

# FOXP3 蛋白复合体及调节性 T 细胞功能研究进展

孔超<sup>1,2</sup>, 李丹<sup>2</sup>, 陈祚珈<sup>2</sup>, PICCION Miranda<sup>2</sup>, 袁晓君<sup>1</sup>, 李斌<sup>2</sup>

1. 上海大学生命科学学院, 上海市能源作物育种及应用重点实验室, 上海 200444
2. 中国科学院上海巴斯德研究所, 分子病毒与免疫重点实验室, 上海 200031

**摘要** FOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞(FOXP3<sup>+</sup>Tregs)负责正常机体免疫稳态的维持。人类许多重大免疫性疾病均与调节性 T 细胞的功能异常相关。叉头状家族转录蛋白 FOXP3 是调节性 T 细胞中特异性表达的关键转录因子, 对调节性 T 细胞的发育与功能有着重要作用。近年来的研究表明, FOXP3 蛋白转录调控复合体的装配及其翻译后修饰调节对调节性 T 细胞的功能至关重要, 相关生理过程受到各种炎症微环境的动态调节。深入研究 FOXP3<sup>+</sup>Tregs 活性调节的分子机制将为攻克人类重大免疫及相关性疾病提供创新性线索。

**关键词** 调节性 T 细胞; FOXP3; 蛋白复合体; 翻译后修饰

**中图分类号** R392.11

**文献标志码** A

**doi** 10.3981/j.issn.1000-7857.2014.15.011

## FOXP3 Complex and Its Function in Regulatory T Cells

KONG Chao<sup>1,2</sup>, LI Dan<sup>2</sup>, CHEN Zuojia<sup>2</sup>, PICCION Miranda<sup>2</sup>, YUAN Xiaojun<sup>1</sup>, LI Bin<sup>2</sup>

1. Shanghai Key Laboratory of Bio-energy Crops, College of Life Science, Shanghai University, Shanghai 200444, China
2. Key Laboratory of Molecular Virology & Immunology, Institute Pasteur of Shanghai, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

**Abstract** FOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells (FOXP3<sup>+</sup>Tregs) belong to a specific subset of CD4<sup>+</sup> T cells which modulate many immune responses and play an indispensable role in maintaining immune homeostasis in vivo. Many major human diseases such as the autoimmune disease, the infectious disease, the allergic disease, the transplanting rejection and the cancers are associated with the dysfunction of the Tregs. The forkhead family transcription factor FOXP3 is a master regulator in the development and functions of the Tregs. Recently, a common conclusion is shared by many researchers that the FOXP3 is not a solo transcription factor, it interacts with some other transcription factors such as the STAT3 and the ROR $\gamma$ t to form a complex, to dynamically modulate the specific gene transcription progress. Furthermore, many studies including those of our laboratory demonstrate that posttranslational modification of the FOXP3 also plays an important role in the functions of the Tregs. In summary, further understanding of molecular mechanisms underlying the regulation of the FOXP3<sup>+</sup>Treg function by inflammation will lead a novel therapeutic clue for conquering major human diseases.

**Keywords** regulatory T cell; FOXP3; protein complex; posttranslational modification

调节性 T 细胞(regulatory T cells, Tregs)属于 T 淋巴细胞中表达 CD4、CD25 的一类 T 细胞亚群, 其功能在于维持体内的免疫稳态<sup>[1]</sup>。研究发现, 叉头状转录因子 FOXP3 是调节性

T 细胞中的一类重要调控因子, 其在调节性 T 细胞的发育过程中起着不可或缺的作用。随着对 FOXP3 研究的深入, 人们发现 FOXP3 不仅可以与其他转录因子形成蛋白复合体, 动态

收稿日期: 2014-01-22; 修回日期: 2014-03-11

基金项目: 国家重点基础研究计划(973 计划)项目(2014CB541803), 上海市博士后科学基金项目(12R21417100), 中国博士后科学基金项目(2012M520946), 国家自然科学基金青年项目(31200647), 国家自然科学基金重点项目(81330072), 中国科学院外籍青年科学家计划项目(2013Y1SB0005)

作者简介: 孔超, 硕士研究生, 研究方向为分子免疫, 电子邮箱: ckong@ips.ac.cn; 李斌(通信作者), 教授, 研究方向为分子免疫, 电子邮箱: binli@sibs.ac.cn

引用格式: 孔超, 李丹, 陈祚珈, 等. FOXP3 蛋白复合体及调节性 T 细胞功能研究进展[J]. 科技导报, 2014, 32(15): 73-79.

调控包括其自身在内的特异性基因转录<sup>[2]</sup>,还可以通过翻译后修饰精确调控自身状态与水平,在翻译后修饰水平上实现对调节性T细胞功能的精确调控<sup>[3-5]</sup>。许多研究表明,调节性T细胞与很多人类重大疾病包括自身免疫性疾病、肿瘤免疫耐受、炎症反应、过敏性疾病等有密切关系<sup>[1,6]</sup>。本文着重讨论正常及炎症微环境下调节性T细胞功能及FOXP3蛋白复合体调控机制的新进展。

