小鼠 Th1 细胞最佳分化需要 STAT1 信号转导

马达^①, HUANG Hua^②, 黄赞^{①②*}

① 发育与疾病相关基因教育部重点实验室, 东南大学基础医学院, 南京 210009;

② Department of Cell Biology, Neurology and Anatomy, Stritch School of Medicine, Loyola University Chicago, Maywood, IL 60153, USA

* 联系人, E-mail: huang.z@seu.edu.cn

2009-07-29 收稿, 2009-09-13 接受

国家自然科学基金资助项目(批准号: 30700412)

摘要 尽管 IFN- γ 单独不能触发 I 型 T 辅助细胞(Th1)分化, 但 IFN- γ 信号缺失却会导致缺陷的 Th1 细胞表型: IFN- γ 受体缺失(*Ifngr*^{-/-})的 Th1 细胞不能永久地抑制 IL-4 的表达; 在 Th2 诱导条件下, 它们能分化成产生 IL-4 的细胞, 说明 IFN- γ 在 Th1 细胞中沉默 *Il4* 基因和稳定 Th1 细胞表型过程中起着关键作用. IFN- γ 信号可能通过抑制 STAT6 磷酸化来抑制 IL-4 的表达. 作为介导 IFN- γ 信号转导的下游分子, 本研究的目的是研究 STAT1 在 Th1 细胞中抑制 IL-4 表达的可能机制. 研究结果显示, STAT1 缺失的幼稚 CD4⁺ T 细胞中 IFN- γ 表达水平降低, 而 IL-4 表达水平升高. 这些细胞在非极性条件下趋向于分化成 Th2 细胞. 在 Th1 诱导条件下, STAT1 缺失的幼稚 CD4⁺ T 细胞呈现缺陷的 Th1 分化: *Stat1*^{-/-} Th1 细胞中 IFN- γ 和 T-bet 表达水平都降低; 这些细胞也不能抑制 IL-4 和 GATA-3 的表达, 并且保留了 STAT6 信号转导. 更重要的是, 在 Th2 诱导条件下, *Stat1*^{-/-} Th1 细胞能高效地被转化成产生 IL-4 的细胞. 在 *Stat1*^{-/-} Th1 细胞中异位表达的 T-bet 能明显地抑制这种转化的能力, 并显著恢复 IFN- γ 表达. 这说明 STAT1 可能通过维持 T-bet 的表达来抑制 IL-4 的表达. 最后, 在 *Stat1*^{-/-} Th1 细胞中观察到位于 *Il4* 基因两个增强子区域的组蛋白 H3 乙酰化(H3^{Ac})和组蛋白 H3 赖氨酸 K4 二甲基化(H3K4^{dim}), 提示这些细胞中的 *Il4* 基因位点可能处于开放的状态. 研究结果显示, 在 Th1 细胞中 STAT1 信号可能介导 *Il4* 基因抑制的新机制: 上调 T-bet 从而抑制 GATA3 和 IL-4 表达、抵抗 STAT6 信号转导, 并抑制 *Il4* 基因位点表观遗传修饰.

关键词

STAT1

Th1/Th2 细胞

T-bet

STAT6 信号转导

幼稚 CD4⁺ T 细胞分化成能产生 IFN- γ 的 I 型辅助性 T 细胞(Th1)对细胞内病原免疫应答来说是必需的过程. 要分化成 Th1 细胞并介导免疫反应, 幼稚 CD4⁺ T 细胞需要获得产生 IFN- γ 的能力并抑制能抵抗 Th1 细胞发育的细胞因子 IL-4 的表达^[1]. 通常, IL-12 是最主要的启动 Th1 细胞分化的细胞因子. 它通过激活 STAT4 并随之上调 IFN- γ 表达来刺激 Th1 细胞分化^[2-5]. 完全分化好的 Th1 细胞永久丧失了产生 IL-4 的能力^[6]. 产生 IFN- γ 的细胞若不能沉默 IL-4 的产生

潜能, 就会破坏 Th1 免疫^[7]. 目前尚不清楚 Th1 细胞是如何关闭 IL-4 的产生潜能的.

