

溃疡性结肠炎患者外周血单个核细胞中Foxp3 mRNA的表达水平

李永哲, 孙可歆, 赵 臣

■背景资料

Foxp3是新近发现的一个转录因子,介导CD4⁺CD25⁺T调节细胞的发育、表达及功能维持。Foxp3基因减低会导致CD4⁺CD25⁺T调节细胞数量下降,免疫调节功能缺陷,可诱发严重的自身免疫反应,因此, Foxp3对机体免疫自稳起着决定性作用。溃疡性结肠炎(UC)是一种病因未明的自身免疫性疾病,研究Foxp3与UC活动性的关系有利于疾病的诊断及开展新的免疫治疗方法。

李永哲, 孙可歆, 赵臣, 中国医学科学院中国协和医科大学、北京协和医院检验科 北京市 100730
国家自然科学基金资助项目, No. 30471617
国家高技术研究发展计划(863计划)重大专项基金资助项目, No. 2002AARZ2011
通讯作者: 李永哲, 100730, 东城区帅府园1号, 中国医学科学院中国协和医科大学、北京协和医院检验科。
yongzhelipumch@yahoo.com.cn
电话: 010-65295416 传真: 010-65295416
收稿日期: 2006-01-11 接受日期: 2006-02-08

Expression of Foxp3 mRNA in peripheral blood monocytes of patients with ulcerative colitis

Yong-Zhe Li, Ke-Xin Sun, Chen Zhao

Yong-Zhe Li, Ke-Xin Sun, Chen Zhao, Department of Laboratory, Hospital of Peking Union Medical College, Beijing 100730, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30471617, and the Key Special Foundation of National 863 Project, No. 2002AARZ2011
Correspondence to: Yong-Zhe Li, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China. yongzhelipumch@yahoo.com.cn
Received: 2006-01-11 Accepted: 2006-02-08

Abstract

AIM: To investigate the level of Foxp3 mRNA in the peripheral blood monocytes (PBMCs) of patients with ulcerative colitis (UC), and its relationship with activity of UC.

METHODS: Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to examine Foxp3 mRNA expression in the PBMCs from 22 cases with UC in active stage, 20 cases at stable stage, and 30 normal controls.

RESULTS: Foxp3 mRNA expression was lower in patients with UC at active stage than that in the controls (1.58 ± 0.31 vs 3.27 ± 0.40 , $P < 0.05$), while Foxp3 mRNA expression in UC at stable stage was not significantly different from that in the controls ($P = 0.104$). The level of Foxp3 mRNA in the PBMCs in active UC was negatively correlated with the Walmsley renal scoring ($r = -0.756$, $P = 0.000$).

CONCLUSION: Foxp3 mRNA expression in the PBMCs may be involved in the pathogenesis and activity of UC.

Key Words: Ulcerative colitis; Foxp3; Peripheral blood monocytes

Li YZ, Sun KX, Zhao C. Expression of Foxp3 mRNA in peripheral blood monocytes of patients with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(8):810-813

摘要

目的: 探讨溃疡性结肠炎(UC)患者外周血单个核细胞中Foxp3 mRNA表达及其与疾病活动性的关系。

方法: 应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测42例UC患者(活动期22例、缓解期20例)和30例正常对照组外周血单个核细胞Foxp3 mRNA的表达水平。

结果: UC患者急性期Foxp3 mRNA水平低于正常人, 差异有显著性(1.58 ± 0.31 vs 3.27 ± 0.40 , $P < 0.05$); 缓解期Foxp3 mRNA水平与正常人差异无显著性($P = 0.104$); PBMC中Foxp3 mRNA表达水平与Walmsley评分标准有相关性, 且呈负相关。

结论: UC患者外周血单个核细胞中Foxp3 mRNA表达水平显著低于正常人, 其参与了UC的发病过程并与疾病的活动性有关。

关键词: 溃疡性结肠炎; 转录因子Foxp3; 外周血单个核细胞

李永哲, 孙可歆, 赵臣. 溃疡性结肠炎患者外周血单个核细胞中Foxp3 mRNA的表达水平. *世界华人消化杂志* 2006;14(8):810-813
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/810.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种病

因未明慢性非特异性的结肠炎症. 其发病可能与免疫、遗传、感染等因素有关, 并可伴有多发结节性红斑、关节炎、Graves病等自身免疫性肠外表现. 随着实验技术的进步, 越来越多的研究发现细胞免疫在IBD的发病中起了非常重要的作用. Foxp3是新近发现的一个转录因子, 属于foxhead家族成员, 组成性表达于机体的CD4⁺CD25⁺T调节细胞, 介导CD4⁺CD25⁺T调节细胞在胸腺的发育、外周表达及功能维持. 研究发现Foxp3基因突变或敲除的小鼠, 其体内CD4⁺CD25⁺T调节细胞数量下降, 调节功能缺陷, 可诱发严重的自身免疫反应, 因此, Foxp3对机体免疫自稳起着决定性作用^[1]. 本文对在UC患者外周血单个核细胞(PBMC)中的表达及疾病活动性关系进行研究, 以明确Foxp3在发病中的作用, 并为疾病的诊断及新的免疫学疗法的开展提供依据.