## 1 FOXP3蛋白复合体研究进展

叉头蛋白P3(forkhead box p3, FOXP3)是叉头状转录因子家族成员,由X染色体基因编码,对Tregs的发育和功能起着重要的转录调节作用。人源FOXP3基因突变可在早期就导致自身免疫疾病的发生,如X染色体性联合自身免疫失调综合征(immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome, IPEX)等。与人类相同,小鼠缺失FOXP3也会导致严重的自身免疫疾病<sup>[7-9]</sup>。FOXP3蛋白的持续表达为天然调节性T细胞(nature Tregs, nTregs)行使正常的免疫抑制功能所必须<sup>[10]</sup>。早期研究显示,人源FOXP3可以与许多转录调节蛋白形成FOXP3蛋白复合体,动态调控包括其自身在内的基因特异性转录,介导Tregs的免疫调节功能<sup>[3,4]</sup>。近期Rudra等<sup>[11]</sup>将鼠源FOXP3蛋白复合体提纯,利用生化质谱分析进行检测,结果发现FOXP3可形成多种蛋白复合体,相对分子质量在400~800 kDa之间,被检测出的蛋白达361种,其中约30%的蛋白可能直接参与了Tregs的基因转录过程。

目前这些蛋白已经有许多为人们所熟知<sup>[12]</sup>。随着对FOXP3<sup>+</sup>Tregs研究的深入,逐渐认识到在调控Tregs功能的过程中,FOXP3并不是单独起作用的,而是与许多其他转录因子相互作用,形成蛋白复合体,动态调控Tregs的发育与功能<sup>[2,4]</sup>。例如,与FOXP3同家族的FOXP1可以通过FOXP3的二聚化结构域与之形成异二聚体,从而结合到亮氨酸-锌指结构域产生作用<sup>[4,13]</sup>。此外,FOXP3可以通过特定的螺旋卷曲(coiled-coil)结构形成同源二聚体,进而产生有活性的FOXP3寡聚体,调控Tregs功能<sup>[14]</sup>。受转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )诱导的核内类视黄醛相关受体蛋白- $\gamma$ (retinoid-related orphan receptor- $\gamma$ , ROR $\gamma$ )是T助细胞-17(T helper cell-17, Th17)细胞发育与功能的主要转录因子,其结合到白细胞介素-17A(interleukin-17A, IL-17A)的启动子区,促进静息T细胞向Th17细胞分化;而FOXP3则可以借助其第二外显子编码区与ROR $\gamma$ 相互作用,抑制IL-17A的表达,从而促进静息状态的T细胞向Tregs发育<sup>[15]</sup>。ROR $\alpha$ 可以与FOXP3的第二外显子区相互作用,抑制FOXP3的转录,FOXP3则可能与ROR $\alpha$ 的AF2结构域结合,下调IL-17、IL-22以及趋化因子受体3(chemokine (C-X-C motif) receptor 3, CXCR3)的表达。因此,在T细胞中高水平表达FOXP3可以抑制某些促炎症因子的表达,从而促进T细胞向Tregs分化<sup>[16]</sup>。

FOXP3与不同转录因子的结合,具有不同生理功能从而介导Treg不同亚型的功能异质性。干扰素调节因子4

(interferon regulatory factor 4, IRF4)作为Th2细胞中重要的转录因子在Treg中与FOXP3结合并且共同作用于一系列特异的靶基因,使Tregs能特异地抑制Th2细胞的功能。IRF4缺失的Tregs则不能控制Th2的反应<sup>[17]</sup>。FOXP3与Th1细胞表达的主要转录因子T-bet相互作用能促使Tregs对Th1反应的抑制<sup>[18]</sup>,而FOXP3与Th17细胞的关键因子信号转导与转录激活因子3(signal transducers and activators of transcription, STAT3)结合则帮助Tregs有效抑制Th17细胞功能<sup>[19]</sup>。因此,Treg在不同的环境刺激下,相应的转录因子在细胞中表达上调,与FOXP3相互作用后,保证了Tregs能及时抑制各类免疫反应。

此外,含有锌指结构的Ikaros家族成员Eos可以通过招募共转录抑制因子C端结合蛋白1(C-terminal binding protein-1, CtBP1)结合到FOXP3复合体上,使得FOXP3复合体获得转录抑制活性<sup>[20]</sup>。活化T细胞核因子(nuclear factor of activated T cells, NFAT)和活化蛋白1(activator protein 1, AP-1)也可以和FOXP3相互作用。NFAT可以与AP-1及DNA形成复合物动态调控IL-2、IL-4和IFN- $\gamma$ 的表达<sup>[21-23]</sup>。而FOXP3则可以通过自身FKH结构域在同一DNA区域与NFAT-AP-1复合物中的NFAT结合并抑制该复合物调控的特异基因的转录过程。由此认为,NFAT可能在T细胞的可塑性上扮演着十分重要的开关作用,它可以分别应答不同的信号刺激,与不同的转录因子相互作用,介导不同的生理功能,即Tregs的免疫耐受和效应性T细胞(T effector cells, T effs)的免疫激活。需要指出的是,缺失了N端结构域而只有C端锌指结构域,亮氨酸拉链结构域以及叉头状结构域的FOXP3会丧失其介导的免疫抑制功能<sup>[24]</sup>,而Zeng等<sup>[25]</sup>的研究发现似乎删除整个FOXP3的N端结构域并不影响其结合DNA的能力,因此推测其N端序列可能并不直接参与结合DNA的过程,而是招募某些共激活因子或共抑制因子结合于特定的DNA区域,实现特异的转录调节作用。由此可见,完整的FOXP3结构域(N端结构域,C端锌指结构域、亮氨酸拉链结构域、叉头状结构域)对于Tregs行使其正常功能是必不可少的<sup>[24,26]</sup>。

