

哮喘患儿外周血 RORC 和 Foxp3 mRNA 表达水平的变化及其意义

黄雪琼, 檀卫平*, 麦贤弟, 吴葆菁, 蓝 丹
(中山大学孙逸仙纪念医院儿科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】研究淋巴细胞亚群 Th17 与 Treg 上游调控基因维甲酸相关孤儿核受体(RORC)、叉状头转录因子 P3 (Foxp3)mRNA 在支气管哮喘患儿外周血单个核细胞中的表达变化,并探讨其临床意义。【方法】采用荧光实时定量 PCR 技术分别检测 20 例哮喘发作期(年龄 8.5 ± 2.3)和 20 例哮喘缓解期(年龄 9.2 ± 1.8)外周血单个核细胞的 RORC 和 Foxp3 mRNA 表达水平,并与 10 例健康对照组(年龄 8.0 ± 1.6)进行比较。并将哮喘患儿 RORC 和 Foxp3 mRNA 表达水平与其同期肺功能第一秒用力呼气容积(FEV1)进行相关分析。【结果】哮喘发作组 RORC mRNA 水平显著高于缓解组和正常对照组(5.41 ± 0.12 vs 3.33 ± 0.27 vs 3.78 ± 0.13 , $P < 0.01$);哮喘发作组 Foxp3 mRNA 水平显著低于缓解组和正常对照组(3.34 ± 0.12 vs 4.43 ± 0.07 vs 4.13 ± 0.04 , $P < 0.01$);缓解组和正常对照组相比,RORC 和 Foxp3 mRNA 水平均无明显差异($P > 0.05$)。哮喘发作组 RORC mRNA/Foxp3 mRNA 比值明显高于缓解组和正常对照组(1.68 ± 0.09 vs 0.76 ± 0.06 vs 0.92 ± 0.04 , $P < 0.01$)。Pearson 相关分析显示,哮喘患儿外周血 RORC mRNA 水平与 FEV1 成负相关,而 Foxp3 mRNA 水平与 FEV1 成正相关(r 分别为 -0.58 和 0.52 , $P < 0.01$)。【结论】RORC mRNA/Foxp3 mRNA 在发作期哮喘患儿存在失衡表达,提示 Th17/Treg 失衡可能在哮喘的急性发作及肺功能损伤中起着重要作用。

关键词:哮喘;RORC;FOXP3;Th17 细胞;Treg 细胞

中图分类号:R725.622.5

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2012)02-0190-05

Expression and Significance of RORC and Foxp3 mRNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) in Children with Bronchial Asthma

HUANG Xue-qiong, TAN Wei-ping*, MAI Xian-di, WU Bao-jing, LAN Dan

(Department of Pediatrics, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the mRNA expression and significance of RORC (the transcription factor of Th17 cells) and Foxp3 (the transcription factor of Treg cells) in PBMC in children with bronchial asthma. 【Methods】To detect the mRNA expressions of RORC and Foxp3 in PBMC by quantitative real-time PCR in 40 asthmatic children, including 20 children of acute attack group (age 8.5 ± 2.3), 20 children of remission group (age 9.2 ± 1.8) and 10 children of healthy control (age 8.0 ± 1.6). To analyze the relationship between the RORC and Foxp3 mRNA expressions and the FEV1 of pulmonary function in asthmatic children. 【Results】It was showed that RORC mRNA expressions in asthmatic children was higher in attack stage than in remission stage and in control group (5.41 ± 0.12 vs 3.33 ± 0.27 vs 3.78 ± 0.13 , $P < 0.01$). In contrast, Foxp3 mRNA in asthmatic children was lower in attack stage than in remission stage and in control group (3.34 ± 0.12 vs 4.43 ± 0.07 vs 4.13 ± 0.04 , $P < 0.01$). However, there was no significant difference in the expression of both RORC and Foxp3 mRNA between asthmatic children in remission stage and healthy group ($P > 0.05$). The ratio of RORC/Foxp3 mRNA in PBMCs of asthmatic children in attack stage was significantly higher than those in remission stage and healthy controls (1.68 ± 0.09 vs 0.76 ± 0.06 vs 0.92 ± 0.04 , $P < 0.01$). Pearson correlation analysis revealed that RORC mRNA was negatively correlated with FEV1, but Foxp3 mRNA was positively correlated with FEV1 ($r = -0.58$ and 0.52 , $P < 0.01$). 【Conclusions】The imbalance of RORC/Foxp3 mRNA expression exists in asthmatic children, suggesting a potential role for

