基础研究 文章编号:0253-3626(2011)03-0302-04

糖皮质激素对儿童重症肌无力 Th1/Treg 细胞转录因子表达的影响及机制研究

黄志新[1],黄 志[2]

(1.儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室;2.重庆医科大学附属儿童医院神经内科,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨糖皮质激素治疗对儿童重症肌无力(Myasthenia gravis,MG)Th1/Treg 细胞转录因子表达及相关细胞因子的影响。方法:应用 RT-PCR 技术检测 52 例 MG 患儿和 20 例健康对照者外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell,PBMC)T-bet 和 FOXP3 mRNA 的表达情况,应用 ELISA 法检测相关细胞因子干扰素 -γ(Interferon-gamma,IFN-γ)、白细胞介素 -6(Interleukin-6,IL-6)及转化生长因子 -β1(Transforming growth factor-β1,TGF-β1)的浓度变化情况。结果:与健康对照组比较,患儿 T-bet mRNA 的表达显著增高($P<0.05$),而激素治疗前组与治疗后组比较无显著性差异。激素治疗前组 FOXP3 mRNA 的表达显著高于健康对照组($P<0.05$),激素治疗后组与健康对照组比较,差异无统计学意义,激素治疗前后组无显著性差异。T-bet mRNA 与 FOXP3 mRNA 的表达比值,激素治疗前组显著高于健康对照组($P<0.05$)。激素治疗后组与健康对照组及治疗前组比较,IFN-γ 的浓度显著升高($P<0.05$),而健康对照组与治疗前组比较无显著性差异。3 组之间,IL-6 和 TGF-β1 的浓度无显著性差异。结论:T-bet mRNA 和 FOXP3 mRNA 在 MG 患儿中表达异常,表明 Th1 和 Treg 细胞参与了 MG 的发病,经激素治疗后免疫功能有所恢复;本组患儿 IL-6 和 TGF-β1 的浓度无明显异常,提示这些患儿免疫功能紊乱程度较轻,未达到显著差异水平;而在一定情况下,IFN-γ 在治疗后其水平升高可能对机体发挥着一定的保护作用。

【关键词】儿童重症肌无力;T-bet;FOXP3;干扰素 -γ

【中国图书分类法分类号】R746.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-09-01

The impact of glucocorticoid treatment to Th1/Treg cell transcription factor expression in children with myasthenia gravis and its mechanism research

HUANG Zhi-xin, et al

(*Key Laboratory of Developmental Diseases in Childhood, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of glucocorticoid treatment on the expression of Th1/Treg cell transcription factor and related cytokines in children with myasthenia gravis (MG). *Methods*: RT-PCR was used to detect the expressions of T-bet and FOXP3 mRNA in children's peripheral blood mononuclear cells of 52 MG patients and 20 healthy children; ELISA was applied to analyze related cytokines IFN-γ, IL-6 and TGF-β1 concentration changes. *Results*: Compared with the healthy control group, the T-bet mRNA expression was significantly higher ($P<0.05$) in children with MG, while the groups before and after hormone treatment were

作者介绍:黄志新(1985-),男,硕士,
研究方向:小儿神经系统免疫性疾病和惊厥性疾病。
通信作者:黄 志,男,教授,Email:huangzhi3500@yahoo.com.cn。

[4] Altieri D C. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy[J]. Trends Mol Med, 2001, 7(12): 542-547.

[5] Vucic D, Stennicke H R, Pisabarro M T, et al. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas [J]. Curr Biol, 2000, 10 (21): 1359 - 1366.

[6] Sanna M G, Correia J D S, Ducrey O, et al. IAP Suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: the TAK1 /JNK1 signaling cascade and caspase inhibition[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22 (6): 1754-1766.

[7] Vucic D, Deshayes K, Ackerly H, et al. SMAC negatively regulates the anti-apoptotic activity of melanoma inhibitor of apoptosis (ML2IAP) [J]. J Biol Chem, 2002, 277 (14): 12275-12779.

[8] Crnkovic-Mertens I, Hoppe-Seyler F, Butz K. Induction of apoptosis in tumor cells by siRNA-mediated silencing of the livin/ML-IAP/KIAP gene[J]. Oncogene, 2003, 22(51):8330-8336.

[9] Nachmias B, Ashhab Y, Bucholtz V, et al.Caspase-mediated cleavage converts Livin from an antiapoptotic to a proapoptotic factor: implications for drug-resistant melanoma[J].Cancer Res, 2003, 63(19): 6340-6349.

