

继发性肺结核患者治疗初期 FOXP3 TSDR DNA 去甲基化变化情况分析*

武学成¹, 冀红霞², 魏玉娥³ (1. 深圳市龙华新区慢性病防治中心, 广东深圳 518110;
2. 深圳市龙华新区疾病预防控制中心, 广东深圳 518110;
3. 深圳市龙华新区人民医院检验科, 广东深圳 518110)

摘要:目的 应用一种 FOXP3 TSDR DNA 去甲基化荧光定量 PCR 技术, 并分析该方法在继发性肺结核患者治疗初期变化情况。方法 选取 2014 年 6 月~2015 年 5 月来深圳市龙华新区慢性病防治中心就诊的继发性肺结核病人 47 例作为研究组, 健康对照 40 例, 分离外周血单个核细胞, 筛选 CD4⁺CD25⁺T 细胞, 提取基因组 DNA。利用去甲基化 FOXP3 TSDR 特异性引物扩增对照组基因组 DNA, 通过酶切、克隆和回收纯化等过程构建质粒标准品, 优化 FOXP3 TSDR 去甲基化实时定量 PCR 技术, 建立 CD4⁺CD25⁺T 细胞比例与 FOXP3 TSDR PCR 拷贝换算关系, 用该方法分析对照组和研究组 0 周及治疗后 2, 4 和 8 周时的调节 T 细胞频率(FOXP3 TSDR 去甲基化), 应用 spss16.0 软件统计分析实验所得数据。结果 0 周时 47 例研究组抗酸染色均为阳性, 对照组均为阴性。以抗酸染色结果分组: 对照组、抗酸(1+)组、抗酸(2+)组、抗酸(3+)组和抗酸(4+)组其调节 T 细胞频率分别为 1.63%±0.70%, 1.96%±0.10%, 1.32%±0.32%, 0.86%±0.21% 和 0.53%±0.12%, 抗酸(2+)组与对照组差异无统计学意义, 抗酸(3+)组与对照组差异有统计学意义。研究组 0, 2, 4 和 8 周时调节 T 细胞频率均值、范围及 95% 可信区间分别为 1.05%(0.32%~2.03%), CI(0.93%, 1.18%); 2.04%(0.95%~3.95%), CI(1.85%, 2.24%); 3.44%(2.35%~4.95%), CI(3.27%, 3.61%); 2.79%, (1.02%~4.27%), CI(2.60%, 2.98%)。对照组与研究组 0 周时人群调节 T 细胞频率之间差异有统计学意义($t=4.669$, $P<0.05$)。单变量方差分析显示治疗时间对研究组外周血调节 T 细胞频率(FOXP3 TSDR 去甲基化)水平变化有影响($F=347.2$, $P<0.001$, $df=3$, 组内 $F=407.4$, $P<0.001$, $df=3$), 治疗时间和分组交互效应呈线性关系($F=678.2$, $P<0.001$, $df=1$)。结论 该方法敏感、特异, 可以用于继发性肺结核患者的疗效监测。

关键词:继发性肺结核; 调节 T 细胞去甲基化区域(treg-specific demethylated region FOXP3 TSDR); 叉头状/翅膀状螺旋转录因子(forkhead box P3 protein, Foxp3)

中图分类号: R521.5; R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)03-084-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.03.023

Situation Changes of DNA Demethylation Analysis of FOXP3 TSDR at the Beginning of Patients with Secondary Pulmonary Tuberculosis

WU Xue-cheng¹, JI Hong-xia², WEI Yu-e³

(1. Shenzhen Longhua New District Chronic Disease Prevention and Control Center, Guangdong Shenzhen 518110, China; 2. Shenzhen Longhua New District Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Shenzhen 518110, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Longhua New District People's Hospital, Guangdong Shenzhen 518110, China)

