文章编号:1000-5404(2010)13-1395-04

论著

高血脂对小鼠 Foxp3 基因表达的影响

王治校[1,2],王崇全[2],何朝荣[2],詹中群[2],王俊峰[2],李大主[1] (430021 武汉,华中科技大学附属协和医院心血管内科[1];442000 湖北 十堰,郧阳医学院附属太和医院心血管内科[2])

[摘要] **目的** 研究高血脂对小鼠 Foxp3 基因表达的影响,并观察 ApoE$^{-/-}$ 小鼠动脉粥样硬化中 Foxp3 的表达及鉴定其功能。**方法** 选取 8 周龄雄性 C57BL/6J ApoE$^{-/-}$ 及其同系野生型小鼠 16 只,分为对照组和高脂饮食组($n=8$),构建小鼠动脉粥样硬化模型,比较不同组小鼠血脂水平、斑块面积和不同器官组织中 Foxp3$^+$CD4$^+$CD25$^+$ Tregs 细胞的数目;利用 RT-PCR 和 Western blot 分析组织中 Foxp3 基因转录水平和 Foxp3 蛋白表达水平。**结果** 与对照组[TG(2.0±0.1)mmol/L、TC(20.6±0.1) mmol/L]比较,高脂饮食组小鼠血脂水平[TG(2.8±0.2)mmol/L、TC(28.2±1.2) mmol/L]明显升高($P<0.01$),斑块面积(25 044.32±4 920.42)μm^2 显著增加($P<0.01$),而不同器官组织中 Foxp3$^+$CD4$^+$CD25$^+$ Tregs 细胞的数目显著减少($P<0.05$),Foxp3 基因转录水平($P<0.01$)和 Foxp3 蛋白表达($P<0.05$)降低。**结论** 高脂能抑制不同免疫器官 Foxp3 基因的表达和功能,可能是高脂致动脉粥样硬化的机制之一。

[关键词] 高血脂;Foxp3 基因;动脉粥样硬化;Foxp3$^+$CD4$^+$CD25$^+$ Tregs 细胞
[中图法分类号] R541.4;R589.2;R394.3 **[文献标志码]** A

Effects of hyperlipidemia on expression of Foxp3 in ApoE-knockout mice

Wang Zhixiao[1,2], Wang Chongquan[2], He Chaorong[2], Zhan Zhongqun[2], Wang Junfeng[2], Li Dazhu[1] ([1]Department of Cardiology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan, Hubei Province, 430022; [2]Department of Cardiology, Taihe Hospital, Yunyang Medical College, Shiyan, Hubei Province, 442000, China)

[Abstract] **Objective** To examine the effect of hyperlipemia on expression of Foxp3 gene in ApoE$^{-/-}$ mice. **Methods** Sixteen male ApoE$^{-/-}$ mice were randomly divided into control group and high fat diet group, 8 in each group. Blood-lipid levels, plaque areas, and the number of Foxp3$^+$CD4$^+$CD25$^+$ regulatory T cells in different organ tissues were compared between the 2 groups. Transcription and expression levels of Foxp3 gene in tissues of mice were detected by RT-PCR and Western blotting, respectively. **Results** The blood-lipid level (2.8±0.2 mmol/L for TG, 28.2±1.2 mmol/L for TC) was significantly higher, the plaque area was remarkably larger (25 044.32±4 920.42 μm^2), the number of Foxp3$^+$CD4$^+$CD25$^+$ regulatory T cells was significantly lesser, and the transcription and expression levels of Foxp3 gene were notably lower in different organ tissues, in high fat diet group than in control group ($P<0.05$). **Conclusion** Hyperlipemia can inhibit the expression and function of Foxp3 gene in different immune organs, which may be one of the mechanisms underlying atherosclerosis due to hyperlipemia.

