

# 雷帕霉素对重型再生障碍性贫血模型小鼠脾脏CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞凋亡的影响

林赠华 刘红 朱丽 杨熙 张亚平 钱娟 刘海燕

**【摘要】** 目的 探讨雷帕霉素(Rapamycin, RAPA)对重型再生障碍性贫血(SAA)模型小鼠CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞凋亡情况的影响及可能的机制。方法 以近交系雌性BALB/c小鼠作为对照(对照组),应用IFN- $\gamma$ 腹腔注射联合白消安灌胃的方法建立SAA小鼠模型(SAA组),并使用RAPA腹腔注射5 d治疗SAA小鼠(RAPA组)。骨髓活检病理学检查观察各组小鼠的骨髓造血组织变化;免疫磁珠分选出各组小鼠脾脏Treg细胞,用流式细胞术检测其凋亡率;Western blot法检测各组小鼠脾脏Treg细胞的Akt、磷酸化(p)-Akt、Stat3、p-Stat3的表达水平;收集各组小鼠外周血和脾脏中单个核细胞,用流式细胞术检测CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg细胞的比例变化。结果 与对照组相比,SAA组造血细胞明显减少,且造血细胞被大量的脂肪组织所代替,RAPA组造血细胞亦明显减少,可见大量脂肪细胞;对照组、SAA组、RAPA组小鼠胫骨骨髓造血组织面积分别为(94.25 $\pm$ 4.20)%、(7.00 $\pm$ 2.00)%、(9.75 $\pm$ 1.83)%,差异有统计学意义(Welch  $F=1\,441.822, P<0.001$ );RAPA组略高于SAA组[ $\Delta\bar{x}=2.15\%$ (95%CI 0.15%~5.35%), $P=0.037$ ]。对照组、SAA组、RAPA组脾脏Treg细胞凋亡率分别为(19.84 $\pm$ 1.39)%、(29.85 $\pm$ 2.72)%、(22.39 $\pm$ 3.71)%,差异有统计学意义( $F=18.338, P<0.001$ );RAPA组Treg细胞凋亡率明显低于SAA组。RAPA组脾脏Treg细胞中Akt、Stat3的表达水平高于SAA组,而p-Akt和p-Stat3表达水平低于SAA组( $P$ 值均 $<0.05$ )。SAA组、RAPA组的脾脏CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>细胞比例均低于对照组,且RAPA组明显高于SAA组( $P$ 值均 $<0.017$ )。结论 IFN- $\gamma$ 联合白消安诱导的SAA模型小鼠脾脏Treg细胞存在过度凋亡现象,而RAPA可能通过抑制Treg细胞内Akt及Stat3的磷酸化上调Foxp3的表达,从而抑制Treg细胞的凋亡。

**【关键词】** 再生障碍性贫血; 调节性T细胞; 雷帕霉素; 细胞凋亡; 叉状头转录因子3

**基金项目:**国家自然科学基金(81070400);南通市科技项目(HS2015004);南通市卫计委科研基金(WQ2016067)

**Rapamycin affect the apoptosis of splenic CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells of mouse severe aplastic anemia model** Lin Zenghua, Liu Hong\*, Zhu Li, Yang Xi, Zhang Yaping, Qian Juan, Liu Haiyan.

\*Department of Hematology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China

Corresponding author: Liu Hong, Email: hongliu63@126.com

**【Abstract】 Objective** To explore the effects and possible mechanism of rapamycin (RAPA) on apoptosis of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs from the mouse severe aplastic anemia (SAA) model. **Methods** The BALB/c female SAA model mice were induced by interferon-gamma in combination with busulphan. The SAA model mice were intraperitoneal injection with RAPA at daily dose of 0.5 mg/kg for 5 days (the RAPA-treated group,  $n=15$ ) in the SAA group ( $n=15$ ) and the un-treated group ( $n=15$ ) were control. Bone marrow hematopoiesis changes were observed by the patho-morphological examination of femurs. The mononuclear cells of the peripheral blood and spleen were subjected to assess the intracellular Foxp3 expression in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs by flow cytometry (FCM). In addition, after being purified by immunomagnetic beads, the splenic CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs was subjected to assess apoptosis by FCM and the Akt and Stat3 phosphorylation by using of western blot. **Results** The patho-morphological examination of