抑制 IL-4 信号转导是可能的机制之一. 在 Th1 细胞中异位表达 GATA-3 能恢复产生 IL-4 的能力^[8]. 然而, 这种能力在最终分化好的 Th1 细胞中减弱了. 这提示除了抑制 IL-4 信号转导外, 更多的机制掌控着 Th1 细胞表型的稳定性. 主要的转录因子, 包括 T-bet 也可能促进 Th1 细胞表型的稳定. 在幼稚 CD4⁺ T 细胞中, T-bet 能刺激 IFN- γ 的产生, 并促进 Th1 细胞分

英文版见: Ma D, Huang H, Huang Z. STAT1 signaling is required for optimal Th1 cell differentiation in mice. Chinese Sci Bull, 2010, 55, doi: 10.1007/s11434-010-0030-9

化^[9]. T-bet 还能上调 IL-12 β 2 链从而促进 IL-12 应答^[10,11]. 研究表明, T-bet 上调 H2.0 相似的可读框蛋白(HLX)并与之相互作用, 可导致 *Ifng* 位点重构^[12,13]. 另外, 有研究报道, T-bet 在 Th2 细胞中也能促进 IFN- γ 表达, 并抑制 IL-4 表达. 这可能通过抑制 GATA3 或干扰 GATA3 DNA 结合^[9,10,14,15]来实现. 近來有研究表明, T-bet 可与一个 *Il4* 沉默子区域结合, 并与 Runx3 协同激活 IFN- γ 并抑制 IL-4 表达^[16]. T 细胞中 IFN- γ 首先通过 STAT1 激活 T-bet, 而且 IFN- γ 信号已被证明在稳定 Th1 细胞表型中扮演着关键的角色^[11,17~19]. 综上所述, IFN- γ -STAT1-T-bet 可能形成一个正向调节环, 对稳定 Th1 细胞表型起着关键作用.

此前, 我们观测到 IFN- γ 信号通过阻止 STAT6 结合到 IL-4 受体而抑制 STAT6 信号转导, 提示这是 IFN- γ 介导 Th1 细胞定型的可能的机制之一^[19]. 本研究拟进一步研究 STAT1 是否介导 IFN- γ 在 Th1 细胞发育中的功能以及 STAT1 是如何起作用的. 利用 STAT1 缺陷小鼠模型, 我们在体外培养 *Stat1*^{-/-} Th1 细胞, 并比较了这些细胞是如何区别于野生型(WT) Th1 细胞. 我们发现 *Stat1*^{-/-} Th1 细胞呈现内在的缺陷表型. 我们进一步探究了可能造成这种分化缺陷的多种因素: 主要转录因子异常表达、信号转导异常、或者表观遗传修饰改变. 我们的研究揭示了 STAT1 在 Th1 细胞发育中的独特作用.

1 材料和方法

(i) 动物和细胞培养. WT对照小鼠, *Ifngr*^{-/-}和 *Stat1*^{-/-}小鼠购自 Taconic (Germantown, NY) 和 Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). 幼稚的 CD4⁺ T 细胞和去除 T 细胞的抗原递呈细胞(APC)分别从淋巴结和脾脏中纯化得到^[19]. 所有触发分化条件下, 都在 2 mL PRMI 完全培养液中加入 APC (2×10^6)、IL-2 (10 U/mL)、抗 CD3 抗体(2C11, 3 μ g/mL)和抗 CD28(3 μ g/mL)抗体来刺激纯化的幼稚的 CD4⁺ T 细胞(2×10^6). 对 Th1, 其诱导条件中另外加入 IL-12 (10 ng/mL, BD-PharMigen, San Diego, CA), 抗 IL-4 抗体(11B11, 10 μ g/mL)以触发 Th1 细胞发育; 对 Th2, 其诱导条件中加入 IL-4 (5 ng/mL, BD-PharMigen, San Diego, CA), 抗 IL-12 抗体(10 μ g/mL)和抗 IFN- γ 抗体(10 μ g/mL)以触发 Th2 细胞发育. 在非极化条件下, 不加入任何中和抗体; 在中和条件下, 加入抗 IL-12

抗体、抗 IFN- γ 抗体和抗 IL-4 抗体. 刺激 2 d 后清洗细胞, 在含 IL-2 (10 ng/mL)和 IL-12 (2 ng/mL, 以培养 Th1 细胞)或 IL-4 (2 ng/mL, 培养 Th2 细胞)培养液中培养至第 5 天, 再用 IL-2 进一步扩增细胞至第 11 天. 在非极化条件下, 只加入 IL-2 (10 ng/mL); 在中和条件下, 则加入 IL-2 (10 ng/mL)、抗 IL-12 抗体、抗 IFN- γ 抗体和抗 IL-4 抗体, 直至第 11 天. 所有的抗体都是小鼠单克隆抗体.

(ii) 细胞内染色和酶联免疫吸附测定(ELISA). 细胞内染色或 ELISA 检测 IL-4 或 IFN- γ 的产量的方法参考文献[19]. 细胞内染色法: 收获细胞, 清洗, 在含 IL-2 和莫能菌素(monensin)培养液中用佛波脂/钙离子载体(PMA/ionomycin)刺激 6 h. 细胞固定后, 用皂苷缓冲液透膜, 用抗 IL-4 或 IFN- γ 的特异性抗体染色, IL-4 或 IFN- γ 的产量用细胞流式仪(FACS)测定. ELISA 法: 收获细胞, 清洗, 在含 IL-2 的培养液中使细胞浓度达到 1×10^6 个/mL, 并加入佛波脂/钙离子载体刺激过夜. 收集上清用于 ELISA 检测 IL-4 或 IFN- γ 的产量.