除了FOXP3形成的蛋白复合体的调控外,许多转录因子可以通过特异性调控FOXP3的转录水平,影响Tregs的功能与状态<sup>[27]</sup>。成骨特异性转录因子(acute myeloid leukaemia / runt-related transcription factor, AML1/RUNX1)以及AML2/RUNX3对Tregs的发育非常重要。在TGF- $\beta$ 信号的刺激下,RUNX1和RUNX3可以结合于FOXP3基因的启动子,提高FOXP3蛋白的表达量,从而在调控Treg的发育与功能中发挥重要作用<sup>[28]</sup>。STAT3则可以通过限制Smad3与FOXP3增强子的结合,从而抑制Tregs功能,介导Tregs向Th17细胞转化<sup>[19,29]</sup>。GATA结合蛋白3(GATA binding protein 3, GATA3)是Th2细胞的主要转录因子,对Th2细胞的发育与功能非常重要。研究显示GATA3可以结合于FOXP3的启动子区,抑制FOXP3的表达,从而抑制GATA3<sup>+</sup>T细胞向诱导型调节性T细胞(induced Treg cells, iTregs)发育<sup>[30]</sup>。有趣的是,

在将小鼠 Tregs 中的 GATA3 基因敲除后, Tregs 表达的 FOXP3 则会相对降低, 且伴随着 Tregs 某些功能的丧失<sup>[31]</sup>。GATA3 也可以结合到 FOXP3 的 CNS2 区域, 促进 FOXP3 的表达。因此推测 GATA3 似乎可以与不同类型细胞 (Tregs 和 Th2 细胞) 中的特异分子相互作用, 从而分别提高或降低 FOXP3 的表达水平。

近期有研究对 FOXP3 与其他调节因子的相互作用过程提出一种可能的创新模式, 使得 FOXP3 调控 Tregs 发育与功能的过程成为了随机的选择事件<sup>[32]</sup>。首先, 某些共作用因子如 CTS, RUNX 等可能先于 FOXP3 结合于相应的增强子区域, FOXP3 则利用与它们的相互作用从而找到其对应的增强子并与其结合; 其次, 这一过程也可能由同是叉头状转录因子家族的 FOXO1 介导, FOXO1 可以与 FOXP3 特异性增强子结合, 随后 FOXP3 识别 FOXO1 并将其替换; 最后, NFAT 和 AP-1 可能在 T 细胞表面受体信号 (T cell receptor signal, TCR signal) 的刺激下, 参与了 FOXP3 特异性增强子区域的染色质重塑过程, 从而使得该区域的染色质结构处于开放状态, 利于 FOXP3 的结合。这一模型的提出深化了之前对 FOXP3 蛋白调节 Tregs 发育与功能机制的认识。

包括本分子免疫课题组在内的许多研究表明 FOXP3 对 Tregs 的一系列调控不仅发生在转录水平, 许多蛋白酶因子对 FOXP3 的翻译后修饰也会对 FOXP3 的表达水平与功能产生重要影响, 从而调控 Tregs 的功能<sup>[2-3]</sup>。例如, FOXP3 在形成二聚体的过程中, 其 250 位和 252 位的两个赖氨酸位点发挥了重要作用, 而对这两个位点的可逆修饰如乙酰化等则可以实现翻译后修饰对 Tregs 的动态调控<sup>[14]</sup>。Li 等<sup>[3]</sup>先前的研究发现, 人源 Tregs 中的 FOXP3 蛋白可以发生赖氨酸乙酰化, 且其 N 端可以直接招募乙酰转移酶 Tat 结合蛋白 60 (Tat interaction protein, 60kDa, TIP60), 从而介导 FOXP3 的转录抑制活性。FOXP3 也能和 II 型组蛋白去乙酰化酶 (Histone deacetylase, HDAC) HDAC7 及 HDAC9 相互作用, 形成复合物, 进而通过翻译后修饰精确调控 FOXP3 的功能。此外, 乙酰转移酶 P300 及组蛋白去乙酰化酶 SITR1 可能也参与了 FOXP3 的乙酰化调控<sup>[33]</sup>。P300 能够促进 FOXP3 的乙酰化, 提高 FOXP3 的稳定性, 从而增加 FOXP3 蛋白水平活性, 增强 Tregs 的功能。本分子免疫课题组最近的研究揭示了一种 E3 泛素连接酶分子——Stub1, 它能够在压力信号如促炎症细胞因子、脂多糖等的刺激下, 多泛素化 FOXP3 蛋白的 48 位赖氨酸残基, 这一过程需要分子伴侣热休克蛋白 70 (Heat shock protein 70, Hsp70) 的参与。多泛素化的 FOXP3 蛋白进而通过蛋白酶体降解, 抑制 Tregs 的免疫抑制功能<sup>[5]</sup>。同一时期, van Loosdregt 等<sup>[34]</sup>则发现了一种去泛素化酶——泛素蛋白特异性蛋白酶 7 (ubiquitin specific peptidase 7, USP7), 这种酶能够去泛素化 FOXP3, 使其免于被蛋白酶体降解, 从而提高 FOXP3 的含量与稳定性, 维持 Tregs 的正常功能。在蛋白酶体介导的 FOXP3 降解途径中, HIF-1 $\alpha$  由于可以直接和 FOXP3 结合, 可能也参与了这一过程, 影响 Tregs 的功能<sup>[35,36]</sup>。

除了由此可见, 许多蛋白因子对 FOXP3 蛋白的翻译后修饰作用决定了 Tregs 的发育与功能。

综上所述, 以 FOXP3 为中心形成的对 Tregs 功能的调控机制是一个庞大而精细的调控网络, 从而使得 Tregs 可以应对外界各种微环境信号, 维持机体自身免疫耐受, 调节机体免疫稳态 (图 1)。

