

CD4⁺T 细胞分化与表观遗传作用

江 阳*

(上海第二医科大学免疫学教研室, 上海 200025)

摘要 DNA 甲基化、染色质重塑等表观遗传作用对 CD4⁺T 细胞向 Th1 和 Th2 的分化有重要的影响, 现对 Th1 细胞表达 IFN- γ 以及 Th2 细胞表达 IL-4/IL-13 在基因转录水平的调节作用给予概述, 重点阐述相关转录因子、酶以及蛋白质复合物所发挥的表观遗传调节作用的可能机制。

关键词 表观遗传; 甲基化; 染色质重塑; CD4⁺T 细胞; 细胞分化

1942 年, Waddington 最早提出表观遗传学 (epigenetics) 一词, 认为是遗传学领域中探讨基因型与表型之间相互关系的一个新的研究方向^[1], 然而 60 多年来不同的研究者却对它的具体含义有不同的理解。现在一般认为表观遗传学是研究 DNA 序列不发生改变时基因表达的一种可遗传的亚稳定状态^[2]。基因转录前染色质水平的结构调整, 以及核酸和蛋白质的甲基化、乙酰基化和磷酸化等都属于表观遗传学的范畴, 涉及染色质重塑 (chromatin remodeling) 和转录延续性。表观遗传在 T 细胞分化过程中也发挥重要的作用。现在研究多集中在 T 细胞基因表达方面, 特别是未成熟的 CD4⁺T 细胞向 Th1 和 Th2 分化。本综述主要讨论 T 细胞分化过程中 IFN- γ 和 IL-4/IL-13 基因位点的表观遗传调控作用。

1 表观遗传作用的机制初探

哺乳动物细胞的基因组 DNA 中, 约有 3%~5% 的胞嘧啶是以 5-甲基胞嘧啶的形式存在的, 同时 70% 的 5-甲基胞嘧啶参与了 CpG 序列的形成^[3], 而非甲基化的 CpG 序列多与看家基因以及组织特异性表达基因有关, 这提示 CpG 的甲基化与否在基因的表达调节中起作用。同时还发现在 DNA 复制后期常伴有由 DNA 甲基化酶 (Dnmts) 以 S-腺苷-甲硫氨酸为甲基供给来源而引起的 DNA 甲基化现象。已经发现的多种 DNA 甲基化酶中, Dnmt1 主要催化尚未完全甲基化的 DNA 模板^[4], Dnmt3a 和 Dnmt3b 也可催化未甲基化的 DNA^[5], 但 Dnmt2 的功能现在仍有争议^[6]。小鼠前 T 细胞如果缺失 Dnmt1 的活性, 胸腺和外周组织中的 T 细胞数量会明显下降, 并且胸腺中的 TCR- $\alpha\beta$ 细胞也减少, $\gamma\delta$ T 细胞增加并异常表达 CD8^[7]。

若在 T 细胞发育的晚期缺失了 Dnmt1 却没有什么问题, 说明甲基化酶会影响早期 T 细胞的发育。1999 年人们在哺乳动物细胞中发现了一种特异性的以甲基化的 CpG DNA 为底物的去甲基化酶^[8], 为机体中去甲基化作用提供了一个客观的依据。对甲基化如何影响基因的表达, 现在有两种见解: 一种认为 5'-甲基化胞嘧啶可延伸到 DNA 双螺旋的大沟槽中, 阻碍了转录因子与 DNA 的结合^[9]; 另外有人认为细胞内一些蛋白质与甲基化的启动子结合, 阻碍了转录因子与靶序列结合, 如甲基结合蛋白 MeCP1、MeCP2 和甲基结合区域 MBD1、MBD2、MBD3 等。MeCP2 和 MBD2、MBD3 与一种有组蛋白去乙酰化作用的大蛋白质复合物形成有关, 而改变染色质构型^[10]。简而言之, DNA 甲基化使得组蛋白等成为非乙酰化状态而带有正电荷, 而 DNA 带有负电荷, 使染色质的结合变得紧密, 阻碍了转录的进行。除了甲基化作用, DNA 酶 (DNase) 也影响染色质构型。DNaseI 可割断细胞核基因组 DNA 的高度敏感部位, 形成一种“开放”的染色质, 从而影响基因的表达调控。