(iii) RT-PCR. 用 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA)从两轮细胞培养物中提取 RNA, 用 Superscript III 逆转录酶(Invitrogen)逆转录出 cDNA, 用于半定量 RT-PCR. 每份样品的 cDNA 都做 10 倍和 100 倍稀释, 用等体积的模板进行 PCR 扩增. PCR 参数: 94 $^{\circ}$ C, 2 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s, 60 $^{\circ}$ C, 2 min, 25 个循环. PCR 产物行 1.5%琼脂糖凝胶电泳. 引物序列可供查询.

(iv) 逆转录病毒感染. 在 Th1 或 Th2 诱导条件下, 用抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体、IL-2 和 APC 一起刺激 WT 或 *Stat1*^{-/-}小鼠来源的第 11 天的 Th1 细胞 40 h. 在 2 mL 含凝聚胺(polybrene, 阳离子多聚物基因载体)(8 μ g/mL)的病毒上清中, 活化的细胞($1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 个)于室温以 $1400 \times g$ 离心 1 h. 感染的细胞再培养 5 d.

(v) 免疫沉淀和蛋白质杂交. STAT6 免疫沉淀, 并检测其磷酸化参考文献[19].

(vi) ³⁵S-蛋氨酸标记实验. 用预热的 PBS 洗涤 WT 或 *Stat1*^{-/-}小鼠来源的第 11 天的 Th1 细胞, 用含 2% FBS 的无蛋氨酸和半胱氨酸的 RPMI 培养液重悬并培养 1 h. 清洗后, 再次用该培养液重悬细胞, 并加入 100 μ Ci 的 ³⁵S-蛋氨酸, 于 37 $^{\circ}$ C 标记细胞 2 h. 清洗后, 用裂解液裂解细胞, 行 STAT6 免疫沉淀. 沉淀下来的蛋白行 SDS-PAGE 和放射自显影.

(vii) 染色质免疫沉淀(ChIP). 按试剂盒(Upstate 生物技术公司, Lake Placid, NY)提供的指导进行染色质免疫沉淀实验. 沉淀的 DNA 溶于 50 μ L TE 缓冲液. 用针对 CNS-1 (保守非编码序列-1)、IE (内含子增强子)和非调控对照区的特异性引物通过实时 PCR 来检测沉淀的染色质量. 非调控对照区位于 Th2 细胞因子基因位点内的 *Rad50* 基因内. 这个区域的表观遗传修饰在 Th1 细胞分化过程中是不变的^[20]. 用 DNA 总量来校正沉淀的 DNA 量, 作为 IP DNA 相对值, 定义为特异性抗体沉淀的 DNA 量减去正常 IgG 沉淀的 DNA 量与 DNA 总量的比率^[21].

2 结果

2.1 *Stat1*^{-/-}的 CD4⁺细胞趋向于分化成 Th2 细胞

幼稚的 CD4⁺细胞表达低水平的 IFN- γ 和 IL-4. 为了测定 STAT1 是否潜在影响细胞因子的表达, 纯化了 WT 或 *Stat1*^{-/-}小鼠幼稚 CD4⁺ T 细胞, 并检测它们产生 IFN- γ 和 IL-4 的潜能. 发现 STAT1 活性的缺失导致 IFN- γ 表达减少, 这之前报道的 IFN- γ 最佳表达需要 STAT1 的情况相符(图 1(a)). 而且, STAT1 缺失还导致 IL-4 表达增高, 提示 STAT1 参与抑制 IL-4 表达(图 1(a)).

细胞因子表达的改变可能影响 Th 细胞极化. 为

验证该可能性, 我们在非极化条件下(无针对 IL-4, IL-12 或 IFN- γ 的特异性抗体, 也无外源的极性的细胞因子 IL-4, IL-12 或 IFN- γ)触发 T 细胞分化 11 d. 我们发现, 大部分 WT 细胞都分化成产生 IFN- γ 的细胞(99.7%), 而只有少于 1%的细胞产生 IL-4. 尽管 *Stat1*^{-/-}细胞分化成产生 IFN- γ 的细胞百分比相似(99.2%), 但 IFN- γ 表达量却显著减少. 更重要的是, 与 WT 细胞中只有 0.2%细胞分化成产生 IL-4 的细胞的相比, *Stat1*^{-/-}细胞分化成产生 IL-4 的细胞比率增至 5.1% (图 1(b)). 这可能是由于 IL-4 表达的升高形成以自分泌或旁分泌的方式触发 IL-4 分泌细胞的分化, 因为在中和条件下(用抗体中和 IL-12, IL-4 和 IFN- γ)触发的 WT 或 *Stat1*^{-/-}细胞分化都不能产生明显的 IL-4 或 IFN- γ (图 1(c)). 这些数据提示 STAT1 可能影响 IFN- γ 和 IL-4 表达, 并潜在地影响 Th1 和 Th2 分化.

