

哮喘患儿转录因子 T-bet/GATA-3 mRNA 比值 及其与 Th1/Th2 平衡间的关系

檀卫平, 李 静, 夏 焱, 吴葆菁, 麦贤弟, 李晓圆, 黄花荣, 黄绍良
(中山大学附属第二医院儿科, 广东 广州 510120)

摘 要:【目的】研究转录因子 T-bet/GATA-3 在小儿哮喘发病以及 Th1/Th2 失衡中的作用。【方法】本实验拟通过半定量 RT-PCR 检测部分哮喘患儿外周血单个核细胞(PBMC)中 T-bet、GATA-3 mRNA 表达情况,同时采用三色荧光流式细胞仪检测哮喘患儿的 Th1、Th2 细胞数量,并对 T-bet、GATA-3 mRNA 表达水平与 Th1、Th2 细胞比率进行相关分析,了解 T-bet/GATA-3 对哮喘患儿的 Th 细胞分化的调节作用。【结果】哮喘患儿外周血淋巴细胞转录因子 T-bet mRNA 表达水平显著低于正常对照组,其中哮喘发作组显著低于缓解组 ($P < 0.05$);转录因子 GATA-3 mRNA 表达水平显著高于正常对照组,哮喘发作组又显著高于缓解组 ($P < 0.05$)。哮喘患儿外周血淋巴细胞亚群 Th1 百分率显著低于正常对照组,其中哮喘发作组又显著低于缓解组 ($P < 0.05$); Th2 细胞百分率显著高于正常对照组,哮喘发作组又显著高于缓解组 ($P < 0.05$)。哮喘患儿 T-bet mRNA 表达量与 Th1 细胞比率呈正相关($r=0.731$),与 Th2 细胞比率呈负相关($r=-0.685$);GATA-3 mRNA 表达量与 Th1 细胞比率呈负相关($r=-0.692$),与 Th2 细胞比率呈正相关($r=0.717$);T-bet/GATA-3 mRNA 比值与 Th1 细胞比率呈正相关($r=0.793$),与 Th2 细胞比率呈负相关($r=-0.639$),与 Th1/Th2 比值呈正相关($r=0.801$)。【结论】哮喘患儿 T-bet/GATA-3 mRNA 表达水平失调,与哮喘患儿 Th1/Th2 失衡密切相关,可作为衡量 Th1/Th2 平衡的新指标。

关键词:哮喘;儿童;T-bet;GATA-3;Th1;Th2

中图分类号:R725.6

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2008)01-0095-04

T-bet/GATA-3 mRNA Ratio as a Novel Measure of Th1/Th2 Balance in Asthmatic Children

TAN Wei-ping, LI Jing, XIA Yan, WU Bao-qing, MAI Xian-di,
LI Xiao-yuan, HUANG Hua-rong, HUANG Shao-liang

(Pediatric Department, SUN Yat-sen Memorial Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract:【Objective】To explore the effect of T-bet and GATA-3 mRNA expression on profiles of type 1 and type 2 Th cells in asthmatic children. 【Method】To detect the mRNA expression of T-bet and GATA-3 in the PBMC by semi-quantitative PCR and determine Th1 and Th2 cell numbers by FACS in 38 asthmatic children, including acute attack group of 20 (age 3-13, 6.2 ± 2.9); 18 of remission group (age 3-12, 6.1 ± 2.5); and 20 healthy control children (age 3-12, 6.9 ± 2.7). 【Result】It was showed that T-bet mRNA in asthmatic children was lower than control group and lower in attack stage than in remission stage (0.14 ± 0.035 vs 0.21 ± 0.033 vs 0.28 ± 0.031 , $P < 0.05$). To opposite, GATA-3 mRNA was higher in asthmatic children than control group and higher in attack stage than in remission stage (0.49 ± 0.091 vs 0.44 ± 0.083 vs 0.37 ± 0.041 , $P < 0.05$). It was showed that Th1 percentage was lower in asthmatic children than those of control group and lower in attack stage than those of remission stage (9.67 ± 3.80 vs 14.69 ± 3.16 vs 21.18 ± 3.45 , $P < 0.05$). Th2 percentage in asthmatic children was higher than that of control group and higher in attack stage than that of remission stage (20.76 ± 7.95 vs 14.28

收稿日期:2006-12-25

基金项目:广东省自然科学基金(031668A;6021301A)