Abstract: **Objective** To analyze changes of DNA demethylation analysis of FOXP3 TSDR at the beginning of the secondary pulmonary tuberculosis patients by utilizing real-time PCR technology. **Methods** To select 47 patients of secondary pulmonary tuberculosis as a research group from June 2014 to May 2015 and 40 healthy donors as a control group. The peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of research group and control group were isolated. CD4⁺CD25⁺T cells were isolated from PBMC. Genomic DNA was isolated from CD4⁺CD25⁺T cells. PCR was performed in a final reaction volume containing demethylation-specific primers. Plasmid standard was generated by PCR products were enzyme digestion, TOPO TA cloning, and recycling and purification. A real-time PCR system was established by quantitatively analyzing the specificity of FOXP3 TSDR demethylation to treg (regulatory T-cell). Treg numbers of control group at week 0 and research group treated at week 0, week 2, week 4 and week 8 by using real-time PCR assay of the FOXP3 TSDR demethylation. The experimental data was analyzed by using SPSS 16.0 software. **Results** The M. tuberculosis in sputum of research group were positive by smear microscopy, however the results of control group were negative. The treg frequency of control group, 2+ group and 3+ group respectively was 1.63%±0.70%, 1.96%±0.10% and 0.86%±0.21%, respectively. The difference between the treg fre-

* 基金项目: 2015 年深圳市科技研发资金项目第二批基础研究项目(JCYJ20150325103202291)。

作者简介: 武学成(1980-), 男, 硕士, 副主任技师, 医师, 研究方向: 细菌分子生物学。

quency of control group and that of 2+ group by smear microscopy had not statistical significance, however which of 3+ group was opposite. The average treg frequency of research group treated at week 0, 2, 4 and 8 respectively was at 1.05%, 2.04%, 3.44% and 2.79%, range of which respectively was 0.32% ~ 2.03%, 0.95% ~ 3.95%, 2.35% ~ 4.95% and 1.02% ~ 4.27%, 95% confidence interval of which respectively was (0.93%, 1.18%), (1.85%, 2.24%), (3.27%, 3.61%) and (2.60%, 2.98%). The treg frequency of difference between control group and research group at week 0 had statistical significance ($t=4.669, P<0.05$). The treg frequency was influenced by time of therapy, using One-Way ANOVA analysis ($F=347.2, P<0.001, df=3$, within-subjects Contrasts: $F=407.4, P<0.001, df=3$). Test of the treatment time and group interaction effect was linear ($F=678.2, P<0.001, df=1$). **Conclusion** DNA demethylation analysis of FOXP3 TSDR was high sensitivity and specificity in monitoring changes of treg at the beginning of the secondary pulmonary tuberculosis patients.

Keywords: secondary pulmonary tuberculosis; treg-specific demethylated region, FOXP3 TSDR; forkhead box P3 protein (FOXP3)

结核病是慢性传染性疾病,据世界卫生组织评估,目前我国结核病年发病人数约为130万,占全球发病人数的14%,位居全球第二位,我国已成为全球22个结核病高负担国家之一^[1]。结核病免疫机制主要依赖细胞免疫,结核分枝杆菌感染后,是巨噬细胞分泌大量的细胞因子,同时T淋巴细胞与巨噬细胞相互作用和协调,T淋巴细胞识别特异性抗原受体,分化参与结核结节的形成等迟发型超敏反应^[2~4]。研究发现抗结核整体的免疫网络需要一种调节T细胞(Treg),这种T细胞特异性分子标记是一种转录因子Foxp3(forkhead box P3 protein),又称叉头状/翅膀状螺旋转录因子,在调控调节性T细胞的发育和功能中起重要作用^[5]。本研究通过荧光定量PCR技术分析继发性肺结核病人治疗0, 2, 4和8周转录因子FOXP3 TSDR去甲基化情况,评价该方法对继发性肺结核病人疗效观察和机体免疫监测的意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 研究组:根据《中华人民共和国卫生行业标准肺结核诊断标准(WS288-2008)》,选取2014年6月~2015年5月来深圳市龙华新区慢性病防治中心就诊的继发性肺结核病人(以浸润性肺结核为主,含纤维空洞性肺结核和干酪样肺炎)47例,男性32例,女性15例,年龄18~47岁,平均年龄(32 ± 11.2)岁,细菌学(痰涂片、痰培养)和影像学均为阳性继发性肺结核患者作为研究对象,排除HIV,自身免疫疾病、肿瘤、炎症性肠病、过敏和伴X-染色体多内分泌病等疾病,治疗期间未用免疫抑制剂和激素类药物,治疗方案依据肺结核标准化学治疗方案-复治涂阳肺结核治疗方案2HRZSE/4~6HRE。

