

高迁移率族蛋白 B1 对小鼠调节性 T 细胞 Toll 样受体 4 表达的影响

许长涛¹, 姚咏明², 李为民¹, 吴 瑶², 黄立锋²

(1. 解放军总医院第二附属医院肝胆外科, 北京 100091;

2. 解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所, 北京 100037)

【摘要】 目的 观察高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)对调节性 T 细胞(Treg)Toll 样受体 4(TLR4)表达的影响,初步探讨其与 Treg 免疫活性的关系。方法 用免疫磁珠法分离正常 C3H/HeN(TLR4 受体野生型)小鼠脾脏 CD4⁺CD25⁺Treg。采用可溶性抗 CD3 抗体(1 mg/L)和抗 CD28 抗体(1 mg/L)辅助活化,观察不同浓度 HMGB1(0、10、100、1 000 μg/L)刺激不同时间(24、48、72 h)后 Treg TLR4 表达的时间-效应关系和剂量-效应关系。结果 以 100 μg/L 浓度的 HMGB1 刺激,Treg TLR4 在 24、48 和 72 h 表达水平均明显受抑(*P*均<0.01),但各时间点组间比较差异无统计学意义(*P*均>0.05);不同剂量 HMGB1 刺激 48 h 可诱导 Treg TLR4 表达水平下调,其中以 100 μg/L、1 000 μg/L HMGB1 作用时 Treg TLR4 表达降低尤为明显(*P*<0.05 和 *P*<0.01)。结论 HMGB1 能显著诱导 Treg 表达 TLR4 下调,进而参与调节 Treg 的免疫活性。

【关键词】 高迁移率族蛋白 B1; Toll 样受体; 调节性 T 细胞

中图分类号:Q786;Q813.11 文献标识码:A 文章编号:1008-9691(2008)03-0167-04

Effect of high mobility group box-1 protein on Toll-like receptor 4 expression of regulatory T cells in mice
XU Chang-tao¹, YAO Yong-ming², LI Wei-min¹, WU Yao², HUANG Li-feng². 1. Hepatobiliary Surgery, Second Hospital Affiliated to The Chinese PLA General Hospital, Beijing 100091, China; 2. Burns Institute, First Hospital Affiliated to The Chinese PLA General Hospital (formerly 304th Hospital), Beijing 100037, China

Corresponding author: YAO Yong-ming (Email: c_ff@sina.com)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of high mobility group box-1 protein (HMGB1) on Toll-like receptor 4 (TLR4) expression of regulatory T cells (Tregs) and its relationship to the immunologic activity of Tregs in mice. **Methods** CD4⁺CD25⁺Tregs were isolated from C3H/HeN (TLR4 wild type) murine splenocytes with a CD4⁺CD25⁺Tregs isolation kit. Tregs were stimulated on Tregs by HMGB1 in 96-well (1×10⁵ cells/well) cell plates cultured with anti-mouse CD3 (1 mg/L) and anti-mouse CD28 (1 mg/L). After being stimulated, Tregs were harvested to determine the expression of TLR4 and analyze the time-and dose-dependent response between HMGB1 (0, 10, 100, and 1 000 μg/L) and TLR4 expression by flow cytometry at different time points (24, 48 and 72 hours). **Results** Compared with the normal control group, the expression of TLR4 on Tregs stimulated by HMGB1 (100 μg/L) was significantly down-regulated at 24, 48, and 72 hours, respectively (all *P*<0.01), and no differences in TLR4 expression on Tregs were observed among various intervals (all *P*>0.05). Meanwhile, HMGB1 at various doses (10, 100, and 1 000 μg/L) also could induce the significant down-regulation of TLR4 expression on Tregs, and it maintained low value on Tregs when stimulated by HMGB1 at doses of 100 μg/L or 1 000 μg/L (*P*<0.05 and *P*<0.01), nevertheless, no differences in TLR4 expressions were observed between 100 μg/L and 1 000 μg/L groups (*P*>0.05). **Conclusion** HMGB1 can markedly down-regulate the expression of TLR4 on Tregs, thereby possibly modulating the immunologic activity of Tregs.