[Key words] hyperlipemia; Foxp3 gene; atherosclerosis; Foxp3^{high+}CD4$^+$CD25$^+$ regulatory T cells

Supported by the National Natural Science Foundation of China (C03030201). Corresponding author: Li Dazhu, Tel: 86-27-85726375, E-mail: lidazhuhp@sohu.com

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是动脉血管壁的一种慢性免疫炎症性疾病[1],是体内外多种因素综合作用的结果。高血脂、高胆固醇、糖尿病、吸烟和高血压等传统危险因素能启动 AS 并加速其发展。CD4$^+$CD25$^+$Tregs 细胞(regulatory T cells, Tregs)是一群抑制功能强大的 T 细胞亚群,通过下调对自身或非己抗原的免疫反应,在阻止免疫介导的疾病中起重要作用。最近研究提示 Tregs 可能在 AS 炎症机制中起重要作用[2];急性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)时循环 Tregs 数量和功能异常[3]。但 Tregs 细胞的数目和功能异常的机制尚不清楚。现许多研究认为参与 AS 发展的危险因素抑制了 Tregs 的功能,有实验显示 AS 危险因素均直接或间接参与了 AS 炎性细胞的激活,感染和 ox-LDL 的急性负荷可使

[基金项目] 国家自然科学基金(C03030201)
[通信作者] 李大主,电话:(027)85726375,E-mail: lidazhuhp@sohu.com

AS的慢性炎症急性进展。在对自身免疫病、感染、哮喘、抑制免疫和肿瘤的研究发现,许多抗原除直接激活炎性效应细胞外,更重要的是通过影响Foxp3表达而影响Tregs的分化发育和功能[4,5]。但均只停留在观察性研究和体外实验。本实验主要研究动脉粥样硬化的一项重要危险因素——高血脂,对Foxp3表达的影响,并观察小鼠动脉粥样硬化时体内各组织中Foxp3表达情况,探讨高脂致动脉粥样硬化炎症的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

8周龄雄性C57BL/6J ApoE$^{-/-}$及其同系野生型小鼠16只,体质量(20±1)g(北京维通利华实验动物有限公司)。血脂分析试剂盒(Merck公司);MTT,DMSO(深圳晶美公司);ECL-PLUS试剂盒(Amersham公司);Lipofectamine 2000(Invitrogen公司);兔抗鼠Foxp3单克隆抗体(ABCAM公司)。完全培养基的成分:RPMI1640(Gibco公司);20%胎牛血清(Gibco公司)。FITC-anti mouseCD4, PE-anti mouseCD25, FITC-anti mouse Foxp3, Foxp3$^+$CD4$^+$CD25$^+$Treg细胞免疫磁珠(MACS)分选试剂盒(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠分组及饲养 C57BL/6J ApoE$^{-/-}$小鼠设为高脂组,给予高脂饮食喂养其成分:140 g酪蛋白、585 g玉米粉、840 g玉米油、50 g维生素和矿物质、2 g酒食酸胆碱、2 g胱氨酸、1 g DL-蛋氨酸、157.5 g猪油、12.5 g胆固醇。同系野生型小鼠设为对照组,给予普食(较高脂喂养增加玉米粉含量,去掉猪油和胆固醇)[6]。

1.2.2 流式细胞仪检测CD4$^+$CD25$^+$T细胞和Foxp3$^+$CD25$^+$T细胞数目 喂养12周后,利用荧光活化细胞分选系统(fluorescence activated cell sorting, FACS)检测两组小鼠(每组8只,取平均值)脾脏、淋巴结和胸腺中CD4$^+$CD25$^+$T细胞和Foxp3$^+$CD25$^+$T细胞占CD4细胞的比例。

1.2.3 血脂分析 喂养12周后,采用酶法测各组小鼠血浆中TC和TG浓度。HDL-C和LDL-C选用沉淀法,按照试剂盒说明进行检测。从TC中减除HDL-C和LDL-C的浓度既得VLDL+IDL-C的浓度。

1.2.4 主动脉根部斑块面积分析 两组小鼠喂养12周后,于20周龄时10%乌拉坦麻醉断颈处死小鼠,立即取出主动脉窦至升主动脉部分,行冰冻切片,间隔10 μm,每张切片厚度8 μm。HE染色后在40倍显微镜下观察斑块形态;JVC公司Tonx-432图像分析系统计算斑块与管腔面积、比例及管壁厚度。取每只小鼠8张连续切片面积均值作为该小鼠斑块面积值。

1.2.5 Real-time RT-PCR分析Foxp3 mRNA表达 利用Real-time RT-PCR荧光染料嵌合法分析各组小鼠胸腺、脾脏、斑块和外周血中Foxp3 mRNA转录水平。Foxp3引物上游5′-CAGGAGAAAGCGGATACCAAATG-3′,下游5′-ATCTGTGAGGACTACCGAGCC-3′;β-actin引物上游5′-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3′,下游5′-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3′。先将各组小鼠标本用碾磨器碾碎。提取总mRNA后行逆转录反应,然后行实时荧光定量PCR反应:应用SYBR Green Ⅰ荧光染料技术行实时定量PCR反应,获取各组标本的标准曲线,计算机分析Ct值。Ct值的定义:C代表Cycle,t代表threshold,Ct值的含义:每个反应管内荧光强度达到系统认为的有目的DNA合成时的循环数(以阴性对照作参考)。