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2018.03.005

作者单位:215006 苏州大学附属第一医院血液内科[林赠华(现在南通大学附属医院血液内科,226001)];南通大学附属医院血液内科(刘红、朱丽、杨熙、张亚平、钱娟、刘海燕)

通信作者:刘红,Email:hongliu63@126.com

femurs showed normal marrow cell proliferation in un-treated group and hypocellularity in both SAA group and RAPA-treat group, with an increase in the number of fat cells. The bone marrow hematopoietic tissue ratio in RAPA-treat group was higher than SAA group [ (9.75±1.83)% vs (7.00±2.00)%,  $\Delta\bar{x}$  = 2.15% (95% CI 0.15%–5.35%),  $P$  = 0.037]. In the SAA group, FCM analysis showed down-expression of Foxp3 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs compared with the un-treated group. However, after treatment with RAPA, the expression of Foxp3 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs was increased ( $P$  < 0.017). Compared with the un-treated group, increased CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs apoptosis [(19.84 ± 1.39)% vs (29.85 ± 2.72)%] with increased Akt phosphorylation accompanied by increased Stat3 phosphorylation was found in SAA group ( $P$  < 0.05, respectively). On the contrary, RAPA-treated group exhibited CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs with a reduction in apoptosis rate [(22.39 ± 3.71)%], Akt phosphorylation and Stat3 phosphorylation compared with the SAA group ( $P$  < 0.05, respectively). **Conclusion** These results indicate that RAPA may increase the expression of Foxp3 by down-regulation the levels of Akt and Stat3 phosphorylation and reduce apoptosis in splenic CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs from the mice model of SAA.

**【Key words】** Anemia, aplastic; T-lymphocytes, regulatory; Rapamycin; Apoptosis; Forkhead box P3

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81070400); The Foundation of Nantong City (HS2015004); Research Foundation of Health and Family Planning Commission of Nantong (WQ2016067)

再生障碍性贫血(AA)是由活化或功能亢进的T淋巴细胞作用于造血干/祖细胞导致的造血细胞凋亡及骨髓造血功能衰竭<sup>[1]</sup>。既往研究认为Treg细胞减少是AA重要的免疫学特征,可能参与AA的发病过程<sup>[2-3]</sup>。而AA患者Treg细胞减少的原因还不是十分清楚。核转录因子Foxp3特异性表达于Treg细胞,是其发育和功能作用的关键。研究表明Akt及Stat3的磷酸化水平与Foxp3蛋白的表达存在密切联系<sup>[4]</sup>。文献报道雷帕霉素(Rapamycin, RAPA)可以体内外扩增Treg细胞<sup>[5]</sup>,并可通过与环孢素A不同的作用机制治疗免疫介导的AA小鼠<sup>[6]</sup>。本研究我们观察RAPA对重型AA(SAA)模型小鼠Treg细胞凋亡的影响以及可能的机制,拟从细胞和分子水平探讨RAPA在AA治疗中的实验依据。

### 对象与方法

1. 研究对象:近交系雌性BALB/c小鼠45只,清洁级,8~12周龄,体重18~22 g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供(合格证号:2015000511717),均饲养于南通大学医学院实验动物中心。采用随机数字表法将小鼠随机分对照组、SAA组及RAPA组,每组15只。

2. 仪器和试剂:小鼠源性重组IFN- $\gamma$ 购自美国Peprotech公司;白消安片购自英国GSK公司;小鼠淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司;抗小鼠CD4-FITC、CD25-PE、Foxp3-PE-Cy5及同型阴性对照,固定破膜剂和破膜剂缓冲液均购自美国eBioscience公司;小鼠CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg

分选试剂盒、免疫磁珠分选缓冲液、免疫磁珠 midi 及 mini 分选器均购自德国 Miltenyi 公司; Western Blot 全套仪器购自美国 Bio-Rad 公司; 兔抗小鼠  $\beta$ -actin、Akt、磷酸化 Akt (p-Akt)、Stat3、磷酸化 Stat3 (p-Stat3) 一抗均购自美国 CST 公司; 山羊抗兔二抗购自美国 Jackson 公司; Annexin V-APC 凋亡试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司; RAPA 购于美国 Gene Operation 公司。

3. SAA模型的建立及RAPA治疗过程:将白消安片剂研磨后制成2 mg/ml悬液,给予BALB/c小鼠18 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃,同时每日腹腔注射IFN- $\gamma$  7 500 U(0.2 ml),连续用药8 d建立SAA模型。给予对照组每日1次0.2 ml 0.9%氯化钠溶液灌胃,同时腹腔注射0.2 ml 0.9%的氯化钠溶液。造模用药后第1天起RAPA组小鼠给予RAPA 0.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> (0.2 ml)×5 d腹腔注射,其余两组小鼠给予蒸馏水每日0.2 ml×5 d腹腔注射。

4. 标本采集:在RAPA组用药结束后第2天进行标本采集。摘眼球法取小鼠眶后静脉血1.0~2.0 ml, EDTA抗凝, PBS缓冲液1:1稀释,以小鼠淋巴细胞分离液常规分离获得单个核细胞。后断颈处死各组小鼠,无菌取小鼠脾脏和股骨。脾脏置于200目尼龙滤网研磨制备成脾细胞悬液,以小鼠淋巴细胞分离液分离获得单个核细胞。

5. 骨髓组织病理形态学观察:将各组小鼠股骨以Bouin固定液固定,乙醇梯度脱水后常规Hemapun865塑料包埋,切片厚度为4  $\mu$ m,瑞氏-吉姆萨染色,光学显微镜下观察组织形态并计算造血

组织面积。

6. 免疫磁珠分选Treg细胞:取各组小鼠脾脏单个核细胞,免疫磁珠分选缓冲液调整细胞密度为 $2.5 \times 10^8/\text{ml}$ ,按 $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Treg细胞分选试剂盒说明书分选Treg细胞,调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 备用。

7. Treg细胞凋亡率的检测:取各组Treg细胞悬液各100  $\mu\text{l}$ ,离心、重悬,Annexin V-APC标记后上流式细胞仪检测Treg细胞凋亡率。

8. Western blot法检测Akt、p-Akt、Stat3和p-Stat3的表达:离心收集 $1 \times 10^6$ 个Treg细胞,加入20  $\mu\text{l}$ 裂解液+苯甲基磺酰氟(按100:1混匀)冰上裂解30 min,4  $^\circ\text{C}$ 离心(12 000 r/min,离心半径16 cm)20 min,BCA法测定总蛋白浓度,根据蛋白浓度调整上样量进行SDS-PAGE电泳,转膜后4  $^\circ\text{C}$ 封闭10 h,加入一抗(Akt、p-Akt、Stat3、p-Stat3和内参分别稀释1 000倍)4  $^\circ\text{C}$ 孵育18 h,洗涤后室温孵育二抗1 h后,再次洗涤后加用ECL发光液孵育,至显影仪上显影,扫描后与内参进行对比分析计算各蛋白的表达量。实验重复3次。

9. Treg细胞中Foxp3表达的检测:取各组小鼠框后静脉血及脾脏单个核细胞,调整细胞密度为 $1 \times 10^7/\text{ml}$ ,取100  $\mu\text{l}$ 制备好的单个核细胞悬液根据操作说明先进行细胞表面 $\text{CD4-FITC}$ 和 $\text{CD25-PE}$ 染色,破膜后进行胞内Foxp3-PE-Cy染色,洗涤后重悬细胞,上流式细胞仪检测 $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+/\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ 及 $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+/\text{CD4}^+$ 细胞比例。

10. 统计学处理:采用SPSS 16.0软件进行统计分析,符合正态分布数据用均数 $\pm$ 标准差表示,方差齐的资料三组间比较采用单因素方差分析,并采用LSD-*t*检验进一步行两两比较;方差不齐的资料三组间比较采用Welch检验,并采用Tamhane's T2法进一步行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。不符合正态分布的数据用中位数(范围)表示,采用Kruskal-Wallis检验进行组间比较,组间比较有统计学意义的变量进一步进行两两比较,将*P*值