1 材料和方法

1.1 材料 北京协和医院2005-04/10门诊和住院诊断明确的40例患者, 其中男34例, 女6例, 年龄26-68岁, 平均年龄47岁. 全部病例符合1993年太原全国非感染性肠道学术会议制定的《溃疡性结肠炎的诊断及疗效标准》. UC活动性按Walmsley评分标准进行评价^[2], <4分为缓解期; 5-8分为中度活动期; 9分以上为重度活动期. 其中活动期22例, 缓解期18例(经内科治疗缓解者). 30例健康体检者为正常对照组.

1.2 方法

1.2.1 PBMC的分离 正常对照组和UC患者分别取肘静脉血3 mL, 肝素抗凝, 稀释后的血液缓慢加入等体积的淋巴细胞分离液(Ficoll)中, 2 000 r/min离心20 min, 分离出PBMC, 再加入5倍体积9 g/L生理盐水, 2 000 r/min离心10 min, 洗涤2次, 加入Trizol(Invitrogen公司)后, -80℃保存.

1.2.2 总RNA的提取 从-80℃冰箱中取出PBMC, 彻底混匀, 室温静置5 min; 加入0.2 mL氯仿, 剧烈振荡15 s, 室温静置2 min; 4℃ 12 000 g离心15 min, 轻吸出上层水相至另一EP管, 加等体积异丙醇, 混匀静置10 min; 4℃ 12 000 g离心10 min; 弃上清, 加入1 mL 750 mL/L乙醇洗涤沉淀, 4℃ 7 500 g离心5 min; 吸干乙醇, 空气中干燥; 加入20 μL无RNA酶水溶解RNA.

1.2.3 RNA纯度和含量的测定 取5 μL抽提的RNA样品上样电泳, 在12 g/L普通琼脂糖凝胶图谱中显示28 S, 18 S两条带, 且28 S带亮度为

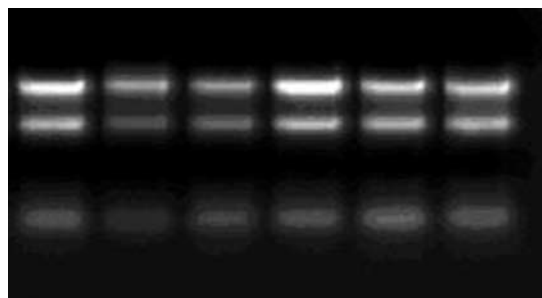


图1 总RNA电泳图.

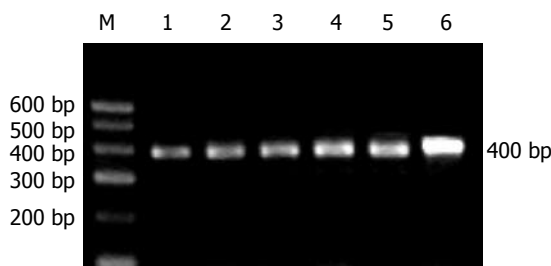


图2 UC患者PBMC中Foxp3基因RT-PCR扩增结果. M: Marker; 1-6: 扩增条带400 bp; 1-2: UC活动期患者; 3-4: UC缓解期患者; 5-6: 正常对照.

18 S带亮度二倍者入选. 紫外分光光度计检测RNA在260 nm, 280 nm波长处的吸光度值, 并计算 A_{260}/A_{280} 比值和RNA浓度(浓度 $\mu\text{g/mL} = A_{260} \times 40 \times \text{稀释倍数}$)(图1).

1.2.4 cDNA的合成 20 μL逆转录反应体系中包含样品总RNA 2-4 μg, M-MLV逆转录酶200 U, Rnasin 50 U, 4×dNTP 2 μL, Oligo(dT) 26 U, DTT 1 μL, 5×反应缓冲液4 μL和无RNA水9 μL. 反应条件为37℃ 1 h, 然后95℃ 5 min灭活逆转录酶.