收稿日期:2011-11-18

基金项目:广东省自然科学基金(9451008901003013);广东省科学事业费计划项目(2010B031600228)

作者简介:黄雪琼,在读硕士研究生,研究方向:儿科呼吸,E-mai:second_1985@126.com; * 通信作者:檀卫平,博士,副教授,硕士生导师,E-mai:weiptan@yahoo.com.cn

Th17/Treg imbalance in the pathogenesis and reduction of lung function in asthmatic children.

Key words: asthma; RORC; Foxp3; Th17 cells; regulatory T cells

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2012,33(2):190-194]

支气管哮喘是一种由多种炎症细胞和炎症介质参与的慢性呼吸道疾病。Th1/Th2 失衡和嗜酸性粒细胞炎症理论一直被公认为哮喘发病的主要机制,近年研究显示其它的 CD4⁺T 淋巴细胞亚型 Treg 和 Th17 在哮喘的转归上同样起关键作用^[1-2]。本文通过采用实时荧光定量 PCR 技术,分别检测 Th17 与 Treg 上游调控基因维甲酸相关孤儿核受体 (retinoic acid-related orphan nuclear receptor C, RORC)、叉状头转录因子 P3(forkhead box P3,Foxp3) mRNA 表达水平,以探讨其在哮喘发病机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象

入选病例为 2010 年 6 月至 2011 年 10 月在中山大学孙逸仙纪念医院儿科哮喘专科门诊及住院就诊的哮喘急性发作期儿童 20 例,以及经规则联合吸入 ICS/LABA 治疗后哮喘缓解儿童 20 例,诊断标准均符合 2008 年中华医学会儿科学分会呼吸学组修订的《儿童支气管哮喘诊断与防治指南》中儿童支气管哮喘诊断标准^[3]。健康对照组:选择健康体检的儿童 10 例,男 5 例,女 5 例,平均年龄为 8.0(S = 1.6)岁,均为无过敏性疾病和近期无呼吸道感染,所有受试者无恶性肿瘤病史及自身免疫病史,近 4 周内未使用全身糖皮质激素等免疫抑制剂。

1.2 试剂及仪器设备

ABI step one PCR 仪;ABI cycler PCR 仪;离心机;ABI MultiScribe™ Reverse Transcriptase 逆转录试剂盒及 SYBR Green 荧光染料试剂;Trizol 试剂盒;小儿肺功能仪(意大利 COSMED 公司)。

1.3 方 法

1.3.1 肺功能检测 选取第一秒用力呼气容积(FEV₁)、第一秒用力呼气量/用力肺活量(FEV₁/FVC),最大呼气峰流速(PEF)作为观察指标,辅助哮喘分组。

1.3.2 外周血单个核细胞的分离和培养 抽取入选研究对象的外周静脉血 2 mL(EDTA 抗凝)。常

规 Ficoll 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞,加入 RPMI1640 培养液重悬单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells,PBMC),调整细胞密度为 2×10⁶ /mL。每孔 0.5 mL 接种于 24 孔板,加入 anti-CD3(OKT3)(0.2 mg/L) + antiCD28(1 mg /L),置于 37 ℃、体积分数 5% CO₂,饱和湿度培养箱培养 72 h,收集细胞。

1.3.3 RNA 提取及逆转录反应 用 Trizol 试剂、异硫氰酸胍-酚-氯仿法提取单个核细胞总 RNA,核酸测定仪测 A₂₆₀/A₂₈₀,要求在 1.8 ~ 2.0 之间。按照 ABI MultiScribe™ Reverse Transcriptase 试剂盒进行半量体系 RNA 逆转录,每 12.5 μL 逆转录体系中加入上述总 RNA 200 ng 作为模板进行反应,将标本总 RNA 70 ℃ 4 min 预变性,立即置于冰上,加反应混合液后按反应条件:25 ℃ 10 min,37 ℃ 120 min,85 ℃ 5 min,4℃进行,获得的 cDNA -80 ℃ 保存。