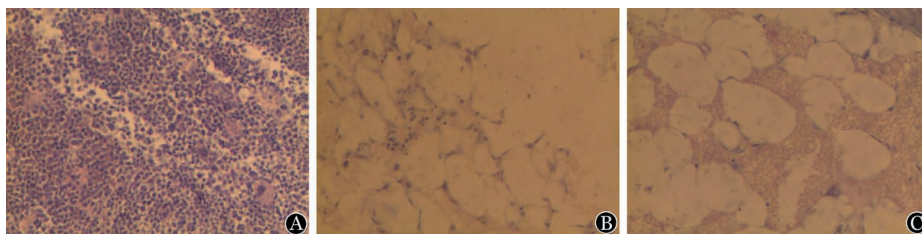
进行Bonferroni校正,即 $P < 0.017$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 各组小鼠组织病理学观察:与对照组相比,SAA组造血细胞明显减少,且造血细胞被大量的脂肪组织所代替,RAPA组造血细胞亦明显减少,可见大量脂肪细胞(图1)。对照组、SAA组和RAPA组小鼠胫骨骨髓造血组织面积组间比较差异有统计学意义(Welch  $F = 1\ 441.822$ ,  $P < 0.001$ )。进一步采用Tamhane's T2法进行两两比较,SAA组与RAPA组骨髓造血组织面积明显低于对照组( $P$ 值均 $< 0.001$ ),RAPA组略高于SAA组[ $\Delta\bar{x} = 2.15\%$ (95%  $CI$  0.15% ~ 5.35%),  $P = 0.037$ ]。提示RAPA治疗5 d对SAA小鼠的骨髓造血功能略有改善(表1)。

2. 各组小鼠脾脏Treg细胞凋亡率比较:见表1。对照组、SAA组、RAPA组小鼠脾脏中Treg细胞凋亡率组间比较差异有统计学意义( $F = 18.338$ ,  $P < 0.001$ )。进一步采用LSD-*t*检验进行两两比较,与对照组相比,SAA组小鼠脾脏中Treg细胞凋亡率显著增多[ $\Delta\bar{x} = 10.01\%$ (95%  $CI$  5.23% ~ 14.79%),  $P < 0.001$ ];而RAPA组Treg细胞凋亡率明显低于SAA组[ $\Delta\bar{x} = -7.45\%$ (95%  $CI$  -10.93% ~ -3.98%),  $P < 0.001$ ],与对照组比较差异无统计学意义[ $\Delta\bar{x} = 2.55\%$ (95%  $CI$  -1.48% ~ 6.59%),  $P = 0.196$ ]。提示经5 d RAPA治疗后SAA小鼠Treg细胞凋亡率显著下降。

3. 各组小鼠脾脏Treg细胞Akt、p-Akt、Stat3和p-Stat3蛋白表达水平的比较:对照组、SAA组、RAPA组脾脏Treg细胞中Akt、p-Akt、Stat3、p-Stat3蛋白表达水平组间比较差异均有统计学意义( $F$ 分别为325.928、558.417、134.306、319.330,  $P$ 值均 $< 0.001$ )。LSD-*t*检验行两两比较,对照组、RAPA组Akt、Stat3蛋白水平(Akt相对表达量分别为 $1.22 \pm 0.15$ 、 $0.91 \pm 0.02$ ,Stat3相对表达量分别为 $1.10 \pm 0.14$ 、



A:对照组;B:重型再生障碍性贫血模型小鼠;C:重型再生障碍性贫血模型小鼠腹腔注射雷帕霉素 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 5 \text{ d}$

图1 各组小鼠骨髓病理学结果(低倍,瑞氏吉姆萨染色)

