

组蛋白去乙酰化酶抑制剂对人外周血 CD4⁺T 细胞 Th1/Th2 分化的影响

张洁, 吕丽君, 周鸣鸣, 孙晓蕾, 汪晓莺*

南通大学医学院免疫系, 南通 226019

[摘要] **目的** 探讨曲古抑菌素 A(TSA)和丁酸钠(NaB)对人外周血 CD4⁺T 细胞向 Th1/Th2 分化的影响。**方法** 体外分离并培养人外周血 CD4⁺T 细胞,分为 TSA 组(0.33 μmol/L)、NaB 组(1.4 mmol/L)和对照组(CON 组)。采用 MTT、流式细胞术、qRT-PCR 和酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测 TSA 组、NaB 组及对照组细胞因子 IFN-γ、IL-4 表达水平及 IFN-γ⁺ 细胞/IL-4⁺ 细胞比值。**结果** 外周血 CD4⁺T 细胞在植物血凝素(PHA)刺激 48 h 后,ELISA 检测细胞培养上清显示:TSA 组、NaB 组上清 IFN-γ、IL-4 分泌水平明显高于对照组($P < 0.05$)。qRT-PCR 检测显示:TSA 组、NaB 组 IFN-γ mRNA 表达高于对照组,相比对照组提高到(3.12±0.34)、(2.3±0.51)倍,差异有统计学意义($P < 0.05$);IL-4 mRNA 提高到(1.87±0.42)、(1.63±0.51)倍,差异有统计学意义($P < 0.01$)。流式细胞术对胞内因子检测显示:TSA 组、NaB 组 IFN-γ⁺ 细胞/IL-4⁺ 细胞比值明显升高,是对照组的 1.93、1.55 倍,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** TSA、NaB 暴露可引起人外周血 CD4⁺T 细胞 Th1/Th2 分化平衡改变,出现向 Th1 方向的“Th1/Th2 平衡的漂移”。

[关键词] 曲古抑菌素 A;丁酸钠;辅助 T 细胞;干扰素 γ;白介素 4

[中图分类号] R 392.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)06-0621-04

Effect of trichostatin A and sodium butyrate on variation of Th1/Th2 cell balance after differentiation of peripheral blood CD4⁺T cells

ZHANG Jie, LÜ Li-jun, ZHOU Ming-ming, SUN Xiao-lei, WANG Xiao-ying*

Department of Immunology, College of Medicine, Nantong University, Nantong 226019, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of trichostatin A(TSA) and sodium butyrate(NaB), histone deacetylase inhibitors, on the balance of Th1/Th2 after differentiation of peripheral blood CD4⁺T cells. **Methods** Peripheral CD4⁺T cells were grown *in vitro* and were divided into TSA group, NaB group, and CON group. The concentrations of IL-4 and IFN-γ (Th1/Th2 factors) in the supernatants were examined by ELISA in each group 48 h later; the expressions of IL-4 and IFN-γ were analyzed by qRT-PCR; and the T-lymphocytes in peripheral blood (PBL) were measured by flow cytometry. **Results** ELISA showed that the supernatant IFN-γ and IL-4 levels in the TSA and NaB groups were significantly higher than those in the CON group 48 h after treatment with TSA(0.33 μmol/L) and NaB(1.4 mmol/L); real-time quantitative PCR also showed that the expressions of IFN-γ and IL-4 mRNA in TSA and NaB groups were significantly higher than those in the CON group (3.12 : 1, 2.3 : 1; $P < 0.05$). However, flow cytometry showed that the ratios of IFN-γ⁺ cells/IL-4⁺ cells were significantly higher in TSA and NaB groups than that in the CON group((1.93 : 1, 1.55 : 1; $P < 0.05$). **Conclusion** Treatment with TSA and NaB, both histone deacetylase inhibitors, can induce a shift of Th1/Th2 cell balance toward Th1 cells in peripheral CD4⁺T cells.