1.3.4 检测目的基因表达 采用 SYBE GREEN 实时荧光定量 PCR 检测 RORC、Foxp3 mRNA 表达,内参基因为 GAPDH(表 1),参照说明书设定 PCR 程序,95 ℃ 10 min 变性,然后 95 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s 重复 40 个循环进行扩增。反应结束,设定最佳阈值,获取 Ct 值,根据仪器给出的标准曲线和斜率,获得目的基因的相对表达指数。半量反应体系(12.5 μL):cDNA 模板 2 μL、正向引物 0.25 μL、反向引物 0.25 μL、无 RNA 酶水 3.75 μL、SYBE GREEN 试剂 6.25 μL。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

Primer	Sequences	Product /bp
RORC	Sence ACAGCTCCATGCCACCGTAT	105
	Antisence TCAAAGCAGGAGCAATGGAAGT	
Foxp3	Sence GAGCGTGGCGTAGGTGAAAG	83
	Antisence ACAGCACATTCCAGAGTTCTT	
GAPDH	Sence GAAGATGGTGATGGGATTTTC	226
	Antisence GAA GGT GAA GGT CGG AGT C	

1.4 统计学方法

所有数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组均

数比较采用方差分析或秩和检验; $P < 0.05$ 有统计学差异。采用 Pearson 方法进行相关分析。数据分析使用 SPSS 16.0 软件。

2 结 果

2.1 哮喘患儿肺功能检测结果及分组
入选者资料详见表 2。

表 2 入选者一般资料

Table 2	General status of patients ($\bar{x} \pm s$)	
	Acute attack group	Remission group
Age/years	8.5 $\pm$ 2.3	9.2 $\pm$ 1.8
Sex (male:female)	12:8	11:9
FEV ₁ /%	59.7 $\pm$ 15.5	84.9 $\pm$ 14.9
FEV ₁ /FVC/%	65.2 $\pm$ 2.6	80.3 $\pm$ 9.7
PEF/%	68.0 $\pm$ 21.5	86.4 $\pm$ 13.4

FEV₁:forced expiratory volume in one second; FVC:forced vital capacity; PEF:peak expiratory flow.

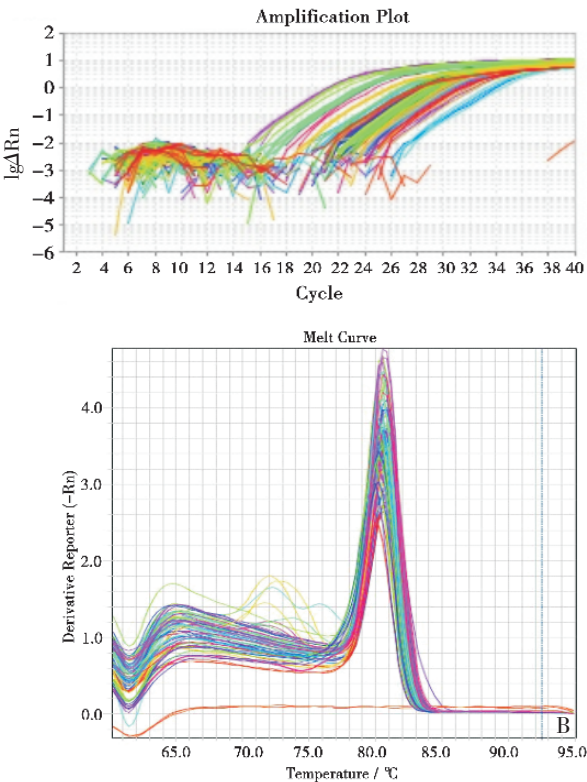


图 1 外周血单个核细胞 RORC 基因的荧光定量 PCR 的样本扩增曲线图及溶解温度曲线图

Fig.1 The amplification plot and melt curve of RORC mRNA in peripheral blood mononuclear cells