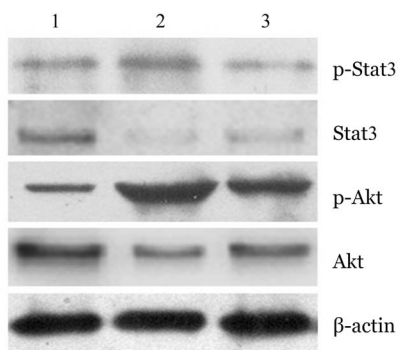
**表1** 各组小鼠骨髓造血组织面积和脾脏Treg细胞凋亡率分析

组别	骨髓造血组织面积		脾脏Treg细胞凋亡率(%)	
	鼠数	值( $\bar{x} \pm s$ )	鼠数	率( $\bar{x} \pm s$ )
对照组	8	94.25±4.20	4	19.84±1.39
SAA组	8	7.00±2.00 <sup>a</sup>	7	29.85±2.72 <sup>a</sup>
RAPA组	8	9.75±1.83 <sup>ab</sup>	6	22.39±3.71 <sup>b</sup>
统计量	1 441.822		18.338	
P值	<0.001		<0.001	

注:SAA组:重型再生障碍性贫血模型小鼠;RAPA组:重型再生障碍性贫血模型小鼠腹腔注射雷帕霉素0.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>×5 d。与对照组比较,<sup>a</sup>P<0.01;与SAA组比较,<sup>b</sup>P<0.05

1.15±0.18)均高于SAA组(0.85±0.23、0.95±0.15), p-Akt、p-Stat3蛋白水平(p-Akt相对表达量分别为0.47±0.18、p-Stat3相对表达量分别为0.42±0.01、0.29±0.14)低于SAA组(1.01±0.21、0.64±0.23)(P值均<0.001);RAPA组Akt、p-Stat3蛋白水平低于对照组,p-Akt、Stat3蛋白水平高于对照组(P值均<0.05)(图2)。

4. Treg细胞中Foxp3表达水平比较:各组小鼠



1:对照组;2:重型再生障碍性贫血模型小鼠;3:重型再生障碍性贫血模型小鼠腹腔注射雷帕霉素0.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>×5 d

**图2** Western blot法检测各组小鼠脾脏Treg细胞内Akt、磷酸化(p)-Akt、Stat3、p-Stat3蛋白表达水平

脾脏中CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>细胞在CD4<sup>+</sup>T细胞中所占比例组间差异有统计学意义( $\chi^2 = 28.366, P < 0.001$ ),各组间外周血及脾脏CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>细胞在CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞中所占比例差异均有统计学意义( $\chi^2$ 分别为13.113、28.186,P值均<0.01)。进一步两两比较并行Bonferroni校正,SAA组与RAPA组脾脏CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>细胞比例均明显低于对照组,且RAPA组明显高于SAA组(P值均<0.017);但RAPA组外周血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>细胞比例与SAA组比较差异均无统计学意义(表2)。提示RAPA治疗后小鼠脾脏Treg细胞Foxp3表达上调,但外周血中未见明显改变。

讨 论

近年来,随着免疫学、分子生物学和细胞生物学技术的发展,AA被认为是一种异质性疾病<sup>[1]</sup>。虽然新近研究显示端粒酶异常和体细胞突变等遗传背景在AA发病中发挥作用<sup>[7]</sup>,但T淋巴细胞异常活化及功能亢进造成的骨髓损伤仍然在原发获得性AA的发病机制中占主要地位<sup>[8]</sup>。

CD4<sup>+</sup>Treg细胞由Sakaguchi等<sup>[9]</sup>在1995年首次报道,其表型以持续表达IL-2受体α链(CD25)为特点。Foxp3是叉头翼状螺旋家族的一个主转录调节因子,促进Treg细胞遗传程序的发展<sup>[10-12]</sup>。Foxp3<sup>-/-</sup>小鼠Treg细胞发育受阻,出现严重的自身免疫性疾病<sup>[10,12-13]</sup>。而当输注正常的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞后则可避免自身免疫性疾病的发生。Hori等<sup>[13]</sup>研究发现逆转录Foxp3基因后可以使初始的T细胞转变成Treg细胞,从而证明Foxp3特异性表达于CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞并在该细胞的发育成熟和功能完善