[10] Nachmias B, Lazar I, Elmalech M, et al. Subcellular localization determines the delicate balance between the anti-and pro-apoptotic activity of Livin[J]. Apoptosis, 2007, 2 (9):9-15.

(责任编辑:冉明会)

of no significant difference. In the group before hormone treatment, FOXP3 mRNA expression was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$), while the hormone therapy group and the healthy control group were of no significant difference and the groups before and after hormone therapy were of no significant difference. For the ratio of T-bet mRNA expression to FOXP3 mRNA, the groups before hormone therapy was significantly higher than in healthy controls. In hormone therapy group, compared with the healthy control group and before hormone therapy group, IFN-γ concentration was significantly higher ($P<0.05$), while the healthy control group and the before treatment group showed no significant difference. In the three groups, IL-6 and TGF-β1 levels were not significantly different. *Conclusion*: T-bet mRNA and FOXP3 mRNA expressions are abnormal in children with MG. Th1 and Treg cells are concerned with the pathogenesis of MG. After hormone therapy, the immune function has been restored to some extent. In this research, IL-6 and TGF-β1 levels are not abnormal, suggesting a less extent in children with immune dysfunction and no significant difference; in some cases, IFN-γ levels increase after treatment, which suggests IFN-γ may also play a role in the protection of the body.

【Key words】children with myasthenia gravis; T-bet; FOXP3; IFN-γ

重症肌无力是发生在神经肌肉接头处，针对自身抗原乙酰胆碱受体(Acetylcholine receptor，AChR)的自身免疫性疾病。免疫细胞、补体和细胞因子参与了该病的发生。李保华等[1]研究发现，儿童重症肌无力(Myasthenia gravis，MG)的临床特点是：起病年龄小，以 1~5 岁为主，患病率较成人高，性别差异不明显，绝大多数患儿以眼肌症状为首发表现，Osser men 改良分型以Ⅰ型即眼肌型(Ocular MG，OMG)为主，较少进展为全身型，合并胸腺瘤者少见。大量的研究表明，Th1 细胞功能紊乱在 MG 的发病中具有重要的作用，其通过分泌干扰素-γ(Interferon-gamma，IFN-γ)、肿瘤坏死因子(Tumor necresis factor-alpha，TNF-α)等促炎症细胞因子参与 MG 的发生，T-bet 作为该细胞的主要转录因子，能诱导初始 CD4+T 细胞向 Th1 型分化。Treg 细胞作为一种抑制性的免疫调节细胞，在维持机体对自身抗原的免疫耐受方面具有重要的作用，该细胞的功能失调将导致多种自身免疫性疾病的发生，转化生长因子-β1(Transforming growth factor-β1，TGF-β1)是其分泌的主要细胞因子，FOXP3 则是该细胞的主要转录调节因子。正常状态下 Th1/Treg 细胞保持着动态平衡状态，当该种平衡被打破时，机体的免疫功能发生紊乱，从而介导多种免疫性疾病的发生，包括 MG。目前，口服糖皮质激素(强的松)是治疗 MG 的主要措施和手段。而国内外关于激素对 MG 患者免疫功能影响的研究较少，尤其在儿童 MG 方面。本研究旨在了解激素治疗前后 T-bet mRNA 和 FOXP3 mRNA 表达情况和相关细胞因子 IFN-γ、IL-6 及 TGF-β1 的水平变化情况，从而探讨激素在儿童 MG 中的干预机制及小儿 MG 的免疫学变化规律。

1 对象和方法

1.1 研究对象

收集 MG 患儿 52 例，所有患儿都通过临床症状和辅助检查(新斯的明试验、肌疲劳试验及电生理检查)确诊，其中激素治疗前组(新发及复发病例)31 例，激素治疗后组 21 例。所有患儿均为 OMG，行胸腺 MRI 检查者无 1 例有胸腺增生和胸腺瘤等异常情况。凡抽血前 3 月内使用激素或免疫抑制剂及伴有其它自身免疫性疾病者均不纳入激素治疗前组，本研究激素治疗后组为临床症状改善且激素治疗时间至少 1 月。健康对照组 20 例，为同期未使用激素和免疫抑制剂治疗及未患免疫性疾病健康儿童。激素治疗前组年龄范围为 1~13 岁，平均年龄为(5.00±3.66)岁，男 12 例，女 19 例；激素治疗后组年龄范围为 2~12 岁，平均年龄为(5.10±2.86)岁，男 8 例，女 13 例；健康对照组组年龄范围为 2~9 岁，平均年龄为(5.00±2.29)岁，男 8 例，女 12 例，3 组性别及年龄均差异无统计学意义。

