

• 论 著 •

溃疡性结肠炎患者外周血 T-bet/GATA-3 基因平衡的检测

张少华

(湖北省咸宁市中心血站体检科 437100)

摘要:目的 研究溃疡性结肠炎(UC)患者 Th₁、Th₂ 类细胞因子和转录因子 T-bet 和 GATA-3 的相关性,探讨它们在 UC 患者发病机制中的作用。方法 选择 40 例 UC 患者,分离外周血单核细胞,分别用酶联免疫吸附实验和 RT-PCR 技术检测 UC 患者血清中的 IFN- γ 、IL-4 和外周血单核细胞转录因子 T-bet 和 GATA-3 的表达状态,同时以 40 例健康人作对照。结果 UC 患者血清中 IL-4 水平较健康人降低,IFN- γ 的水平升高;GATA-3 mRNA 表达水平下降,T-bet mRNA 表达水平升高。结论 UC 患者外周血 Th₁/Th₂ 比例失衡,可能与外周血中 GATA-3 基因表达下降、T-bet 基因表达升高相关;T-bet/GATA-3 的表达失调可能引起 UC 患者的细胞免疫紊乱。

关键词:结肠炎,溃疡性; GATA3 转录因子; 细胞因子类

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.01.018

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)01-0038-02

Detection of the T-bet and GATA-3 Balance on T Cell in Ulcerative Colitis Patients

Zhang Shaohua

(Department of the Physical Examination, the Blood Center of Xianning City, Xianning 437100, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between the transcription factor T-bet/GATA-3 and the Th₁ and Th₂ related factors in Ulcerative colitis(UC), and to analyse the role of them in the pathogenesis of UC. **Methods** Anti-coagulated venous blood by heparin was collected from UC patients and healthy people. Serum IFN- γ and IL-4 and the expression of T-bet/GATA-3 mRNA in PBMC were analysed by ELISA and RT-PCR. **Results** Compared with the 40 normal controls, the level of serum IL-4 and the gene expression of GATA-3 mRNA was significantly decreased ($P < 0.05$). The level of Serum IFN- γ and the expression of T-bet mRNA in PBMC in UC patients was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** The level of Th₁/Th₂ cytokine is of imbalance in UC patients, which is related to the low expression of GATA-3 and high expression of T-bet, and the abnormal expressions of T-bet/GATA-3 in PBMC may involve in UC immunopathogenesis.

Key words: UC; GATA-3; Cytokines

Th₁/Th₂ 细胞分化平衡状态在许多疾病的发病机制中发挥重要作用。溃疡性结肠炎(UC)是 1 种病因不明的免疫性疾病,目前还难以找到特异而有效的治疗方法。近年来研究表明,UC 患者 Th 细胞免疫失衡与其发病机制密切相关,但其具体机制尚未完全明确^[1]。文献报道,两种新的转录因子 T-bet 和 GATA-3 的平衡对调控 Th₁/Th₂ 分化至关重要,T-bet 和 GATA-3 分子的相对优势可能决定 Th₀ 细胞漂移的方向^[2]。本文通过检测 UC 患者外周血 T 细胞转录因子 T-bet 和 GATA-3 的表达状况,以及患者血清中 IFN- γ 、IL-4 的表达水平,探讨其发病机制,并为 UC 的临床治疗提供新的理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 40 例 UC 患者取自咸宁学院附属医院,其中男 22 例,女 18 例;年龄 23~64 岁,中位年龄 33 岁,均符合 UC 患者诊断标准,并于用药前取外周抗凝血^[3]。健康对照组 40 例取自本院体检部,排除 UC 及其他自身免疫性疾病,其中男 22 例,女 18 例;年龄 22~58 岁,中位年龄 32 岁。

1.2 试剂 TaqDNA 聚合酶(Promega 公司),Trizol 试剂(GIBCO 公司),PCR 引物设计由上海卓康生物公司合成,ELISA 试剂盒购自达科为科技公司。

