

鹿龙再生汤对重型再生障碍性贫血小鼠 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞内 Foxp3 表达的影响

王旭丽 林赠华 刘红 陆伟 刘海燕 陆雯萍 钱宇

The traditional Chinese medicine Lulongzaisheng decoction may affect the expression of Foxp3 by regulation of Akt and Stat3 phosphorylation in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from severe aplastic anemia mouse models Wang Xuli, Lin Zenghua, Liu Hong, Lu Wei, Liu Haiyan, Lu Wenping, Qian Yu

Corresponding author: Liu Hong, Department of Hematology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China. Email: hongliu63@126.com

多数再生障碍性贫血(AA)由活化或功能亢进的T淋巴细胞作用于造血干/祖细胞,导致造血细胞凋亡及骨髓造血功能衰竭^[1-2],而调节性T细胞(Treg)在其发病过程中起重要作用^[3]。有研究发现下调Foxp3基因,小鼠体内Treg细胞数量下降,调节功能缺陷^[4]。相关研究也表明Akt及Stat3的磷酸化水平与Foxp3蛋白的表达存在密切联系^[5-6]。鹿龙再生汤是我国著名老中医朱良春先生治疗AA的经验方且效果良好^[7],但未见其细胞和分子水平的研究。本研究我们通过分析中药鹿龙再生汤对SAA小鼠模型CD4⁺CD25⁺Treg细胞Foxp3表达的影响及Akt、Stat3磷酸化水平的变化,从分子水平探讨鹿龙再生汤治疗AA可能的作用机制。

对象和方法

1. 研究对象:近交系雌性BALB/c小鼠,清洁级,8~12周龄,体重18~22 g,由南通大学医学院实验动物中心提供,合格证号:SCXK(苏)2012-0031。BALB/c重型AA模型小鼠参照文献^[8],通过白消安灌胃及腹腔注射IFN- γ 10 d诱导建立。

2. 实验分组:将鹿龙再生汤中药原液浓缩10倍,为浓缩液。取40只重型AA模型小鼠,随机分为4组,每组10只,分别予浓缩液、1:5灭菌蒸馏水稀释液、1:10灭菌蒸馏水稀释液及灭菌蒸馏水灌胃5 d,设为AA中药大剂量组、AA中药中剂量、AA中药小剂量组及AA组;另取10只正常BALB/c

小鼠作为正常组,予灭菌蒸馏水灌胃15 d。各组灌胃量均为0.01 ml/g。

3. 仪器和试剂:小鼠源性重组IFN- γ 购自美国Peprotech公司;白消安片购于英国GSK公司;鹿龙再生汤由南通大学附属医院中医科配制;小鼠淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物公司;异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗鼠CD4抗体(CD4-FITC)、藻红蛋白(PE)标记的抗鼠CD25抗体(CD25-PE)、PE-Cy5标记的抗鼠Foxp3抗体(Foxp3 PE-Cy5)、相应的同型阴性对照抗体(Rat IgG1-PE)、固定破膜剂和破膜剂缓冲液均购自美国eBioscience公司;小鼠CD4⁺CD25⁺Treg细胞分选试剂盒、小鼠FITC-CD4抗体、免疫磁珠分选缓冲液、免疫磁珠mini、midi分选器均购于德国Miltenyi公司;Western blot全套仪器购自美国Bio-Rad公司;兔抗小鼠 β -actin、Akt、磷酸化(p)-Akt、Stat3及p-Stat3抗体均购自美国CST公司;山羊抗兔二抗购自美国Jackson公司。

4. 标本采集:采集各组小鼠的眶后静脉血1.0 ml(EDTA抗凝),分离获得单个核细胞;处死小鼠,无菌取小鼠脾脏,制备成脾细胞悬液,分离获得单个核细胞。

5. Treg细胞的检测:取100 μ l制备好的单个核细胞悬液(1×10^7 /ml,单只小鼠)于流式管中,同时设定同型对照管(分别为CD25及Foxp3的对照管),试验管和Foxp3的对照管中加入CD4-FITC、CD25-PE各5 μ l,CD25的对照管中加入CD4-FITC、CD25的同型对照Rat IgG1-PE 5 μ l,混匀,室温避光孵育15~30 min后洗涤,258 \times g离心5 min,弃上清后加入新鲜配制的固定/破膜液,混匀,4 $^{\circ}$ C避光孵育30~60 min,用固定/破膜缓冲液洗涤后加入正常大鼠血清,4 $^{\circ}$ C避光封闭15 min,试验管加入Foxp3 PE-Cy5 10 μ l,对照管加入Foxp3的同型对照Rat IgG2a-PE-Cy 10 μ l,混匀,4 $^{\circ}$ C避光孵育60 min,用固定/破膜缓冲液2 ml洗涤1次,弃上清后重悬细胞,上流式细胞仪进行检测。实验重复3次。

