

T-bet、GATA-3 与 T 细胞亚群在再障中的相关性研究 *

沈红石 任传路 陈海飞 李征洋 唐杰庆 吴天勤[△]

(苏州解放军第 100 医院血液科,南京军区血液病中心 215007)

摘要 目的 探讨外周血中 T-bet 和 GATA-3 mRNA 的表达在再生障碍性贫血中的发病机制及意义。方法 入选 27 例再障患者,其中重型再障 15 例,轻型再障 12 例,25 例健康体检者为对照组。采用流式细胞术检测参试者外周血 Th1 和 Th2 细胞,RT-PCR 检测外周血单核细胞中转录因子 T-bet 和 GATA-3 mRNA 的表达。结果 与健康对照组相比,再障患者血浆 T-bet mRNA 与 Th1 细胞比例显著升高($P<0.01$),GATA-3 mRNA 与 Th2 细胞明显降低($P<0.05$ 、 $P<0.01$)。与轻型再障患者相比,重型再障患者血浆转录因子 T-bet mRNA 及 Th1 细胞比例均明显升高($P<0.01$),GATA-3 mRNA 水平与 Th2 细胞比例也显著下降($P<0.05$ 、 $P<0.01$)。结论 T-bet 与 GATA-3 异常表达可增强 Th1 细胞功能,抑制 Th2 细胞功能,导致患者免疫功能异常,最终引起再障发生、发展。

关键词 再生障碍性贫血;T-bet;GATA-3

中图分类号 R556.5 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 09-1677-03

Expression of T-bet, GATA-3 mRNA and T cell subsets in peripheral blood of patients with aplastic anemia*

SHEN Hong-shi, REN Chuan-lu, CHEN Hai-fei, LI Zheng-yang, TANG Jie-qing, WU Tian-qin[△]

(Department of hematology, Pla No.100 Hospital, The Hematology Center of Nanjing Military Region 215007)

ABSTRACT Objective: To investigate the pathogenic role of T-bet and GATA-3 mRNA expression in aplastic anemia(AA). **Methods:** 27 patients with AA including 15 cases of severe AA and 12 cases of mediate AA, and 25 healthy people (control group) were selected. Flow cytometry was used to detect the expression of Th1 and Th2 in peripheral blood, and RT-PCR to quantify T-bet and GATA-3 mRNA. **Results:** Compared with the control group, the expression of Th1 and T-bet mRNA in the AA group increased significantly ($P<0.01$), while the expression Th2 and GATA-3 mRNA decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** Abnormal expression of T-bet and GATA-3 plays an important role in the development and progression of AA, with the possible mechanism of enhancing Th1 cells and inhibiting Th2 cells.

Key words: Aplastic anemia; T-bet; GATA-3

Chinese Library Classification: R556.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2012) 09-1677-03

再生障碍性贫血(aplastic anemia, AA)是一种以全血细胞减少与骨髓造血衰竭为特征的骨髓造血系统疾病^[1,2]。其发病机制尚不十分清楚,免疫介导的造血功能抑制是目前研究最多的机制。Th1、Th2 细胞失衡在 AA 的免疫机制中起关键作用。免疫学研究表明,Th1、Th2 细胞的分化可受多种因素影响,但以局部微环境的调节最为重要。T-bet(T-box expressed in T cells)和 GATA-3(GATA binding protein-3)作为特异性 Th 细胞转录因子,在 Th 细胞分化发育中发挥重要的作用^[3-5]。本研究即探讨血液 T-bet/GATA-3 及 Th1、Th2 细胞水平在 AA 中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

入选 2008 年 6 月至 2011 年 5 月我院血液科门诊就诊及病房收治的 AA 患者 27 例,其临床骨髓细胞形态学、生化及细胞遗传学检查符合 AA 的诊断标准^[6],其中重型再障(SAA)患者

15 例,轻型再障(MAA)患者 12 例。全部患者中,男 17 例,女 10 例,年龄 19-58 岁,平均 33 ± 9.8 岁,病程 5-235 月,平均 20 ± 17.6 月。对照组选择健康体检者 25 例,其中男 16 例,女 9 例,年龄 20-59 岁,平均 32 ± 8.3 岁。

1.2 标本采集

再障组与对照组均抽取外周静脉血 8mL,其中 EDTA 抗凝 6 mL,肝素钠抗凝 2 mL。后者经培养 16-20 h 后用于 Th 辅助细胞亚群检测。EDTA 抗凝血分离单个核细胞,提取总 mRNA,于 -80°C 冰箱冻存,用于 T-bet 与 GATA-3 的检测。