1.3 方法 1)RT-PCR 检测转录因子 T-bet 和 GATA-3 基因的表达:分别抽取 CIP 患者和健康对照组外周静脉血 5 mL,采用肝素钠抗凝,Ficoll 密度梯度离心法分离 PBMC,将分离的单核细胞洗涤后置于低温冻存备用,运用异硫氰酸胍一步法提取 RNA,用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度,取 2 μ g 进行逆转录。引物序列 T-bet: P1 为 5'-CCT CGC ACC TGG AGG CTG GCT G-3'; P2 为 5'-TTA TCA GTT GGG AAA ATA GTT A-3',扩增的长度为 334 bp。GATA-3: P1 为

5'-GAA TGC CAA TGG GGA CCC TG-3', P2 为 5'-CTA ACC CAT GGC GGT GAC CA-3',扩增长度为 343 bp。以 β -actin 为内参照,对 RT-PCR 结果,采用凝胶电泳进行软件分析,基因表达强度以 T-bet 或 GATA-3/ β -actin 的比值表示。2) ELISA 法检测血清中 IFN- γ 、IL-4 的表达:取冻存的患者血清,采用 ELISA 法检测血清中 IFN- γ 、IL-4 水平,具体操作按试剂盒提供的说明书进行,每个样本和标准品均设 3 个复孔,酶标测试仪 450 nm 处读数,根据标准曲线,读出细胞因子的水平(以 pg/mL 为单位)。

1.4 统计学处理 实验结果以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS11.0 软件分析,采用两样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UC 患者外周血 T 细胞转录因子 T-bet 和 GATA-3 基因的表达结果显示,UC 患者外周血 T 细胞转录因子 T-bet 基因的表达水平明显高于健康对照组,GATA-3 基因的表达低于健康对照组,T-bet/GATA-3 的比值明显高于健康对照组, $P < 0.05$,详见表 1。

表 1 UC 患者外周血 T 细胞转录因子 T-bet 和 GATA-3 的表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	T-bet(pg/mL)	GATA-3(pg/mL)	T-bet/GATA-3
UC 组	0.32 \pm 0.18*	0.11 \pm 0.01*	2.91 \pm 2.50*
健康对照组	0.13 \pm 0.04	0.15 \pm 0.02	0.88 \pm 0.21

注:与健康对照组比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 UC 患者外周血细胞因子 IFN- γ 、IL-4 表达水平的检测结果显示,UC 患者外周血中 IFN- γ 表达水平明显高于健康对照组,IL-4 的表达水平低于健康对照组,IFN- γ /IL-4 的比值明显

高于健康对照组, $P < 0.05$, 见表 2。

表 2 UC 患者外周血细胞因子 IFN- γ 、IL-4 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IFN- γ (pg/mL)	IL-4(pg/mL)	IFN- γ /IL-4
UC 组	20.44 \pm 7.21*	13.26 \pm 5.12*	1.54 \pm 1.41*
健康对照组	11.15 \pm 4.02	19.33 \pm 4.54	0.58 \pm 0.88

注:与健康对照组比较,* $P < 0.05$ 。

3 讨 论

UC 是 1 种病因不明的免疫性疾病,目前还难以找到特异而有效的治疗方法。近年来研究表明,UC 患者 Th 细胞免疫失衡与其发病机制密切相关。Th 细胞亚群及其相互间的平衡在免疫应答的调节中起到关键作用,Th₁ 细胞主要介导与细胞毒和局部炎症反应有关的免疫应答,参与细胞免疫与迟发型超敏性炎症反应;Th₂ 细胞的主要功能为刺激 B 细胞增生并产生抗体,与体液免疫应答有关。其中 Th₁ 细胞主要分泌 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 等,以分泌 IFN- γ 为特征;Th₂ 细胞主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 等,以分泌 IL-4 为特征,T 细胞的分化具有一定的可塑性,其分化受多种内外因素的影响^[4]。