[Key words] trichostatin A; sodium butyrate; Th1 cells; Th2 cells; interferon-γ; interleukin-4

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(6):621-624]

表观遗传学(epigenetics)修饰是基因表达调控的重要形式之一,即在不改变特定基因的条件下,通过 DNA 的甲基化、组蛋白的共价修饰等作用使基因

表达发生可遗传的变化。其中,组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferase, HAT)及组蛋白去乙酰化酶(HDAC)可通过调控组蛋白的乙酰化状态参与染色

[收稿日期] 2011-02-22 **[接受日期]** 2011-04-19

[基金项目] 江苏省高校自然科学基金(10KJB310010),江苏省高校优势学科建设工程资助项目。Supported by Natural Science Foundation of the Higher Education Institutions of Jiangsu Province(10KJB310010) and the Priority Academic Program of Higher Education Institutions of Jiangsu Province (PAPD).

[作者简介] 张洁,讲师。E-mail: romly80@sina.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0513-5584863, E-mail: wxy@ntu.edu.cn

质重塑,进而导致转录抑制^[1]。因此调控 HAT 和 HDAC 在细胞内的动态平衡可改变基因的表达。组蛋白去乙酰化酶抑制剂(HDI)是近年来引起极大关注的一类新型药物,尤其在抗肿瘤药物筛选上,HDI 表现出了较大的优势,其中曲古抑菌素 A(TSA)和丁酸钠(NaB)在临床应用较多^[2-3]。但 HDI 发挥作用的分子机制并不十分明确。

Th1/Th2 平衡是维持机体处于健康状态的重要机制之一,一旦此平衡被打破,将可能引起异常的免疫应答。本实验室的前期研究表明,TSA 可下调小鼠过度表达的 Th2 型细胞因子 IL-4,而明显促进 Th1 型细胞因子 IFN- γ 的分泌^[4],但没有涉及人外周血 Th 细胞的分化,且未检验更多 HDI。因此,本研究以人外周血 CD4⁺ T 细胞为研究对象,加入 2 种不同的 HDI 抑制 HDAC 活性,检测 Th1/Th2,探讨组蛋白 H3 乙酰化水平对 Th1 和 Th2 分化的影响。

1 材料和方法

1.1 主要药品及试剂

TSA、NaB、植物血凝素(PHA)、MTT、二甲亚砜(DMSO)均购自 Sigma 公司,CD4⁺ T 细胞分离试剂盒(human)购自 Miltenyi Biotec 公司,IFN- γ 和 IL-4 ELISA 检测试剂盒(Bioscience 公司);TRIzol Reagent (Invitrogen 公司);SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (TaKaRa 公司);RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas 公司)、MPCS 磁力架(Dynal 公司)、流式细胞仪(BD 公司)、酶标仪(南京华东电子集团有限公司)等。

1.2 外周血采集及 T 细胞分离培养

采集 EDTA-Na₂ 抗凝静脉血 100 ml,在冰浴中保存,即送实验室,使用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),再使用 Miltenyi Biotec CD4⁺ T 细胞阳性分选试剂盒按说明书进行 CD4⁺ T 细胞分离,上清一并收集到上述离心管。将分离好的淋巴细胞以 4×10^6 cells/well 接种于 96 孔培养板,分别设置 TSA/NaB 刺激组及对照组(PHA 终浓度 10 mg/L)。在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下根据实验需要培养 48 h。

1.3 ELISA 法测定培养上清中 IFN- γ 、IL-4 水平

收取对照组和 TSA、NaB 组 48 h 的培养上清 1 ml,根据各试剂盒说明书严格操作。

1.4 实时定量 RT-PCR 检测 IFN- γ 、IL-4 mRNA 表达

离心细胞培养液,得到沉淀。TRIzol 法抽提 RNA,并将其反转录为 cDNA,-20 $^{\circ}$ C 保存。实时荧光定量 PCR(real-time PCR)用 SYBR Green 染料法。引物采用 Primer premier 5.0 辅助设计,由上海生工生物工程技术有限公司合成。合成上下游引物

