

调节性 T 细胞 Foxp3 基因 DNA 甲基化在风湿性心脏病中的研究进展[△]潘东华¹, 杜振宗², 宋剑非², 王海永²

(1. 桂林医学院研究生学院, 广西桂林 541004; 2. 桂林医学院附属医院心胸外科, 广西桂林 541004)

提要: 风湿性心脏病是一种因感染溶血性链球菌所引起的自身免疫性疾病。调节性 T 淋巴细胞(Tregs)是近年以来发现的有免疫调节功能的一群 T 淋巴细胞亚群, 在维持人体免疫耐受和免疫应答稳态方面具有非常重要的作用, 它的数量减少或功能异常与多种自身免疫性疾病有关。然而, 叉头翼状螺旋转录因子^[3] (forkhead box protein P3, Foxp3) 基因作为调节性 T 细胞的转录因子, 对调节和维持其免疫抑制功能起决定性作用。目前有学者认为 Foxp3 基因在表观遗传学中, 特别是甲基化状态对其稳定的表达有着重要作用。本文将对调节性 T 细胞 Foxp3 基因的 DNA 甲基化与风湿性心脏病发病机制的研究作一综述。

关键词: 风湿性心脏病; CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞; Foxp3 基因; DNA 甲基化

中图分类号: R541.9

文献标志码: A

文章编号: 1007-9688(2016)01-0115-04

风湿性心脏病被认为是一种常见的自身免疫性疾病, 它的发生、发展与多种复杂的免疫反应以及炎症反应有关。CD4⁺CD25⁺Tregs 是抑制性 T 细胞的亚群, 它能够抑制机体对外来抗原以及自身抗原的免疫应答, 在维持机体免疫耐受以及稳态方面具有重要作用。有研究提出 CD4⁺CD25⁺Treg 的功能失调或数量减少都有可能引起风湿性心脏病以及其他自身免疫疾病的发生^[1]。而叉头翼状螺旋转录因子^[3] (forkhead box protein P3, Foxp3) 作为 CD4⁺CD25⁺ T 淋巴细胞的转录调节因子, 近几年来国内外有学者认为它在表观遗传学尤其是 DNA 甲基化方面, 对维持免疫抑制功能起到了决定性作用。本文将对调节性 T 细胞 Foxp3 基因的 DNA 甲基化与风湿性心脏病发生发展的研究作一综述。

1 调节性 T 细胞与 Foxp3

1.1 CD4⁺CD25⁺Tregs 的功能

CD4⁺CD25⁺Tregs 是于 1995 年由 Sakaguchi^[2]首次报道, 它是一种 T 细胞亚群, 当时因它来源于胸腺的 CD4⁺CD25⁺ T 细胞, 因此命名为调节性 T 细胞。有研究证实在正常人和小鼠的外周血以及脾脏器官中大约有 5%~10% 的 CD4⁺ T 稳定地表达 CD25 分子 [白细胞介素 (interleukin, IL)-2 受体 α 链], 同时发现其胞质中特异性地表达 Foxp3^[3], 根据其来源和作用机制的不同, 可分为天然 CD4⁺CD25⁺Treg (nTreg)^[4]和诱导性 CD4⁺CD25⁺Treg (iTreg)。nTreg 在胸腺中

正常分化、发育和成熟, 被释放到外周血可以发挥免疫调节作用, 其主要机制是通过抑制 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞的活化与增殖来达到免疫负调节的作用, 且还与移植物的耐受性有关以及参与肿瘤的形成。而 iTreg^[5]一般在外周由抗原及其他因素诱导产生, 主要来自初始 CD4⁺T 细胞, 其通过分泌 IL-10 和转化生长因子 β (TGF-β) 来调节免疫应答过程, 从而起到抑制自身免疫应答、炎症反应过程及抑制排斥反应等作用, 但是其维持机体免疫平衡作用的发挥需要某些持续的刺激来维持 Foxp3 分子的稳定表达。