作者简介:檀卫平(1966-),女,安徽东至县人,博士,副教授,E-mail:twping@yahoo.com;黄绍良,通讯作者,教授。

± 1.71 vs 4.1 ± 1.55 , $P < 0.05$). Spearman correlation analysis revealed that T-bet mRNA was positively correlated with Th1 percentage ($r=0.731$) and negatively correlated with Th2 percentage ($r=-0.685$). GATA3 mRNA level was negatively correlated with Th1 percentage ($r=-0.692$) and positively correlated with Th2 percentage ($r=0.717$). The T-bet/GATA-3 mRNA ratio was positively correlated with Th1 percentage ($r=0.793$) and Th1/Th2 ratio ($r=0.801$), but negatively correlated with Th2 percentage ($r=-0.639$). 【Conclusion】The T-bet/GATA-3 mRNA expression is closely correlated with Th1/Th2 balance, and the T-bet/GATA-3 ratio may act as a new measure of the Th1/Th2 balance in asthmatic children.

Key words: asthma; children; T-bet; GATA-3; Th1; Th2

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008,29(1):95-98,112]

近年研究发现哮喘患者体内最显著的免疫改变是 Th1/Th2 细胞平衡失调,进而导致 IgE 合成增加,嗜酸性粒细胞(EOS)增殖增多及凋亡减少,从而介导了气道高反应与慢性气道炎症。尽管目前已广泛认为哮喘气道炎症发生的基础是 Th2 细胞功能活化,伴随 Th2 型细胞因子的大量分泌,以前的研究多以检测细胞因子水平来间接代表 Th1、Th2 细胞功能状态^[1],直接从数量上检测哮喘患者 Th1、Th2 细胞分化状态的报道甚少,对影响哮喘患者 Th1、Th2 细胞分化的上游过程更是了解甚少。最新的研究结果表明,转录因子的选择性表达是对 Th 细胞定向分化起关键作用的调控因素。其中 T-bet(T-box expressed in T cells)和 GATA-3(GATA-binding protein-3)分别控制原初性 T 细胞向 Th1 和 Th2 的定向分化^[2]。研究转录因子 T-bet/GATA-3 在小儿哮喘发病以及 Th1/Th2 失衡中的作用,国内外尚无文献报道。本实验拟通过半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测部分哮喘患儿外周血单个核细胞(PBMC)中 T-bet、GATA-3 mRNA 表达情况,同时采用三色荧光流式细胞仪检测哮喘患儿的 Th1、Th2 细胞数量,了解 T-bet/GATA-3 对哮喘患儿的 Th 细胞分化的调节作用。

1 材料与方 法

1.1 研究对象

(1)哮喘组患儿 38 例,均符合 2003 年中华医学会儿科学分会呼吸学组修订的儿童哮喘诊断标准^[3]。其中,哮喘急性发作组 20 例,年龄 3~13 岁,平均 6 岁($S=2.9$);(2)哮喘临床缓解组 18 例,年龄 3~12 岁,平均 6 岁($S=2.5$),以支气管哮喘急性期发作治疗后持续 4 周以上无哮喘发作症状、肺部检查正常、近 4 周内无感染及用糖皮质激素等药物史确定为缓解期纳入标准。确定采集标本

前 2 周内未使用过激素及免疫调节剂。(3)对照组 20 例,均为我院职工健康子女或到我院进行入托体检的健康儿童,其中男 10 例,女 10 例,年龄 3~12 岁,平均 7 岁,平均 6 岁($S=2.7$)。近 2 周内无呼吸道感染,无其他急、慢性疾病,无过敏性及与免疫密切相关的疾病。

1.2 主要试剂

TRIzol isolation Reagent 购自 invitrogen 公司,DEPC 购自威佳公司,Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 MBI 公司,PCR 引物由 TaKaRa 公司合成,Ex Taq 酶、DL2000 DNA Marker 购自 TaKaRa 公司。佛波醇酯(PMA)、离子霉素(ionomycin)、莫能霉素(monensin)、DPBS、皂素(saponin)、多聚甲醛(PFA)均购自 Sigma 公司,RPMI 1640 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司,红细胞裂解液购自美国 Pharmingen 公司。鼠抗人 CD3-TC、鼠抗人 CD8-FITC、PE(藻红蛋白)标记的大鼠抗人 IL-4 单抗、FITC(异硫氢酸荧光素)标记的大鼠抗人 IFN- γ 单抗、PE 标记的鼠 IgG2a 同种型对照免疫球蛋白、FITC 标记的鼠 IgG1 同种型对照免疫球蛋白、Cy-chrome 标记的鼠 IgG1 以及 k 同种型对照免疫球蛋白均购自美国 Pharmingen 公司。