序列如下:IL-4(252 bp),上游 5'-CGA GTT GAC CGT AAC AGA CAT-3';下游 5'-AAC GTA CTC TGG TTG GCT TC-3';IFN- γ (280 bp),上游 5'-GCA GCC AAC CTA AGC AAG-3',下游 5'-CAC CTG ACA CAT TCA AGT TC-3';GAPDH(240 bp),上游 5'-TGA TGA CAT CAA GAA GGT GGT GAA G-3',下游 5'-TCC TTG GAG GCC ATG TGG GCC AT-3'。反应体系 25 μ l,SYBR Premix Ex Taq[™] 12.5 μ l,10 μ mol/L 引物各 1 μ l,cDNA 2 μ l,灭菌双蒸水 8.5 μ l。反应条件:预变性 95 $^{\circ}$ C 15 s;40 个循环,每循环为 95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 15 s;72 $^{\circ}$ C 采集荧光。所用 Real-time PCR 扩增仪为 MX3000P(美国 Stratagene 公司)。

1.5 流式细胞术检测 CD3⁺ T 细胞及 IFN- γ 或 IL-4 阳性细胞的比例

根据荧光确定细胞门,每份标本计数 2×10^5 个细胞,并计算出表达 CD3、IFN- γ 或 IL-4 阳性细胞的百分率,用阴性对照设定阳性染色细胞的 cut-off 值。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 15.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间数据比较采用配对样本 *t* 检验。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 外周血 CD4⁺ T 细胞分离和 TSA、NaB 暴露下细胞增殖情况

磁珠法分离健康人外周血 CD4⁺ T 细胞,纯度达 $(96.4 \pm 2.6)\%$,得率 80% 以上,可以一次性得到 3×10^7 CD4⁺ T 细胞(图 1A)。当 TSA 和 NaB 暴露浓度分别为 0.33 μ mol/L 和 1.4 mmol/L 时,镜下观察发现 CD4⁺ T 细胞数目高于对照组(图 1B)。

2.2 上清中细胞因子 IL-4、IFN- γ 水平的检测结果

在 TSA、NaB 作用下,HDAC 受抑制。实验采用 ELISA 方法检测 CD4⁺ T 细胞细胞因子分泌情况。CD4⁺ T 细胞在体外培养 48 h 后,细胞因子的分泌量达到平台期(图 2A),所以本研究选择加入 PHA 刺激 48 h 作为检测时间点。结果显示:TSA 和 NaB 组细胞上清中 IFN- γ 、IL-4 分泌量均上升($P=0.002,0.00,P=0.001,0.007$),各组与对照组的差异均有统计学意义,而 IFN- γ 分泌增加幅度高于 IL-4(图 2B)。

2.3 细胞因子 IL-4、IFN- γ mRNA 的表达

采用 SYBR Green I 荧光嵌合法 real-time PCR 检测各组 IFN- γ 、IL-4 mRNA 表达的变化,结果用 $\Delta\Delta$ Ct 法分析,GAPDH 作为参照基因对各组样品进行归一化处理,系统自动计算出各组 mRNA 变化倍数。结果显示:TSA 组、NaB 组相比对照组 IFN- γ mRNA 提

高到(3.12±0.34)倍、(2.3±0.51)倍, 差异有统计学意义($P=0.00, P=0.00$); IL-4 mRNA 表达提高到(1.87±0.42)倍、(1.63±0.51)倍, 差异有统计