A: sample amplification plot diagram; B: melt curve diagram

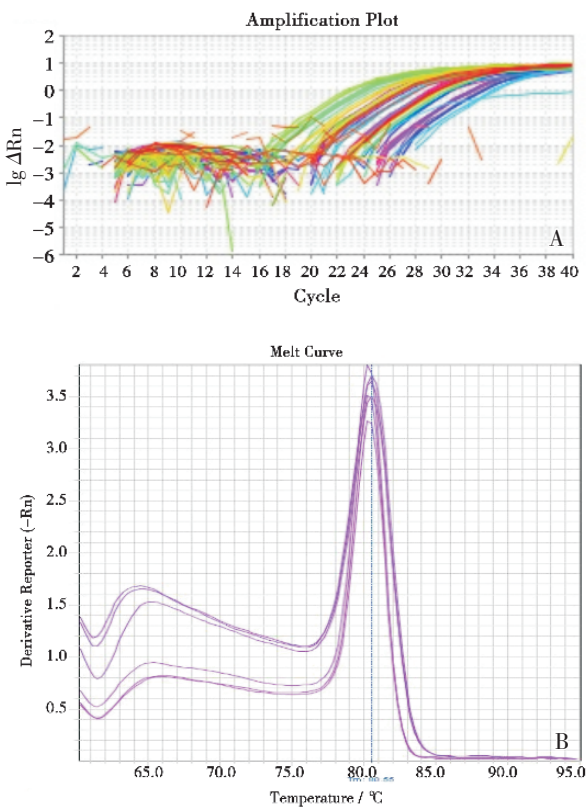


图 2 Foxp3 mRNA 的扩增曲线及溶解温度曲线图
Fig.2 The amplification plot and melt curve of Foxp3 mRNA in peripheral blood mononuclear cells

A: sample amplification plot diagram; B: melt curve diagram

2.2 实时荧光定量 PCR 检测 RORC mRNA、Foxp3 mRNA

根据标准曲线计算出 Ct 值与各自内参 GAPDH 的 Ct 值校正后, 得到 RORC/GAPDH mRNA 及 Foxp3/GAPDH mRNA 的相对数值 (图 2、图 3)。

2.3 哮喘患儿外周血单个核细胞 RORC mRNA 表达水平

哮喘发作组 RORC mRNA 水平 (5.41 ± 0.12) 显著高于缓解组 (3.33 ± 0.27) 和正常对照组 (3.78 ± 0.13), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 缓解组与正常对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 3)。

2.4 哮喘患儿外周血单个核细胞 Foxp3 mRNA 表达水平

哮喘发作组 Foxp3 mRNA 水平 (3.34 ± 0.12) 显著低于缓解组 (4.43 ± 0.07) 和正常对照组 (4.13 ± 0.04), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 缓解组与正常对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 3)。

3)。

2.5 哮喘儿童外周血单个核细胞中 RORC mRNA/Foxp3 mRNA 比值变化

哮喘发作组 RORC mRNA/Foxp3 mRNA 比值明显高于缓解组和正常对照组，差异有统计学意义 ($P < 0.01$)；缓解组与正常对照组比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$ ，表 3)。

表 3 哮喘发作组、缓解组和正常对照组 RORC、Foxp3 mRNA 表达

Table 3 The mRNA expression of RORC and Foxp3 in children with bronchial asthma ($\bar{x} \pm s$)				
Groups	<i>n</i>	RORC	Foxp3	RORC/Foxp3
Acute	20	5.41 ± 0.12 ¹⁾²⁾	3.34 ± 0.12 ¹⁾²⁾	1.68 ± 0.09 ¹⁾²⁾
Remission	20	3.33 ± 0.27	4.43 ± 0.07	0.76 ± 0.06
Control	10	3.78 ± 0.13	4.13 ± 0.04	0.92 ± 0.04
<i>F</i> value		30.71	36.77	48.65

1)compare with remission group; $P < 0.05$; 2)compared with control group; $P < 0.05$

2.4 哮喘患儿外周血 RORC mRNA、Foxp3 mRNA 水平与 FEV1 的关系

将哮喘组外周血 RORC mRNA、Foxp3 mRNA 水平分别与 FEV1(%)进行相关分析,发现哮喘患儿外周血 RORC mRNA 水平与 FEV₁ 成负相关,而 Foxp3 mRNA 水平与 FEV₁ 成正相关, r 分别为-0.58 和 0.52, $P < 0.01$ (图 3、4)。