1.3 检测方法

1.3.1 T-bet 与 GATA-3 mRNA 的检测 通过实时荧光定量 PCR(Real time FQ-PCR)方法检测这两种转录因子 mRNA 的水平。Trizol 试剂盒、FQ-PCR 试剂盒均购自美国 Gibco-BRL 公司。ABI-7300 型 Real time PCR 检测仪购自美国 ABI 公司。通过美国生物技术信息中心 Genebank 数据库检索 T-bet、GATA-3、GAPDH 的 mRNA 序列,利用美国 Whitehead 生物学

* 基金项目 全军医药卫生科研课题 (07M018)

作者简介 沈红石 (1970),女,博士研究生,副主任医师,研究方向:从事血液内科临床及基础研究

[△]通讯作者 吴天勤 (1963),男,本科,主任医师,研究方向:从事血液内科临床及基础研究

(收稿日期 2011-12-01 接受日期 2011-12-23)

研究所 Primer3 程序设计探针,参照文献方法设计上下游引物。由上海申友生物技术公司合成。探针及引物序列见表 1。实时定量 FQ-PCR 总反应体系 25μL, 其中含 2× QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 12.5μL,上下游引物各 1μL,样品 cDNA 1.5μL。反应条件 50℃ 2 min,95℃ 15 min 94℃ 15 s,55℃ 30s,72℃ 30s,50 次循环。利用 RG-3000 实时监测定量 RT-PCR 仪。利用溶解曲线对扩增产物进行特异性分析,采用 Relative Quantification Software1.0 分析软件对结果分析,以同时扩增的内参 GAPDH 的表达量为参照,表达强度以转录因子/GAPDH 的基因拷贝数的比值来表示。

1.3.2 Th 细胞亚群的检测 利用流式细胞仪测定外周血 Th1、Th2 细胞比例。主要仪器与试剂:佛波酯(PMA,美国 Sigma 公司),离子霉素(Ionomycin,美国 Alexis 公司),布雷菲德菌素 A (BFA,美国 Sigma 公司),RPMI 1640 培养基与胎牛血清均为南通碧云天生物制品公司生产,二甲基亚砷(DMSO,美国 Sigma

公司),单抗 CD3Per-CP、CD8-APC、IFNγ-FITC/IL-4PE、FACS 通透液、FACS 溶血素、流式细胞仪(FACSArial)均由美国 BD 公司生产。检测步骤参照文献方法^[7]。

1.4 统计学方法

所有数据通过 SPSS 13.0 软件包进行处理,计量资料以均数± 标准差表示,采用双侧 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

与健康对照组相比,再障患者血浆 T-bet mRNA 与 Th1 细胞比例显著升高 (P<0.01),GATA-3 mRNA 与 Th2 细胞明显降低(P<0.05、P<0.01),见表 2。与轻型再障患者相比,重型再障患者血浆转录因子 T-bet mRNA 及 Th1 细胞比例均明显升高 (P<0.01),GATA-3 mRNA 水平与 Th2 细胞比例也显著下降 (P<0.05、P<0.01),见表 3。

表 1 T-bet、GATA-3、GAPDH 探针及引物序列
Table 1 The probe and primer sequence of T-bet, GATA-3, GAPDH gene

Gene		Sequence
GAPDH	Probe	5'-FAM-CATCCTGGGCTACACTGAGGACCA-TAMRA-3'
	F-primer	5'-CCGAGGGCCCCACTAAAGG-3'
	R-primer	5'-GCTGTTGAAGTCACAGGAGACAA-3'
T-bet	Probe	5'-FAM-TTCCGGGTGGCAGCTGACAT-TAMRA-3'
	F-primer	5'-ATGTGACCCAGATGATTGTGC-3'
	R-primer	5'-CTTGAAAGTAAAGATATGCGTG-3'
GATA-3	Probe	5'-FAM-AAATGGCTTGCTCAGGGAAC-TAMRA-3'
	F-primer	5'-GGCACGGGACACTACCTG-3'
	R-primer	5'-GTCCCCATTGGCATTCTCT-3'

表 2 再障患者与对照组转录因子与 Th 细胞亚群水平比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 The comparison of Transcription Factor and Th cell subsets level between aplastic anemia group and control group