学意义($P=0.00, P=0.00$), 即 TSA、NaB 能够从 mRNA 水平上调 IFN- γ 和 IL-4 表达(图 3)。

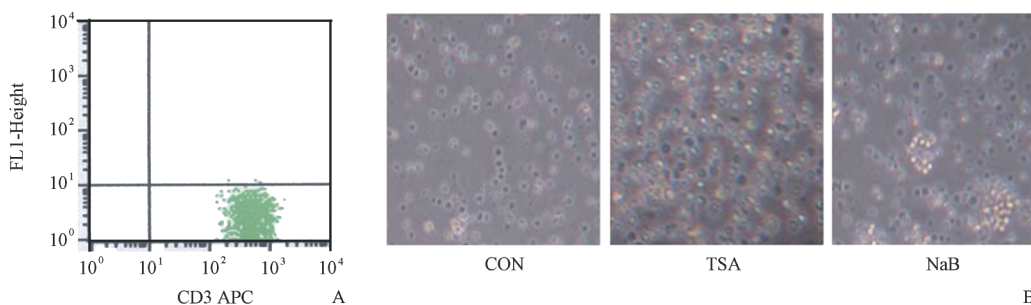


图 1 TSA 和 NaB 作用对磁珠分离纯化的 CD4⁺T 细胞增殖的影响

Fig 1 Proliferation of CD4⁺T cells enriched from PBMC using magnetic beads after treatment with TSA and NaB

A: Flow cytometry analysis of CD3 expression in CD4⁺T cells; B: CD4⁺T cell proliferation in TSA(0.33 $\mu\text{mol/L}$) and NaB(1.4 mmol/L) groups at 48 h. Original magnification: $\times 400$ (B)

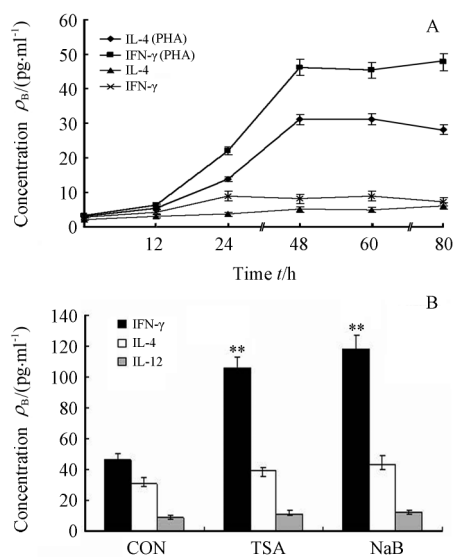


图 2 TSA、NaB 暴露对 CD4⁺T 细胞 IL-4、IFN- γ 等细胞因子表达的影响

Fig 2 Effect of TSA and NaB on expression of IL-4, IFN- γ , and IL-12 in CD4⁺T cells

A: Time-dependent curve of expression in TSA and NaB groups; B: TSA and NaB treatment increased IL-4 and IFN- γ expression in CD4⁺T cells at 48 h. $** P<0.01$ vs CON group; $n=3, \bar{x}\pm s$

2.4 CD4⁺T 淋巴细胞亚群的检测 PHA 刺激 48 h 后, 分别用 IL-4 和 IFN- γ 抗体标记干预组(TSA、NaB)和对照组 CD4⁺T 细胞。检测数据显示, 干预组 IFN- γ ⁺T 细胞比例(61.6%、42.5%)分别比对照组(32.6%)上升了 1.89 倍和 1.30 倍, 差异有统计学意义($P=0.00, 0.007$)。干预组 IL-4⁺T 细胞比例(45.6%、39.21%)与对照组(46.5%)相比则有降低, 但差异没有统计学意义($P=0.574, 0.057$)。其净效应是改变了 IFN- γ ⁺细胞/IL-4⁺细胞

比值。TSA 组和 NaB 组 IFN- γ ⁺细胞/IL-4⁺细胞比值明显升高, 是对照组的 1.93 倍和 1.55 倍($P=0.00, 0.0012$, 图 4)。结果提示在抑制剂的作用下 Th0 向 Th1 分化方向上占优势, 出现了“Th1/Th2 平衡的漂移”现象。

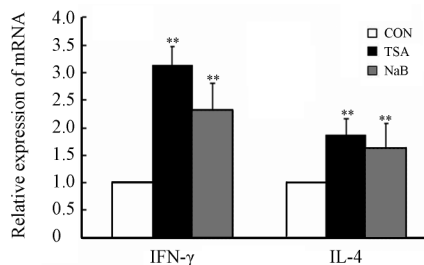


图 3 TSA、NaB 对 CD4⁺T 细胞 IL-4、IFN- γ mRNA 表达的影响

Fig 3 TSA and NaB increased IL-4 and IFN- γ mRNA expression in CD4⁺T cells at 48 h