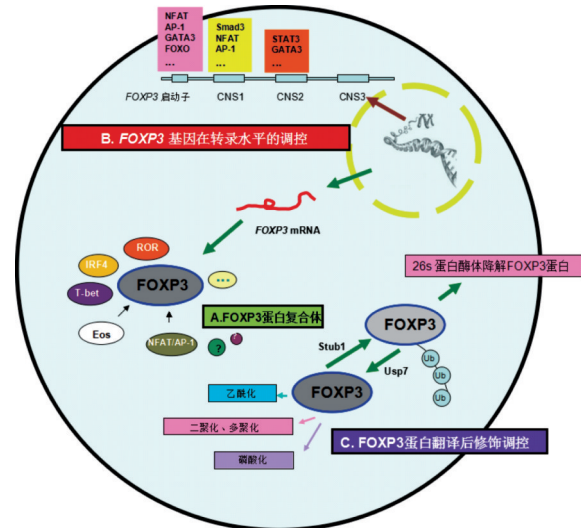


图 1 Tregs 细胞中以 FOXP3 为中心形成的调控网络

Fig. 1 The regulation network of FOXP3 in Tregs. A. FOXP3 interacts with other protein factors to form a complex. B. FOXP3 gene transcriptional regulation modulated by specific transcription factors. C. FOXP3 protein posttranslational modification regulation

## 2 FOXP3<sup>+</sup>调节性 T 细胞功能的研究进展

调节性 T 细胞属于 CD4<sup>+</sup>T 细胞, 是其重要的一类亚群, 对于保持自身抗原耐受, 防止自身免疫疾病的发生、限制慢性炎症以及调节淋巴细胞增殖的稳态平衡都非常重要。免疫系统能够识别“自我”和“非己”是由于免疫细胞 (包括免疫 T 细胞和免疫 B 细胞) 在早期的发育过程中, 在中枢免疫器官通过克隆清除 (clonal deletion) 获得了对自身抗原的耐受, 从而能够区分出自身抗原和外来抗原。除了这种被动的耐受机制外, 机体体内还有一种主动的免疫耐受机制, 即调节性 T 细胞诱导的对自身抗原的免疫耐受。Brunkow 等<sup>[37]</sup>于 2001 年通过高通量基因组序列分析的方法发现 FOXP3 基因是决定调节性 T 细胞的重要转录因子。

随着 Tregs 维持免疫稳态的作用逐渐受到重视, 对 Tregs 功能的研究也越来越多。Tregs 既可以抑制自身反应性 T 细胞, 防止自身免疫疾病的发生, 也可以调控其他免疫细胞包括抗原呈递细胞 (antigen-presenting cell, APC) 和 Tregs 等的功能<sup>[38]</sup>。早期研究中未见关于 nTregs 和 iTregs 功能是否完全一致的报道, 而近些年的许多研究似乎趋于认为 nTregs 与 iTregs 不但来源不同, 功能也是不尽相同的。nTregs 可能在维

持机体对自身物质的免疫反应上起着决定性作用,即自身免疫耐受;而*i*Tregs则有可能在机体维持对外来病原体、共生微生物及食物的免疫反应方面有着更重要的生理功能<sup>[39]</sup>。

人类漫长的进化过程中与多种微生物形成了互利共生关系。在人和动物的消化道内,有着大量的微生物,其中也不乏有致病性的病原微生物。因此,这里也成为Tregs维持机体免疫稳态功能的重要场所,如何正确的区分共生微生物、病原微生物及外来食物成分并分别对其进行免疫耐受和免疫反应成为了Tregs的主要任务。也就是说,Tregs在维持宿主与共生微生物的共生关系中起着重要的免疫调节作用<sup>[40]</sup>。这种免疫调节作用与树突状细胞(dendritic cells, DC)也有重要联系,近期的研究发现缺失了泛素连接酶肿瘤坏死因子受体相关因子6(TNF receptor-associated factor 6, TRAF6)的小鼠因为不能有效激活DC细胞,使得DC细胞对Tregs与Th2细胞的平衡调节被打破,最终导致小鼠肠道的免疫稳态失调<sup>[41]</sup>。当外界病原微生物入侵机体时,机体的天然免疫系统包括抗原递呈细胞(APC)、Teffs和淋巴B细胞等通过一系列免疫反应参与入侵病原菌的免疫清除。如果免疫反应过于强烈,免疫系统在清除病原体的同时便可能造成机体组织损伤。Tregs则可以通过抑制Teffs及抗原呈递细胞等其他免疫细胞的活化从而达到对机体的保护作用。Tregs的功能类似于“损有余而补不足”,即对组织损伤信号进行识别从而使得机体免于受到过度的免疫反应造成的组织损伤<sup>[42]</sup>。如在结肠炎小鼠模型中,有效的激活Tregs可以减少小鼠肠道的受损状况,而Tregs的功能过强则可能会危及机体与共生菌群的免疫稳态<sup>[43]</sup>。

然而,Tregs的免疫抑制功能也是一把双刃剑。Tregs可以抑制Teffs的免疫反应,一些病原菌则利用了这一特性,使得机体的免疫系统不能够彻底清除它们,从而造成慢性感染。在抗利什曼虫(*Leishmania*)感染的模型小鼠中,由于Tregs在感染部位积累,使得Teffs的功能受到限制,阻止了机体对寄生物的有效清除,最终导致小鼠的慢性感染<sup>[40]</sup>。

