

慢性再生障碍性贫血患者中医证型与 T-bet/GATA-3 相关信号通路、Th 亚群的相关性

李 峻^{1*} 周永明² 胡明辉² 孙伟玲² 薛志忠²

(1. 江苏省中医院血液科, 南京市汉中路 155 号, 210029;

2. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院血液科, 检验科)

基金项目: 上海市教育委员会科研项目资助(07CZ031); 上海市卫生局青年科研项目资助(2007Y64)

* 通讯作者: leejohnner2005@yahoo.com.cn, 15051846937

[摘要] **目的** 从 Th 细胞失衡、转录因子 T-bet/GATA-3 及相关信号通路水平分析其与慢性再生障碍性贫血(CAA)中医证型的关系。**方法** 选择 CAA 患者, 辨证分为脾肾阳虚组和脾肾阴虚组各 20 例, 另选 20 例健康者做对照(正常组), 采用实时荧光定量 PCR 检测 CAA 患者外周血单个核细胞(PBMNC) T-bet、GATA-3 及 STAT4、STAT6 mRNA 表达, 采用流式细胞术、酶联免疫吸附法检测 CAA 患者外周血 Th1、Th2 比例及 PBMNC 培养上清 IFN- γ 、IL-12、IL-4 水平。**结果** 脾肾阴虚组患者 PBMNC T-bet、STAT4、T-bet/GATA-3 比值、Th1、IFN- γ 、IL-12 均高于脾肾阳虚组($P < 0.05$), 并且此 2 组患者亦高于正常组($P < 0.05$), 而 GATA-3、STAT6、IL-4 3 组比较则无统计学差异($P > 0.05$)。**结论** 与脾肾阳虚型患者相比, CAA 脾肾阴虚型存在更严重的 IFN- γ /T-bet、IL-12/STAT4 通路异常活化和 Th1 偏移, 脾肾阴虚型存在更明显的免疫异常状态。

[关键词] 慢性再生障碍性贫血; T-bet; STAT4; Th1/Th2 失衡; 中医证型

Correlation between TCM Syndromes and the T-bet/GATA-3 Related Signal Paths and Th Subgroup in Chronic Aplastic Anemia Patients

LI Jun¹, ZHOU Yongming², HU Minghui², SUN Weiling², XUE Zhizhong²

(1. Jiangsu Provincial TCM Hospital, Nanjing 210029; 2. Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To analyze the correlation between TCM Syndromes of chronic aplastic anemia (CAA) patients and the transcription factor T-bet/GATA-3 and its related signal paths from the Th cells imbalance. **Methods** The CAA patients, who were diagnosed as spleen and kidney yang deficiency type and spleen and kidney yin deficiency type, 20 cases each, were tested with realtime PCR to determine the expression of T-bet, GATA-3, STAT4, and STAT6 mRNA of the mononuclear cells of peripheral blood (PBMNC), and the ratio of Th1 and Th2 and the levels of IFN- γ , IL-12, and IL-4 in the cultured supernatant of PBMNC were examined with flow cytometry (FCM) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Twenty healthy people were taken as the normal control group for comparison. **Results** The PBMNC T-bet, STAT4, T-bet/GATA-3, Th1, IFN- γ and IL-12 of those with spleen and kidney yin deficiency were all higher than those of spleen and kidney yang deficiency type ($P < 0.05$), and the above indexes of both treated groups were all higher than the normal control group. GATA-3, STAT6, Th2, and IL-4 of the three groups were without significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion** Compared with spleen and kidney yang deficiency patients, spleen and kidney yin deficiency patients have more serious abnormal activation of IFN- γ /T-bet and IL-12/STAT4 paths and Th1 excursion, and they have also more obvious immune abnormality.