【Key words】 high mobility group box-1 protein; Toll-like receptor; regulatory T cells

新近研究表明,调节性 T 细胞(Treg)在免疫反

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(2005CB522602);

国家自然科学基金资助项目(30672178)

通讯作者:姚咏明,教授,博士生导师,Email:c_ff@sina.com

作者简介:许长涛(1979-),男(汉族),辽宁省人,硕士研究生。

应的负性调节过程中起了重要作用,其免疫调节的水平将会影响机体免疫应答的发展方向^[1],因此,关于 Treg 免疫活性调节机制的研究日益受到关注。Toll 样受体(TLRs)是一类具有信号转导跨膜功

能、广谱识别能力的“模式”识别受体,已发现 Treg 高表达 TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR7、TLR8 的 mRNA,细胞表面也表达相关的 TLRs 分子,因此,多种内源性抗原或病原体相关分子模式(PAMP)可能参与调控 Treg 的活性^[2]。我们既往的资料证实,高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)作为晚期炎症因子可上调 TLR2 基因表达^[3],但其是否参与 Treg TLR4 分子的调节过程尚不清楚。本实验通过 HMGB1 体外刺激小鼠脾脏 CD4⁺CD25⁺Treg,观察 HMGB1 对 Treg TLR4 表达水平的影响,初步探讨其对 Treg 免疫活性的调节效应。

1 材料与方法

1.1 材料:雄性健康清洁级 C3H/HeN(TLR4 受体野生型)小鼠,体重(22±2)g,购自北京维通利华动物公司。RPMI 1640 培养基购自北京天润善达生物有限公司,胎牛血清(FCS)购自天海生物有限公司, HMGB1 购自美国 Sigma 公司;抗小鼠 CD3/CD28 购自美国 eBioscience 公司,异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗小鼠 TLR4 购于美国 Imgenex 公司。

1.2 Treg 制备:断颈处死小鼠后取脾脏,加磷酸盐缓冲液(PBS)研磨,过网收集细胞悬液,离心后加溶血素混匀、再离心、洗涤弃上清液,取下层细胞。

1.3 磁珠孵育和磁性分选:采用 MiniMACS 免疫磁性分离系统进行两步分离^[4-5]。先获取 CD4⁺T 细胞,再分选,获得 CD4⁺CD25⁺Treg 悬液。用体积分数为 10%的 FCS-RPMI 1640 培养基重悬 Treg,调整细胞浓度为 1×10⁹/L,接种于 96 孔细胞培养板。

1.4 细胞分组和处理:96 孔培养板,根据加入 HMGB1 剂量不同随机分为 0(对照组)、10、100 和 1 000 μg/L 组,根据 HMGB1 刺激时间不同再分为 24、48、72 h 组,每组 4 孔。各孔均加入可溶性抗 CD3(1 mg/L)和可溶性抗 CD28(1 mg/L)作为辅助活化剂^[6],在 37 ℃、体积分数为 5%的 CO₂ 细胞培养箱中培养,采用流式细胞仪检测 TLR4 的表达情况。TLR4 分子表达水平分别以平均荧光强度和细胞阳性率(%)表示。

1.5 统计学处理:实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 12.0 统计软件包对数据进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Treg 纯度分析(图 1):正常小鼠 CD4⁺CD25⁺Treg 占 CD4⁺T 细胞的 5%~10%,分选所得 CD4⁺CD25⁺Treg 纯度在 91%以上,且所获 CD4⁺CD25⁺Treg 经锥虫蓝检测活性大于 97%。

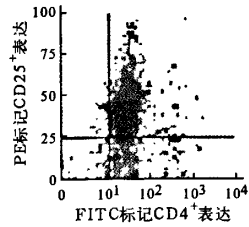


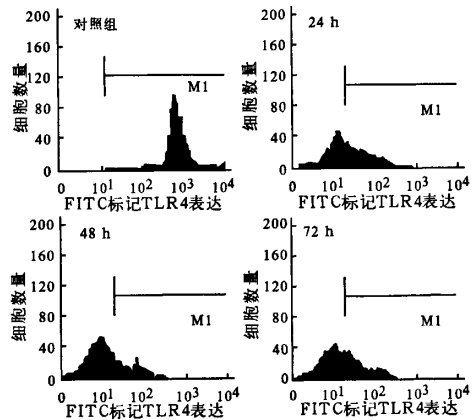
图 1 CD4⁺CD25⁺Treg 纯度分析

2.2 HMGB1 影响 Treg TLR4 表达的时间-效应关系(表 1;图 2):对照组小鼠 Treg 表面 TLR4 表达呈高水平;以 HMGB1 100 μg/L 刺激后 24、48、72 h 组 Treg TLR4 表达的平均荧光强度和细胞阳性率均较对照组显著下降(P 均 <0.01),但不同时间处理组 TLR4 表达水平差异无统计学意义。