1.2.6 Western blot分析Foxp3蛋白表达 从组织中提取蛋白,制备10% SDS-PAGE,等胶凝固好后,拔去梳子,电泳缓冲液清洗上样孔,将准备好的样品(每个样品取相同总蛋白量,根据要加入相应的6× loading buffer上样缓冲液,振荡器混匀后,100 ℃煮5~10 min,4 ℃存放备用)进行上样;电泳:30 mA 20 min,35 mA 1 h;免疫印迹(湿转):电泳结束后,使用转移电泳装置(Bio-Rad, Richmoad, CA),在4 ℃,400 mA恒流条件下电转120 min,将蛋白转移到PVDF膜上;免疫显色:封闭:用封闭液(含5% 脱脂牛奶的TBST溶液)室温封闭PVDF膜1 h或4 ℃过夜,一抗孵育:封闭液稀释抗体,然后与封闭好的PVDF膜室温孵育2 h或4 ℃过夜,洗膜:TBST洗膜3次,每次10 min,二抗孵育:用封闭液稀释相应的二抗,室温下孵育PVDF膜2 h,洗膜:TBST洗膜3次,每次10 min,采用Amersham公司ECL+plus™ Western blotting system试剂盒进行显色X光显影:在暗房中进行获得显示条带的胶片。用GSD8000密度扫描系统(英国UVP公司)进行图像分析。

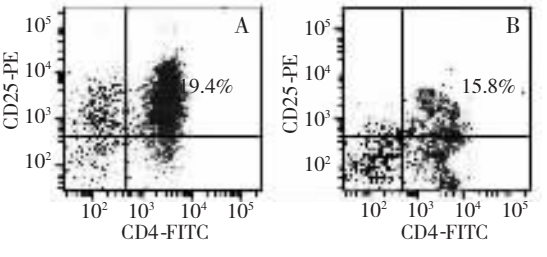
1.3 统计学分析

使用SPSS 13.0统计软件进行分析。数据用$\bar{x}\pm s$表示,组间比较采用t检验。

2 结果

2.1 各组CD4$^+$CD25$^+$T细胞和Foxp3$^+$CD25$^+$T细胞数目比较

脾组织中CD4$^+$CD25$^+$/CD4高脂饮食组(15.8±1.3)%较对照组(19.4±2.0)%减少($P<0.05$)。主动脉和腹股沟区淋巴结中CD4$^+$ CD25$^+$/CD4,高脂饮食组[(3.9±1.3)%]较对照组[(5.1±1.4)%]减少($P<0.05$)。其胸腺组织中,高脂饮食组[(1.1±0.3)%]也较对照组[(2.4±0.7)%]显著降低($P<0.05$);为进一步确定Tregs细胞同时检测Foxp3$^+$CD25$^+$T细胞时,发现在脾脏组织中其数目在高脂饮食组[(6.8±0.49)%]较对照组[(8.5±0.5)%]减少($P<0.05$)。见图1。



A:对照组 B:高脂饮食组

图1 流式细胞仪检测两组小鼠脾脏中的CD4$^+$CD25$^+$T细胞散点图

2.2 体质量和血脂水平检测

实验开始时,8 周龄小鼠平均体质量为(20 ± 1)g;喂养 12 周达 20 周龄时,对照组、高脂饮食组小鼠体质量分别为(28 ± 2)g 和(29 ± 3)g($P > 0.05$)。对小鼠高脂喂养后,其血浆 TG、TC、LDL 和 VLDL + IDL-C 水平明显升高与对照组比较有统计学意义($P < 0.05$),而血浆 HDL-C 浓度差异不显著($P > 0.05$),见表 1。