Key Words chronic aplastic anemia (CAA); T-bet; STAT4; Th1/Th2 imbalance; TCM syndromes

再生障碍性贫血(aplastic anemia, AA)是一种以全血细胞减少和骨髓造血衰竭为特征的血液系统难治性疾病。研究表明, AA 患者免疫功能异常, 尤其是 T 细胞免疫功能异常在其发病过程中起重要作用。免疫学基础研究表明, Th1/Th2 分化和转化受多种因素影响, 其中以局部微环境的调节尤为重要, T-bet (T-box expressed in T cells) 和 GATA-3 (GATA

binding protein³) 作为特异性 Th 细胞转录因子, 在 Th 细胞分化发育中发挥重要的作用^[1]。研究表明, AA 患者存在 T-bet 的过度表达, 且和患者的免疫异常、疾病活动性相关^[2]。本研究从 T-bet/GATA-3 相关信号通路及 Th 亚群失衡角度探讨慢性再生障碍性贫血(CAA)中医证型与异常免疫指标之间的关系, 以进一步说明 AA 辨证分型的客观基础。

1 资料及方法

1.1 诊断标准

西医诊断标准符合《血液病诊断及疗效标准》^[3] (第2版)中CAA的诊断标准。中医证候诊断标准按照文献^[4]标准,结合周永明教授经验作适当合并,将治疗组患者分为脾肾阳虚型和脾肾阴虚型。①脾肾阳虚型:面色苍白、形寒肢冷、食少便溏、腰膝酸软、时有齿衄、肌衄、阳痿早泄,舌淡胖有齿痕,脉沉细。②脾肾阴虚型:面色苍白、头晕耳鸣、腰膝酸软、手足心热、心烦易怒、低热盗汗、口燥咽干、时有齿衄、肌衄,舌淡红偏干、苔少,脉弦细数。

1.2 纳入标准

①符合CAA诊断标准;②符合以上中医证候诊断标准;③愿意接受本研究方案;④年龄12~75岁;⑤所有患者入选时未用环孢菌素(CsA)和停用雄激素治疗2周以上。

1.3 排除标准

①肝肾功能异常者;②过敏体质或对多种药物过敏者;③妊娠期或哺乳期患者;④严重心脏病,包括心肌梗死、心功能不全3级以上者。

1.4 一般资料

病例均来源于上海中医药大学附属岳阳医院2006年3月~2008年12月期间的门诊和住院患者,脾肾阳虚型患者(脾肾阳虚组)20例,男7例,女13例;年龄14~65岁,平均(41.2±15.3)岁;病程1~48个月,平均18个月。脾肾阴虚型患者(脾肾阴虚组)20例,男8例,女12例;年龄13~63岁,平均(39.2±17.4)岁;病程1~47个月,平均17个月。两组患者一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。另选择20例正常人(正常组)为岳阳医院体检中心健康体检者,男10例,女10例,年龄15~70岁,平均(42.2±16.5)岁。

1.5 检测指标及方法

检测20例脾肾阳虚组患者、20例脾肾阴虚组患者外周血单个核细胞(PBMNC)转录因子T-bet、GATA-3及相关信号分子mRNA表达;检测14例脾肾阳虚组患者、16例脾肾阴虚组患者外周血Th1、Th2比例及PBMNC培养上清细胞因子分泌情况,检测20例正常组上述指标。

1.5.1 转录因子及信号分子检测 采用实时荧光定量PCR(Realtime FQ-PCR)方法检测PBMNC转录因子T-bet、GATA-3及信号分子STAT4、STAT6 mRNA表达。主要试剂与仪器:TRIZOL(联合生物

集团公司),FQ-PCR试剂盒(达辉生物公司),Real-time PCR检测仪ABI-7300(ABI公司)。基因探针及引物序列:GAPDH TaqMan 探针(Pro):5'-FAM-CATCCTGGGCTACACTGAGGACCA-TAMRA-3',上游引物F:5'-CCGAGGGCCCCACTAAAGG-3',下游引物R:5'-GCTGTTGAAGT-CACAGGAGACAA-3';GATA-3 TaqMan 探针(Pro):5'-FAM-AAATGGCTTGCT-CAGGGAAGT-TAMRA-3',上游引物F:5'-GGCACGGGACACTACCTG-3',下游引物R:5'-GTCCCCATTGGCATTTCCT-3';T-bet TaqMan 探针(Pro):5'-FAM-TTCCGGGTG-GCAGCTGACAT-TAMRA-3',上游引物F:5'-ATGTGACCCAGATGA-TTGTGC-3',下游引物R:5'-CTTGGAAAGTAAAGATATGCCGTG-3';STAT6 TaqMan 探针(Pro):5'-FAM-TTCCTGT-CACCTGCTTGCC-TCAGTCACT-TAMRA-3',上游引物F:5'-TGCCTGCCCTACTGTGG-3',下游引物R:5'-GCTGAGTAAGGTGGCTTTGAGT-3';STAT4 TaqMan 探针(Pro):5'-FAM-CTC-CCAGCCGTGCGAAGTTTCAAGACC-TAMRA-3',上游引物F:5'-ACAAAGCCTTTG-GCAAACACTAC-3',下游引物R:5'-CACTTCG-GATTGTTGAAATGG-GTAT-3'。实验方法参照文献^[5]。数据分析:采用仪器自带软件ABI Prism 7300 SDS Software,基于循环阈值(cycle threshold, CT)与靶基因初始拷贝数的对数之间的线性关系,通过比较T-bet、GATA-3、STAT4、STAT6与GAPDH的CT值来定量靶基因的相对表达量。mRNA相对表达量= $2^{-\Delta t} \times 100\%$, Δt = 目标基因CT值 - 内参(GAPDH)CT值,靶基因相对于正常对照组的倍数= $2^{-[\Delta t(\text{靶基因}) - \Delta t(\text{正常组})]}$, $\Delta t(\text{正常组})$ = 正常组目标基因CT平均值 - 正常组GAPDH CT平均值。