**表2** 各组小鼠外周血和脾脏Foxp3表达水平比较(%)

组别	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> 细胞比例				CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> 细胞比例			
	外周血		脾脏		外周血		脾脏	
	鼠数	百分比[M(范围)]	鼠数	百分比[M(范围)]	鼠数	百分比[M(范围)]	鼠数	百分比[M(范围)]
对照组	10	76.74(65.12~83.90)	13	72.80(64.45~87.07)	8	2.35(1.60~3.65)	14	2.22(1.69~3.11)
SAA组	9	30.89(7.16~60.98) <sup>a</sup>	11	19.05(12.05~46.04) <sup>a</sup>	9	1.76(0.37~2.75)	10	0.73(0.53~1.01) <sup>a</sup>
RAPA组	9	65.49(15.88~87.83)	12	42.22(25.26~68.73) <sup>ab</sup>	10	2.38(0.84~4.67)	10	1.28(0.98~1.90) <sup>ab</sup>
$\chi^2$ 值	13.113		28.186		4.356		28.366	
P值	0.001		<0.001		0.113		<0.001	

注:SAA组:重型再生障碍性贫血模型小鼠;RAPA组:重型再生障碍性贫血模型小鼠腹腔注射雷帕霉素0.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>×5 d。与对照组比较,<sup>a</sup>P<0.017;与SAA组比较,<sup>b</sup>P<0.017

中发挥了重要作用。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 细胞可通过分泌抑制性细胞因子 IL-10 和 TGF- $\beta$ 、细胞溶解作用、代谢紊乱诱导的免疫抑制作用、树突状细胞介导的免疫抑制效应等方式抑制自身反应性 T 细胞和 Treg 细胞的活化<sup>[14-15]</sup>。在 AA 的发病中, Treg 细胞减少可引起 Th1/Th2 比例增高, 导致抑制自身免疫反应的作用减弱, 体内自身反应性 T 细胞大量增殖活化, 使得造血干细胞受到免疫损伤, 最终导致 AA 的发生。本研究结果显示 SAA 小鼠 Treg 细胞 Foxp3 表达减低, 这与上述文献报道一致, 此外我们发现 SAA 小鼠 Treg 细胞凋亡率显著增加, 从而推测 Foxp3 的低表达可能会减弱免疫抑制功能, 导致自身免疫失衡, 从而参与了 AA 的发病。

在 PI3K-Akt-mTOR 信号传导通路中, Akt 是信号转导通路的核心, PI3K 激活了 Akt 后可以通过磷酸化作用激活或抑制其下游的靶蛋白从而诱发细胞的生长, 经过多种途径促进细胞存活, 是重要的抗凋亡因子<sup>[16]</sup>。mTOR 是一种非典型的丝/苏氨酸蛋白激酶, 是 Akt 的下游靶蛋白, 在细胞的增殖、分化中起着中心调控作用<sup>[17-18]</sup>。Treg 细胞数目的决定环节, 即分化过程, 实质上就是 Foxp3 被诱导表达的过程。既往研究表明 Akt-mTOR 通过影响 Foxp3 启动子、阻断 TGF- $\beta$  对 Foxp3 的诱导信号等抑制 Foxp3 的表达, 进而影响 Treg 细胞分化<sup>[19-21]</sup>。Feuerer 等<sup>[22]</sup>研究也认为激活 PI3K-Akt-mTOR 信号通路可以抑制 Treg 细胞分化。国内也有相关研究证实抑制 PI3K-Akt-mTOR 通路可以使 Foxp3 表达增强<sup>[23]</sup>。Stat3 参与细胞的生长、增殖、恶性转化及凋亡抑制等功能的调控, 其过度激活可以导致细胞的异常增殖和凋亡障碍<sup>[24]</sup>。Pallandre 等<sup>[25]</sup>发现通过小干扰 RNA 沉默 Stat3 基因后可以抑制 Treg 细胞中 Foxp3 表达。Stat3 的激活对于 Treg 细胞的分化也具有抑制作用<sup>[26-27]</sup>。p-Stat3 可以抑制 Smad3 与 Foxp3 增强子的结合, 抑制 Treg 细胞的外周分化<sup>[28]</sup>, 而且 Stat3 还可以通过间接诱导 ROR $\gamma$ t 而抑制 Foxp3 的表达<sup>[29]</sup>。我们推测: 低水平的 Stat3 磷酸化可以增强 Treg 细胞中 Foxp3 的表达, 促进 Treg 细胞的分化, 降低 Treg 细胞的凋亡。