Group	n	T-bet	GATA-3	Th1(%)	Th2(%)
AA group	27	4.78± 1.24	1.08± 0.12	25.79± 4.15	1.05± 0.35
Control group	25	1.12± 0.17	1.27± 0.41	12.68± 2.27	1.44± 0.42
T value		14.6209	2.2289	13.9716	3.6479
P value		0.0000	0.0303	0.0000	0.0006

表 3 轻型与重型再障患者转录因子与 Th 细胞亚群水平比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 The comparison of Transcription Factor and Th cell subsets level between MAA group and SAA group

group	n	T-bet	GATA-3	Th1(%)	Th2(%)
MAA group	15	6.21± 1.49	1.11± 0.32	31.63± 5.26	0.78± 0.19
SAA group	12	3.46± 1.03	1.56± 0.53	21.53± 3.28	1.21± 0.43
T value		5.4298	2.5829	5.7983	3.4837
P value		0.0000	0.0160	0.0000	0.0018

3 讨论

细胞免疫功能异常是 AA 的重要发病机制之一。近年来研究发现,由 T 细胞介导的造血功能抑制在 AA 的发生、发展中

有重要意义^[8-9]。而 Th1、Th2 细胞的分化及其平衡对免疫应答起关键调节作用。Th1、Th2 细胞均由初始型 CD4⁺T 细胞 (即 Th0 细胞) 转化而来, 后者在多种信号分子刺激下分化发育, 包括抗原-抗原受体复合体、胞外细胞因子、胞内信号转导分子、核转录因子、共刺激信号分子等。国外研究发现, AA 患者血浆 Th1、Th2 细胞水平失衡, Th1 细胞比例显著升高^[10]。在本组资料中, AA 患者 Th1 细胞比例平均达 25.79%, 远高于对照组的 12.68%, 而 Th2 细胞比例明显降低, 重型 AA 患者 Th1 细胞比例也明显高于轻型 AA 患者, 这与相关研究结果相似^[11], 提示 Th1 细胞数目增多或功能亢进是 AA 的重要发病机制之一。转录因子 T-bet、GATA-3 分别作为 Th1、Th2 细胞的特异性转录因子而受到广泛关注。在本组资料中, AA 患者血浆 T-bet mRNA 远高于对照组患者, 而 GATA-3 mRNA 则显著低于对照组, 在重型 AA 与轻型 AA 患者也可见到类似现象, 与国外有关研究结果相似。表明转录因子 T-bet、GATA-3 对 AA 患者 Th1、Th2 细胞的分化其重要作用。

T-bet 是 2000 年哈佛大学的 Szabo 等发现的一个重要的 Th1 转录因子, 因发现其 T 盒仅表达于 T 细胞而得名^[3,12]。T-bet 可控制 Th1 细胞特征性细胞因子 IL-4 的合成, 故被称为 Th1 特异性细胞因子。T-bet 在 Th0 细胞向 Th1 细胞分化过程中起决定作用^[13]。首先, T-bet 是 IFN- γ 转录的强烈激活剂^[14]。其次, T-bet 可诱导并维持 IL-12R β 2 的表达。此外, T-bet 还可将分化中或完全分化的 Th2 细胞、效应性 Th2 细胞逆转为 Th1 细胞, 并产生大量 IFN- γ , 抑制 IL-4、IL-5、IL-13 等 Th2 型细胞因子的合成。GATA-3 是 1993 年发现的一种细胞谱系特异性因子, 是 T 细胞发育重要的转录调节因子。研究表明, GATA-3 可能通过两种不同的机制发挥作用^[15,16]。首先, IL-4 通过活化 STAT-6 增强 GATA-3 的表达; 其次, GATA-3 的产生在 Th1 细胞中完全受抑制, 说明 IL-12 和 IFN- γ 的信号转导分别依赖于 STAT-4 和 STAT-1 的活化。Th0 细胞高表达 GATA-3, 向 Th2 细胞分化时 GATA-3 水平进一步升高, 而向 Th1 细胞分化时其表达降到最低水平, 当分化中的 Th1 细胞导入 GATA-3 基因时, 可使其分化方向发生改变, 而表达 Th2 型细胞因子, 且能维持 Th2 的极化状态。转录因子 T-bet、GATA-3 表达异常将导致 Th 分化失衡, 这可能在再障发病机制中起关键作用。升高的 T-bet 通过促进 IFN- γ 、IL-12 的分泌, 使 Th0 细胞大量向 Th1 细胞分化, 并诱导 Th1 细胞功能亢进, 过度活化自身反应性 T 淋巴细胞, 促进细胞毒 T 淋巴细胞产生颗粒酶 A、B 及穿孔素等, 从而大量杀伤自身造血干细胞, 抑制骨髓造血。