2.2 STAT1 介导抑制 Th1 细胞产生 IL-4 的潜能

为检测 STAT1 是否抑制成熟 Th1 细胞合成 IL-4 的潜能, 我们做了两轮 T 细胞培养. 第一轮, 在 Th1 诱导条件下(IL-12, 抗 IL-4 抗体)触发幼稚 WT 或 *Stat1*^{-/-} CD4⁺ T 细胞发育, 培养 11 d; 第二轮, 第 11 天的 WT 或 *Stat1*^{-/-} Th1 细胞重新在 Th1 (Th1-1)或 Th2 (Th1-2)诱导条件下激活, 并再培养 5 d. 培养结

图1 STAT1 缺陷的 CD4⁺细胞趋向于分化成 Th2 细胞

(a) WT 或 *Stat1*^{-/-}小鼠来源的幼稚 CD4⁺ T 细胞用佛波脂/钙离子载体刺激过夜. IFN- γ 和 IL-4 的产量用 ELISA 检测. (b) WT 或 *Stat1*^{-/-}小鼠来源的淋巴结 T 细胞在含 IL-2 的培养基里活化后培养到 11 d, 最后细胞用佛波脂/钙离子载体刺激 6 h, 收获细胞, CD4⁺ T 细胞中 IFN- γ 和 IL-4 的产量用细胞内染色法检测. (c) WT 或 *Stat1*^{-/-}小鼠来源的幼稚 CD4⁺ T 细胞在含 IL-2 以及抗 IL-12, IL-4 和 IFN- γ 的抗体的培养液中培养 11 d. CD4⁺ T 细胞中产生 IL-4 和 IFN- γ 潜能用细胞内染色法检测并用流式细胞仪分析

WT 细胞能有效地分化成 Th1 细胞(Th1-1, 99.6%为产生 IFN- γ 的细胞), 它们产生高水平的 IFN- γ , 但不产生 IL-4(图 2(a)和(b)). 而且, 这些细胞表型很稳定: 在 Th2 诱导条件下(Th1-2, 图 2(b))也不会被重新诱导表达 IL-4. 相反地, *Stat1*^{-/-} Th1 细胞呈现缺陷表型:

在 Th1-1 条件下只有 23.8%的细胞表达 IFN- γ . 而且这些细胞保留了产生 IL-4 的能力(Th1-1, 8.6%为产生 IL-4 的细胞). 最重要的是, 与对照的 Th2 细胞(Th2, 35.1%为产生 IL-4 的细胞)相似, 这些细胞能高效地被转变成能产生 IL-4 的细胞(Th1-2, 23.6%为产生

图 2 STAT1 抑制 IL-4 在 Th1 细胞中的表达

幼稚 CD4⁺ T 细胞在 Th1 诱导条件下培养 11 d 后, 重新用 TCR 刺激活化细胞, 并在 Th1 诱导条件下(Th1-1)或 Th2 诱导条件下(Th1-2)再培养 5 d. 作为对照, 幼稚 CD4⁺ T 细胞也在 Th2 诱导条件下培养 11 d. 最终, 用细胞内染色法来检测 IFN- γ (a)或 IL-4 (b)的产能. (c) 用连续稀释 10 倍的模板(三角形所示)行半定量 RT-PCR 来检测 *Il4*, *Ifng*, *Tbx21* 和 *Gata3* 的表达

IL-4 的细胞) (图 2(a)和(b)). 这些数据强有力地说明 STAT1 可介导抑制成熟 Th1 细胞产生 IL-4 的潜能.

研究表明, T-bet 和 GATA3 是决定 CD4⁺ 细胞是分化成 Th1 还是 Th2 细胞的主要因子. *Stat1*^{-/-} Th1 缺陷表型可能是由于这些关键的转录因子的表达紊乱. 我们用半定量 RT-PCR 的方法检测了 T-bet 和 GATA3 的基因表达量. 与预期结果一致, WT Th1 细胞表型稳定: 在 Th1-1 或 Th1-2 条件下, 它们都表达高水平的 IFN- γ , 且检测不到 IL-4 表达. 它们正常表达 T-bet 而抑制 GATA3 表达(图 2(c)). 相反地, 我们观测到 *Stat1*^{-/-} Th1-1 细胞表达 IL-4, 而且在 *Stat1*^{-/-} Th1-2 细胞中 IL-4 水平升高, 与 *Stat1*^{-/-} Th2 对照的水平相当. 而且, 与 WT 细胞相比, *Stat1*^{-/-} Th1-1 和 Th1-2 细胞中 T-bet 水平都降低. 更重要的是, 这些细胞保留了表达 GATA3 的能力(图 2(c)). 这些数据表明, 由缺少 STAT1 导致的关键转录因子异常表达, 造成了 *Stat1*^{-/-} Th1 细胞表型不稳定.