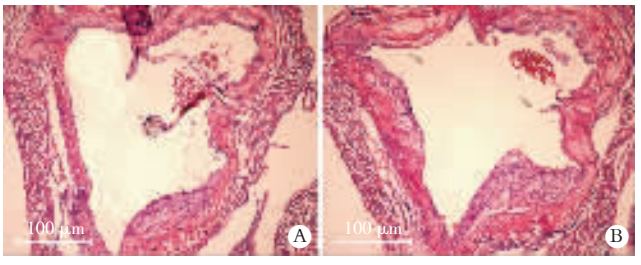
表 1　喂养 12 周时两组小鼠血脂水平比较(mmol/L, $n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	TG	TC	HDL-C	LDL-C	VLDL + IDL-C
对照组	2.0 ± 0.1	20.6 ± 0.1	2.0 ± 0.1	4.2 ± 0.5	15.0 ± 2.6
高脂组	2.8 ± 0.2[a]	28.2 ± 1.2[a]	2.1 ± 0.3	5.8 ± 0.3[a]	20.0 ± 0.2[a]

a:$P < 0.01$,与对照组比较

2.3 动脉粥样硬化斑块面积比较

利用 JVC 公司 Tonx-427 图像分析系统计算动脉粥样硬化斑块(图 2)与管腔面积比例及管壁厚度。结果显示高脂饮食组小鼠斑块面积(25044.32 ± 4920.42)μm^2、斑块面积与血管径比(36.82 ± 4.32)% 分别显著大于对照组斑块面积(597.38 ± 305.43)μm^2 以及斑块面积与血管径比值(0.88 ± 0.42)%($P < 0.05$)。

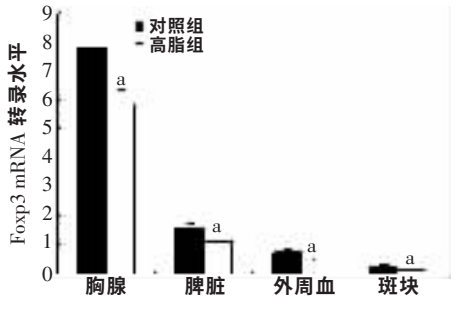


A:对照组;B:高脂组

图 2　12 周两组小鼠动脉粥样硬化斑块 HE 染色观察结果

2.4 组织和外周血中 Foxp3 转录水平分析

小鼠脾脏、胸腺、和外周血和斑块中 Foxp3 mRNA 转录水平结果显示:高脂饮食组较对照组 Foxp3 转录水平显著降低($P < 0.01$)(图 3)。

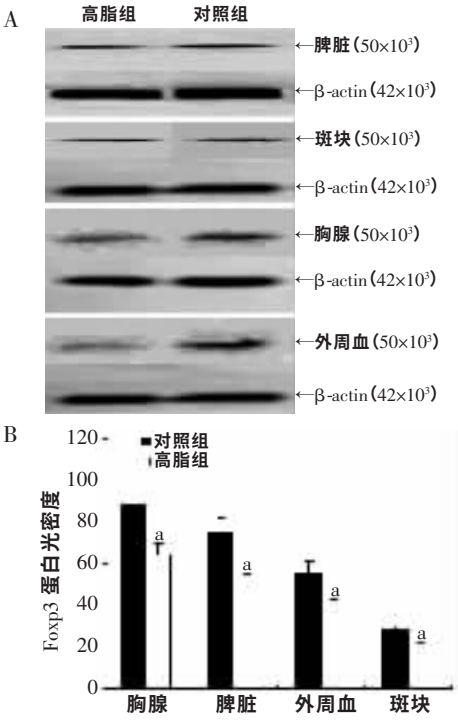


a:$P < 0.01$,与对照组比较

图 3　12 周时两组小鼠各种组织中 Foxp3 mRNA 转录水平分析

2.5 Foxp3 蛋白表达定量分析

喂养 12 周时两组小鼠脾脏、胸腺、血液和斑块中 Foxp3 蛋白表达结果显示,各组织中以胸腺 Foxp3 蛋白表达量最高,且高脂饮食组较对照组各组织中蛋白表达量显著减少($P < 0.05$)(图 4)。