本研究骨髓活检结果提示 RAPA 组骨髓造血功能与 SAA 组相比略有恢复, 但和对照组比较仍是增生明显低下, 本研究结果提示 RAPA 的疗效没有既往研究明显<sup>[6]</sup>, 考虑跟本研究用药的剂量及疗程与前者不同有关。本研究结果显示 SAA 组 Treg 细胞 Foxp3 表达降低, 凋亡率显著增加, RAPA 组脾脏

Treg 细胞 Foxp3 表达上调而凋亡率下降, 因此我们认为 RAPA 可能通过抑制 Treg 细胞中 Akt 及 Stat3 的磷酸化, 上调 Foxp3 的表达来抑制该细胞的凋亡, 促进其增殖。本研究结果可为 RAPA 治疗 AA 提供一定的理论依据。

### 参考文献

- [1] Young NS, Calado RT, Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia [J]. *Blood*, 2006, 108(8):2509-2519. DOI: 10.1182/blood-2006-03-010777.
- [2] Shi J, Ge M, Lu S, et al. Intrinsic impairment of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in acquired aplastic anemia [J]. *Blood*, 2012, 120(8):1624-1632. DOI: 10.1182/blood-2011-11-390708.
- [3] 刘海燕, 林赠华, 刘红, 等. 调节性 T 细胞和 Th17 细胞在新型小鼠重型再生障碍性贫血模型中的变化 [J]. *中华血液学杂志*, 2012, 33(8):653-656. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2012.08.016.
- [4] Yang H, Guo HZ, Li XY, et al. Viral RNA-unprimed Rig-I restrains Stat3 activation in the modulation of regulatory T cell/Th17 cell balance [J]. *J Immunol*, 2017, 199(1):119-128. DOI: 10.4049/jimmunol.1700366.
- [5] Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells [J]. *Blood*, 2005, 105(12):4743-4748. DOI: 10.1182/blood-2004-10-3932.
- [6] Feng X, Lin Z, Sun W, et al. Rapamycin is highly effective in murine models of immune-mediated bone marrow failure [J]. *Haematologica*, 2017, 102(10):1691-1703. DOI: 10.3324/haematol.2017.163675.
- [7] Mufti GJ, Kulasekararaj AG, Marsh JC. Somatic mutations and clonal hematopoiesis in aplastic anemia [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(17):1674-1675. DOI: 10.1056/NEJMc1509703#SA3.
- [8] 中华医学会血液学分会红细胞疾病(贫血)学组. 再生障碍性贫血诊断与治疗中国专家共识(2017年版) [J]. *中华血液学杂志*, 2017, 38(1):1-5. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.01.001.
- [9] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases [J]. *J Immunol*, 1995, 155(3):1151-1164.
- [10] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(4):330-336. DOI: 10.1038/ni904.
- [11] Hori S, Sakaguchi S. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells [J]. *Microbes Infect*, 2004, 6(8):745-751. DOI: 10.1016/j.micinf.2004.02.020.
- [12] Khattry R, Cox T, Yasayko SA, et al. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(4):337-342. DOI: 10.1038/ni909.
- [13] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3 [J]. *Science*,