2.3 *Stat1*^{-/-} Th1 细胞保留 STAT6 信号转导

此前, 我们报道了 *Ifngr*^{-/-} Th1 细胞不能关闭 STAT6 信号转导^[19]. 我们进一步探讨 STAT1 是否在 Th1 细胞中介导抑制 STAT6 信号转导. *Stat1*^{-/-} Th1 细胞培养了 11 d 后, 用 IL-4 刺激细胞. 免疫沉淀 STAT6 后用抗磷酸化酪氨酸的抗体通过蛋白杂交检测 STAT6 的磷酸化. 作为对照, *Stat1*^{-/-} Th2 细胞 STAT6 活性很强(光密度测定, 磷酸化的 STAT6 与 STAT6 总量的比值是 1.04), 而 WT Th1 细胞显示 STAT6 信号转导受损(光密度比值为 0.45). 与 WT Th1 细胞不同, *Stat1*^{-/-} Th1 细胞在 IL-4 刺激下保持较强的 STAT6 磷酸化(光密度比值为 0.93), 与 *Stat1*^{-/-} Th2 细胞类似(图 3(a)). 这些都说明 STAT1 在 Th1 细胞中可能介导抑制 STAT6 信号转导.

IFN- γ 在 Th1 细胞中至少部分地通过阻止 STAT6 与 IL-4 受体结合来阻断 STAT6 信号转导^[19]. IFN- γ 信号可能诱导 STAT6 结合蛋白从而覆盖 STAT6, 防止其与 IL-4 受体结合. 为证实这种可能性, 我们施行了 ³⁵S-蛋氨酸标记实验, 然后免疫沉淀 STAT6. 沉淀的蛋白行 SDS-PAGE 并放射自显影. 有趣的是, 我们在 WT Th1 细胞中发现了差异条带, 在 *Stat1*^{-/-} Th1 细胞中却没有(图 3(b)). 用常规 IgG 作对照也没观测到这一条带.

图 3 *Stat1*^{-/-} Th1 细胞不能抑制 STAT6 信号转导

(a) 收获第 11 天的 WT, *Ifngr*^{-/-} 或 *Stat1*^{-/-} 的 Th1 或 Th2 细胞, 用 IL-4 (10 ng/mL) 刺激 10 min. 免疫沉淀 STAT6, 用抗磷酸化的酪氨酸的抗体(anti-PY)行蛋白质杂交, 检测 STAT6 磷酸化. 数字代表 STAT6 磷酸化的光密度值经过 STAT6 总量光密度值校正后的值. (b) 用 ³⁵S-蛋氨酸标记第 11 天的 WT 和 *Ifngr*^{-/-} Th1 细胞, 收获细胞, 裂解, 用正常 IgG 或抗 STAT6 抗体行免疫沉淀. 沉淀的蛋白行 SDS-PAGE 并放射自显影

2.4 T-bet 修复 *Stat1*^{-/-} Th1 细胞的 Th1 表型

在 Th1 细胞中 STAT1 激活 T-bet, 而在 *Stat1*^{-/-} Th1 细胞中 T-bet 下调. 为检测 T-bet 是否能修复表型, 我们通过逆转录病毒转导来过表达 T-bet, 并做了两轮 Th 细胞培养. 和预期结果一致, 在 Th1-2 条件下, 转染 GFP 的 *Stat1*^{-/-} Th1 细胞 IFN- γ 表达减少. 这些细胞即使在 Th1-1 条件下也能表达 IL-4, 且在 Th1-2 条件下就会显著上调 IL-4 表达(图 4(a)和(b)). 与 GFP 对照细胞相比, 转染 T-bet 的 *Stat1*^{-/-} Th1 细胞不仅在 Th1-1 条件下 IFN- γ 表达量增多, 在 Th1-2 条件下也能恢复 IFN- γ 表达. 最重要的是, T-bet 在两种条件下都能显著抑制 IL-4 表达(图 4(a)和(b)). 作为对照, WT Th1 细胞在这些条件下 Th1 细胞表型稳定(图 4(a)和(b)). 这些结果都提示 STAT1 可能通过 T-bet 介导抑制 IL-4 表达.