6. Treg细胞的分选:取400 μ l单个核细胞悬液(细胞密度为 2.5×10^6 /ml,多只小鼠富集)加100 μ l Biotin-Antibody Cocktail轻轻混匀,置于4 $^{\circ}$ C避光孵育10 min,再分别加入300 μ l缓冲液,200 μ l Anti-Biotin MicroBeads和100 μ l CD25-PE抗体,轻轻混匀,4 $^{\circ}$ C避光孵育15 min后加入10 ml缓冲液,402 \times g离心10 min后重悬于500 μ l缓冲液中备用,用midi分选器分选获得纯度较高的CD4⁺细胞悬液,离心后重悬于900 μ l缓冲液中,再加入100 μ l Anti-PE MicroBeads轻轻混匀,4 $^{\circ}$ C避光孵育15 min,离心后重悬于500 μ l缓冲液中,用mini分选器两次分选获得纯度较高的CD4⁺CD25⁺Treg细胞悬液,调整细胞密度至 1×10^6 /ml备用。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.08.013

基金项目:国家自然科学基金(81070400);江苏省医学创新团队与领军人才项目(LJ201136);江苏省中医药局科技项目(LZ11096);南通市社会事业科技创新与示范计划(HS2013067)

作者单位:226001 南通大学附属医院血液内科[王旭丽(现在南京军区南京总医院血液科,210002)、林赠华、刘红、陆伟、刘海燕、陆雯萍、钱宇]

通信作者:刘红,Email:hongliu63@126.com

7. Western blot法检测Akt、p-Akt、Stat3、p-Stat3的表达水平:离心收集 1×10^6 个 $CD4^+ CD25^+$ Treg细胞,加入20 μ l细胞组织快速裂解液+苯甲基磺酰氟(按100:1混匀),冰上裂解30 min,4 $^{\circ}$ C离心20 min,测定蛋白浓度后剩余蛋白上清液以4:1的浓度加入SDS上样缓冲液(5 \times)混匀于沸水煮8 min;配制10%的分离胶、5%的浓缩胶、电泳液、封闭液、转膜液及TBST(1 \times)等;调整蛋白浓度,依次上样为Marker、正常组、AA组、AA中药小剂量组、AA中药中剂量组及AA大剂量组各20 μ l;100 V电泳15 min后调至150 V电泳40 min;15 V转膜40 min后封闭90 min,TBST(1 \times)洗涤5 min,4 $^{\circ}$ C过夜,次日TBST(1 \times)洗涤,室温孵育二抗1 h后洗涤,膜上覆ECL发光液后至显影仪上显影。

8. 统计学处理:采用SPSS 13.0软件进行统计分析,所有数据用均数 \pm 标准差表示,根据方差齐或不齐,组间各均数比较采用t或t_c检验,P<0.05为差异有统计学意义。

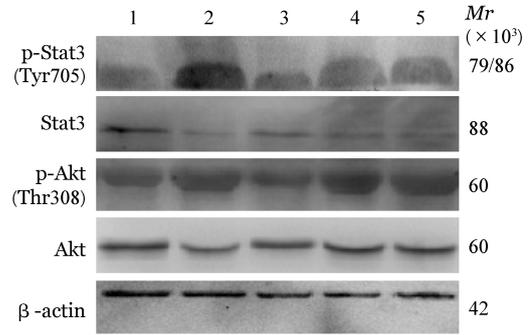
结 果

1. 结果见表1,正常组、AA中药小剂量组、AA中药中剂量组、AA中药大剂量组外周血及脾脏 $CD4^+CD25^+$ Treg/ $CD4^+$ 细胞、 $CD4^+CD25^+$ Foxp3 $^-$ / $CD4^+$ 细胞及 $CD4^+CD25^+$ Foxp3 $^+$ / $CD4^+CD25^+$ 细胞比例均明显高于AA组(P值均<0.05)。