1.3 研究方法

1.3.1 T-bet 及 GATA-3 mRNA 表达水平的 RT-PCR 检测 取枸橼酸钠抗凝外周静脉血 2 mL,常规分离淋巴细胞。淋巴细胞总 RNA 提取与定量,参照 TRIzol 说明书进行。1%琼脂糖电泳分析 RNA 的完整性,RNA 用荧光分光光度计定量后置-70℃保存。取 2 μ g 总 RNA 根据逆转录试剂盒说明逆转录合成 cDNA,所得第一链 cDNA 产物迅速冰浴后置-20℃冰箱保存备用。T-bet 引物可扩增长度为 312 bp(F:5'-ccgtgactgcctaccagaat-3',R:5'-tcatgctgactgcycgaac-3'),GATA-3 引物可扩增长度为

326 bp (F: 5'-aggcaggagtggtgaact-3', R: 5'-tttttcggttctcgtctgg-3'), β -actin 引物可扩增片段长度为 247bp (F: 5'-gtggcgcccccgcacacca-3', R: 5'-cgggtggccttgggattgag-3'). PCR 反应体系: 10×PCR buffer 5 μ L, 10 mM dNTP Mix 5 μ L, cDNA (RT 产物) 2 μ L, 上游引物 20 μ mol/L, 下游引物 20 μ mol/L, Taq polymerase 0.25 μ L, 灭菌水调总反应体积为 50 μ L。94℃预变性 5 min; 94℃ 45 s, 55℃ 50 s, 72℃ 1 min, 25 个循环; 72℃延伸 7 min。取 T-bet、GATA3 及 β -actin 扩增产物 10 μ L 在 1.2% 琼脂糖凝胶中, 100 V 电泳 20 min。凝胶电泳图像输入 Kodak digital Science System DC40 凝胶成像系统, 应用图像分析软件进行各条带平均灰度值分析, 以同时扩增的 β -actin 为内参照, 用转录因子/ β -actin 的比值表示转录因子相对表达量。

1.3.2 哮喘患儿 Th1/Th2 平衡的三色荧光流式细胞仪检测 静脉采血 1 mL, 肝素抗凝, 按 1:1 与 RPMI 1640 培养基混匀, 加 PMA 25 ng/L, ionomycin 1 mg/L 作刺激原, 同时加蛋白质转运抑制剂 monensin 17 mg/L, 37℃、体积分数 5% CO₂ 培养 4 h 后, 裂解红细胞, 2 mL DPBS 缓冲液洗 1 次, 弃上清, 鼠抗人 CD3-TC 20 μ L、CD8-FITC 20 μ L, 室温避光 45 min。同时做空白对照及同种阴性对照, 2 mL 缓冲液洗 1 次, 1 500 r/min ($r=15$ cm) 离心 5 min, 弃上清。加 40 g/L 多聚甲醛 500 μ L, 固定 20 min, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清。然后加含 0.1% 皂素的缓冲液 2 mL 破膜 10 min, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清。再用大鼠抗人 IFN- γ -PE 及大鼠抗人 IL-4-PE 单抗 (0.2 μ g/管) 室温避光孵育 30 min, 2 mL 含 0.1% 皂素的缓冲液洗 1 次, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清。最后用 500 μ L 含 20 g/L 多聚甲醛的 DPBS 悬浮细胞, 上机检测, 每一样品检测 20 000 个细胞。

1.4 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间均数比较采用 SPSS 10.0 软件进行单因素方差分析, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 哮喘患儿外周血淋巴细胞转录因子 T-bet 及 GATA-3 mRNA 表达水平

哮喘患儿外周血淋巴细胞转录因子 T-bet mRNA 和 T-bet/GATA-3 mRNA 表达水平均显著

低于正常对照组, 其中哮喘发作组均显著低于哮喘缓解组 (P 均 < 0.05); 哮喘患儿外周血淋巴细胞转录因子 GATA-3 mRNA 表达水平显著高于正常对照组, 其中哮喘发作组显著高于哮喘缓解组 ($P < 0.05$; 图 1, 表 1)。