1.2 主要试剂

人淋巴细胞分离液购自天津 TBD 公司。RNA 提取试剂盒购自北京天根公司，逆转录试剂盒购自 TaKaRa 公司，2*Taq PCR MasterMix 购自北京天根公司，PCR 引物由 TaKaRa 公司合成。IFN-γ、IL-6 及 TGF-β1 ELISA 试剂盒购自北京四正柏公司。

1.3 方法

1.3.1 抽取患儿及对照组外周肝素抗凝血 3 ml，分离外周血清及外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell，PBMC)，血清保存于 -20℃冰箱用于 ELISA 检测，提取的 PBMC 用于进一步处理。

1.3.2 T-bet 和 FOXP3 mRNA 相对表达量的 RT-PCR 检测

提取 PBMC 总 RNA，严格按照说明书进行操作，提取的 RNA 保存于 -80℃冰箱备用。取 5 μl 总 RNA 进行逆转录反应，反应体系总体积 10 μl，在冰上按照说明书进行操作，产生的 cDNA 保存于 -20℃冰箱备用。取 cDNA 2 μl 再进行 PCR 反应，总反应体系为 25 μl，历经 35 个循环生成目的产物，其中 T-bet 的引物序列：上游序列 ATGTGACCCAGATGATTGTGCTC，下游序列 GATACTGGTTGGGTAGGAGAGGAG，退火温度为 63℃，产物长度为 333 bp；FOXP3 引物序列：上游序列 CTTTCACCTACGCCACGCTCATC，下游序列 GGCAAGACAGTGGAAACCTCACTTC，退火温度为 55℃，产物长度为

412 bp；β-actin 的引物序列：上游序列 CACCACACCTTCTACAATGAGCA，下游序列 GTGATCTCCTTCTGCATCCTGT，退火温度为 65℃，产物长度 695 bp。取 10 μl PCR 产物于 2%琼脂糖凝胶上电泳，应用凝胶成像系统分析软件分析条带吸光度值，以 T-bet/β-actin 和 FOXP3/β-actin 值作为转录因子的相对表达量。

1.3.3 血清 IFN-γ、IL-6 及 TGF-β1 浓度测定 应用ELISA法检测 IFN-γ、IL-6 及 TGF-β1 浓度，按照说明书进行操作。

1.4 统计分析

所有结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示，3 组之间均值的比较应用 SPSS17.0 软件进行单因素方差分析，检验水准为 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 MG 患儿 T-bet 和 FOXP3 mRNA 的表达水平

与健康对照组比较，患儿 T-bet mRNA 的表达显著增高（$P<0.05$），而激素治疗前组与治疗后组比较差异无统计学意义。激素治疗前组 FOXP3 mRNA 的表达显著高于健康对照组（$P<0.05$），激素治疗后组与健康对照组差异无统计学意义，激素治疗前后组差异无统计学意义。结果见表 1、图 1。



1、2、3 分别表示激素治疗前组 FOXP3 mRNA、T-bet mRNA、β-actin 的表达；4、5、6 分别代表激素治疗后组 FOXP3 mRNA、T-bet mRNA、β-actin 的表达；7、8、9 分别代表正常对照组 FOXP3 mRNA、T-bet mRNA、β-actin 的表达；M 为 DNA 标记物

图 1 3 组 T-bet mRNA 和 FOXP3 mRNA 的表达情况

2.2 T-bet mRNA 与 FOXP3 mRNA 的表达比值的变化

T-bet mRNA 与 FOXP3 mRNA 的表达比值，激素治疗前组显著高于健康对照组（$P<0.05$）。见表 1。

2.3 MG 患儿血清 IFN-γ、IL-6 及 TGF-β1 浓度测定

激素治疗后组与健康对照组及治疗前组比较，IFN-γ 的浓度显著升高（$P<0.05$），而健康对照组与治疗前组比较差异无统计学意义。3 组之间，IL-6 和 TGF-β1 的浓度差异无统计学意义。见表 2。

表 1 3 组 T-bet mRNA 和 FOXP3 mRNA 相对表达水平及比值（$\bar{x} \pm s$）

组别	例数	T-betmRNA 表达水平	FOXP3 mRNA 表达水平	T-bet/FOXP3 mRNA 比值
激素治疗前组	31	0.51 ± 0.19*	0.26 ± 0.14*	2.46 ± 1.56*
激素治疗后组	21	0.43 ± 0.17*	0.23 ± 0.11	2.13 ± 1.03
正常对照组	20	0.22 ± 0.10	0.16 ± 0.10	1.62 ± 0.73