a:$P < 0.05$,与对照组比较

A:两组小鼠脾脏、胸腺、外周血和斑块中 Foxp3 蛋白表达;B:两组小鼠不同组织 Foxp3 蛋白定量比较

图 4　12 周两组小鼠各组织中 Foxp3 蛋白表达分析

3 讨论

AS 的发生、发展与炎症反应密切相关。近来许多研究认为调节性 T 细胞功能异常在 AS 的发生、发展中起重要作用[2]。$CD4^+CD5^+$ Tregs 细胞是机体的专职和功能强大的抑制性 T 细胞,在机体免疫耐受和免疫稳态维持中起重要作用。最近研究提示 Tregs 可能在 AS 炎症机制中起重要作用[2]。人和动物患 AS 时存在自身抗原 HSP60 和 ox-LDL 反应性 T 细胞和抗体[7],我们向 $ApoE^{-/-}$ 小鼠输注 HSP60 特异性 Tregs,结果显著抑制了 AS 斑块中炎性细胞浸润,同时有效地抑制了 AS 的进展[8],抑炎性细胞因子如转化生长因子 TGF-β1 和 IL-10 等水平下降,体内树突状细胞(dendritic cell, DC)的致耐受性显著减弱,而致耐受 DC 和 TGF-β1 在诱导外周原始 T 细胞向 Treg 的分化过程中起重要作用,提示自身免疫耐受缺陷存在[9,10];给小鼠体内过继性转移淋巴细胞能加速动脉粥样化[11];而过继性转移 $CD4^+CD25^+$ T 细胞和口服耐受诱导产生抗原特异性调节性 T 细胞能抑制小鼠动脉粥样斑块的形成[8];急性冠脉综合征(ACS)患者循环 Tregs 数量(Tregs 占循环 $CD4^+$ T 细胞的比例为 2.5%)显著低于正常人(Tregs 占 $CD4^+$ T 细胞的比例为 11.4%),Tregs 存在明显的功能的障碍,即抑制效应 T 细胞增值的能力显著下降[3],与 ACS 时的抑炎细

胞因子 IL-10 和 TGF-β1 减少正相关,而与炎症标记物 CRP 和 IFN-Y 等负相关。这些研究直接或间接说明调节性 T 细胞能抑制粥样硬化时的炎症反应,具有抗动脉粥样硬化的作用[12]。而且提示 AS 时可能存在 Treg 介导的免疫调节机制的异常。因此,有理由认为 Tregs 直接参与了 AS 炎症反应的调控。但机体对作为自身抗原的 HSP60 和 ox-LDL 等,免疫系统本应对其处于免疫耐受或免疫无反应状态,但为和将其作为异性抗原启动免疫炎症反应呢? 另外,同样是 AS 的患者,不同个体炎症反应强度相去甚远,有的斑块一直很稳定,而有的很早就发生急性冠脉事件、斑块破裂、血栓形成。因此机体可能存在内源性免疫调节机制紊乱。

Fox 转录因子家族是一个以具有叉头螺旋结构(forkhead/winged helix, FKH)为特征,功能各异的转录因子大家族。这个家族成员在细胞发育的各个进程中起着不同的作用。Foxp3 属于 Fox 转录因子家族的一员,是迄今所发现的 Treg 的最关键的和特异性的转录因子,Foxp3 决定并代表着 Tregs 的发育和免疫调节功能[13, 14]。

本实验主要研究 AS 的一个重要危险因素—高血脂,对小鼠 Foxp3 表达的影响以及探讨高脂时 Tregs 细胞分化发育异常的机制。实验结果发现高脂饮食时小鼠动脉粥样硬化形成加速的同时,脾脏、胸腺及淋巴结组织中 $CD4^+CD25^+$ T 细胞和 $Foxp3^+CD25^+$ T 细胞数目减少,各组织中 Foxp3 mRNA 转录水平及 Foxp3 蛋白表达也下降,尤以胸腺减低明显。给予高脂喂养的小鼠检测血脂水平明显升高,但体内各组织 $CD4^+CD25^+$ T 细胞、$Foxp3^+CD25^+$ T 细胞数目、Foxp3 mRNA 转录水平和 Foxp3 蛋白表达较阴性对照组均减低,各组织中尤以胸腺降低最明显。