1.5.2 Th 亚群检测 采用流式细胞仪测定外周血Th1、Th2细胞比例。主要试剂与仪器:佛波酯(PMA,上海明睿生物技术有限公司),离子霉素(Ionomycin,美国Alexis公司),布雷菲德菌素A(BFA,美国Sigma公司),RPMI1640(美国Gibco公司),胎牛血清(FBS,杭州四季青生物制品公司),二甲基亚砷(DMSO,美国Sigma公司),单抗CD3PerCP、CD8-APC、IFN- γ FITC/IL-4PE、FACS通透液、FACS溶血素、流式细胞仪(FACS Areal)均为美国BD公司产品。实验步骤参照文献^[6]。

表1 3组受试者PBMNC T-bet、GATA-3、STAT4、STAT6表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	T-bet	GATA-3	T-bet/GATA-3	STAT4	STAT6
脾肾阴虚组	20	6.00±2.16*#	1.15±0.36	5.51±2.18*#	5.11±1.74*#	1.02±0.31
脾肾阳虚组	20	4.22±2.04*	1.16±0.34	3.58±1.23*	3.94±1.41*	1.07±0.38
正常组	20	1.03±0.19	1.03±0.19	1.03±0.26	1.00±0.22	1.00±0.25

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与脾肾阳虚组比较,# $P<0.05$

1.5.3 细胞因子检测 酶联免疫吸附法(ELISA)检测外周血单个核细胞培养上清 γ 干扰素(IFN- γ)、白细胞介素12(IL-12)、白细胞介素4(IL-4)的表达水平。主要仪器与试剂:酶标仪(Bio-RAD680型),人IL-12(p70)定量试剂盒、人IL-4定量试剂盒、人IFN- γ 定量试剂盒均为上海森雄科技公司产品,植物血球凝集素(PHA-P,L1668,Sigma公司)。实验方法:肝素抗凝,采集患者外周血4ml,用淋巴细胞分离液分离单个核细胞,含10%FBSRPMI 1640培养液调整细胞浓度为 2×10^6 /ml,加入PHA $10 \mu\text{g}$ /ml,放入37℃、5%CO₂条件培养箱中培养72h,离心(10000r/min,5min)收集上清液,-20℃储存待测,采用ELISA法检测细胞因子IFN- γ 、IL-12、IL-4的表达水平,检测方法严格按试剂盒说明书操作。

1.6 统计学方法

数据统计分析采用SPSS 13.0软件。计量资料数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,多个样本均数间的两两比较采用SNK检验。

2 结果

2.1 各组受试者PBMNC转录因子、信号分子表达比较

表1示,与正常组相比,脾肾阴虚与脾肾阳虚组患者PBMNC T-bet、STAT4表达及T-bet/GATA-3比值均升高($P<0.05$),而GATA-3和STAT6表达则无统计学差异($P>0.05$);与脾肾阳虚组患者相比,脾肾阴虚组PBMNC T-bet、STAT4表达及T-bet/GATA-3比值均升高($P<0.05$),而GATA-3和STAT6表达无统计学差异($P>0.05$)。