表 1 100 μg/L HMGB1 刺激不同时间对 Treg TLR4 表达影响的时间-效应关系($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数(孔)	Treg TLR4 平均荧光强度	Treg TLR4 细胞阳性率(%)
对照组	4	146.42±3.31	93.39±4.41
24 h 组	4	52.09±3.89*	45.08±10.95*
48 h 组	4	47.90±3.87*	49.30±7.61*
72 h 组	4	48.14±6.39*	44.03±5.00*

注:与对照组比较,* $P < 0.01$



注:M1 为 Marker1,标示区间

图 2 HMGB1 不同作用时间对 Treg TLR4 表达的影响

2.3 HMGB1 影响 Treg TLR4 表达的剂量-效应关系(表 2;图 3):HMGB1 作用 48 h 后,不同剂量组 Treg TLR4 表达水平均较对照组显著下降(P 均 <0.01),其中以 100 μg/L 和 1 000 μg/L HMGB1 作用时 TLR4 表达降低尤为明显,与 10 μg/L 组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$),而

100 μg/L 组与 1 000 μg/L 组的 TLR4 表达水平无明显差异 ($P > 0.05$)。TLR4 表达平均荧光强度和细胞阳性率变化趋势基本一致。

表 2 不同浓度 HMGB1 刺激 48 h 对 Treg TLR4 表达影响的剂量-效应关系 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	Treg TLR4 平均荧光强度	Treg TLR4 细胞阳性率 (%)
对照组	4	143.89 ± 5.16	94.47 ± 6.96
10 μg/L 组	4	62.59 ± 5.29 ^a	60.69 ± 4.57 ^a
100 μg/L 组	4	49.94 ± 4.83 ^{ab}	40.13 ± 8.03 ^{ab}
1 000 μg/L 组	4	43.87 ± 8.19 ^{ac}	47.26 ± 12.22 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与 10 μg/L 组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$

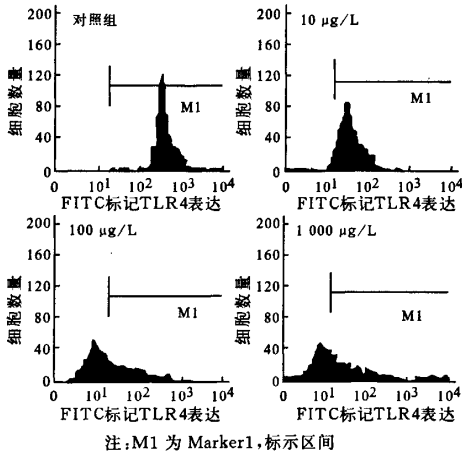


图 3 不同剂量 HMGB1 对 Treg TLR4 表达的影响

3 讨论

研究表明, HMGB1 被分泌至细胞外后, 可作为重要晚期炎症因子诱导多种炎性细胞发生异常改变甚至坏死等^[7]。已证实 HMGB1 可以通过其两个结构域 A 盒、B 盒以及一个高度重复并富含酸性氨基酸的 C-末端与不同蛋白相互作用, 包括转录因子、甾体激素受体和病毒组分等。有资料提示, HMGB1 可与晚期糖基化终末产物受体 (RAGE)、TLR2 和 TLR4 等结合, 诱导细胞活化^[8], 但这些结合方式因物种和细胞类型的不同而存在明显的差异。因此, HMGB1 虽然在结构上高度保守, 但其介导的调控机制却呈多样性。TLRs 归为白细胞介素-1 受体 (IL-1R)/TLR (TIR) 超家族, 它以胞内区高度进化保守的 TIR 结构域为特征, 并可通过胞外区的亮氨酸重复序列功能区识别各种 PAMP, 其配体几乎涵盖了所有病原体及其产物, 从而赋予生物体先天性

抵抗感染的能力。TLRs 识别配体后由 MyD88 等含 TIR 的接头蛋白介导, 通过 MyD88 依赖途径或 MyD88 非依赖途径进行信号转导。不同的接头蛋白决定不同 TLRs 的信号转导通路, 继而诱导一系列基因活化和细胞因子、趋化因子分泌, 协同刺激因子表达上调、抗原呈递能力增强, 从而引发天然免疫应答, 并在适应性免疫应答中起重要的调节作用。

