$CD4^+CD25^+$T细胞占$CD4^+$T细胞含量低于对照组,差异有统计学差异($P<0.05$);模型组小鼠脾细胞中Foxp3阳性细胞($Foxp3^+CD4^+CD25^+$Tregs)占$CD4^+CD25^+$T细胞含量与对照组相比显著降低($P<0.01$),2组小鼠脾细胞悬液中$CD4^+CD25^+$T细胞、$Foxp3^+CD4^+CD25^+$Tregs的流式细胞仪检测结果见图1。

表3 各组小鼠$CD4^+CD25^+$T细胞、$Foxp3^+CD4^+CD25^+$Tregs细胞的含量及Foxp3 mRNA的表达 ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	$CD4^+CD25^+$T细胞(%)	$Foxp3^+CD4^+CD25^+$Tregs(%)	Foxp3mRNA
模型组	8.82±0.75[a]	6.83±1.18[b]	0.47±0.30[a]
对照组	9.89±0.88	8.38±0.76	1.53±1.19

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较



A:模型组; B:对照组

图1 流式细胞仪检测$CD4^+CD25^+$T细胞、$Foxp3^+CD4^+CD25^+$Tregs结果

2.4.2 $Foxp3^+CD4^+CD25^+$Tregs数量与$CD4^+CD25^+$T细胞数量的相关分析 模型组小鼠$Foxp3^+CD4^+CD25^+$T细胞数量变化与其$CD4^+CD25^+$T细胞数量呈正相关($r=0.864$, $P<0.01$),对照组小鼠$Foxp3^+CD4^+CD25^+$Tregs数量变化与其$CD4^+CD25^+$T细胞数量亦呈正相关($r=0.977$, $P<0.01$)。

2.5 RT-FQ-PCR检测Foxp3 mRNA

模型组小鼠脾细胞中Foxp3 mRNA转录水平较对照组降低,模型组小鼠脾脏细胞中Foxp3 mRNA表达量为(0.47±0.30),低于正常对照组的Foxp3 mRNA表达(1.53±1.19)($P<0.05$)。见表3。

2.6 血清IL-2、IFN-γ测定

模型组小鼠血清IL-2、IFN-γ水平均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表2。

3 讨论

传统观点认为重症肌无力的发病与AchRAb介导的体液免疫密切相关,MG基本病理机制是终板突触后膜上乙酰胆碱受体(AchR)的减少,其发生的关键在于机体针对AchR所产生的免疫应答异常。近年来认为Tregs细胞在AID中起着关键作用,Foxp3表达异常,Tregs细胞减少,不足以维持自身免疫耐受,是AID进展的重要因素[4]。

本研究选用3~4周龄的C57BL/6雌性小鼠,采用mAb35进行腹腔注射建立PTMG,从临床表现(肌

无力和易疲劳性)、药理学试验阳性、电生理改变、血清中AChRAb滴度升高证明建模成功。我们研究发现模型组小鼠脾细胞中$CD4^+CD25^+$T细胞数量、$Foxp3^+CD4^+CD25^+$Tregs数量与正常对照组相比均降低,表明$Foxp3^+CD4^+CD25^+$Tregs细胞的数量异常破坏了机体的免疫耐受平衡,不能正常抑制T细胞的活化,使肌无力小鼠体内存在大量活化的T、B淋巴细胞,参与AchR的减少,造成神经肌肉接头处的传递障碍,导致骨骼肌收缩无力。推测AchR的减少可能的机制为:①异常增多的B淋巴细胞产生的AchRAb和AchR竞争性结合,降低了Ach和AchR的正常结合;②我们实验结果表明PTMG小鼠IL-2、IFN-γ水平均升高,证明Th1细胞过度活化增殖,进而激活细胞毒T细胞、巨噬细胞,吞噬、破坏AchR。