注：与正常对照组比较，*$P<0.05$

表 2 3 组之间 IFN-γ、IL-6 和 TGF-β1 浓度（$\bar{x} \pm s$）

组别	例数	IFN-γ (pg/ml)浓度	IL-6(pg/ml) 浓度	TGF-β1(ng/ml)浓度
激素治疗前组	31	15.91 ± 7.21△	5.46 ± 1.05	34.92 ± 17.84
激素治疗后组	21	20.49 ± 8.09*	5.57 ± 0.77	52.13 ± 32.99
正常对照组	20	13.74 ± 5.18	5.59 ± 1.06	38.44 ± 17.85

注：与正常对照组比较，*$P<0.05$；与激素治疗后组比较，△$P<0.05$

3 讨 论

口服激素广泛应用于 OMG 患者，其主要的作用机制为抑制淋巴细胞的增殖和分化，使淋巴细胞重新分布于非炎症反应组织，降低细胞因子的表达，抑制抗原提呈过程，并且能促进肌肉 AchR 的合成[2]。最近有研究表明，强的松治疗能降低 OMG 向全身型 MG（General MG，GMG）的转变并且延迟 GMG 的发生[3]。

T-bet 缺失的小鼠使初始 CD4+T 细胞向 Th1 型细胞分化受损，同时伴有 IFN-γ 生成减少，并致使初始 CD4+T 细胞向 Th2 型细胞分化，T-bet 能诱导或维持 B 细胞向 Th1 型 B 细胞分化[4]。本研究结果显示 MG 患儿 T-bet mRNA 的表达水平明显高于正常对照组，表明 Th1 细胞转录增加，功能增强，与国内外大多有关研究结果一致；激素治疗后组 T-bet mRNA 的表达水平较治疗前组有所下降，但差异无统计学意义，可能与我们取激素治疗后组标本的时间有关（大多数标本是取自激素治疗 1 月），虽然患儿的临床症状有所改善，但免疫功能的恢复还需更长的时间，适当的延长取标本时间，可能得到有差异性的结果。

FOXP3 作为 Treg 细胞主要转录调节因子，与 Treg 细胞形成和功能维持紧密相关。在有关 MG 患者的研究发现，FOXP3 mRNA 和蛋白表达水平显著下降，伴有 Treg 细胞功能严重受损和数量下降[5,6]，而 Matsui 等的研究发现 MG 患者的胸腺和外周血中 Treg 细胞的数量并没有显著性的改变[7]。迄今为止，有关 Treg 细胞研究仍有争议性，但大多研究者认为 Treg 细胞的数量或功能下降与疾病的发生有关。本实验研究发现，激素治疗前组 FOXP3 mRNA 的表达显著高于健康对

照组,经激素治疗后表达水平呈下降趋势。这一结果的可能原因是:MG 患儿免疫平衡失调,Th1 细胞数量和功能增加,机体为维持整个免疫系统的平衡,致使 Treg 细胞数量和功能应激性增加,但不足以抵抗 Th1 细胞的致炎作用从而导致疾病的发生;经激素治疗后 FOXP3 mRNA 的表达有所下降,反映患儿的免疫功能正处于恢复阶段。

T-bet mRNA 与 FOXP3 mRNA 的表达比值,激素治疗前组显著高于健康对照组,经激素治疗后,水平有所下降,与健康对照组差异无统计学意义。这一结果进一步说明激素对患儿免疫功能的恢复具有重要的作用。