T-bet 属转因子 T-box 超家族成员,可诱导原代 T 细胞表达 T-bet,促进其向 Th₁ 细胞分化和分泌 IFN- γ ,还发现 T-bet 表达和作用不依赖 IL-12/STAT-4 途径。此外,T-bet 基因敲除小鼠的 NK 细胞和 Th₁ 细胞其 IFN- γ 表达显著降低,但是 IL-4 和 IL-5 等 Th₂ 型细胞因子表达水平明显增加。与 T-bet 调控 Th₁ 细胞分化的作用相反,GATA-3(1 种锌指状基序转录因子,以 GATA 序列作为其 DNA 同源性序列)可调节 Th₂ 细胞分化和分泌 Th₂ 型细胞因子,从而抑制 Th₁ 细胞分化和分泌 IFN- γ 。机体 Th₁/Th₂ 细胞分化失衡,可导致肿瘤、感染、自身免疫性疾病及移植排斥反应。在类风湿关节炎、银屑病中,Th₁ 及其细胞因子占优势;而在系统性红斑狼疮及 HIV 感染等患者中,Th₂ 细胞及其细胞因子占优势,通过逆转 Th₁/Th₂ 细胞分化失衡可在一定程度上改善病情^[5-8]。

本研究结果显示,UC 患者血清中 IFN- γ 水平升高,IL-4 的水平降低,说明 Th₁ 细胞活性处于优势,而 Th₂ 细胞处于相对弱势,提示 UC 患者细胞免疫异常为主,而体液 GATA-3 免疫受抑制。同时,监测转录因子 T-bet 与 GATA-3 的表达情况发现,患者外周血 T 细胞高表达 T-bet,而 GATA-3 的表达下降,与国外相关报道一致。GATA-3 水平下降,不能促进 Th₀ 细胞向 Th₂ 细胞分化,而 T-bet 水平升高,可促使 Th₁ 细胞的

分化和细胞因子的水平升高,最后导致机体呈 Th₁ 优势表达^[9]。

本研究认为,把 Th₀ 细胞向 Th₁/Th₂ 细胞分化这个环节作为治疗 UC 的新靶点,将 Th₁ 状态逆转为 Th₂ 状态,或许会成为 UC 免疫治疗的 1 个新途径。因此,通过调节 T-bet 与 GATA-3 表达,可纠正 Th₁/Th₂ 细胞分化失衡,为包括 UC 在内其他 Th 细胞免疫紊乱的相关疾病提供新思路。

参考文献

- [1] Kang HY, Lee JY, Lee JS, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors-gamma activator, ciglitazone, inhibits human melanocyte growth through induction of apoptosis [J]. Arch Dermatol Res, 2006, 11(5): 1-5.
- [2] Wang T, Zhao H, Ren H, et al. Type 1 and type 2 T-cell profiles in idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. Haematologica, 2005, 90(7): 914-923.
- [3] 中华医学会消化病学分会. 对炎性反应肠病诊断治疗规范的建议[J]. 中华消化杂志, 2001, 21(6): 236-239.
- [4] Wu CL, Xu JC, Fang LI, et al. Polarization and apoptosis of T cell subsets in idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. Int J Lab Hematol, 2007, 29(3): 177-184.
- [5] 陈晋广,任小丽. T-bet 和 GATA-3 对银屑病 Th₀ 细胞漂移作用的研究[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2007, 23(11): 966-967.
- [6] 朱奕薛,伍昌林,薛俭成. 特发性血小板减少性紫癜患者外周血调节性 T 细胞的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(6): 490-491.
- [7] 庞艳华,郝建宇,关玉盘,等. 溃疡性结肠炎患者 Th₁ 类细胞因子的表达[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(14): 1665-1667.
- [8] 张素真,张德纯. 溃疡性结肠炎发病的免疫学机制[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(5): 490-491.
- [9] Kawashima M, Miossec P. mRNA quantification of T-bet, GATA-3, IFN-gamma, and IL-4 shows a defective Th₁ immune response in the peripheral blood from rheumatoid arthritis patients: link with disease activity[J]. J Clin Immunol, 2005, 25(3): 209-214.