1.2 Foxp3 分子的功能

Foxp3 是转录因子 forkhead /winged-helix (叉头/螺旋翼状) 家族中的一员, 它最早被研究者发现于果蝇体内。Foxp3 主要在胸腺、脾脏等淋巴器官和组织中表达^[6]。Foxp3 表达于机体的 CD4⁺CD25⁺T 调节细胞, 并介导 Treg 细胞在外周器官的表达、功能的维持以及胸腺的发育。发育不成熟的胸腺 T 淋巴细胞通过 T 细胞受体 (TCR) 与 MHCII-肽相互作用的机制诱导 Foxp3 分子的表达^[7], 因此使一部分参与自身免疫反应 TC 的 CD4⁺T 细胞最终能够发育、分化成为成熟 Treg。表达缺陷或未表达的 Foxp3 淋巴细胞进入外周血后可逐渐发展成为自身免疫反应性 T 细胞, Foxp3 基因可以调节 Treg 的发育与功能维持, 也是决定 Treg 免疫抑制功能的重要因素^[8]。有实验证实: 自身免疫性疾病的患者中 Foxp3 分子数量上显著减少或功能上存在缺失。在人类基因组中, 假如 Foxp3 基因发生突变, 其编码的蛋白质丧失功能, 就会导致 Treg 细胞发育和功能失调, 出现免疫调节紊乱, 引起以系统性自身免疫疾病为特征的 IPEX 综合征 (immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked syndrome, IPEX)^[9,10]。Walker 等^[11]学者提出 CD4⁺CD25⁻ T 细胞的活化能使 CD4⁺CD25⁺ TregFoxp3 表达增加, 并与免疫抑制功能有关。以上实验结果表明 Foxp3 分子 CD4⁺CD25⁺Treg 是产生免疫抑制功能的关键基因, 并在 CD4⁺CD25⁺Treg 的产生以及功能上极其

[△]基金项目: 国家自然科学基金(项目编号: 81160296); 广西自然科学基金(项目编号: 2013GXNSFCB019005); 广西医药卫生计划课题(项目编号: Z2015397)

作者简介: 潘东华(1986-), 男, 在读医学硕士, 研究方向为心血管系统疾病的表观遗传学。

通信作者: 王海永, E-mail: docwanghy@sina.com

重要。

2 Foxp3 分子表达的 DNA 甲基化调控

DNA 甲基化是表观遗传学调控修饰现象之一, DNA 甲基化的具体过程是在 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferases, DNMTs) 的作用下, DNA 脱氧胞嘧啶 (cytosine) 的第 5 位碳原子被 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM) 携带的甲基基团共价性结合, 形成 5-甲基胞嘧啶 (5-Methylcytosine, 5-mC)。在哺乳动物的基因组中, 甲基化常发生于 CpG 二核苷酸的 5' 端胞嘧啶上, 有研究证实胚胎的形成过程中大概 60%~90% 的 CpG 位点呈甲基化状态。CpG 岛是一段富含大量 CpG 二核苷酸成分以及未甲基化的 CpG 簇, 位于转录起始位点区域或结构基因的启动子中。CpG 岛的甲基化状态的改变和许多基因的表达有关, 基因启动子区域中 CpG 岛的甲基化能让部分转录因子不与 DNA 序列正常结合, 由此可以抑制基因的转录; 除此之外, 某些特定基因序列的低甲基化状态也可以使该基因过度表达, 从而引起疾病的发生和发展。有研究发现, Foxp3 基因表观遗传学的修饰和调控可以影响 Foxp3 分子的表达及功能的发挥^[12]。T 细胞 DNA 中某特定区域的 CpG 甲基化调节各种在转录中起决定性作用因子的表达, 从而明确辅助性 T 细胞的分化方向^[15]。目前发现 Foxp3 基因存在 3 个高度保守的非编码区序列区域: 特异性去甲基化区 (TSDR)、TGF-敏感区、启动子区, 这些序列都参与 Foxp3 基因的转录调节, 也是调节 T 细胞分化过程中的关键靶点^[13, 14]。

2.1 Foxp3 基因启动子区域的 DNA 甲基化修饰

T 细胞 DNA 中特定区域的 CpG 甲基化调控着各种关键转录因子的表达, 从而决定了辅助性 T 细胞分化的方向^[15]。然而 Foxp3 基因启动子区域 CpG 岛的甲基化状态与其表达密切相关, 能够直接决定 Foxp3 基因的表达。Zorn 等^[16]曾报道通过硫唑嘌呤 (azathiopurine, Aza) 这种免疫抑制剂可以诱导人自然杀伤 (NK) 细胞的 DNA 去甲基化, 或形成低甲基化状态来改变 Foxp3 基因的表达。Kim 等^[17]发现在初始 CD4⁺CD25⁻T 细胞的 Foxp3 基因启动子 (-250 至 +1) 上有 10%~45% 的 CpG 区域表现为持续甲基化状态, 但在 nTreg 和 TGF-β 诱导的 iTreg 中, 这些 CpG 区域全部呈去甲基化改变。Janson 等^[18]研究显示, 人 CD4⁺CD25⁻T 细胞的以上区域约 70% 呈甲基化状态, 然而 CD4⁺CD25⁻T 细胞呈甲基化状态的区域仅为 5%。这些研究都提示位于 Foxp3 基因近端启动子的序列中 CpG 区域的甲基化状态对于 Foxp3 基因正常表达起关键作用。