总之, AA 患者外周血转录因子 T-bet、GATA-3 mRNA 表达异常及相应的 Th1、Th2 细胞水平失衡, 表明 AA 患者存在免疫异常, 且与疾病严重程度密切相关, 但 AA 发生、发展的详细分子机制尚需进一步深入研究。

参考文献 (References)

- [1] Young NS. Introduction: acquired aplastic anemia[J]. Semin Hematol, 2000,37: 2
- [2] Young NS. Acquired aplastic anemia [J]. Ann Intern Med,2002,136: 534-546
- [3] Szabo SJ,Kim ST,Costa GL,et al.A novel transcription factor,T-bet, directs Th1 lineage commitment[J].Cell,2000,100(6):655-669
- [4] Rengarajan J,Szabo SJ,Glimcher LH.Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization [J]. Immunol Today,2000,2(10):479-483
- [5] Kawashima M;Miossee P. mRNA quantification of T-bet,GATA3, IFN-gamma,and IL-4 shows a defective Th1 immune response in the peripheral blood from rheumatoid arthritis patients:link with disease activity[J]. Journal of Clinical Immunology ,2005,25(3),209-214
- [6] 张之南,沈悝.血液病诊断及疗效标准[M].北京 科学出版社,2007: 19-21
Zhang Zhi-nan,Shen Ti.Criterion of therapeutic effect and diagnosis of Hematologic Diseases[M].Bei Jing:science press,2007:19-21
- [7] 李峻,周永明,胡明辉. 环孢菌素 A 对慢性再生障碍性贫血患者 T-bet、GATA-3、相关信号分子、细胞因子及 Th1 / Th2 的影响[J]. 中国实验血液学杂志,2010,18(5) :1211-1219
Li Jun,Zhou Yong-ming,Hu Ming-hui.Influence of cyclosporin A on the Expression of T-bet/GATA-3,Their Relevant Signal Transduction Molecules,Cytokines,and Th1/Th2 Balance in Patients with Chronic Aplastic Anemia [J]. Journal of Experimental Hematology, 2010,18 (5):1211-1219
- [8] Brodsky RA,Jones RJ. Aplastic anemia [J].Lancet,2005,365 (9471): 1647-1656
- [9] Montdeone I, Monteleone G, Del V B G,et al.Regulation of the T helper cell type 1 transcription factor T -bet in toeliac disease mucosa [J].Gut,2004,53(8):1090-1095
- [10] Solomou EE,Keyvanfar K,Young NS.T-bet Th1 transcription factor is up-regulated in T cells from patients with aplastic anemia[J].Blood, 2006,107(10):3983-3991
- [11] Chakir H,Wang H,Lefebvre DE,et al.T-bet / GATA-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations:pre-dominant role of GATA-3 [J].J Immunol Methods,2003,278 (4): 157-169
- [12] Peng SL.The T-box transcription factor T-bet in immunity and autoimmunity[J].Cell MoImmunol,2006,3(2):87-95
- [13] 董萍云,王娟,李立红.T-bet/GATA-3 调控 Th1/Th2 分化失衡疾病的研究进展[J].中国皮肤性病学杂志,2008,22(1):53-55
Dong Ping-yun,Wang Juan,Li Li-hong.Advances in the Research of T-bet/GATA-3 in the Regulative Mechanisms of Imbalance of Th1/Th2 Cell Differentiation [J]. The Chinese Journal of Dermatovenereology, 2008,22(1):53-55
- [14] Martins G A, Hutchins A S, Reiner S L. Transcriptional activators of helper T cell fate are required for establishment but not maintenance of signature cytokine expression [J]. J Immunol,2005,175 (9): 5981-5985
- [15] Zheng W,Flavell RA.The transcription factor GATA-3 is necessary an sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells[J].Cell, 1997,89(4):587-596
- [16] Gorbachev A V,Fairchild R L.CD40 engagement enhances antigen presenting langerhans cell priming of IFN gamma producing C1M O and CDS0 T cells independently of IL-12 [J].J Immunol,2004,173(4): 2443-2452