Treg 在机体免疫系统中发挥负向调节作用, 既能抑制不恰当的免疫反应, 也能减弱正常的应答反应水平, 因此, 机体必须对 Treg 的免疫活性加以精确调控, 合理限定免疫应答的范围、程度及作用时间, 以维持自身免疫稳态。研究发现 Treg 表面可表达多种相关的 TLRs 分子^[9], 并可直接识别病原体, 进而调节自身的生物活性。然而, 众多的 TLRs 对 Treg 的影响趋势不尽相同, 例如 Pam3Cys (TLR2 配体) 可以诱导正常小鼠体内 Treg 数量的显著增加^[9]; 鞭毛蛋白 (TLR5 特异性配体) 则能刺激人 Treg 增殖, 促进其核内 FOXP3 水平上调, 且能提高 Treg 抑制 Tconv 细胞活性的能力^[10]; TLR8 的特异性抗原刺激 Treg 后能直接抑制 Treg 免疫调节能力^[11]。TLR4 的大部分配体与脓毒症发病密切相关, Treg 表面 TLR4 表达水平可影响对致炎因子的识别及炎症级联反应的发生发展。

本组结果显示, 用 HMGB1 在本组剂量-效应关系的实验中, 100 μg/L 和 1 000 μg/L 组 TLR4 表达的抑制程度明显大于 10 μg/L 组, 而 100 μg/L 组与 1 000 μg/L 组间表达强度无显著差异。由此可见, HMGB1 与 Treg 相互作用似乎存在一个剂量饱和和浓度, HMGB1 < 100 μg/L 时, TLR4 表达下降并呈现剂量依赖性; 超过该浓度时, TLR4 表达则维持在一个较低水平。在时间-效应关系的实验中, 发现 24~72 h TLR4 表达水平均呈显著下降改变, 但各时间点的表达量无明显差异。表明在 HMGB1 刺激下, Treg 表面 TLR4 表达于 24 h 即已下调; 如果 HMGB1 达到饱和浓度 (如 100 μg/L), TLR4 表达水平则在 24 h 迅速降至较低范围, 并维持至 72 h; 如果 HMGB1 未及饱和浓度 (如 10 μg/L), 则 TLR4 表达水平在 48 h 仍有下调的潜能。

目前关于不同实验模型和刺激物对 TLR4 基因及蛋白表达影响的报道存在较大差异。有人采用内毒素刺激小鼠巨噬细胞可诱导 TLR2 高表达, 但 TLR4 改变不明显^[12]。相反, 内毒素刺激人外周血单核细胞 4 h, 可剂量依赖性诱导 TLR4 mRNA 表达增加^[13]; 另有资料证实, 嗜肺性军团杆菌感染

可诱导树突状细胞表达 TLR2 和 TLR4 上调^[14]。最近, Park 等^[8]报道了 HMGB1 刺激 RAW264.7 细胞后, 利用荧光共振能量转移和免疫共沉淀方法证实 HMGB1 可以和 TLR4 直接结合于细胞膜表面, 15 min 后 TLR4 表达水平开始下调。因此, 各种刺激物对 TLR4 表达的不同效应可能与细胞类型、分化程度以及刺激物的种类、作用时间、浓度有关。值得说明的是, 虽然 HMGB1 和内毒素具有部分相同的细胞识别受体, 而且均可增强核转录因子- κ B 过程, 但二者最终诱导的基因表达模式却不尽相同^[15], 从而介导机体更加复杂的应答反应。

虽然尚不清楚 HMGB1 诱导 Treg 下调 TLR4 表达的确切效应, 但我们的研究显示, HMGB1 能诱导 Treg 下调其抑制性分子 CTLA-4、FOXP3 的表达水平, 减弱 Treg 的免疫抑制活性^[16]。由此可以推测, HMGB1 刺激诱导 Treg TLR4 表达下降后, 通过细胞信号转导途径下调 Treg 相关抑制性分子的进一步表达, 从而减弱该细胞的免疫抑制能力, 有助于宿主维持较强的应答反应水平, 并能迅速清除体内病原体。随着病原体逐渐被清除, HMGB1 浓度下降, Treg TLR4 表达水平开始回升, 其负性调节能力重新恢复, 并调控宿主体内应答反应过程。