2.5 *Stat1*^{-/-} Th1 细胞中组蛋白修饰模式发生改变

在幼稚的 CD4⁺ 细胞中 *Il4* 基因位点处于“均

图4 在 *Stat1*^{-/-} Th1 细胞中过表达 T-bet 抑制 IL-4 的表达

第 11 天 WT 或 *Stat1*^{-/-} Th1 细胞在 Th1 诱导或 Th2 诱导条件下活化, 用表达 GFP (Ctr) 或表达 GFP 和 T-bet 的逆转录病毒转导活化的细胞, 再培养 5 d. 设门于 GFP 阳性细胞. 用细胞内染色法来检测 IFN-γ (a) 或 IL-4 (b) 的产生

衡”(poised)状态. 研究发现, 在 Th2 细胞分化中 IL-4 表达上调的同时 *Il4* 基因位点发生表观遗传修饰; 而在无 IL-4 表达的 Th1 细胞中该位点状态仍然处于不开放状态^[22,23]. *Stat1*^{-/-} Th1 细胞中 IL-4 异常表达提示 *Il4* 基因位点在这些细胞中处于可变状态. 为证实这点, 我们用特异性抗 H3^{AC} 和 H3K4^{dim} (活跃基因的标记) 的抗体行染色质免疫沉淀. 用定量 PCR 检测 CNS-1, IE 或对照区 3 个区域的 DNA 富集情况. 我们观察到, WT 或 *Stat1*^{-/-} 小鼠来源的幼稚 CD4⁺ T 细胞中 3 个区域的 H3^{AC} 和 H3K4^{dim} 修饰均为低水平. 当促发 Th2 细胞发育时, 观察到 CNS-1 和 IE 区域中 DNA 显著富集, 而对照区中在 Th 细胞分化时却无此改变(图 5(b)和(c)). 和预期结果一致, WT Th1 细

胞在 3 个检测的区域中 H3^{AC} 和 H3K4^{dim} 仍维持在低水平. 相反地, 在 *Stat1*^{-/-} Th1 细胞的中 CNS-1 和 IE 区域中都检测到染色质富集. 在对照区, 这些细胞中则未检测到染色质富集(图 5(b)和(c)). 这些发现说明在 *Stat1*^{-/-} Th1 细胞中 *Il4* 基因位点未被适时沉默, 仍然处于开放状态.

3 讨论

IFN-γ 信号能通过抑制 STAT6 信号转导来稳定 Th1 细胞表型^[18,19]其作用能以依赖或不依赖于 STAT1 的方式来实现^[24]. 本研究中, 我们力求探究 STAT1 在 IFN-γ 介导 Th1 细胞表型稳定中的作用. 我们的研究揭示了几点新颖之处.

图5 Th1细胞中*IL4*位点的表遗传修饰

(a) *IL4* 基因位点和用于做实时 PCR 的引物区域. (b) WT 和 *Stat1*^{-/-} 小鼠来源的幼稚 CD4⁺ T 细胞、第 7 天和第 11 天的 Th1 或 Th2 细胞用于特异性抗 H3^{Ac} 或 H3K4^{dm} 抗体行染色质免疫沉淀实验. (c) 用实时 PCR 检测 CNS-1, IE 或对照区的 DNA 富集

3.1 STAT1-T-bet 调节环在介导 Th1 细胞定型中起关键作用

IFN- γ 信号在 T 细胞分化中的角色尚无定论. 若缺乏 IL-12, 仅有 IFN- γ 信号并不能启动 Th1 细胞分化^[3,25]. 在体外, IFN- γ 信号可能通过诱导表达 IL-12 受体 $\beta 2$ 链使细胞对 IL-12 应答, 从而触发 IL-12 驱动的 Th1 细胞分化^[26,27]. 在体内, *Stat1*^{-/-} 缺陷小鼠脾脏中 T 细胞的 IFN- γ 表达受损, 并且在受到急性细菌感染后不能存活^[28]. 而且, IFN- γ 信号可部分地通过抑制 STAT6 信号而抑制 *IL4* 并稳定 Th1 表型^[18,19]. 这些观测到的结果都提示 IFN- γ -STAT1 信号在 Th1 细胞分化和 Th1 免疫应答中起着特别的作用. 近有研究表明, 在 Th1 细胞分化过程中 T-bet 是主要的转录因子. T-bet 与 *IL4* 沉默子结合而抑制 IL-4 表达, 提示 T-bet 在 Th1 细胞中直接抑制 *IL4* 基因^[16]. 本研究中, 我们揭示了 STAT1 缺失导致 Th1 表型不稳定, 同时伴有 T-bet 下调. 而异位表达 T-bet 则能修复表型(图 2 和 4). 我们考虑, T-bet 主要是由 STAT1 调节, 并形成正向调节环; 得到的观测数据提示 STAT1 可能

通过维持 T-bet 表达来间接介导抑制 *IL4* 基因. 但是, 我们还不能排除 STAT1 可以通过不依赖于 T-bet 的方式来抑制 IL-4 表达的可能性. 进一步通过研究在 T-bet 缺陷的 CD4⁺ T 细胞中过表达 STAT1 可以阐明这一问题. 由此, 我们鉴定了 STAT1-T-bet 调节环是稳定 Th1 细胞表型的关键因素. 正像分别在 T-bet 或 STA1 缺陷小鼠中看到的, 缺少 T-bet 或 STA1 两者中任何一个都会破坏调节环, 导致缺陷的 Th1 细胞表型.