2 IFN- γ 表达调控的表观遗传作用

2.1 DNA 酶作用位点的变化

早在 20 世纪 80 年代中期就发现, 在被诱导表达 IFN- γ mRNA 的人细胞株中, IFN- γ 的启动子和第一内含子表达上升的同时, 对 DNaseI 的敏感性增加了, 并且 DNaseI 和 IFN- γ 基因的表达有很好的相关

收稿日期: 2003-09-17 接受日期: 2004-02-11

* 通讯作者。Tel: 021-63846590-776633, E-mail: JY-forgetter@163.net

性^[11]。IFN- γ 的这一启动子区有一可与转录因子 CREB/ATF 和 AP-1 结合的重要位点^[12,13], 后来在其第一内含子中发现一个可与 NF- κ B 结合的增强子元件^[14], 并靠近 STAT 结合位点^[15], 这些转录因子结合位点附近的 DNase 的高敏感位点是否会影响到这些转录因子的结合呢? 对小鼠 Th1 和 Th2 细胞 IFN- γ 基因的 DNaseI 高敏感位点进行详细分析发现, 在 Th2 细胞的静止、分化和活化状态时都没有出现 DNaseI 高敏感位点; 而在 Th1 细胞静止阶段, 其第一内含子中有了一个, 分化阶段的第一和第三内含子中有两个, 而活化细胞中原来静止期的那个位点丢失了, 但分化阶段的两个位点还保存着^[16]。同样在人类 CD4⁺Th1 细胞中发现的 DNaseI 的高敏感位点在 IL-4 诱导培养的 CD4⁺T 细胞中也没有找到^[17]。这些提示在 CD4⁺T 细胞向 Th1 分化时, DNase 可切断 IFN- γ 基因高敏感位点的形成, 参与 IFN- γ 的表达调控。T-bet 是诱导 CD4⁺T 细胞和 NK 细胞表达 IFN- γ 的重要的转录因子, 发现也可引起 IFN- γ 的第一内含子 DNaseI 高敏感位点的出现^[18]。以上的研究说明细胞在 IFN- γ 基因转录表达过程中发生了染色质的重构, 并有转录因子参与。

2.2 甲基化作用的影响

1992 年, Pang 等^[19]首先揭示甲基化作用在 IFN- γ 表达调节中的意义。IFN- γ 的启动子 -73~+48 部位可被甲基敏感限制性酶 *Sna*B1 识别, 但这一部位在表达 IFN- γ 的人 B 细胞中是处于低甲基化状态。后来有人进一步证实在小鼠的 Th1 细胞中这一启动子的低甲基化状态同 IFN- γ 的表达有很强的相关性, 而在不表达 IFN- γ 的 Th2 细胞中的启动子已经甲基化, 若用无甲基化作用的 5-aza- 胞嘧啶替代原序列中的胞嘧啶则可使细胞表达 IFN- γ ^[20], 说明甲基化可抑制 IFN- γ 基因的表达。体外实验发现, 此位点的甲基化也可导致 DNA- 蛋白质复合物的缺失。当 *Sna*B1 位点的 CpG 被甲基化了, 则与转录因子 CREB、ATF-2 和 c-Jun 的结合明显减弱^[13], 说明甲基化作用影响了转录因子的结合活性。人类细胞的实验结果与小鼠一样, 人 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞 IFN- γ 基因启动子的 *Sna*B1 和 *Hpa*II 位点的低甲基化也与 IFN- γ 的表达高度相关: 幼稚的 T 细胞和胸腺细胞的这些位点是完全甲基化的^[21], 而成熟 CD8⁺T 细胞和记忆性 CD4⁺T 细胞的这两个位点却表现为低甲基化^[22]。反过来用 IL-4 和 PGE2 处理 CD4⁺T 细胞可抑制 IFN- γ 基因的启动子和内含子的低甲基化, 这些