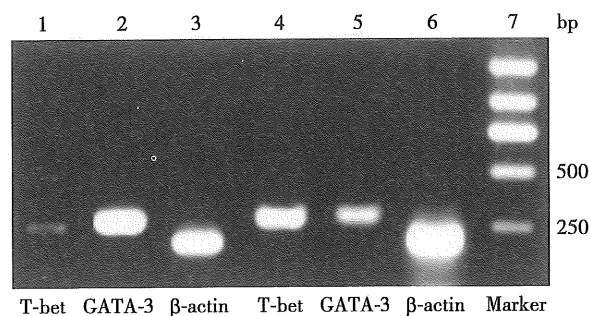


图 1 哮喘患儿 T-bet、GATA-3 mRNA 表达

Fig.1 Expression of T-bet and GATA-3 mRNA in

asthmatic children

Lane 1, 2, 3; asthmatic children; 4, 5, 6; normal control; 7; DL2000

表 1 哮喘患儿 T-bet 及 GATA-3 mRNA 表达水平比较

Table 1 Expression of T-bet and GATA-3 mRNA in

	n	asthmatic children ($\bar{x} \pm s$)		
		T-bet/ β -actin	GATA-3/ β -actin	T-bet/GATA-3
Attack stage	20	0.14 $\pm$ 0.035 ^{1), 2)}	0.49 $\pm$ 0.091 ^{1), 2)}	0.29 $\pm$ 0.088 ^{1), 2)}
Remission stage	18	0.21 $\pm$ 0.033 ¹⁾	0.44 $\pm$ 0.083 ¹⁾	0.51 $\pm$ 0.161 ¹⁾
Normal	20	0.28 $\pm$ 0.031	0.37 $\pm$ 0.041	0.78 $\pm$ 0.115
t		98.43	13.52	107.99

1) compared with normal control, $P < 0.05$; 2) compared with remission stage, $P < 0.05$

2.2 哮喘患儿外周血淋巴细胞亚群 Th1、Th2 细胞百分率的变化

流式细胞仪检测结果显示哮喘患儿外周血淋巴细胞亚群 Th1 百分率和 Th1/Th2 比值均显著低于正常对照组 (P 均 < 0.05), 其中哮喘发作组均显著低于哮喘缓解组 (P 均 < 0.05); 哮喘患儿外周血淋巴细胞亚群 Th2 细胞百分率显著高于正常对照组, 其中哮喘发作组又显著高于哮喘缓解组 ($P < 0.05$; 表 2)。

2.3 哮喘患儿 T-bet/GATA-3 mRNA 表达量与 Th1/Th2 间的相关分析

哮喘患儿 T-bet mRNA 表达量与 Th1 细胞比率呈正相关 ($r=0.731$), 与 Th2 细胞比率呈负相关 ($r=-0.685$); GATA-3 mRNA 表达量与 Th1 细胞比率呈负相关 ($r=-0.692$), 与 Th2 细胞比率呈正相

表 2 哮喘患儿淋巴细胞 Th1、Th2 百分比检测结果($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Th1 and Th2 percentage of asthmatic children				
	<i>n</i>	Th1(%)	Th2(%)	Th1/Th2
Attack stage	20	9.67 ± 3.8 ^{1),2)}	20.76 ± 7.95 ^{1),2)}	0.49 ± 0.13 ^{1),2)}
Remission stage	18	14.69 ± 3.16 ¹⁾	14.28 ± 1.71 ¹⁾	1.03 ± 0.21 ¹⁾
Normal	20	21.18 ± 3.45	4.1 ± 1.55	5.76 ± 2.25
<i>t</i>		245.23	28.35	86.70

1) compared with normal control, $P < 0.05$; 2) compared with remission stage, $P < 0.05$

关($r=0.717$); T-bet/GATA-3 mRNA 比值与 Th1 细胞比率呈正相关($r=0.793$), 与 Th2 细胞比率呈负相关($r=-0.639$), 与 Th1/Th2 比值呈正相关($r=0.801$, P 均 < 0.05)。