3.2 STAT1 信号抑制 STAT6 磷酸化

WT Th1 细胞中 STAT6 磷酸化是被抑制的, 而在 *Ifngr*^{-/-} Th1 细胞中却保留了 STAT6 磷酸化和分化成产生 IL-4 细胞的能力^[19]. IFN- γ 如何抑制 STAT6 磷酸化的机制尚不清楚. 我们之前的研究提示 IFN- γ 能通过阻止 STAT6 与 IL-4 受体结合而抑制 STAT6 信号转导^[19]. 本研究进一步显示了一个未知的 75 KD 蛋白在 WT Th1 细胞中能与 STAT6 免疫共沉淀, 而在 *Ifngr*^{-/-} Th1 细胞中则没有. 该蛋白产物不太可能是报道过的肥大细胞中 STAT6 的降解产物^[29]. Th1 细胞中磷酸化的 STAT6 是完全水解的, 而且 WT 和 *Ifngr*^{-/-} Th1 细

胞中 STAT6 表达水平是相近的^[19,30]。IFN- γ 非常有可能诱导新的 STAT6 结合蛋白以抑制 STAT6 磷酸化。过去 20 年来,一些 STAT6 结合蛋白已经被鉴定出来^[31],其中没有一个显示能抑制 STAT6 磷酸化。进一步的研究很可能鉴定出推测的 STAT6 结合蛋白,深入研究其在调节 STAT6 信号转导和 Th1 细胞分化中的功能将会令人非常感兴趣。

3.3 *Il4* 基因位点的表观遗传修饰

在 Th2 细胞分化中,*Il4* 基因位点是活跃地被修饰和重构的,表现在组蛋白修饰、DNA 修饰、染色体间相互作用等^[22,23]。相比而言,*Il4* 基因位点在 Th1 细胞中却保持关闭的状态。Th1 细胞中,*Il4* 基因位点是如何被关闭的仍不得而知。近来,*Il4* 沉默子已经被鉴定出来^[7]。无沉默子的鼠源 Th1 细胞保留了表达 IL-4 的能力。而且研究表明, Th1 细胞中的主要转录因子 T-bet 能结合在沉默子区与 Runx3 协同作用从而抑制 IL-4 表达^[16]。这些提示在 Th1 细胞中 T-bet 可能通过直接结合 *Il4* 沉默子来介导抑制 *Il4* 基因位点的表观遗传修饰和染色体重构。本研究中,我们进一步展示

了 *Stat1*^{-/-} Th1 细胞中两个增强子区域的 H3^{AC} 和 H3K4^{dim} 增多。这可能是由于保留了 GATA3 表达和 STAT6 信号转导,而这两者都可以触发 *Il4* 基因位点表观遗传修饰和染色体重构^[22,23]。因为缺乏 STAT1 而使 T-bet 下调将不能抑制 GATA3 表达或中和 GATA3 的作用。因此,在 Th1 细胞中 T-bet 可能通过抵抗 GATA3 的作用或直接与 *Il4* 沉默子结合来抑制表观遗传修饰。T-bet 是如何与单一一位点结合并有效影响 *Il4* 基因位点远端区域的表观遗传修饰的,目前还不清楚。沉默子有可能相当于“增强子阻断剂”的功能,干扰了 *Il4* 基因启动子和增强子之间的交互作用^[23]。据我们所知,本研究是首次报道 STAT1-T-bet 调节环缺陷会引起 Th1 细胞中 *Il4* 基因位点表观遗传修饰异常的实验证据。

综上所述,我们鉴定了在 Th1 细胞中 STAT1-T-bet 正向调节环是抑制 *Il4* 基因的关键因素。STAT1-T-bet 调节环通过抑制 STAT6 信号转导、拮抗 GATA3、抑制表观遗传修饰和染色体重构等机理来实现对 *Il4* 基因的抑制。