2.2 Foxp3 基因特异性去甲基化区域的 DNA 甲基化修饰

Treg 的 Foxp3 基因 5' 端非表达区域中有一个特异性的非甲基化区域 (TSDR), 富含 CpG, 在 nTreg 细胞中处于非甲基化状态, 但在传统 CD4⁺T 细胞以及外周诱导的 Treg 细胞 (iTreg) 中, 此区域的甲基化水平极高^[19]。然而, TSDR 的去甲基化状态可能与 Foxp3 分子的表达水平并无重要关系, 因为转化生长因子-β 诱导的 iTreg 细胞的 TSDR 去

甲基化水平很低, 然而 Foxp3 分子的表达水平与 nTreg 的 Foxp3 分子的表达水平相当。同时, 由转化生长因子-β 体外诱导的 iTreg 细胞 Foxp3 分子高表达, 但并不稳定, 在缺少转化生长因子-β 的情况下反复刺激会使其失去 Foxp3 分子的表达。这可能与 iTreg 细胞的 TSDR 区仍处于甲基化状态有关。实验显示即使延长转化生长因子-β 的作用时间, 仍不能使 iTreg 细胞的 TSDR 区去甲基化, 引起 Foxp3 分子的不稳定表达, 说明转化生长因子-β 作用的发挥并不是通过 TSDR 的甲基化实现的。Aza 是一种 DNA 甲基化抑制剂, 在它的作用下 TSDR 的甲基化状态可以明显被抑制。体外实验表明, 即使在缺乏外源性转化生长因子-β 的情况下, Aza 也能引起足够的 iTreg 细胞的 Foxp3 分子稳定表达; 相反 IL-26 能够使 TSDR 甲基化, 并抑制 Foxp3 分子的表达^[20]。因此, TSDR 中的 CpG 序列去甲基化状态能调控 Foxp3 基因的表达和 Treg 的分化, Foxp3 分子的稳定表达受 TSDR 的表观遗传学特点的影响, 但它们并不是决定性的作用。

3 Foxp3 分子、DNA 甲基化与风湿性心脏病的关系

风湿性心脏病是一种常见的主要累及心脏瓣膜和心肌组织的自身免疫性疾病, 它的发病机制极其复杂, 但免疫系统的调节紊乱是导致该病发生的关键环节^[21]。风湿性心脏病的发病机制主要包括两个方面^[22]: 第一步产生自身抗体导致免疫系统紊乱。我们已知 A 族溶血性链球菌细胞壁的 M 蛋白与人体组织中的许多蛋白具有相似的抗原表位, 因此存在交叉抗原。链球菌感染人体后因机体自身免疫系统会产生大量自身免疫抗体, 此后活化自身反应性 T 细胞。在此过程中, 有 T 淋巴细胞参与的体液免疫以及补体系统和 B 淋巴细胞介导的细胞免疫, 并引起 III 型 (免疫复合物型)、IV 型 (迟发型) 超敏反应。第二步是心脏瓣膜受损, 导致风湿性心脏病。自身反应性 T 细胞分泌的细胞因子能激活心脏瓣膜的内皮细胞, 并导致该细胞内的血管细胞黏附分子 21 (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM21) 表达增加, 然后活化的 T 细胞穿过内皮细胞进入无血管结构的心脏瓣膜, 经过一系列的作用形成阿少夫小体 (Aschoff bodies) 或形成由 T 淋巴细胞、巨噬细胞组成的肉芽肿病灶。最终导致心脏瓣膜形成瘢痕, 长期作用下导致风湿性心脏病的发生。自身反应性 T 细胞与其他免疫细胞之间相互作用的研究揭示, 去甲基化的 CD4⁺T 细胞可以杀伤无抗原特异性自体或同源巨噬细胞。T 细胞低甲基化导致巨噬细胞与其他一些自身免疫细胞能够增加抗原凋亡物质, 从而刺激产生抗核抗体。

总的来说, 这些研究结果都显示去甲基化的 CD4⁺T 细胞可以导致产生很多的自身反应性 T 细胞, 造成机体免疫稳态失衡。有研究显示风湿性心脏病的发生、发展与 CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺Treg 有关^[23]。当 CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺Treg 明显减少时, 能使人体细胞免疫低下, 而使体液免疫增强, 并产生大量的自身抗体, 因此更易产生自身免疫性疾病。莫莉等^[24]通过对 24 例风湿性心脏病患者外周血中细胞表型 CD4⁺