$** P<0.01$ vs CON group; $n=3, \bar{x}\pm s$

3 讨论

Th1 和 Th2 细胞因子分别介导细胞免疫反应和体液免疫反应。它们之间存在着交互调节的关系, 即 Th1/Th2 功能平衡^[4]。但在某些疾病状态下, Th0 细胞受特异抗原的刺激时, 一方面可能向 Th1 方向发展, 另一方面可能向 Th2 方向发展。当 Th1 细胞因子分泌增多, 将导致炎症的慢性迁移、器官特异性自身免疫病、急性排斥反应和接触性皮炎的发病或免疫病理损伤; 而 Th2 细胞因子分泌增多, 将导致特异性过敏反应以及高 IgE 综合征和嗜酸性粒细胞增多症等病变。由此可见, Th1/Th2 的平衡是维持机体处于

健康状态的重要机制之一,一旦此平衡被打破,可能引起异常的免疫应答,出现病理状态^[5]。

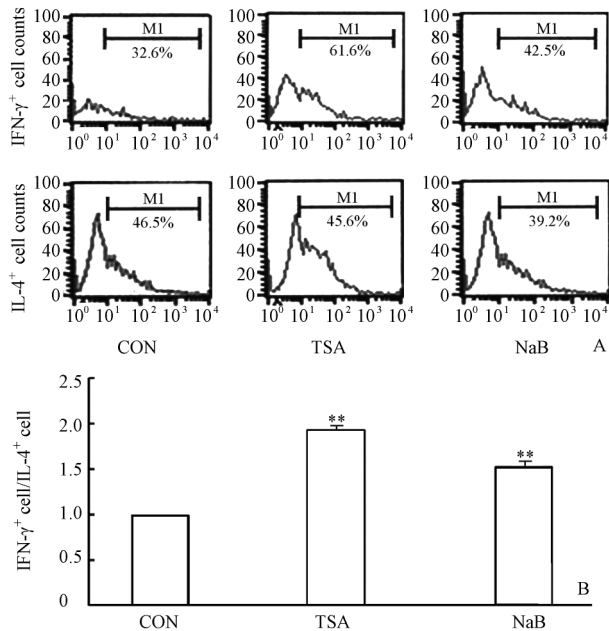


图4 TSA、NaB对CD4⁺T细胞胞内IL-4和IFN-γ分子表达的影响

Fig 4 Effects of TSA and NaB on intracellular IL-4 and IFN-γ expression in CD4⁺ T cells

A: Flow cytometry analysis of IL-4⁺/IFN-γ⁺ expression in CD4⁺ T cells; B: The ratio of INF-γ⁺/IL-4⁺ CD4⁺ T cells in TSA, NaB, and CON groups. ** P<0.01 vs CON group; n=3, $\bar{x} \pm s$

Th1和Th2的分化受细胞内、外环境因素和遗传因素影响,包括APC特性、抗原的结构和剂量、共刺激分子、MHC背景、细胞因子等。当把内外因素整合起来,发现表观遗传修饰改变是其表达调控的主要方式^[6]。目前,表观遗传修饰调控方式中研究最多的是组蛋白乙酰化和DNA去甲基化及染色质重塑。核心组蛋白的乙酰化状态存在着组蛋白乙酰基转移酶(HAT)和组蛋白去乙酰化酶(HDACs)间的动态平衡,HDIs通过抑制HDACs而改变染色质结构,在转录水平进行基因表达调控。通过基因表达谱分析,虽然HDIs仅可调节4%~12%的基因表达,但许多HDIs却具有共同分子靶标,其中也包括免疫功能的分子。因此HDIs为抗炎免疫药设计提供了一种新思路^[2]。