1.2.5 DNA扩增(PCR) PCR反应仪为Promega公司产品. 25 μL DNA反应体系中包含cDNA 2.5 μL, TaqDNA聚合酶0.5 μL, 上游引物1 μL, 下游引物1 μL(上海生物工程公司合成), dNTP 0.5 μL, MgCl₂ 2.0 μL, 10×反应缓冲液2.5 μL和无RNA水15 μL. 以肌动蛋白(β -actin)为内参照, 实验中所用引物序列、反应条件及片段长度如下: β -actin上游引物5'-GCATGGAGTCCTGTGGCAT-3', 下游引物5'-CTAGAAGCATTTCGGTGG-3', 320 bp; Foxp3上游引物5'-ACACCA CCCACCACCGCCACT-3', 下游引物5'-TCGGA TGATGCCACAGATGAAGC-3', 400 bp. 反应条件94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 45 s, 72℃ 7 min, 4℃ 5 min(图2-3).

1.2.6 RT-PCR产物的检测 取5 μL PCR产物置于20 g/L琼脂糖凝胶中80 mV, 40 mA电泳25 min

■ 研发前沿
近年来关于CD4⁺CD25⁺T调节细胞与Foxp3转录因子的研究日益成为研究热点.

■ 创新盘点

近年来关于CD4⁺CD25⁺T调节细胞与Foxp3转录因子的研究日益成为研究热点,已有研究表明二者与自身免疫性疾病密切相关,本研究证实Foxp3参与调控CD4⁺CD25⁺T调节细胞的功能,并与UC的活动性呈明显负相关。

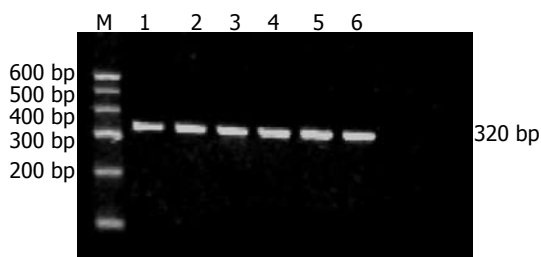


图3 UC患者及正常对照组β-actin内参照电泳图。M: marker; 1-6: 内参照β-actin 320 bp。

表1 正常人、活动期和缓解期UC患者PBMC中Foxp3 mRNA表达水平及Walmsley评分 (mean ± SD)

组别	n	Walmsley评分	Foxp3/β-actin
正常对照组	30		3.27 ± 0.40
活动期UC	22	7.45 ± 1.44	1.58 ± 0.31
缓解期UC	18	3.15 ± 0.75	3.09 ± 0.37

观察。电泳后凝胶置于紫外光可见分析装置中,用Gel Doc 2000 Bio-Rad公司(美国)图像分析系统进行扫描拍照,并检测各电泳条带的A值,计算Foxp3/β-actin,从而得到Foxp3的相对含量。

统计学处理 采用SPSS 11.0软件,先对原始资料进行正态性检验,服从正态性分布用完全随机设计的方差分析。

2 结果

2.1 细胞总RNA抽提结果 RNA纯度检测结果: A_{260}/A_{280} 比值均在1.651-1.928之间,提示RNA较纯。RNA浓度在330-1 700 μg/mL之间。

2.2 正常人、活动期和缓解期UC患者PBMC中的Foxp3 mRNA水平见表1 活动期Foxp3 mRNA水平低于正常人,差异有显著性($P < 0.05$);活动期Foxp3 mRNA水平低于缓解期,差异有显著性($P < 0.05$);缓解期Foxp3 mRNA水平与正常人无显著差异($P = 0.104$)。

2.3 UC活动指数Walmsley评分与Foxp3 mRNA表达的相关性 活动期UC患者Walmsley评分与目的基因Foxp3的表达呈显著负相关($r = -0.756$, $P = 0.000$)。缓解期UC患者Walmsley评分与目的基因Foxp3的表达无相关性($P = 0.813$)。

3 讨论

炎症性肠病(IBD)是一种病因未明、侵及胃肠道的自身免疫性疾病,包括溃疡性结肠炎(UC)和克隆恩病(CD)。近年来,UC的患病率呈逐渐上升趋势^[2],目前认为免疫因素在UC中具有重要