大量研究证明,Tregs对肿瘤细胞的存活也有作用,特别是在由细菌感染引起的恶性肿瘤的发生过程中。Tregs在感染部位积累,会限制局部的抗肿瘤免疫反应,从而导致疾病复发,利于肿瘤增生。在患有胰腺癌的小鼠模型中,利用抗糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体(glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor, GITR)的单克隆抗体(monoclonal antibody)特异性封闭Tregs免疫抑制反应,可以增强机体的抗肿瘤反应,减少体内胰腺癌细胞的数量<sup>[44]</sup>。

Darce等<sup>[45]</sup>与Bettini等<sup>[46]</sup>近期利用不同模型小鼠体内表达的绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)与FOXP3蛋白的融合蛋白——FOXP3<sup>GFP</sup>对Tregs功能进行研究。结果显示低氧诱导因子1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF1- $\alpha$ ), IRF4, 组蛋白乙酰基转移酶(histone/protein acetyltransferases, HAT), Eos, HDAC7, Tip60等转录因子在介导Tregs的免疫抑制作用中均发挥功能。HIF-1 $\alpha$ 似乎可以和IRF4竞争结合

FOXP3,而IRF4与FOXP3的结合则可以进一步促进IRF4自身的转录,使得IRF4的表达量提高,从而增强Tregs对Th2和Th17细胞产生的抑制作用,甚至防止自身免疫疾病的发生。在其过程中,参与FOXP3蛋白表观遗传修饰的因子可能也起到一定的作用<sup>[3,45]</sup>。在Bettini等的实验中,FOXP3<sup>GFP</sup>由于丧失了完整的N端结构域,不能与Eos, Tip60及HDAC7等转录因子发生作用,导致了炎症区域nTregs功能受到抑制,同时也限制了*i*Tregs的诱导。有趣的是,在其构建的FOXP3<sup>GFP</sup>-NOD小鼠中,尽管FOXP3<sup>GFP</sup>蛋白丧失了天然FOXP3的正常功能,Tregs却被“过度激活”了,即这种FOXP3<sup>GFP</sup>蛋白在炎症区域的Tregs内过量表达<sup>[46]</sup>。推测其原因可能是Tregs持续接受炎症区域的信号刺激,导致上述现象。Tregs可以通过多种分子机制实现其免疫抑制作用。其中IL-2、IL-10、TGF- $\beta$ 、IL-35、半乳糖凝集素1(galactin-1)、细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4, CTLA-4)、纤维蛋白原样蛋白2(fibrinogen-like protein 2, FLG-2)、神经菌素1(neuropilin 1, Nrp-1)等均参与了Tregs对Teffs或APC等不同类型免疫细胞的抑制作用<sup>[47-53]</sup>。

### 3 FOXP3<sup>+</sup>Tregs与人类重大疾病的研究进展

从20世纪70年代Gershon等<sup>[54]</sup>提出调节性T细胞的概念至今,Tregs在维持机体免疫平衡中的重要功能已经引起了越来越多的关注。研究Tregs在人类许多重大免疫及相关性疾病中扮演的角色,并利用其功能找出攻克这些疾病的创新性线索已经成为大家争相研究的热点领域。

#### 3.1 FOXP3与人类重大疾病

机体对自身的免疫耐受大致可分为被动耐受和主动耐受两种方式,被动耐受即自身反应性T细胞在发育过程中的克隆清除和失能;主动耐受则是调节性T细胞FOXP3<sup>+</sup>Tregs在外周通过抑制自身反应性T细胞的活性维持的。因此Tregs与自身反应性T细胞的平衡对机体的免疫稳态来说就显得尤为重要,一旦这种平衡被打破则会造成严重的自身免疫性疾病,如IPEX,类风湿性关节炎等。

IPEX综合征的发生便是由于X染色体上编码FOXP3蛋白的基因产生了突变,导致了FOXP3<sup>+</sup>Tregs的功能产生紊乱。研究显示,在IPEX综合征患者在出生几年后,有90%的患者出现了1型糖尿病(T1D)并发症,有70%的患者伴有甲状腺炎<sup>[55-57]</sup>。近期,Lampasona等<sup>[58]</sup>研究发现肠上皮细胞抗原(enterocyte antigens)harmonin和纤毛蛋白villin的自身抗体在IPEX综合征患者中的表达水平相对异常,或许可以作为IPEX综合征的标识分子。这可能为IPEX综合征的早期诊断提供了新思路,从而有利于早期治疗。

近期,癌症免疫疗法成了本领域的研究热点。与传统方法相比,免疫疗法有着更为广阔的潜景。许多研究发现,Tregs介导的免疫抑制可能是肿瘤细胞逃逸免疫清除的关键机制之一,从而使其成为肿瘤免疫治疗的主要障碍<sup>[59,60]</sup>。

近些年利用小鼠模型研究FOXP3<sup>+</sup>Tregs在肿瘤中的作用

取得了进展。例如在体内利用 CD25 特异性抗体抑制 Tregs 的功能,可以限制多种肿瘤的生长,CTLA4 的抗体也可以有效提高肿瘤免疫强度从而增强对肿瘤的免疫治疗效果<sup>[61]</sup>;而增加体内的 Tregs 数量则能够降低体内对肿瘤细胞的免疫反应强度<sup>[62]</sup>。Govindaraj 等<sup>[63]</sup>发现肿瘤坏死因子受体 2 (TNF receptor 2, TNFR2) 对 Tregs 的功能有影响,减少 TNFR2<sup>+</sup>Tregs 数量可以增强骨髓中 Tregs 的杀伤力,提高 TNF- $\alpha$  和 IL-2 的表达量。通过去甲基化药物阿扎胞苷与组蛋白去乙酰化酶抑制剂帕比司他联合使用,结果显示这种方法可以相对提高白血病的临床治疗效果。因此可见,适当改变 Tregs 数量及功能有助于肿瘤细胞的清除。