3 讨 论

哮喘是儿童常见的由多种细胞与细胞组分参与的气道慢性炎症疾病。传统观点认为 Th2 细胞在哮喘发病中起主导作用，近年研究发现其它 CD4+细胞尤其是 Th17 和 Treg 细胞在哮喘发病中也发挥着重要作用,改变 Th17 或 Treg 细胞的表达影响哮喘的气道炎症及气道高反应性^[4-5]。Th17 与 Treg 细胞的分化成熟分别受其上游转录因子 RORC 及 Foxp3 基因表达水平调控^[6]。

本研究通过荧光 RT-PCR 定量检测哮喘患儿 PBMC 中 RORC 及 Foxp3 mRNA 表达水平,探讨其在儿童哮喘发病过程中的变化，并与肺通气功能主要指标 FEV1 进行相关分析。结果发现,哮喘发作组 RORC mRNA 水平显著高于缓解组和正常对照组, Foxp3 mRNA 水平显著低于缓解组和正常对

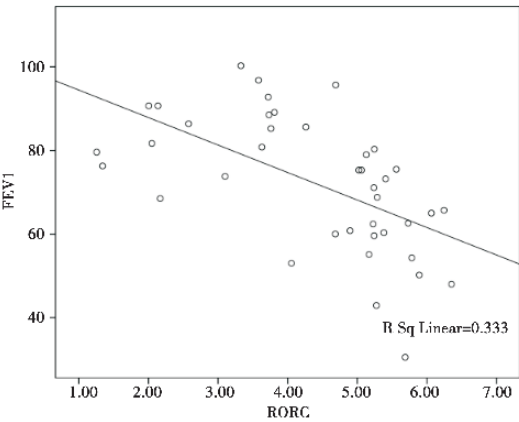


图 3 患儿外周血 RORC mRNA 与 FEV₁ 相关分析
Fig.3 Correlation between the level of RORC mRNA of asthmatic children and their FEV₁

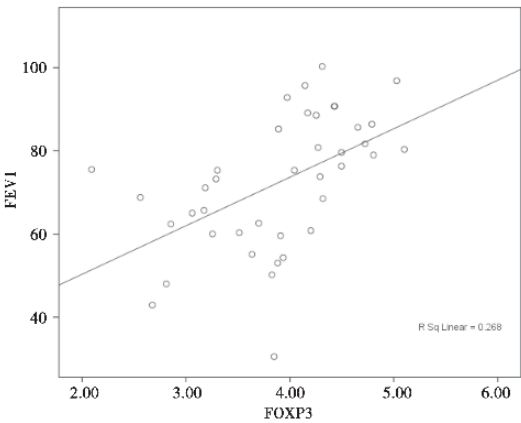


图 4 患儿外周血 Foxp3 mRNA 与 FEV₁ 相关分析
Fig.4 Correlation between the level of Foxp3 mRNA of asthmatic children and their FEV₁

照组，而缓解期 RORC、Foxp3 mRNA 水平和正常对照组无显著差异，表明转录因子 RORC 的活化及其触发的 Th17 细胞增值分化在哮喘的急性发作中起着重要促进作用，而转录因子 Foxp3 表达低下及其靶细胞 Treg 功能不足在哮喘发病过程中不能有效抑制 Th2 及 Th17 的炎症作用。同时发现哮喘患儿 PBMC 中 RORC mRNA 水平与同期 FEV₁ 成负相关, Foxp3 mRNA 水平与同期 FEV₁ 成正相关,提示 RORC 基因高表达与哮喘肺功能的损伤密切相关,而 Foxp3 基因对其具有拮抗作用^[7]。

本课题组以往资料显示，哮喘患儿体内存在 Th1/Th2 平衡失调及其上游转录因子 T-bet/GATA-3mRNA 表达失衡^[8]。Th2 主要通过介导嗜酸性粒细胞气道炎症参与哮喘发病，而后续研究发现儿童哮喘气道炎症呈多型性, Th17 细胞主要