作用,且已成为研究的热点。Foxp3基因定位于Xp11.23,含有84个氨基酸残基的foxhead结构域,GH2锌指结构和一个亮氨酸拉链,该基因家族编码蛋白具有相似的保守结构,均通过其Foxhead结构域与DNA特定位点结合,调节目的基因的活化和表达^[3]。最近研究发现CD4⁺CD25⁺T调节细胞异常表达是导致自身免疫性疾病的主要原因,Foxp3是CD4⁺CD25⁺T调节细胞的特异性标志^[4-5]。人类Foxp3基因可有多种突变,包括点突变、mRNA剪切缺陷及亮氨酸拉链区改变,导致类似的系统性自身免疫病-IPEX(新生儿糖尿病、炎症性肠炎、内分泌综合征等),而且I型糖尿病、克隆恩病也与Foxp3基因改变有关^[6-7]。Hori *et al*^[8]已经证实正常人类和小鼠胸腺及外周血中CD4⁺CD25⁺T调节细胞特异性表达Foxp3,逆转录该基因可以转化初始型T细胞,使其成为具有调节功能的T调节细胞。Maul *et al*^[9]采用流式细胞术和real-time PCR分析CD4⁺CD25⁺T调节细胞、Foxp3表达水平,结果表明IBD患者外周血中CD4⁺CD25⁺T调节细胞保持了他们的抑制活性,疾病活动期CD4⁺CD25⁺调节细胞和Foxp3下降,但疾病缓解期和对照组比率上升,CD4⁺CD25⁺T调节细胞可能参与IBD的发病机制。我们采用半定量RT-PCR方法检测UC患者PBMC中Foxp3 mRNA的表达水平,研究结果显示:UC患者活动期Foxp3 mRNA表达水平显著低于缓解期和正常对照组,而缓解期与正常对照组无显著差异,表明可能由于CD4⁺CD25⁺T调节细胞数量减少,从而使Foxp3 mRNA表达水平降低,调节功能缺陷,诱发严重自身免疫反应。提示Foxp3是CD4⁺CD25⁺T调节细胞中主要的调控基因,Foxp3可能通过以下几种途径参与T调节细胞的功能维持:Foxp3能竞争结合与细胞活化相关基因,以间接抑制效应基因的转录,同时也可直接抑制效应基因的表达;Foxp3可作为一种转接蛋白招募其他具有抑制功能的效应分子与目的基因结合。我们的研究还对UC患者Walmsley评分与Foxp3/β-actin灰度比值进行相关分析,结果二者之间呈明显负相关($P < 0.001$),也就是说,活动指数越高,目的基因的表达量越小;相反,活动指数越小,目的基因的表达量越高。

总之,Foxp3在免疫调节中起着重要作用,了解在疾病发病中的作用及活动性关系,以辅助临床,为溃疡性结肠炎的诊断和治疗提供新

的思路.

4 参考文献

- 1 Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 2005; 6: 331-337
- 2 Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115: 182-205
- 3 Bassuny WM, Ihara K, Sasaki Y, Kuromaru R, Kohno H, Matsuura N, Hara T. A functional polymorphism in the promoter/enhancer region of the FOXP3/Scurfin gene associated with type 1 diabetes. *Immunogenetics* 2003; 55: 149-156
- 4 Anderson MS, Venzani ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, von Boehmer H, Bronson R, Dierich A, Benoist C, Mathis D. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 2002; 298: 1395-1401
- 5 Ramsdell F. Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? *Immunity* 2003; 19: 165-168
- 6 Owen CJ, Jennings CE, Imrie H, Lachaux A, Bridges NA, Cheetham TD, Pearce SH. Mutational analysis of the FOXP3 gene and evidence for genetic heterogeneity in the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 6034-6039
- 7 Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet* 2002; 39: 537-545
- 8 Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299: 1057-1061
- 9 Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, Zeitz M, Duchmann R. Peripheral and intestinal regulatory CD4⁺ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 1868-1878

■同行评价

UC患者急性期Foxp3 mRNA水平明显低于正常人,缓解期表达水平与正常人无差异,活动期表达水平亦明显低于缓解期;并证实了PBMC中的Foxp3 mRNA表达水平与Walmsley评分标准呈负相关关系。本研究题目新颖,设计合理,采用技术手段先进,为UC的诊断和治疗提供了重要的参考。因此,本文研究内容也具有重要的实用意义。

电编 张敏 编辑 王瑾晖

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第十届全国普通外科学术会议征文通知

本刊讯 由解放军普通外科专业委员会主办,南京军区福州总医院承办的“第十届全国普通外科学术会议”拟定于2006-07在福州举行。会议采用院士论坛、专题报告等形式,对普通外科近年来的新技术、新方法及发展趋势进行介绍和讨论。欢迎军内外普通外科医师参加会议。

1 征文内容

征文内容包括:有关普通外科疾病的诊断、治疗的基础和临床研究及护理内容。

2 征稿要求

征稿要求包括: (1) 要求中文全文(4 000字以内)及摘要(500字以内)各1份。稿件请寄软盘(Word 格式), 欢迎用电子邮件方式投稿。(2) 来稿请注明单位、作者姓名、邮编及联系电话(请自留底稿,恕不退稿),请在信封左下角注明“会议征文”字样。

来稿请寄: 350025, 福建省福州市西二球路156号 南京军区福州总医院普通外科 王烈收。E-mail地址: www.fzptwk@public.fz.fj.cn, 传真: 0591-83796855, 电话: 0591-24937077, 军线: 0611-97077, 959770。