CD25⁺及其特异性标志 Foxp3 的变化研究证实, 患者 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 的数量较健康人低, 更容易发生风湿性心脏瓣膜病等自身免疫性疾病, 且大部分患者病史较长, 且反复, 这可能与 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 减少导致致病因子长期存在或扩散有关。当瓣膜长期受到自身抗体的攻击后, 则会使瓣膜增厚、挛缩、变性、坏死并与周围组织黏连, 最终导致严重心脏瓣膜疾病的发生。黄刚哲等^[25]对风湿性心脏病患者外周血 Treg 进行研究, 发现病例组 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞比例低于正常健康人, 同时 IL-10 的血清浓度也较对照组减少。申康均^[26]对风湿性心脏病患者进行的表观遗传学研究发现, 风湿性心脏病患者右心房心肌组织中基因组 DNA 整体甲基化状态增高, 同时风湿性心脏病患者心肌组织中 DNMT1、DNMT3a 和 DNMT3b mRNA 表达水平明显增高。这些研究结论说明风湿性心脏病的发生、发展与 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 以及胞内 Foxp3 因子的表达密切相关, 它们的数量减少可以导致正常机体的免疫调节系统发生紊乱, Treg 的免疫抑制功能还受表观遗传学改变如 DNA 甲基化的调控, 最后导致风湿性心脏病的发生及病情的恶化。

近年来有关调节性 T 细胞的研究较多, 并取得了有效成果, 并发现众多亚群, 这些发现都对研究生物体内许多转录因子的作用机制极为重要。Foxp3 基因被认为是 Treg 发育的关键因素, 在很大程度上促进对 Treg 的认识。DNA 甲基化是目前研究较为热门的调节基因表达的方式, 在个体发育、疾病发生发展和免疫紊乱中起着重要作用。各种因素作用下引起的 T 细胞 DNA 低甲基化后, 可以导致对自身免疫系统有潜在作用基因的表达状态改变, 随后多个环节导致自身免疫性疾病的发生。尽管 DNA 甲基化在风湿性心脏病的研究较少, 但我们相信随着国内、外学者的不断深入研究, 最终能阐明风湿性心脏病等其余自身免疫性疾病的发病机制, 并为这些疾病的诊疗方案提供新的思路。

参考文献:

- [1] BUCKNER J H. Mechanisms of impaired regulation by CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in human autoimmune diseases [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(12): 849-859.
- [2] SCHNEIDAWIND D, PIERINI A, ALVAREZ M, et al. CD4⁺ invariant natural killer T cells protect from murine GVHD lethality through expansion of donor CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells [J]. *Blood*, 2014, 124(22): 3320-3328.
- [3] BEIRANVAND E, ABEDIANKENARI S, REZAEI M S, et al. Increased expression of forkheadbox protein 3 gene of regulatory T cells in patients with active tuberculosis [J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2014, 13(5): 330-334.
- [4] GARCIA SANTANA C A, TUNG J W, GULNIK S. Human treg Cells are characterized by low/negative CD6 expression [J]. *Cytometry A*, 2014, 85(10): 901-908.
- [5] GENG S, YU Y, KANG Y, et al. Efficient induction of CD25⁺iTreg by co-immunization requires strongly antigenic epitopes for T cells [J]. *BMC Immunology*, 2011, 12(1): 27.
- [6] CHU R, LIU S Y, VLANTIS A C, et al. Inhibition of Foxp3 in cancer cells induces apoptosis of thyroid cancer cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 399: 228-234.
- [7] MOTA C, NUNES-SILVA V, PIRES A R, et al. Delta-like 1-mediated Notch signaling enhances the in vitro conversion of human memory CD4 T cells into FOXP3-expressing regulatory T cells [J]. *J Immunol*, 2014, 193(12): 5854-5862.
- [8] PAN F, BARBI J. Ubiquitous points of control over regulatory T cells [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2014, 92(6): 555-569.
- [9] MARTIN-SANTIAGO A, HERVAS J A, HERVAS D, et al. Diagnostic value of the skin lesions in immun dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x-linked syndrome [J]. *Pediatr Dermatol*, 2013, 30(6): e221-e222.
- [10] TUG E, DILEK N F, JAVADIYAN S, et al. A Turkish family with Nance-Horan syndrome due to a novel mutation [J]. *Gene*, 2013, 525(1): 141-145.
- [11] WALKER M R, KASPROWIEZ D J, GERSUK V H, et al. Induction of Foxp3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺CD25⁻ T cells [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(9): 1437-1443.
- [12] LOPEZ-PASTRANA J, SHAO Y, CHERNAYA V, et al. Epigenetic enzymes are the therapeutic targets for CD4 (+) CD25 (+/high) Foxp3 (+) regulatory T cells [J]. *Translational Research*, 2015, 165(1): 221-240.
- [13] KITAGAWA Y, OHKURA N, SAKAGUCHI S. Molecular determinants of regulatory T cell development: the essential roles of epigenetic changes [J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 106.
- [14] LAL G, BROMBERG J S. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression [J]. *Blood*, 2009, 114(18): 3727-3735.
- [15] POLANSKY J K, SEHREIBER L, THELEMANN C, et al. Methylation matters: binding of Ets-1 to the demethylated Foxp3 gene contributes to the stabilization of Foxp3 expression in regulatory T cells [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2010, 88(10): 1029-1040.
- [16] 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.
- [17] KIM H P, LEONARD W J. CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced Foxp3 gene expression: a role for DNA methylation [J]. *J Exp Med*, 2007, 204(7): 1543-1551.
- [18] JANSON P C, WINERDAL M E, MARITS P, et al. FOXP3 promoter demethylation reveals the committed tregs population in humans [J]. *PLoS One*, 2008, 3(2): e1612.
- [19] ENGELA A U, HOOGDUIJN M J, BOER K, et al. Human adipose-tissue derived mesenchymal stem cells induce functional de-novo regulatory T cells with methylated FOXP3 gene DNA [J]. *Clin Exp Immunol*, 2013, 173(2): 343-354.
- [20] LAL G, ZHANG N, VAN DER TOUW W, et al. Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation [J]. *J Immunol*, 2009, 182(1): 259-273.