3 讨 论

哮喘是一种多种细胞和多种介质参与的慢性气道炎症和气道重塑, 在多种细胞和介质构成的复杂网络中, CD4⁺ T 辅助(Th)细胞及其分泌的细胞因子扮演着极其重要的角色^[4]。我们在前期研究中以 ELISA 方法检测哮喘患儿外周血淋巴细胞分泌的细胞因子水平, 结果发现, 与正常对照组比较, 哮喘患儿外周血的淋巴细胞分泌 IL-4 的能力增强, 而分泌 IFN- γ 的能力降低^[5,6], 间接反映了哮喘患儿 Th1 类细胞功能不足, Th2 类细胞功能亢进。近年来, 联合运用荧光标记的抗细胞表面抗原和抗细胞内细胞因子单抗, 结合短时固定、破膜打孔处理, 使我们能从单细胞水平, 在同一细胞内同时检测两种或更多的细胞因子, 结合表面抗原标记, 同时直接对 T 细胞亚群进行分析^[7]。本组研究中我们采用三色荧光流式细胞仪检测哮喘患儿 CD4⁺ T 淋巴细胞内 IFN- γ 与 IL-4 分泌状态, 分析哮喘患儿 Th1、Th2 百分率。结果发现, 与正常对照组比较, 哮喘患儿外周血淋巴细胞中分泌 IL-4 的 CD3⁺CD4⁺ 细胞(Th2)百分率显著增高, 哮喘急性期显著高于缓解期; 分泌 IFN- γ 的 CD3⁺CD4⁺ 细胞(Th1)百分率显著降低, 哮喘急性期显著低于缓解期。进一步直接说明了哮喘患儿体内不仅存在 Th2 细胞功能的过度活化, Th1 型细胞功能不足, 在细胞数量上也显示出 Th2 型细胞的优势分化和 Th1 型细胞的减少, 并且这种趋势在哮喘急性发作期尤为明显。

对于影响 T 细胞分化的相关因素近年来进行

了大量的研究, 由前体 T 细胞向 Th1、Th2 细胞分化, 是化学环境作用于其表面受体进而通过一系列信号转导引起特征性细胞因子谱选择性表达的过程。近期发现, 转录因子 T-bet 和 GATA-3 由于可分别与 IFN- γ 基因及 Th2 细胞因子基因的启动子区结合, 对 Th1 和 Th2 两类细胞的发育分化起中心调节作用。GATA-3 是锌指蛋白 GATA 家族成员, 能促使 Th 合成 Th2 细胞因子。GATA-3 基因敲除小鼠合成 Th2 型细胞因子的能力明显下降, 不能形成经典的由 Th2 介导的气道炎症^[8]。而 T-bet 属于转录因子 T 盒家族(T-box family)成员, 是 Th1 分化的特异性转录因子^[9,10], T-bet 基因完全敲除(T-bet^{-/-})小鼠, 可自发表现出类似于过敏性哮喘特征性的病理炎症改变^[11]。本课题组研究发现, 气道转染 IFN- γ 基因或 T-bet 基因可抑制小鼠的哮喘反应^[12,13]。本研究通过半定量 RT-PCR 检测部分哮喘患儿外周血单个核细胞(PBMC)中 T-bet、GATA-3 mRNA 表达水平, 同时与流式细胞仪检测的哮喘患儿的 Th1、Th2 细胞数量进行分析。结果发现哮喘患儿外周血单个核细胞 T-bet mRNA 表达水平低下, GATA-3 mRNA 表达水平增高。相关性分析进一步证实哮喘患儿 T-bet mRNA 表达水平与 Th1 百分率呈正相关, 与 Th2 百分率呈负相关; 而 GATA-3 mRNA 水平与 Th2 百分率呈正相关, 与 Th1 百分率呈负相关; 且 T-bet/GATA-3 mRNA 比值与 Th1/Th2 比值呈正相关。结合国内外的研究结果, 我们可初步推断 T-bet/GATA-3 平衡失调在哮喘发病以及患儿 Th1/Th2 平衡偏移中起着重要调控作用, 并且 T-bet/GATA-3 比值检测可作为衡量哮喘患儿 Th1/Th2 平衡的新指标。

参考文献:

- [1] 黄花荣, 麦贤弟. 哮喘患儿外周血 CD25 与 IFN- γ 的水平变化及其相关性研究 [J]. 中山医科大学学报, 2002, 23(5): 361-363.
- [2] Finotto S, Glimcher L. T cell-directives for transcriptional regulation in asthma [J]. Springer Semin Immunopathol, 2004, 25(3-4): 281-294.
- [3] 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 儿童支气管哮喘防治常规 [J]. 中华儿科杂志, 2004, 42(2): 100-106.
- [4] Kay A. The role of T lymphocytes in asthma [J]. Chem Immunol Allergy, 2006, 91: 59-75.
- [5] 檀卫平, 黄绍良, 麦贤弟, 等. 麻疹疫苗反复注射对哮喘

(下转第 112 页 to page 112)