人类黑色素瘤细胞可以通过表达可诱导共刺激因子配体 (inducible costimulator-ligand, ICOS-L/B7H) 与相应受体 ICOS 作用,诱导 FOXP3<sup>+</sup>Tregs 增殖,从而抑制机体对黑色素瘤细胞的免疫反应,实现自身的增殖<sup>[64]</sup>。如果用高剂量的 IL-2 对患黑色素瘤的病人进行免疫治疗,则会引起病人体内 ICOS<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>Tregs 的增殖,进而限制 IL-2 介导的免疫反应,使得黑色素瘤得以逃逸免疫清除<sup>[65]</sup>。

肿瘤细胞微环境中有多种因素可以调节肿瘤细胞与 Tregs 之间的微妙平衡。这种平衡受制于微环境信号刺激。当信号刺激偏向于一方时,另一方便会做出反应,因此对肿瘤的治疗不能只是一味减少 Tregs 数量或提高肿瘤免疫反应这么简单,掌握这种“对峙”之间的平衡可能会更加有效。

### 3.2 FOXP3<sup>+</sup>Tregs 及创新性疫苗的研发

FOXP3<sup>+</sup>Tregs 在丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 和人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 等的感染过程中也起着重要的作用<sup>[66-69]</sup>。如在 HIV 和 HCV 的慢性感染中, Tregs 可以在很大程度上增强病原体对机体免疫反应的耐受程度,从而抑制机体对这些病原体的彻底清除。而这一点也正是目前研制治疗性疫苗过程遇到的主要障碍之一。先前研究表明,在感染及肿瘤的相关治疗过程中适当地抑制 Tregs 的功能可以提高疫苗效率,优化治疗效果。针对这种情况,现阶段可以在两个特异性靶点上进行相关疫苗及药物的研发——以 Tregs 本身为靶点或以激活 Tregs 功能的免疫抑制分子如 IL-10 和 TGF- $\beta$  等为靶点。包括本分子免疫课题组在内的许多研究表明,调节性 T 细胞功能的发挥不仅取决于 FOXP3 基因的特异性转录调节因子即 FOXP3 蛋白的表达水平,以调节 FOXP3 蛋白翻译后修饰为中心的众多调控因子对 Treg 细胞功能的动态调控也有着不可或缺的作用<sup>[2-5, 34]</sup>。因此,在疫苗的研发过程中,可以针对这些特异性的蛋白因子开发特异性药物,从而调节 Treg 细胞活性,提高疫苗效率。

总之, FOXP3<sup>+</sup>Tregs 占据着人体免疫稳态调节过程的中心环节,与人类许多重大疾病的发生有着千丝万缕的联系。深入研究疾病微环境下 FOXP3<sup>+</sup>Tregs 的功能及分子调节机制,将为人们攻克这些免疫相关疾病提供新的药物靶点。

## 4 结论

FOXP3<sup>+</sup>Tregs 在维持免疫稳态过程中的重要作用使其广受关注。尽管目前有关 FOXP3<sup>+</sup>Tregs 的研究进展很快,对于诸如 FOXP3<sup>+</sup>Tregs 在不同炎症微环境下的功能可塑性、FOXP3 调节 Tregs 的机制以及 FOXP3<sup>+</sup>Tregs 调控其他免疫细胞的分子机制等问题仍然知之甚少。目前大量对于 FOXP3 基因表达水平、FOXP3 蛋白复合体以及 FOXP3 蛋白翻译后修饰的研究已经为人们深入了解 FOXP3<sup>+</sup>Tregs 的功能及其分子机制奠定了坚实的基础。相信在不久的将来,基于 FOXP3<sup>+</sup>Tregs 的基础研究将有可能应用于癌症、自身免疫疾病等人类重大疾病的临床治疗上。

**致谢** 感谢上海大学与上海巴斯德研究所联合培养硕士研究生项目、中国科学院“百人计划”、上海市“启明星计划”等对本课题组的支持与资助。

### 参考文献 (References)

- [1] Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. Regulatory T cells and immune tolerance[J]. Cell, 2008, 133(5): 775-787.
- [2] Li B, Greene M I. Special regulatory T- cell review: FOXP3 biochemistry in regulatory T cells—how diverse signals regulate suppression[J]. Immunology, 2008, 123(1): 17-19.
- [3] Li B, Samanta A, Song X, et al. FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(11): 4571-4576.
- [4] Li B, Samanta A, Song X, et al. FOXP3 is a homo-oligomer and a component of a supramolecular regulatory complex disabled in the human XLAAD/IPEX autoimmune disease[J]. International Immunology, 2007, 19(7): 825-835.
- [5] Chen Z, Barbi J, Bu S, et al. The ubiquitin ligase Stub1 negatively modulates regulatory T cell suppressive activity by promoting degradation of the transcription factor Foxp3[J]. Immunity, 2013, 39(2): 272-285.
- [6] Littman D R, Rudensky A Y. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation[J]. Cell, 2010, 140(6): 845-858.
- [7] Godfrey V L, Wilkinson J E, Russell L B. X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse[J]. American Journal of Pathology, 1991, 138(6): 1379-1387.
- [8] Bennett C L, Christie J, Ramsdell F, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3[J]. Nature Genetics, 2001, 27(1): 20-21.
- [9] Wildin R S, Freitas A. IPEX and FOXP3: Clinical and research perspectives[J]. Journal of Autoimmunity, 2005, 25(5): 56-62.
- [10] Williams L M, Rudensky A Y. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3[J]. Nature Immunology, 2007, 8(3): 277-284.
- [11] Rudra D, Deroos P, Chaudhry A, et al. Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network[J]. Nature Immunology, 2012, 13(10): 1010-1019.
- [12] Xiao Y, Li B, Zhou Z, et al. Histone acetyltransferase mediated regulation of FOXP3 acetylation and Treg function[J]. Current Opinion