胸腺是培育 T 淋巴细胞发育的场所,积极参与机体免疫耐受机制的形成。而调节性 T 细胞是体内存在的一群具有免疫调节作用的 T 细胞亚群,主要来原于胸腺,其表型为 $CD4^+CD25^+$ Tregs 细胞分为天然和诱生 2 种类型。其前者表型主要为 $Foxp3^+CD4^+CD25^+$,后者表型为 $Foxp3^-CD4^+CD25^+$,在一些抑炎细胞因子(如 TGF-β 或 IL-10 等)作用下可分化为 $Foxp3^+CD4^+CD25^+$ T 细胞。而天然的 $Foxp3^+CD4^+CD25^+$ Tregs 细胞在胸腺内主要以阴性选择的方式存活下来。本实验中对小鼠给予高脂饮食后检测其胸腺和外周组织中 Tregs 细胞数目 Foxp3 mRNA 水平以及 Foxp3 蛋白表达水平均下降,但以胸腺中减低最显著。因此可推测:高脂能通过某些途径调控中枢 Foxp3 的表达,从而影响 Tregs 细胞的生成。但其具体机制还有待进一步阐明。

总之,Foxp3 作为 Tregs 细胞的关键调控因子,对动脉粥样硬化具有保护作用,而 AS 的重要危险因素之一高血脂可能会通过体内炎症反应而抑制 Foxp3 功能来影响 Tregs 细胞的生成和发育,从而加速 AS 中的炎症反应,促使动脉粥样硬化形成加速。这项研究的结果可能会为 AS、炎症性以及其它自身免疫性疾病的预防和治疗提供新的理论依据和干预手段。

参考文献:

[1] Hansson G K, Robertson A K, Soderberg-Naucler C. Inflammation and atherosclerosis[J]. Annu Rev Pathol, 2006, 1: 297 – 329.

[2] Mor A, Planer D, Luboshits G, *et al*. Role of naturally occurring $CD4^+$ $CD25^+$ regulatory T cells in experimental atherosclerosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27(4): 893 – 900.

[3] Hu Z, Li D, Hu Y, *et al*. Changes of $CD4^+$ $CD25^+$ regulatory T cells in patients with acute coronary syndrome and the effect of atorvastatin [J]. J Huazhong University of science and technology Med Sci, 2007, 27(5): 524 – 527.

[4] 吴奎, 孙鲲, 毕玉田, 等. 屋尘螨过敏原 DNA 疫苗对哮喘模型小鼠 $Foxp3^+$ 调节性 T 细胞功能的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(5): 374 – 377.

[5] Ishibashi Y, Tanaka S, Tajima K, *et al*. Expression of Foxp3 in non-small cell lung cancer patients significantly higher in tumor tissues than in normal tissues, especially in tumors smaller than 30 mm[J]. Oncol Rep, 2006, 15(5): 1315 – 1319.

[6] Hsueh-Hsiao Wang, Tzu-Ming Hung, Jeng Wei, and An-Na Chiang. Fish oil increases antioxidant enzyme activities in macrophages and reduces atherosclerotic lesions in apoE-knockout mice[J]. Cardiovasc Res, 2004, 61:169 – 176.

[7] van-Puijvelde G H, Hauer A D, de-Vos P, *et al*. Induction of oral tolerance to oxidized low-density lipoprotein ameliorates atherosclerosis [J]. Circulation, 2006, 114(18): 1968 – 1976.

[8] Yang K, Li D, Luo M, *et al*. Generation of HSP60-specific regulatory T cell and effect on atherosclerosis[J]. Cell Immunol, 2006, 243 (2): 90 – 95.

[9] Li D Z, Sharma R, Zeng Q T. Effects of Ginkgo leaf extract on function of dendritic cells and Th1/Th2 cytokines in patients with unstable angina pectoris[J]. Chin J Integr Med, 2005, 11(4): 260 – 263.

[10] 李大主, 周游, 吴伟, 等. 负载热休克蛋白 60 的致耐受性树突状细胞疫苗对小鼠动脉粥样硬化斑块的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(6): 1079 – 1082.

[11] George J, Harats D, Gilburd B, *et al*. Adoptive transfer of beta(2)-glycoprotein I-reactive lymphocytes enhances early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice[J]. Circulation, 2000, 102(15): 1822 – 1827.

[12] Ait-Oufella H, Salomon B L, Potteaux S, *et al*. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice[J]. Nat Med, 2006, 12(2): 178 – 180.

[13] Nik-Tavakoli N, Hambly B D, Sullivan D R, *et al*. Forkhead box protein 3: essential immune regulatory role[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(11): 2369 – 2373.

[14] Li B, Samanta A, Song X, *et al*. FOXP3 ensembles in T-cell regulation[J]. Immunol Rev, 2006, 212:99 – 113.

(**收稿**:2009-11-18;**修回**:2010-01-29)

(编辑 王 红)