细胞表达 IFN- γ 的能力下降, 同时还发现 IL-4 和 PGE2 的这些效果可被 5-aza- 胞嘧啶的作用抵消^[23]。脐带血 CD4⁺T 细胞中的 94%~96% 的 CpG 位点是高度甲基化的, 而且 IFN- γ 基因的启动子中甲基化的 CpT 和 CpA 的数量要比成人 CD4⁺T 多 5 倍, 这与成熟 CD4⁺T 细胞表达 IFN- γ 的结论一致。在 IL-4、TNF α 和 IFNGR1 基因启动子中没有发现有甲基化的 CpT/CpA。用 T 细胞 *Dnmt*1 选择性失活的小鼠模型中发现, IFN- γ 基因的 -191、-53 和 +17 位点大多是低甲基化的, 而且在幼稚 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 活化后 IFN- γ 的表达量增加与这些位点的去甲基化相关^[7]。以上众多实验说明 IFN- γ 基因中的一些位点甲基化与否将影响 IFN- γ 的表达, 而且甲基化可抑制活化 IFN- γ 所需转录因子的结合能力。

3 IL-4/IL-13 表达调节的表观遗传作用

3.1 DNA 酶作用位点的变化

在小鼠 Th2 细胞及肥大细胞 IL-4 基因 19 kb 范围内发现有 5 个 DNaseI 高敏感的位点^[24]。而在 Th1 细胞中的 IL-4 基因仅有一个 DNaseI 高敏感的位点。在幼稚的 CD4⁺T 细胞用 IL-4 和抗原处理后, IL-4 基因的 DNaseI 高敏感位点由一个变成多个, 这提示有染色质重塑的现象发生。在 Th2 细胞 IL-13 基因间 DNA 也有两个 DNaseI 高敏感位点, 而在 Th1 中没有发现 DNaseI 高敏感位点, 说明 IL-13 基因被活化也有类似的染色质重塑的现象。有研究结果显示转录因子 STAT6 在 CD4⁺T 细胞的染色质重塑中起作用: STAT6 基因剔除小鼠的 T 细胞在向 Th2 分化条件下没有出现新的 DNaseI 高敏感位点, 而且 IL-4 的表达也没有明显增高。但是用 5-aza- 胞嘧啶和 TSA 一同处理 STAT6 基因剔除小鼠的 T 细胞, DNaseI 高敏感位点可重新出现^[25]。这说明 STAT6 本身对于 T 细胞活化的 IL-4 表达并不是必需的, 但染色质重塑是关键。转录因子 GATA-3 可引起 Th1 细胞 IL-4 基因的内含子 2 中的 DNaseI 高敏感位点的出现^[26], 而且在 Th1 极化的细胞中异位表达 STAT6 和 GATA-3 可引起染色质重塑和 IL-4/IL-13 基因 DNaseI 高敏感位点的产生。但是 GATA-3 与靶 DNA 序列的结合并不是必须的, 因为用不能与 DNA 结合的 GATA-3 突变体还是可以引起 Th2 细胞因子的表达。这些提示 IL-4/IL-13 的染色质重塑需要依赖某些特定的转录因子的表达和结合, 也有可能是形成染色质重塑复合物和 IL-4/IL-13 的基因间调节区域结合。