我们研究还发现:模型组小鼠脾细胞中Foxp3 mRNA表达低于正常对照,且模型组及对照组$Foxp3^+CD4^+CD25^+$Tregs与$CD4^+CD25^+$T细胞均呈密切的正相关,这说明PTMG小鼠体内Foxp3 mRNA的降低导致了Tregs的减少和免疫抑制功能下降,细胞免疫失调,免疫耐受机制被打破,导致T、B细胞活化,引起AchR的损伤。但有关Foxp3在MG中的发病机制及其诱导免疫耐受的机制目前尚不十分清楚。推测与下列因素有关:①Foxp3基因介导了Tregs分化发育及其免疫调节功能的维持。研究证实Foxp3基因缺陷的小鼠存在Tregs细胞数量的减少和功能的缺失[5];②TGF-β诱导Foxp3的表达及$Foxp3^+CD4^+CD25^+$Tregs的产生,从而维持外周免疫反应的稳态[6]。我们前期研究发现PTMG模型小鼠TGF-β水平下调[7],因此影响Foxp3表达,进而打破了自身免疫耐受的平衡而致病;③Foxp3通过阻断多种细胞因子表达所必须的转录活化因子NF-κB的活化,而达到抑制相应细胞因子(如IL-2、IL-4和IFN-γ)表达的作用[8]。

IL-2具有促进T、B细胞增殖、分化和增强NK细胞杀伤毒性作用,是参与免疫应答的关键因子。IL-2在效应性T细胞与Tregs起负反馈调节作用,效应性T细胞分泌的IL-2维持并激活$Foxp3^+CD4^+CD25^+$Tregs,后者反过来抑制效应性T细胞产生IL-2[9]。IFN-γ是直接诱导B细胞成熟的细胞因子,能直接促进AChRAb的生成,并调节其他细胞因子如IL-4的表达,而且局部表达的IFN-γ还可以激发对运动终板的体液免疫反应,从而启动MG的病理过程[10]

总之,我们的研究表明PTMG小鼠脾细胞中Foxp3 mRNA表达降低,导致幼鼠机体中Tregs细胞减少,并使IL-2、IFN-γ水平增高,从而使其免疫抑制功能降低,自身反应性T细胞激活增多,导致AchR的损伤,诱发小鼠MG的产生。新近的研究结果表明通过过继转移扩增的$Foxp3^+CD4^+CD25^+$Tregs可以抑制狼疮小鼠的发病[11],而多克隆$CD4^+CD25^+$Treg还可以用来治疗鼠自身免疫性结肠炎、系统性红斑狼疮等AID,提示Tregs细胞具有潜在的治疗AID的能力。因此通过某种方法来改善MG患者Foxp3基因的表达能力,提高其机体中Tregs细胞水平,降低IL-2、IFN-γ的水平,增强Tregs细胞免疫抑制功能,从而来预防和治疗MG是一种新的值得研究和探讨的治疗思路。

参考文献:

[1] Marson A, Kretschmer K, Frampton G M, *et al*. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation[J]. Nature, 2007, 445(7130): 931-935.

[2] 黄志, 徐秀娟. nAChR单克隆抗体建立重症肌无力被动转移小鼠模型的研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(13): 1397-1440.

[3] Lennon V A, Lambert Eh, Leiby K R, *et al*. Recombinant human acetylcholine receptor alpha-subunit induces chronic experimental autoimmune myasthenia gravis[J]. J Immunol, 1991, 146(7): 2245-2248.

[4] Fontenot J D, Rudensky A Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3[J]. Nat Immunol, 2005, 6(4): 331-337.

[5] Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, *et al*. On the ontogeny and physiology of regulatory T cells[J]. Immunol Rev, 2001, 182: 5-17.

[6] Zheng S G, Wang J H, Stohl W, *et al*. TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive $CD4^+CD25^+$ regulatory cells[J]. J Immunol, 2006, 176(6): 3321-3329.

[7] 徐秀娟, 黄志. 重症肌无力被动转移幼鼠的黏膜免疫耐受研究[J]. 中华儿科杂志, 2008, 46(5): 366-369.

[8] Ishimaru N, Kishimoto H, Hayashi Y, *et al*. Regulation of naive T cell function by the NF-kappaB2 pathway[J]. Nat Immunol, 2006, 7(7): 763-772.

[9] Zorn E, Nelson E A, Mohseni M, *et al*. IL-2 regulates FOXP3 expression in human $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells *in vivo*[J]. Blood, 2006, 108(5): 1571-1579.

[10] Karachunski P I, Ostlie N S, Monfardini C, *et al*. Absence of IFN-gamma or IL-12 has different effects on experimental myasthenia gravis in C57BL/6 mice[J]. J Immunol, 2000, 164(10): 5236-5244.

[11] Scalapino K J, Daikh D I. Suppression of glomerulonephritis in NZB/NZW lupus prone mice by adoptive transfer of *ex vivo* expanded regulatory T cells[J]. PLoS One, 2009, 4(6): e6031.

(**收稿**:2009-09-30;**修回**:2009-11-16)

(编辑 王 红)