参考文献

- 1 Szabo S J, Sullivan B M, Peng S L, et al. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol*, 2003, 21: 713—758
- 2 Hsieh C S, Macatonia S E, Tripp C S, et al. Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*, 1993, 260: 547—549
- 3 Seder R A, Gazzinelli R, Sher A, et al. Interleukin 12 acts directly on CD4⁺ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 10188—10192
- 4 Kaplan M H, Sun Y L, Hoey T, et al. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature*, 1996, 382: 174—177
- 5 Thierfelder W E, van Deursen J M, Yamamoto K, et al. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature*, 1996, 382: 171—174
- 6 Murphy E, Shibuya K, Hosken N, et al. Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long-term stimulation. *J Exp Med*, 1996, 183(3): 901—913
- 7 Ansel K M, Greenwald R J, Agarwal S, et al. Deletion of a conserved *Il4* silencer impairs T helper type 1-mediated immunity. *Nat Immunol*, 2004, 5: 1251—1259
- 8 Lee H J, Takemoto N, Kurata H, et al. GATA-3 induces T helper cell type 2 (Th2) cytokine expression and chromatin remodeling in committed Th1 cells. *J Exp Med*, 2000, 192: 105—115
- 9 Szabo S J, Kim S T, Costa G L, et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, 2000, 100: 655—669
- 10 Afkarian M, Sedy J R, Yang J, et al. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4⁺ T cells. *Nat Immunol*, 2002, 3: 549—557
- 11 Mullen A C, High F A, Hutchins A S, et al. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science*, 2001, 292: 1907—1910
- 12 Mullen A C, Hutchins A S, High F A, et al. Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable T(H)1 gene induction. *Nat Immunol*, 2002, 3: 652—658
- 13 Zheng W P, Zhao Q, Zhao X, et al. Up-regulation of Hlx in immature Th cells induces IFN-gamma expression. *J Immunol*, 2004, 172: 114—122

- 14 Hwang E S, Szabo S J, Schwartzberg P L, et al. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science*, 2005, 307: 430—433
- 15 Usui T, Preiss J C, Kanno Y, et al. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *J Exp Med*, 2006, 203: 755—766
- 16 Djuretic I M, Levanon D, Negreanu V, et al. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate *Ifng* and silence *Il4* in T helper type 1 cells. *Nat Immunol*, 2007, 8: 145—153
- 17 Lighvani A A, Frucht D M, Jankovic D, et al. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 15137—15142
- 18 Zhang Y, Apilado R, Coleman J, et al. Interferon gamma stabilizes the T helper cell type 1 phenotype. *J Exp Med*, 2001, 194: 165—172
- 19 Huang Z, Xin J, Coleman J, et al. IFN-gamma suppresses STAT6 phosphorylation by inhibiting its recruitment to the IL-4 receptor. *J Immunol*, 2005, 174: 1332—1337
- 20 Fields P E, Lee G R, Kim S T, et al. Th2-specific chromatin remodeling and enhancer activity in the Th2 cytokine locus control region. *Immunity*, 2004, 21: 865—876
- 21 Makar K W, Perez-Melgosa M, Shnyreva M, et al. Active recruitment of DNA methyltransferases regulates interleukin 4 in thymocytes and T cells. *Nat Immunol*, 2003, 4: 1183—1190
- 22 Lee G R, Kim S T, Spilianakis C G, et al. T helper cell differentiation: Regulation by cis elements and epigenetics. *Immunity*, 2006, 24: 369—379
- 23 Ansel K M, Djuretic I, Tanasa B, et al. Regulation of Th2 differentiation and *Il4* locus accessibility. *Annu Rev Immunol*, 2006, 24: 607—656
- 24 Ramana C V, Gil M P, Schreiber R D, et al. Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling. *Trends Immunol*, 2002, 23: 96—101
- 25 Macatonia S E, Hsieh C S, Murphy K M, et al. Dendritic cells and macrophages are required for Th1 development of CD4⁺ T cells from alpha beta TCR transgenic mice: IL-12 substitution for macrophages to stimulate IFN-gamma production is IFN-gamma-dependent. *Int Immunol*, 1993, 5: 1119—1128
- 26 Wenner C A, Guler M L, Macatonia S E, et al. Roles of IFN-gamma and IFN-alpha in IL-12-induced T helper cell-1 development. *J Immunol*, 1996, 156: 1442—1447
- 27 Hu-Li J, Huang H, Ryan J, et al. In differentiated CD4⁺ T cells, interleukin 4 production is cytokine-autonomous, whereas interferon gamma production is cytokine-dependent. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 3189—3194
- 28 Gavrilescu L C, Butcher B A, Del Rio L, et al. STAT1 is essential for antimicrobial effector function but dispensable for gamma interferon production during *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun*, 2004, 72: 1257—1264
- 29 Suzuki K, Nakajima H, Kagami S, et al. Proteolytic processing of Stat6 signaling in mast cells as a negative regulatory mechanism. *J Exp Med*, 2002, 196: 27—38
- 30 Zamorano J, Rivas M D, Setien F, et al. Proteolytic regulation of activated STAT6 by calpains. *J Immunol*, 2005, 174: 2843—2848
- 31 Hebenstreit D, Wirnsberger G, Horejs-Hoeck J, et al. Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006, 17: 173—188