[20] 张正刚, 刘小斌, 向道康, 等. 风湿性心脏病二尖瓣置换同期房颤双极射频消融手术前后血清 NT-proBNP 水平变化及意义[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(21): 3535-3536.

[21] GUILHERME L, KALIL J. Rheumatic heart disease: molecules involved in valve tissue inflammation leading to the autoimmune process and anti-s. pyogenes vaccine [J]. Front Immunol, 2013, 4: 352.

[22] LEE J H, WANG L C, LIN Y T, et al. Inverse correlation between CD4⁺ regulatory T-cell population and autoantibody levels in paediatric patients with systemic lupus erythematosus [J]. Immunology, 2006, 117(2): 280-286.

[23] 莫莉, 许礼发. 风湿性心脏病患者外周血调节性 T 细胞与 IL-10、TGF-β1 的关系及意义[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2012, 6(10): 2776-2778.

[24] 黄刚哲, 金勇男. 风湿性心脏病患者瓣膜组织自身抗原变化与 IL-10、TGF-β1 血清浓度变化之间的关系[J]. 中国免疫学杂志, 2015, 3: 393-395.

[25] 申康均. 风湿性心脏病与 DNA 甲基化异常的相关实验研究[D].中南大学, 2012.

(收稿日期:2015-05-04)

(上接第 92 页)

有影响,但主要是增加舒张期中心动脉血容量,改善重要器官的血供;尽管有担心主动脉内球囊反搏有降低后负荷,有加重梗死和 SAM 征的可能,但对合并血流动力学不稳定的急性广泛前壁心肌梗死+梗阻性肥厚型心肌病,没有禁忌证,应该是有效的。(6)关于药物治疗方面应该慎用硝酸酯类扩血管药。

参考文献:

[1] MARON B J. Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review [J]. J Am Med Assoc, 2002, 287(10): 1308-1320.

[2] MARON B J, MARON M S, SEMSARIAN C. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy after 20 years: clinical perspectives [J]. J Am Coll Cardiol, 2012, 60(8): 705-715.

[3] ELLIOTT P, MCKENNA W J. Hypertrophic cardiomyopathy [J]. Lancet, 2004, 363(9424): 1881-1891.

[4] 关怀敏, 解金红, 陈玉善, 等. 肥厚型心肌病伴发晕厥的机制及其防治研究 [J]. 实用医学杂志, 2014, 30 (21): 3428-3430.

[5] 胡大一. 心血管内科高级教程[J]. 北京: 人民军医出版社, 2010: 356-360.

[6] 刘丽稳, 李星星, 王敏增. Embozene 微球栓塞剂替代无水酒精行经皮腔内室间隔心肌消融术[J]. 创伤与急危重病医学, 2015, 3(1): 41-44.

(收稿日期:2015-06-17)