- in *Immunology*, 2010, 22(5): 583–591.
- [13] Chae W J, Henegariu O, Lee S K, et al. The mutant leucine–zipper domain impairs both dimerization and suppressive function of Foxp3 in T cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(25): 9631–9636.
- [14] Song X, Li B, Xiao Y, et al. Structural and biological features of FOXP3 dimerization relevant to regulatory T cell function[J]. *Cell Reports*, 2012, 1(6): 665–675.
- [15] Ichiyama K, Yoshida H, Wakabayashi Y, et al. Foxp3 inhibits ROR gamma-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with ROR gamma[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(25): 17003–17008.
- [16] Du J, Huang C, Zhou B, et al. Isoform-specific inhibition of ROR alpha-mediated transcriptional activation by human FOXP3[J]. *Journal of Immunology*, 2008, 180(7): 4785–4792.
- [17] Zheng Y, Chaudhry A, Kas A, et al. Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses [J]. *Nature*, 2009, 458(7236): 351–356.
- [18] Koch M A, Tucker-Heard G, Perdue N R, et al. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation[J]. *Nature Immunology*, 2009, 10(6): 595–602.
- [19] Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, et al. CD4<sup>+</sup> regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner[J]. *Science*, 2009, 326(5955): 986–991.
- [20] Pan F, Yu H, Dang E V, et al. Eos mediates Foxp3-dependent gene silencing in CD4<sup>+</sup> regulatory T cells[J]. *Science*, 2009, 325(5944): 1142–1146.
- [21] Rooney J W, Sun Y L, Glimcher L H, et al. Novel NFAT sites that mediate activation of the interleukin-2 promoter in response to T-cell receptor stimulation[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1995, 15(11): 6299–6310.
- [22] Macian F, Lopez-Rodriguez C, Rao A. Partners in transcription: NFAT and AP-1[J]. *Oncogene*, 2001, 20(19): 2476–2489.
- [23] Rao A, Luo C, Hogan P G. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function[J]. *Annual Review of Immunology*, 1997, 15: 707–747.
- [24] Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT[J]. *Cell*, 2006, 126(2): 375–387.
- [25] Zeng W P, Sollars V E, Belalcazar Adel P. Domain requirements for the diverse immune regulatory functions of Foxp3[J]. *Molecular Immunology*, 2011, 48(15–16): 1932–1939.
- [26] Lee S M, Gao B, Fang D. FoxP3 maintains Treg unresponsiveness by selectively inhibiting the promoter DNA-binding activity of AP-1[J]. *Blood*, 2008, 111(7): 3599–3606.
- [27] Haiqi H, Yong Z, Yi L. Transcriptional regulation of Foxp3 in regulatory T cells[J]. *Immunobiology*, 2011, 216(6): 678–685.
- [28] Klunker S, Chong M M, Mantel P Y, et al. Transcription factors RUNX1 and RUNX3 in the induction and suppressive function of Foxp3 + inducible regulatory T cells[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2009, 206(12): 2701–2715.
- [29] Xu L, Kitani A, Stuelten C, et al. Positive and negative transcriptional regulation of the Foxp3 gene is mediated by access and binding of the Smad3 protein to enhancer I[J]. *Immunity*, 2010, 33(3): 313–325.
- [30] Mantel P Y, Kuipers H, Boyman O, et al. GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells[J]. *PLoS Biology*, 2007, 5(12): e329.
- [31] Wang Y, Su M A, Wan Y Y. An essential role of the transcription factor GATA-3 for the function of regulatory T cells[J]. *Immunity*, 2011, 35(3): 337–348.
- [32] Samstein R M, Arvey A, Josefowicz S Z, et al. Foxp3 exploits a pre-existent enhancer landscape for regulatory T cell lineage specification [J]. *Cell*, 2012, 151(1): 153–166.
- [33] Van Loosdregt J, Vercoulen Y, Guichelaar T, et al. Regulation of Treg functionality by acetylation-mediated Foxp3 protein stabilization[J]. *Blood*, 2010, 115(5): 965–974.
- [34] Van Loosdregt J, Fleskens V, Fu J, et al. Stabilization of the transcription factor Foxp3 by the deubiquitinase USP7 increases Treg-cell-suppressive capacity[J]. *Immunity*, 2013, 39(2): 259–271.
- [35] Shi L Z, Wang R, Huang G, et al. HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2011, 208(7): 1367–1376.
- [36] Dang E V, Barbi J, Yang H Y, et al. Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1[J]. *Cell*, 2011, 146(5): 772–784.
- [37] Brunkow M E, Jeffery E W, Hjerrild K A, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse[J]. *Nature Genetics*, 2001, 27(1): 68–73.
- [38] Rudensky A Y, Campbell D J. In vivo sites and cellular mechanisms of T reg cell-mediated suppression[J]. *Journal Experimental Medicine*, 2006, 203(3): 489–492.
- [39] Lehtimaki S, Lahesmaa R. Regulatory T cells control immune responses through their non-redundant tissue specific features[J]. *Frontiers in Immunology*, 2013, 4: 294.
- [40] Belkaid Y, Tarbell K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions (\*) [J]. *Annual Review of Immunology*, 2009, 27: 551–589.
- [41] Han D, Walsh M C, Cejas P J, et al. Dendritic cell expression of the signaling molecule TRAF6 is critical for gut microbiota-dependent immune tolerance[J]. *Immunity*, 2013, 38(6): 1211–1222.
- [42] Mason D, Powrie F. Control of immune pathology by regulatory T cells [J]. *Current Opinion in Immunology*, 1998, 10(6): 649–655.
- [43] Powrie F, Leach M W, Mauze S, et al. Phenotypically distinct subsets of CD4<sup>+</sup> T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice[J]. *International Immunology*, 1993, 5(11): 1461–1471.
- [44] Aida K, Miyakawa R, Suzuki K, et al. Suppression of Tregs by anti-glucocorticoid induced TNF receptor antibody enhances the antitumor immunity of interferon-alpha gene therapy for pancreatic cancer[J]. *Cancer Science*, 2013.
- [45] Darce J, Rudra D, Li L, et al. An N-terminal mutation of the Foxp3 transcription factor alleviates arthritis but exacerbates diabetes[J]. *Immunity*, 2012, 36(5): 731–741.
- [46] Bettini M L, Pan F, Bettini M, et al. Loss of epigenetic modification driven by the Foxp3 transcription factor leads to regulatory T cell insufficiency[J]. *Immunity*, 2012, 36(5): 717–730.
- [47] Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4<sup>+</sup> T cells[J]. *Nature Immunology*, 2007, 8(12): 1353–1362.
- [48] Wu H, Li P, Shao N, et al. Aberrant expression of Treg-associated