2. 正常组、AA中药小剂量组、AA中药中剂量组、AA中药大剂量组脾脏 $CD4^+CD25^+$ Treg细胞中p-Stat3相对表达水平分别为 1.43 ± 0.38 、 1.58 ± 0.40 、 1.71 ± 0.48 、 1.69 ± 0.40 ,均低于AA组的 2.17 ± 0.53 ;正常组、AA中药小剂量组、AA中药中剂量组、AA中药大剂量组脾脏 $CD4^+CD25^+$ Treg细胞中Stat3相对表达水平分别为 2.17 ± 0.38 、 2.13 ± 0.48 、 2.05 ± 0.48 、 2.25 ± 0.49 ,均高于AA组的 1.69 ± 0.36 (P值均<0.05)(图1)。

3. 正常组、AA中药小剂量组脾脏 $CD4^+CD25^+$ Treg细胞中p-Akt相对表达水平分别为 1.26 ± 0.39 、 1.47 ± 0.48 ,均低于AA组的 1.71 ± 0.47 ;正常组、AA中药小剂量组脾脏 $CD4^+CD25^+$ Treg细胞中Akt相对表达水平分别为 0.60 ± 0.56 、 0.72 ± 0.58 ,均高于AA组的 0.44 ± 0.37 (P值均<0.05)(图1)。

4. AA中药中剂量组、AA中药大剂量组p-Akt相对表达水平分别为 1.78 ± 0.55 、 1.77 ± 0.55 ,与AA组的 1.71 ± 0.47 比较差异无统计学意义;AA中药中剂量组、AA中药大剂量组Akt相对表达水平分别为 0.71 ± 0.55 、 0.65 ± 0.55 ,与AA组的 0.44 ± 0.37 比较差异均无统计学意义(P值均>0.05)(图1)。



1: 正常组;2: AA组;3: AA中药小剂量组;4: AA中药中剂量组;5: AA中药大剂量组

图1 Western blot方法检测各组小鼠脾脏 $CD4^+CD25^+$ 调节性T细胞磷酸化(p-Stat3)、Stat3、p-Akt、Akt蛋白表达水平

讨 论

$CD4^+CD25^+$ Foxp3 $^+$ Treg细胞是一类表达 $CD4$ 、 $CD25$ 及转录因子Foxp3的T淋巴细胞亚型,占 $CD4^+$ T细胞的5%~10%。从正常组织中剔除 $CD4^+CD25^+$ Foxp3 $^+$ Treg细胞会导致相关自身免疫病的发生,重新输注后可恢复^[9-11]。Foxp3是 $CD4^+CD25^+$ Treg细胞发挥免疫调节作用的关键因子,其对 $CD4^+CD25^+$ Treg细胞的发育成熟和功能的完善发挥了重要作用^[12-13]。由于绝大多数AA患者体内Treg细胞数量减少^[14],且相关的细胞因子分泌失衡,导致其自身免疫反应的抑制作用减弱,体内自身反应性T细胞的大量增殖活化,靶向杀伤造血干细胞,引起骨髓造血功能衰竭。因此, $CD4^+CD25^+$ Treg细胞的数量减少、功能异常及Foxp3的表达异常与AA的发病有关^[3]。

Akt是原癌基因c-Akt表达编码的一种丝氨酸苏氨酸蛋白激酶,为PI3K下游的靶蛋白,是PI3K/Akt信号转导通路的核心,Akt使第308位上的苏氨酸位点(Thr308)和第473位上的丝氨酸(Ser473)磷酸化而被激活成为具有磷酸激酶活性的p-Akt,发挥抑制细胞凋亡、促进细胞增殖和促进细胞运动等生物学作用^[15]。哺乳动物的雷帕霉素靶(mTOR)为Akt的下游靶蛋白,是PI3K/Akt信号转导通路的关键因子,在细胞的增殖、分化中起着中心调控点作用^[16]。抑制PI3K-Akt-mTOR信号通路可增强 $CD4^+CD25^+$ Treg细胞特异性基因Foxp3的表达^[5]。信号转导子及转录激活子3(Stat3)是Stat