2.2 不同中医证型外周血Th1、Th2细胞比例比较

表2示,脾肾阴虚与脾肾阳虚组CAA患者Th1比例及Th1/Th2比值均高于正常组($P<0.05$),而Th2比例与正常组相比无统计学差异($P>0.05$);与脾肾阳虚组患者相比,脾肾阴虚组Th1比例升高($P<0.05$),而Th2比例及Th1/Th2比值则无统计学差异($P>0.05$)。

表2 3组受试者外周血Th1、Th2比例比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Th1(%)	Th2(%)	Th1/Th2
脾肾阴虚组	16	23.28±2.47*#	1.36±0.39	18.23±5.07*
脾肾阳虚组	14	18.46±1.67*	1.24±0.32	15.87±4.13*
正常组	20	9.91±1.48	1.14±0.24	9.00±2.02

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与脾肾阳虚组比较,# $P<0.05$

2.3 不同中医证型PBMNC培养上清细胞因子表达比较

表3示,脾肾阴虚与脾肾阳虚组CAA患者PBMNC培养上清IFN- γ 、IL-12均高于正常组($P<0.05$),而IL-4与正常组相比无统计学差异($P>0.05$);与脾肾阳虚组患者相比,脾肾阴虚组PBMNC培养上清IFN- γ 、IL-12均升高($P<0.05$),而IL-4则无统计学差异($P>0.05$)。

表3 3组受试者PBMNC培养上清IFN- γ 、IL-12、IL-4比较(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IFN- γ	IL-12	IL-4
脾肾阴虚组	16	79.40±11.67*#	44.36±8.42*#	20.78±4.90
脾肾阳虚组	14	68.69±9.36*	34.93±4.43*	20.23±2.84
正常组	20	29.58±8.50	20.61±6.53	22.15±4.07

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与脾肾阳虚组比较,# $P<0.05$

3 讨论

Th1、Th2细胞分化及其相互之间的平衡在免疫应答的调节中起着关键的作用,现已证实Th1、Th2细胞是由初始型CD4⁺T细胞(Th0细胞),在抗原-抗原受体、共刺激信号分子、胞外细胞因子、胞内信号转导分子、核转录因子等共同作用下分化发育而来,决定Th1和Th2两型细胞生物学特征的关键因素是它们所分泌细胞因子的种类^[7]。近年来体内外实验研究表明,CAA患者存在明显的Th1、Th2失衡^[8]。本研究结果显示,CAA患者外周血Th1比例、PBMNC IFN- γ 分泌水平平均明显高于正常人,而Th2比例、IL-4分泌水平和正常人没有明显差异,Th1/Th2比值明显升高,Th1/Th2平衡向Th1偏移,与以上文献报道相似。

亚群特异性转录因子T-bet、GATA-3在T细胞亚群分化过程中具有重要的调节作用,维持了Th亚

群表型,调节了Th1/Th2分化,即转录因子调节Th细胞亚群分化^[9]。T-bet在T细胞活化过程中能被IFN- γ 诱导而上调,这是通过STAT1依赖的途径所致,IFN- γ 通过一个自分泌反馈环控制T-bet的表达而调节自身表达。IL-12能通过增强IFN- γ 表达而间接增加T-bet的表达,研究表明T-bet的诱导并不依赖IL-12,但能被IL-4/STAT6所抑制。T-bet在Th1细胞分化中起着决定性作用。本研究结果显示,治疗前CAA患者T-bet在转录水平表达明显高于正常人,且T-bet和外周血Th1细胞比例、PBMNC IFN- γ 分泌水平成正相关性,因而T-bet在CAA患者Th1亢进、免疫异常激活过程中起到重要作用。GATA-3属于GATA转录因子家族,是T细胞发育中最重要的转录调节因子之一,GATA-3能抑制IFN- γ 的表达,导致Th1亚群的抑制和Th2亚群的分化。本结果显示,CAA患者GATA-3、STAT6在转录水平表达与正常人无明显差异,PBMNC IL-4分泌水平也与正常人无明显差异,说明IL-4/STAT6/GATA-3通路在CAA的Th1/Th2失衡、Th1漂移发生中在基因转录水平没有发生明显变化。由于本研究病例数较少,进一步研究可增加样本数,同时检测STAT6、GATA-3蛋白磷酸化水平的变化以明确其在CAA患者Th1漂移中是否发生活化或抑制。