- cytokine IL-35 along with IL-10 and TGF-beta in acute myeloid leukemia[J]. *Oncology Letter*, 2012, 3(5): 1119-1123.
- [49] Collison L W, Workman C J, Kuo T T, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function[J]. *Nature*, 2007, 450(7169): 566-569.
- [50] Garin M I, Chu C C, Golshayan D, et al. Galectin-1: A key effector of regulation mediated by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells[J]. *Blood*, 2007, 109(5): 2058-2065.
- [51] Onishi Y, Fehervari Z, Yamaguchi T, et al. Foxp3<sup>+</sup> natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation[J]. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(29): 10113-10118.
- [52] Shevach E M. Mechanisms of Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cell-mediated suppression[J]. *Immunity*, 2009, 30(5): 636-645.
- [53] Delgoffe G M, Woo S R, Turnis M E, et al. Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis [J]. *Nature*, 2013, 501(7466): 252-256.
- [54] Gershon R K, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes[J]. *Immunology*, 1970, 18(5): 723-737.
- [55] Gambineri E, Torgerson T R, Ochs H D. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis[J]. *Current Opinion in Rheumatology*, 2003, 15(4): 430-435.
- [56] Wildin R S, Smyk-Pearson S, Filipovich A H. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome[J]. *Journal of Medical Genetics*, 2002, 39(8): 537-545.
- [57] Gambineri E, Perroni L, Passerini L, et al. Clinical and molecular profile of a new series of patients with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome: inconsistent correlation between forkhead box protein 3 expression and disease severity[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2008, 122(6): 1105-1112 e1101.
- [58] Lampasona V, Passerini L, Barzagli F, et al. Autoantibodies to harmonin and villin are diagnostic markers in children with IPEX syndrome[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e78664.
- [59] Dunn G P, Old L J, Schreiber R D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting[J]. *Immunity*, 2004, 21(2): 137-148.
- [60] Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2005, 5(4): 263-274.
- [61] Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2006, 6(4): 295-307.
- [62] Curiel T J, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival[J]. *Nature Medicine*, 2004, 10(9): 942-949.
- [63] Govindaraj C, Tan P, Walker P, et al. Reducing TNF Receptor 2+ regulatory T cells via the combined action of azacitidine and the HDAC inhibitor panobinostat for clinical benefit in acute myeloid leukemia patients[J]. *Clinical Cancer Research*, 2013.
- [64] Martin-Orozco N, Li Y, Wang Y, et al. Melanoma cells express ICOS ligand to promote the activation and expansion of T-regulatory cells [J]. *Cancer Research*, 2010, 70(23): 9581-9590.
- [65] Sim G C, Martin-Orozco N, Jin L, et al. IL-2 therapy promotes suppressive ICOS<sup>+</sup> Treg expansion in melanoma patients[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2013.
- [66] Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, et al. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection[J]. *Hepatology*, 2003, 38(6): 1437-1448.
- [67] Park S H, Veerapu N S, Shin E C, et al. Subinfectious hepatitis C virus exposures suppress T cell responses against subsequent acute infection[J]. *Nature Medicine*, 2013, 19(12): 1638-1642.
- [68] Kinter A L, Hennessey M, Bell A, et al. CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2004, 200(3): 331-343.
- [69] Singh A, Vajpayee M, Ali S A, et al. Cellular interplay among Th17, Th1, and Treg cells in HIV-1 subtype "C" infection[J]. *Journal of Medical Virology*, 2013.

(编辑 田恬)



## 《科技导报》“书评”栏目征稿

“书评”栏目发表图书评论文章,被评论的图书以高级科普、学术专著及科学文化图书为主,兼顾科学精神、科学方法、科技哲学、科学人文、科学家传记、经典科学著作、科学通俗读物、科学道德等内容。欢迎投稿,择优刊登。每篇书评以2100字左右为宜,需配书影,并含书名、作者、出版单位、出版年份、定价等信息。栏目责任编辑:陈广仁,投稿邮箱:chenguangren@cast.org.cn。