表1 重型再生障碍性贫血(AA)模型小鼠外周血和脾脏 $CD4^+CD25^+$ 调节性T细胞(Treg)比例(%、 $\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	外周血			脾脏		
	$CD4^+CD25^+$ / $CD4^+$ 细胞	$CD4^+CD25^+$ Foxp3 $^+$ / $CD4^+$ 细胞	$CD4^+CD25^+$ Foxp3 $^-$ / $CD4^+CD25^+$ 细胞	$CD4^+CD25^+$ / $CD4^+$ 细胞	$CD4^+CD25^+$ Foxp3 $^+$ / $CD4^+$ 细胞	$CD4^+CD25^+$ Foxp3 $^-$ / $CD4^+CD25^+$ 细胞
正常组	3.69 ± 0.30	3.57 ± 0.32	95.12 ± 0.29	2.11 ± 0.22	1.85 ± 0.23	87.62 ± 2.25
AA组	2.57 ± 0.35	1.94 ± 0.26	75.23 ± 1.05	1.96 ± 0.60	1.26 ± 0.70	64.01 ± 1.73
AA小剂量组	5.16 ± 0.52	4.54 ± 0.42	87.79 ± 2.68	2.58 ± 0.85	1.85 ± 0.37	71.54 ± 2.82
AA中剂量组	5.52 ± 0.64	4.68 ± 0.60	86.63 ± 2.64	3.15 ± 0.36	2.40 ± 0.40	79.04 ± 6.34
AA大剂量组	6.18 ± 0.57	5.38 ± 0.55	86.81 ± 3.11	3.08 ± 0.54	2.16 ± 0.23	71.28 ± 5.57

注:AA组的外周血和脾脏 $CD4^+CD25^+$ / $CD4^+$ 、 $CD4^+CD25^+$ Foxp3 $^+$ / $CD4^+$ 、 $CD4^+CD25^+$ Foxp3 $^-$ / $CD4^+CD25^+$ 细胞比例与其他各组比较差异均有统计学意义。实验重复3次

家族的重要成员,参与多种生理过程的调控,在 JAK-Stats 信号转导途径中发挥作用,经 JAK 磷酸化,成为其活性形式 p-Stat3(Tyr705),促进下游多种靶基因的表达^[17]。Wahl^[18]研究发现,体内初始 CD4⁺T 细胞在 TGF-β 因子的诱导及 IL-6 的协同作用下,通过激活 Stat3 以诱导 RORγt 的表达,抑制了以 Foxp3 表达为特征的 Treg 细胞分化。研究还发现,抑制磷酸化 STAT3-RORγt 通路,可以增强 Foxp3 的表达^[19]。由此可以推断,下调 Stat3 磷酸化水平可以增强 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞中 Foxp3 的表达,而上调 Stat3 可以抑制该细胞内 Foxp3 的表达。此外,研究证实 mTOR 作为 Akt 的下游靶蛋白,可直接磷酸化 Stat3 丝氨酸位点(Ser727),促进 Stat3 对靶基因的转录,而且 Stat3 依赖性转录对 mTOR 的作用相当敏感^[20]。由此可以推断,上调 p-Akt 可以促进 p-Stat3 的表达。