- 2003, 299(5609):1057-1061. DOI: 10.1126/science.1079490.
- [14] Bopp T, Becker C, Klein M, et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression [J]. *J Exp Med*, 2007, 204 (6):1303-1310. DOI: 10.1084/jem.20062129.
- [15] Han KL, Thomas SV, Koontz SM, et al. Adenosine A<sub>2A</sub> receptor agonist-mediated increase in donor-derived regulatory T cells suppresses development of graft-versus-host disease [J]. *J Immunol*, 2013, 190 (1): 458-468. DOI: 10.4049/jimmunol.1201325.
- [16] Heras-Sandoval D, Pérez-Rojas JM, Hernández-Damián J, et al. The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration [J]. *Cell Signal*, 2014, 26 (12):2694-2701. DOI: 10.1016/j.cellsig.2014.08.019.
- [17] Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression [J]. *Oncogene*, 2004, 23(18): 3151-3171. DOI: 10.1038/sj.onc.1207542.
- [18] Pene F, Claessens YE, Muller O, et al. Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma [J]. *Oncogene*, 2002, 21 (43): 6587-6597. DOI: 10.1038/sj.onc.1205923.
- [19] Wei J, Duramad O, Perng OA, et al. Antagonistic nature of T helper 1/2 developmental programs in opposing peripheral induction of Foxp3+ regulatory T cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104 (46): 18169-18174. DOI: 10.1073/pnas.0703642104.
- [20] Kerdiles YM, Stone EL, Beisner DR, et al. Foxo transcription factors control regulatory T cell development and function [J]. *Immunity*, 2010, 33 (6): 890-904. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.12.002.
- [21] Harada Y, Harada Y, Elly C, et al. Transcription factors Foxo3a and Foxo1 couple the E3 ligase Cbl-b to the induction of Foxp3 expression in induced regulatory T cells [J]. *J Exp Med*, 2010, 207(7):1381-1391. DOI: 10.1084/jem.20100004.
- [22] Feuerer M, Hill JA, Mathis D, et al. Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(7):689-695. DOI: 10.1038/ni.1760.
- [23] 葛圣林, 彭磊磊, 张成鑫. PI3K-Akt-mTOR 信号通路对 Foxp3 基因表达的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(6):855-859. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2011.06.027.
- [24] Lim CP, Cao X. Structure, function, and regulation of STAT proteins [J]. *Mol Biosyst*, 2006, 2(11):536-550. DOI: 10.1039/b606246f.
- [25] Pallandre JR, Brillard E, Créhange G, et al. Role of STAT3 in CD4 + CD25 + FOXP3 + regulatory lymphocyte generation: implications in graft-versus-host disease and antitumor immunity [J]. *J Immunol*, 2007, 179(11):7593-7604.
- [26] Durant L, Watford WT, Ramos HL, et al. Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis [J]. *Immunity*, 2010, 32 (5):605-615. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.05.003.
- [27] Huber M, Steinwald V, Guralnik A, et al. IL-27 inhibits the development of regulatory T cells via STAT3 [J]. *Int Immunol*, 2008, 20(2):223-234. DOI: 10.1093/intimm/dxm139.
- [28] Xu L, Kitani A, Stuelten C, et al. Positive and negative transcriptional regulation of the Foxp3 gene is mediated by access and binding of the Smad3 protein to enhancer I [J]. *Immunity*, 2010, 33(3):313-325. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.09.001.
- [29] Burgler S, Mantel PY, Bassin C, et al. RORC2 is involved in T cell polarization through interaction with the FOXP3 promoter [J]. *J Immunol*, 2010, 184(11):6161-6169. DOI: 10.4049/jimmunol.0903243.

(收稿日期:2017-11-24)

(本文编辑:刘爽)

·读者·作者·编者·

## 关于重视引用国内文献的意见

部分作者在撰写论文时,只引用国外文献(或非中文语种的文献)。诚然,在医学的许多领域,国内的研究水平确实有待提高,有引用国外文献的必要。但是,不引用国内相关文献,将存在以下问题:①作者没有阅读国内文献,这样作者阅读的文献就不全面,作者所撰写的论文、综述等的科学性、先进性就值得商榷。②不引用国内文献,就不能准确、全面地反映国内的研究水平和进展,毕竟本刊发表的文章主要的阅读对象是中国医师。③有的作者虽然阅读了国内文献,但未引用。不引用国内文献的想法可能更为复杂,如轻视或忽略国内同行,或暗示首创权。除非是专门的国外医学文摘或国外文献综述,均应有国内文献的复习、引用和注解。本刊倡导在论文的撰写中应维护参考文献的科学性,鼓励作者在引用国外文献的同时检索并引用国内相关的文献。

本刊编辑部