本结果表明,治疗前CAA患者PBMNC分泌IL-12、STAT4转录水平均明显高于正常人,因而IL-12/STAT4通路的异常激活在CAATh细胞失衡的免疫发病机制中也起着重要作用。CAA患者存在T-bet、IFN- γ 、IL-12、STAT4的过度表达,且和Th1细胞增高相关,因而,IFN- γ /T-bet通路、IL-12/STAT4通路的异常活化在CAA患者Th1/Th2失衡发生中可能起到关键的作用,两者之间可能存在着协同关系。而IL-4分泌、STAT6/GATA-3 mRNA表达及Th2比例与正常人比较没有明显差异,提示IL-4/STAT6/GATA-3通路在CAA的Th1/Th2失衡发生中基因转录水平没有发生明显变化。

一些学者^[10]提出中医证的本质是细胞因子,认为其基本发病机制是由于细胞因子网络的平衡紊乱。而Th1/Th2平衡是细胞因子网络平衡的“枢纽”,Th1/Th2失衡水平与中医证本质有着一定关系^[11]。免疫异常是AA发病的关键所在,而临床实践证实中医药辨证治疗AA疗效肯定。本研究将CAA分为脾肾阴虚和脾肾阳虚两型,两型之间比较,脾肾

阴虚型患者PBMNC T-bet、STAT4 mRNA表达、T-bet/GATA-3比值、Th1、IFN- γ 、IL-12水平均高于脾肾阳虚组患者,而GATA-3、STAT6、Th1/Th2比值、Th2、IL-4水平比较,则无明显差异,以上结果表明,与脾肾阳虚组患者相比,脾肾阴虚者存在更明显的Th1/Th2失衡及IFN- γ /T-bet、IL-12/STAT4通路的异常活化,其免疫异常程度更明显,这可能是CAA脾肾阳虚组治疗效果优于脾肾阴虚型的原因所在,即“阳虚易治,阴虚难调”。

参考文献

- [1]李峻,胡明辉,周永明. T-bet、GATA3在Th1、Th2细胞分化中的作用及意义[J]. 国际免疫学杂志, 2009, 32(2): 126-131.
- [2]Solomou EE, Keyvanfar K, Young NS. T-bet, a Th1 transcription factor, is up-regulated in T cells from patients with aplastic anemia[J]. Blood, 2006, 107(10): 3983-3991.
- [3]张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 2版. 北京:科学出版社, 1999:33-39.
- [4]唐旭东,麻柔,刘锋,等. 再生障碍性贫血CD4⁺/CD8⁺T亚群的CD45RA⁺/RO⁺表达与中医辨证分型的相关性研究[J]. 四川中医, 2006, 24(1): 14-16.
- [5]王婷婷,赵辉,任贺,等. 慢性特发性血小板减少性紫癜患者I类和II类T细胞特点的研究[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(10): 669-673.
- [6]陶国华,曹兴建. 流式细胞术检测Th1/Th2的方法探讨[J]. 临床检验杂志, 2006, 24(2): 116-117.
- [7]Rao A, Avni O. Molecular aspects of T-cell differentiation[J]. Br Med Bull, 2000, 56(4): 969-984.
- [8]和虹,邵宗鸿,何广胜,等. Th1细胞在再生障碍性贫血发病中的作用[J]. 中华血液学杂志, 2002, 23(11): 574-577.
- [9]Mostoslavsky R, Alt FW, Bassing CH. Chromatin dynamics and locus accessibility in the immune system[J]. Nat Immunol, 2003, 4(7): 603-606.
- [10]申维玺. 再论中医证的本质是细胞因子[J]. 中医杂志, 2002, 43(12): 888-890.
- [11]吴婷婷,汪悦. Th1/Th2平衡紊乱与中医证本质之关系[J]. 现代中西医结合杂志, 2006, 15(6): 827-828.

(收稿日期:2010-04-20;修回日期:2010-08-11)

[编辑:邓媛]

欢迎邮购《中医杂志》光盘合订本

1951~1986年(4张光盘)480元;1987~1994年(1张光盘)260元;1995~2004年(1张光盘)280元。光盘合订本为计算机用数据光盘,收入了同期出版的全部《中医杂志》的内容,可对所有文章进行任意字检索,方便实用。汇款地址:北京东直门内南小街16号中医杂志北京医海林音像书店,邮编:100700,电话:(010)64035632,网址:<http://www.jtcm.net.cn>。