本实验中 AA 中药三个不同剂量组的小鼠外周血及脾脏中 CD4⁺CD25⁺ Treg 的数量及 Foxp3 的表达高于 AA 组,说明鹿龙再生汤能提高 AA 模型小鼠 CD4⁺CD25⁺ Treg 的数量并促进 Foxp3 的表达,具有一定的免疫调节作用。AA 模型小鼠 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞中 Akt 及 Stat3 表达较正常小鼠下降, p-Akt 及 p-Stat3 的表达升高, Foxp3 的表达下降。这与 Sauer 等^[5]报道的激活 PI3K-Akt-mTOR 通路可以抑制 Foxp3 的表达及 Wahl 发现的激活 Stat3 抑制了以 Foxp3 表达观点一致。根据上述实验结果推断,小剂量的鹿龙再生汤能抑制该细胞中 Akt 及 Stat3 的磷酸化水平,上调 SAA 小鼠 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞中 Foxp3 的表达,从而发挥一定的免疫调节作用。然而,中剂量及大剂量组 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞内 p-Akt 的表达升高, Akt 表达下降,而 Foxp3 的表达却升高,这似乎与文献报道不符。推测可能与 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞中 Stat3 的激活有关, AA 中药中剂量及大剂量组 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞内 p-Stat3 的表达水平低于 AA 组, Stat3 的表达水平高于 AA 组。较 AA 组而言,这两组小鼠脾脏 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞内 Stat3 的激活受抑制, Foxp3 的表达自然增加,说明这两组中该细胞内 Akt 磷酸化引发的 Foxp3 的表达减弱的作用与 Stat3 的磷酸化受抑制引发的 Foxp3 的表达增加相比较,后者作用更强。此外,研究证实, p-Akt 可以上调 p-Stat3 的表达,这也可以解释 AA 中药大剂量及 AA 中剂量组 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞内 p-Stat3 的表达水平略高于 AA 中药小剂量组的现象。本研究为中药鹿龙再生汤治疗 AA 提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] Li JP, Zheng CL, Han ZC. Abnormal immunity and stem/progenitor cells in acquired aplastic anemia [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2010, 75(2):79-93.
- [2] Nakao S. Immune mechanism of aplastic anemia [J]. Int J Hematol, 1997, 66(2):127-134.
- [3] Solomou EE, Rezvani K, Mielke S, et al. Deficient CD4 + CD25 + FOXP3 + T regulatory cells in acquired aplastic anemia [J]. Blood, 2007, 110(5):1603-1606.
- [4] Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM, et al. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4 + CD25 + T regulatory

- cells in humans [J]. Hun Immunol, 2005, 66(1):13-20.
- [5] Sauer S, Bruno L, Hertweck A, et al. T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(22): 7797-7802.
- [6] Pallandre JR, Brillard E, Créange 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.
- [7] 吴干银, 朱建华, 刘红. 西药常规加鹿龙再生汤治疗再生障碍性贫血 30 例 [J]. 陕西中医, 2006, 27(11): 1369-1370.
- [8] 宁方颖, 林赠华, 刘红, 等. 干扰素-γ 与白消安合用诱导建立小鼠重型再生障碍性贫血模型的研究 [J]. 中华血液学杂志, 2011, 32(11):777-782.
- [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] Chen TC, Cobbold SP, Fairchild PJ, et al. Generation of anergic and regulatory T cells following prolonged exposure to a harmless antigen [J]. J Immunol, 2004, 172(10): 5900-5907.
- [11] Mottet C, Uhlig HH, Powrie F. Cutting edge: cure of colitis by CD4 + CD25 + regulatory T cells [J]. J Immunol, 2003, 170(8): 3939-3943.
- [12] 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.
- [13] Shevach EM. CD4 + CD25 + suppressor T cells: more questions than answers [J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(6):389-400.
- [14] Viguier M, Lemaître F, Verola O, et al. Foxp3 expressing CD4 + CD25 (high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells [J]. J Immunol, 2004, 173(2): 1444-1453.
- [15] Sale EM, Hodgkinson CP, Jones NP, et al. A new strategy for studying protein kinase B and its three isoforms. Role of protein kinase B in phosphorylating glycogen synthase kinase-3, tuberin, WNK1, and ATP citrate lyase [J]. Biochemistry, 2006, 45(1):213-223.
- [16] 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.
- [17] Bowman T, Garcia R, Turkson J, et al. STATs in oncogenesis [J]. Oncogene, 2000, 19(21):2474-2488.
- [18] Wahl SM. Transforming growth factor-beta: innately bipolar [J]. Curr Opin Immunol, 2007, 19(1): 55-62.
- [19] Zhang Y, Zhang L, Wu J, et al. Heme oxygenase-1 exerts a protective role in ovalbumin-induced neutrophilic airway inflammation by inhibiting Th17 cell-mediated immune response [J]. J Biol Chem, 2013, 288(48): 34612-34626.
- [20] Tee AR, Anjum R, Blenis J. Inactivation of the tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products occurs by phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent and -independent phosphorylation of tuberin [J]. J Biol Chem, 2003, 278(39): 37288-37296.

(收稿日期:2015-01-30)

(本文编辑:刘爽)