目前, 关于 Treg 在脓毒症中通过何种确切的机制实现对炎症免疫反应的调节仍有待深入探讨, 尤其是临床资料还非常有限^[1]。但是, 随着对 Treg 受体调控机制研究的深入及相关信号通路的逐渐阐明, 将为有效调节机体免疫应答反应开辟新途径。

参考文献

[1] 张莹, 姚咏明. 调节性 T 细胞与脓毒症关系的研究进展[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(11): 695-697.
 [2] Ishii K J, Coban C, Akira S. Manifold mechanisms of toll-like receptor-ligand recognition[J]. J Clin Immunol, 2005, 25(6): 511-521.
 [3] 姚咏明, 鄢小建, 董宁, 等. 脓毒症大鼠高迁移率族蛋白-1 对组织 Toll 样受体 2 基因表达的影响[J]. 中华创伤杂志, 2003, 19(1): 13-16.
 [4] Fallarino F, Grohmann U, Hwang K W, et al. Modulation of

tryptophan catabolism by regulatory T cells[J]. Nat Immunol, 2003, 4(12): 1206-1212.
 [5] Schwarz A, Maeda A, Wild M K, et al. Ultraviolet radiation-induced regulatory T cells not only inhibit the induction but can suppress the effector phase of contact hypersensitivity[J]. J Immunol, 2004, 172(2): 1036-1043.
 [6] 张莹, 姚咏明, 常青, 等. 不同细胞刺激剂对小鼠调节性 T 细胞功能活化的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(3): 142-145.
 [7] 姚咏明, 徐珊, 盛志勇. 高迁移率族蛋白 B1 的组织损伤效应及其干预途径[J]. 中国医学科学院学报, 2007, 29(4): 459-465.
 [8] Park J S, Gamboni-Robertson F, He Q, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2006, 290(3): C917-924.
 [9] Liu H, Komai-Koma M, Xu D, et al. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(18): 7048-7053.
 [10] Crellin N K, Garcia R V, Hadisfar O, et al. Human CD4⁺ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells[J]. J Immunol, 2005, 175(12): 8051-8059.
 [11] Peng G, Guo Z, Kiniwa Y, et al. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4⁺ regulatory T cell function[J]. Science, 2005, 309(5739): 1380-1384.
 [12] Matsuguchi T, Musikacharoen T, Ogawa T, et al. Gene expression of Toll-like receptor 2, but not Toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages[J]. J Immunol, 2000, 165(10): 5767-5772.
 [13] Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, et al. Differential expression and regulation of Toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells[J]. J Immunol, 2000, 164(11): 5998-6004.
 [14] Rogers J, Hakki A, Perkins I, et al. Legionella pneumophila infection up-regulates dendritic cell Toll-like receptor 2 (TLR2)/TLR4 expression and key maturation markers[J]. Infect Immun, 2007, 75(6): 3205-3208.
 [15] Silva E, Arcaroli J, He Q, et al. HMGB1 and LPS induce distinct patterns of gene expression and activation in neutrophils from patients with sepsis-induced acute lung injury[J]. Intensive Care Med, 2007, 33(10): 1829-1839.
 [16] 张莹, 姚咏明, 董宁, 等. 高迁移率族蛋白 B1 对小鼠调节性 T 细胞抑制性相关分子表达的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2007, 24(5): 616-618.

(收稿日期: 2007-11-29 修回日期: 2008-02-20)
 (本文编辑: 李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

抗震救灾现场急救常识口诀

北京宣武医院 凌 峰教授
 发现生命先送水, 未能饮水快补液。
 清理口鼻头偏侧, 呼吸通畅是原则。
 臀部肩膀往外拖, 不可硬拽伤关节。
 伤口出血靠压迫, 夹板木棍定骨折。
 颈腰损伤勿扭曲, 硬板移送多人托。

地震自救口诀

武警总医院急救医学中心 王立祥教授

颅骨裂缝脑液流, 耳鼻漏出勿阻留, 头部略高禁倒流, 阻断感染生命留。
 颈椎摆动损伤易, 抬颌后仰莫随意, 双手护颈两侧翼, 生命中枢要留意。
 胸廓刺进锐器物, 急切拔出大错误, 双手稳固插入物, 避免气胸不耽误。
 腹腔肠道溢出来, 切忌将其填回来, 碗盆罩住扣起来, 腹膜炎症不早来。
 肢体骨折不盲目, 两根木条来捆住, 远端指趾不麻木, 血管神经保护住。