TSA和NaB都是良好的HDIs,其中TSA来源于链霉素的代谢产物,而NaB则来源于肠道细菌发酵食物纤维产生的四碳短链脂肪酸^[2]。近年来研究显示,TSA对多种实体瘤和白血病均有明显治疗效果,甚至在皮肤T细胞淋巴瘤治疗中已进入II期临床试验阶段^[7]。抑制癌细胞的增殖、调控细胞周期进程、诱导癌细胞凋亡这三方面作用是TSA对抗肿

瘤的主要机制^[2];同样作为HDIs,NaB则可以在更低的生理浓度下发挥与TSA相似的抑癌和调节细胞周期功能^[3,8-10]。上述研究也展示了HDAC介导的组蛋白脱乙酰化参与相关重要疾病的进展,并希望成为筛选易感人群的一个重要指标。

本研究通过同时检测CD4⁺T细胞的IL-4、IFN-γ基因表达情况,研究了组蛋白乙酰化抑制剂TSA和NaB对于Th1/Th2分化的影响。结果表明,在TSA和NaB作用下,CD4⁺T细胞培养上清中的IFN-γ增加幅度高于IL-4;同时流式细胞术数据显示:TSA和NaB组IFN-γ⁺细胞/IL-4⁺细胞比值明显升高,是对照组的1.93倍和1.55倍,表现为Th1/Th2平衡向Th1方向漂移。另外,TSA和NaB暴露条件下IFN-γ表达增加,符合H3K(histone 3 lysine)乙酰化水平增加对基因的调控效果。

综上所述,本研究结果提示组蛋白乙酰化修饰在Th1/Th2分化调控中扮演重要角色,HDAC介导H3K位置上的组蛋白脱乙酰化作用对这一过程进行调控。

[参考文献]

- [1] 黄朝凤,金戈.组蛋白去乙酰化酶与肿瘤关系研究进展[J].中国中医药资讯,2010,3:231-232.
- [2] 储卫华,冯华.组蛋白去乙酰基酶抑制剂抗肿瘤作用的研究进展[J].中国肿瘤临床与康复,2008,2:186-188.
- [3] 曾纛,郑民纛,丰岩清,冯慧宇,张成.丁酸钠和维甲酸可上调肌肉特异性基因的表达[J].中国神经精神疾病杂志,2009,35:398-401.
- [4] 华馨,卞勇华,孙晓雷,季玉红,张洁,汪晓莺,等.组蛋白去乙酰化酶抑制剂TSA对小鼠胶原诱导性关节炎的治疗作用[J].中华微生物学和免疫学杂志,2010,30:785-790.
- [5] 姚金晶,陈宜涛.Th1/Th2平衡调节与疾病发生的研究进展[J].现代生物医学进展,2009,9:2597-2600.
- [6] Sanders V M. Epigenetic regulation of Th1 and Th2 cell development[J]. Brain Behav Immun,2006,20:317-324.
- [7] Trus M R, Yang L, Suarez Saiz F, Bordeleau L, Jurisica I, Minden M D. The histone deacetylase inhibitor valproic acid alters sensitivity towards all trans retinoic acid in acute myeloblastic leukemia cells[J]. Leukemia,2005,19:1161-1168.
- [8] 胡光胜,石巍,廖爱军,曹文涛,曾斌,廖丹.姜黄素和TSA对胃癌c-myc表达影响[J].医学研究杂志,2010,5:82-83.
- [9] Qu W, Kang Y D, Zhou M S, Fu L L, Hua Z H, Wang L M. Experimental study on inhibitory effects of histone deacetylase inhibitor MS-275 and TSA on bladder cancer cells[J]. Urol Oncol,2010,28:648-654.
- [10] Han S, Lu J, Zhang Y, Cheng C, Li L, Han L, et al. HDAC inhibitors TSA and sodium butyrate enhanced the human IL-5 expression by altering histone acetylation status at its promoter region[J]. Immunol Lett,2007,108:143-150.