通过分泌细胞因子 IL-17 启动并扩大中性粒细胞炎症,从而参与非嗜酸细胞型哮喘^[9]。有研究表明,哮喘患者支气管灌洗液中 IL-17 表达均明显增高,且与气道高反应性程度呈正相关关系。IL-17 主要通过诱导支气管上皮细胞和成纤维细胞产生 IL-6、IL-8、PGE2 及 G-CSF 等中性粒细胞趋化因子,募集大量中性粒细胞,参与气道炎症;此外,IL-17 可刺激 TGF- β 、IL-11 等多种促炎性因子及粘蛋白基因表达,参与黏液分泌、气道上皮纤维化和血管生成等气道重塑过程。推测本研究中 RORC 基因参与哮喘发作与肺功能损伤的作用是由其下游的细胞 Th17 与细胞因子 IL-17 介导的。Treg 细胞是维持机体自身免疫耐受的专职免疫抑制 T 细胞。Treg 细胞数量减少或功能缺陷被认为哮喘免疫紊乱的特征表现^[10],而 Foxp3 作为 Treg 细胞的转录因子,是 Treg 细胞功能维持的重要因素。有资料显示哮喘患者 Treg 细胞和 Foxp3 mRNA 表达减少,且其表达水平与 FEV₁ 高低呈正相关^[11],与本研究结果一致。

Th17 细胞与 Treg 细胞在功能上相互拮抗,分化上则具有相关关系^[12]。Th17 细胞过度活化,Treg 细胞数目减少或功能低下导致 Th17/Treg 失衡,从而加重哮喘的发生发展。本研究结果发现,哮喘发作组 RORC mRNA /Foxp3 mRNA 比值明显高于正常对照组和缓解组,提示 Th17/Treg 平衡对于哮喘病情的转归至关重要。进一步研究 Th17/Treg 平衡的调节机制,抑制 Th17 细胞分化及功能,上调 Treg 细胞数量及免疫调节功能,将为哮喘治疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] Al-Ramli W, Prefontaine D, Chouiali F, et al. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 123(5): 1185-1187.
- [2] Boudousquie C, Pellaton C, Barbier N, et al. CD4+CD25+ T cell depletion impairs tolerance induction in a murine model of asthma[J]. *Clin Exp Allergy*, 2009, 39(9): 1415-1426.
- [3] 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 儿童支气管哮喘诊断与防治指南[S]. *中华儿科杂志*, 2008, 46(10): 745-753.
- [4] Pène J, Chevalier S, Preisser L, et al. Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes[J]. *J Immunol*, 2008, 180(13): 7423-7430.
- [5] Strickland DH, Stumbles P A, Zosky G R, et al. Reversal of airway hyperresponsiveness by induction of airway mucosal CD4+CD25+ regulatory T cells [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(12): 2649-2660.
- [6] Chen Z, Lin F, Gao Y, et al. FOXP3 and ROR γ t: transcriptional regulation of Treg and Th17 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(5): 536-542.
- [7] Lu Y, Malmhäll C, Sjöstrand M, et al. Expansion of CD4(+) CD25(+) and CD25(-) T-Bet, GATA-3, Foxp3 and ROR γ t cells in allergic inflammation, local lung distribution and chemokine gene expression [J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19889.
- [8] 檀卫平,李静,夏焱,等. 哮喘患儿转录因子 T-bet/GATA-3 mRNA 表达及其与 Th1/Th2 平衡间的关系[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2008, 29(1): 101-104.
- [9] 李静,檀卫平,吴葆菁,等. 中重度哮喘患儿白细胞介素-17 与中性粒细胞炎症反应的关系[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2010(4): 449-556.
- [10] 黄花荣,刘甜甜,吴葆菁,等. 哮喘患儿急性发作期 CD4+CD25+调节性 T 细胞水平和体质量指数的关系[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2010(1): 106-109.
- [11] Provoost S, Maes T, van Durme Y M, et al. Decreased FOXP3 protein expression in patients with asthma [J]. *Allergy*, 2009, 64(10): 1539-1546.
- [12] Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells[J]. *Nature*, 2006, 441(7090): 235-238.

(编辑 张恩健)