3.2 甲基化作用的影响

甲基化也可以影响 Th2 的分化, 似乎作用不如对 Th1 强, 因为在 T 细胞向 Th2 细胞分化的第 4 天到第 7 天会有 IL-4 和 IL-5 基因的去甲基化表现, 而且这些表现也是很稳定的, 在幼稚 T 细胞向 Th2 细胞分化过程中 IL-4 和 IL-13 基因的 SmaI 位点都发现有去甲基化表现^[18]。但是 DNA 甲基转移酶 Dnmt1 缺陷小鼠的幼稚 T 细胞表达 IL-4 的水平是对照组的 3~4 倍, 而 Dnmt1 缺陷小鼠的 IFN- γ 表达却高达 8 倍^[7]。因此猜测与 IFN- γ 不同, 某些特定位点的去甲基化作用对活化 IL-4 基因的表达作用并不强, 而 IL-4 的表达可能更多地受到染色质重塑或某些关键转录因子的调节。

了解 T 细胞向 Th1 和 Th2 分化的调节过程是免疫学的一个重要研究方向和热点, 这一过程受到诸多因素的影响。分子表观遗传作用对这一分化过程的影响引起了科学家广泛的兴趣。DNA 甲基化和染色质重塑如何参与并调节 Th1 和 Th2 的分化过程, 还有许多有待研究的问题。

参考文献 (References)

- [1] Waddington C. *Endeavour*, 1942, 1: 18
- [2] Jablonka E et al. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 981: 82
- [3] Ehrlich M et al. *Nucleic Acids Res*, 1982, 10: 2709
- [4] Turker MS et al. *Mutat Res*, 1997, 386: 119
- [5] Xie S et al. *Gene*, 1999, 236: 87
- [6] Yoder JA et al. *Hum Mol Genet*, 1998, 7: 279
- [7] Lee PP et al. *Immunity*, 2001, 15: 763
- [8] Bhattacharya SK et al. *Nature*, 1999, 397: 579
- [9] Kass SU et al. *Trends Genet*, 1997, 13: 444
- [10] Razin A. *EMBO J*, 1998, 17: 4905
- [11] Hardy KJ et al. *J Immunol*, 1987, 138: 2353
- [12] Cippitelli M et al. *J Biol Chem*, 1995, 270: 12548
- [13] Penix L et al. *J Exp Med*, 1993, 178: 1483
- [14] Sica A et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 1740
- [15] Xu GL et al. *Nature*, 1999, 402: 187
- [16] Rao A et al. *Br Med Bull*, 2000, 56: 969
- [17] Kiyomasu T et al. *Immunol Lett*, 1999, 69: 239
- [18] Mullen AC et al. *Science*, 2001, 292: 1907
- [19] Pang Y et al. *Blood*, 1992, 80: 724
- [20] Young HA et al. *J Immunol*, 1994, 153: 3603
- [21] Melvin AJ et al. *Eur J Immunol*, 1995, 25: 426
- [22] Katamura K et al. *Mol Immunol*, 1998, 35: 39
- [23] White GP et al. *J Immunol*, 2002, 168: 2820
- [24] Agarwal S et al. *Immunity*, 2000, 12: 643
- [25] Bird JJ et al. *Immunity*, 1998, 9: 229
- [26] Lee HJ et al. *J Exp Med*, 2000, 192: 105

The Relationships between CD4⁺T Cell Differentiation and Epigenetic Regulation

Yang Jiang*

(Department of Immunology, Shanghai Secondary Medical University, Shanghai 200025, China)

Abstract The epigenetic regulation, such as genomic methylation, chromatin remodeling or histone deacetylation, has great influence on the maturation of CD4⁺T helper cells into Th1 phenotype or Th2 phenotype. In this paper, epigenetic regulation of IFN- γ and IL-4/IL-13 loci in Th1/Th2 cells has been reviewed in some detail. It will help to understand the possible role of the correlated transcription factors, enzymes or multiprotein complex in this epigenetic regulation.

Key words epigenetics; methylation; chromatin remodeling; CD4⁺T; differentiation

Received: September 17, 2003 Accepted: February 11, 2004

*Corresponding author. Tel: 86-21-63846590-776633, E-mail: JY-forgetter@163.net