IFN-γ 作为 Th1 细胞分泌的代表性细胞因子,能上调抗原提呈细胞 MHC Ⅱ 分子的表达和增强其抗原提呈能力,具有抑制 Th2 细胞反应的功能,表达异常时,可介导多种自身免疫性疾病的发生。以往研究发现,在 MG 病人的外周血中可检测到 IFN-γ 表达上升。本研究结果显示,激素治疗前组 IFN-γ 浓度较正常对照组有所增加,但差异无统计学意义;激素治疗后组与健康对照组及治疗前组比较,IFN-γ 的浓度显著升高,表明在激素治疗后 IFN-γ 浓度有所增加并发挥着保护机体作用,这与大多数研究者研究结果不相一致,我们推测可能原因为 IFN-γ 抑制了最近发现的另外一种参与 MG 发生的促炎症反应细胞 -Th17 细胞的功能,有研究发现 Th17 细胞也与 MG 的发生有关[8]。有少数研究者也发现 IFN-γ 作用的不衡定性:最近有关 MG 的动物模型—实验性自身免疫性重症肌无力研究发现(Experimental autoimmune myasthenis gravis,EAMG),IFN-γ 敲除的小鼠仍对 EAMG 易感,表明EAMG 的发生可能与 Th1 细胞无关[9];另有研究者发现,IFN-γ 在 Treg 细胞发挥免疫耐受方面具有重要作用,表现为 IFN-γ mRNA 表达上升,而加入 IFN-γ 抵抗物则 Treg 细胞功能受损[10],表明 IFN-γ 对机体发挥着一定的保护作用,这与我们的研究结果相一致。因此,IFN-γ 的具体作用机制仍有待进一步研究。

IL-6 对 B 细胞的增殖分化具有重要作用,能促进 B 细胞增殖分化为浆细胞和产生抗体;本研究中,3 组 IL-6 的浓度差异无统计学意义,反应患儿体液免疫反应紊乱程度较轻。

TGF-β1 作为与 Treg 细胞密切相关的细胞因子,能抑制 T 细胞的增殖和炎症细胞因子的产生,抑制免疫炎症反应,在维持机体的免疫耐受方面具有重要的作用。本研究中,3组 TGF-β1 的浓度虽无显著性差异,但经激素治疗后,TGF-β1 水平呈上升趋势,间接说明 TGF-β1 的保护作用。

本研究显示,Th1 细胞和 Treg 细胞在儿童 MG 的发生中具有重要作用,经激素治疗后 T-bet mRNA 与 FOXP3 mRNA 的表达水平下降,患儿免疫功能有所恢复。经激素治疗后 IFN-γ 的浓度增加,表明在一定条件下,IFN-γ 还能发挥一定的保护作用。该实验进一步证实,激素作为治疗 MG 首选的免疫抑制药物,能有效改善患儿免疫功能,有利于临床症状的改善。

参 考 文 献

[1] 李保华,唐爱萍,姜海平,等.小儿重症肌无力 1381 例临床综合分析[J].中国实用儿科杂志,2000,15(5):283-284.

[2] Conti-Fine B M,Milani M,Kaminski H J. Myasthenia gravis: past, present, and future[J]. J Clin Invest,2006 ,116(11):2843-2854.

[3] Kupersmith M J.Ocular myasthenia gravis:treatment successes and failures in patients with long-term follow-up[J]. J Neurol,2009,256(8):1314-1320.

[4] Peng S L.The T-box transcription factor T-bet in immunity and autoimmunity[J]. Cell Mol Immunol,2006,3(2):87-95.

[5] Zhang Y,Wang H B,Chi L J,et al. The role of FoxP3+CD4+CD25hi Tregs in the pathogenesis of myasthenia gravis[J]. Immunol Lett,2009,122(1):52-57.

[6] Li X,Xiao B G,Xi J Y,et al. Decrease of CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells and elevation of CD19(+)BAFF-R(+) B cells and soluble ICAM-1 in myasthenia gravis[J].Clin Immunol,2008,126(2):180-188.

[7] Matsui N,Nakane S,Saito F,et al. Undiminished regulatory T cells in the thymus of patients with myasthenia gravis [J].Neurology,2010,74(10):816-820.

[8] Baggi F,Ubiali F,Nava S,et al. Effect of IgG immunoadsorption on serum cytokines in MG and LEMS patients[J].J Neuroimmunol,2008,201-202:104-110.

[9] Wang W,Milani M, Ostlie N, et al. C57BL/6 mice genetically deficient in IL-12/IL-23 and IFN-gamma are susceptible to experimental autoimmune myasthenia gravis, suggesting a pathogenic role of non-Th1 cells[J]. J Immunol,2007,178(11):7072-7080.

[10] Awitzki B,Kingsley C I,Oliveira V,et al. IFN-gamma production by alloantigen-reactive regulatory T cells is important for their regulatory function in vivo[J]. J Exp Med,2005,201(12):1925-1935.

(责任编辑:冉明会)

读者·作者·编者

更 正

本刊 2011 年第 36 卷第 1 期第 27 页《抑制 PI3K/Akt 信号通路对胃癌细胞转移和侵袭影响的研究》一文中,通讯作者单位由重庆医科大学附属第一医院消化外科更正为重庆医科大学附属第一医院消化内科。

本刊编辑部