1.1.2 对照组:选择健康人群40例,男性26例,女性14例,年龄17~40岁,平均年龄(28 ± 9.6)岁,与研究组比较,年龄、性别和职业分布差异无统

计学差异。

1.2 试剂和仪器 人外周血基因组提取试剂盒(QIAamp DNA Mini kit)、质粒纯化试剂(Qiagen Plasmid Midi Kit)购于凯杰企业管理(上海)有限公司,CD4⁺T细胞阴性选择试剂(磁珠分离系统)、CD4⁺T细胞 anti-CD25-APC 荧光染液购于 Miltenyi Biotec 公司,DP214-通用型-DNA 纯化回收试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司,pCR2.1-TOPO TA 载体购于 Invitrogen 公司,荧光定量PCR试剂购于ABI公司。使用的仪器有 BioPhotometer D30 (Eppendorf μ Cuvette G1.0,德国 Eppendorf 公司),ABI7500(美国 ABI 公司),-80℃冰箱(Thermo,美国)。

1.3 方法

1.3.1 样品采集及疗程中临床资料收集:研究组在诊断初期和治疗后2, 4, 8周分别用EDTA抗凝管采集清晨空腹血液样本3ml,收集研究对象的初诊、2周、4周和8周的清晨、夜间和即时痰样。对照组只采集一次清晨空腹3ml用EDTA抗凝新鲜血液。收集上述各时间点研究组患者的痰涂片、痰培养、影像学及临床评价资料。

1.3.2 痰涂、染色和镜检:见参考文献[6]。

1.3.3 外周血单个核细胞(PBMC)的提取:用Ficoll密度梯度离心法分离研究组和对照组单个核细胞(淋巴细胞和单核细胞),洗涤,制备PBMC悬液,分成三份,取微量用细胞计数板计数细胞总数和活细胞百分率,分离的血浆冻存-80℃备用。

1.3.4 CD4⁺CD25⁺T细胞筛选:取上述一份PBMC悬液,分离CD4⁺T细胞,分离余液及细胞-80℃备用。CD4⁺T细胞用 anti-CD25-APC 荧光染液分离成CD4⁺CD25⁺T和CD4⁺CD25⁻T细胞,收集细胞及余液-80℃保存备用。

1.3.5 CD4⁺CD25⁺T细胞基因组DNA的提取:按照说明书提取基因组DNA,溶解于0.1×TE缓冲液,置于-80℃储存备用。

1.3.6 质粒标准品的制备:将对照组 40 人份基因组 DNA 各取一定比例混匀,利用去甲基化 FOXP3 TSDR 特异性引物扩增,反应体积 50 μl ,体系比例和反应条件如实时定量 PCR。PCR 产物切胶回收,纯化,DNA 片段克隆至 pCR2.1-TOPO TA 载体,纯化质粒,测序鉴定。确定质粒浓度,然后稀释成 100,10,1,0.1fg,代表浓度 20 000,2 000,200 和 20 质粒拷贝。

1.3.7 FOXP3 TSDR 去甲基化实时定量 PCR 分析:引物和探针参见文献[7]。实时定量 PCR 反应体系如下:反应体积 20 μl ,其中 15 pmol/ μl 上游引物 1 μl ,15 pmol/ μl 下游引物 1 μl ,5 pmol/ μl 杂交探针 1 μl ,200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP,15 ng/ μl 重亚硫酸盐处理基因 DNA 模板和质粒标准品各 2 μl ,混匀,6 000 r/min 短暂离心。反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min 预变性,然后按 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,61 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,共 40 个循环,制备标准品时 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min 延伸。

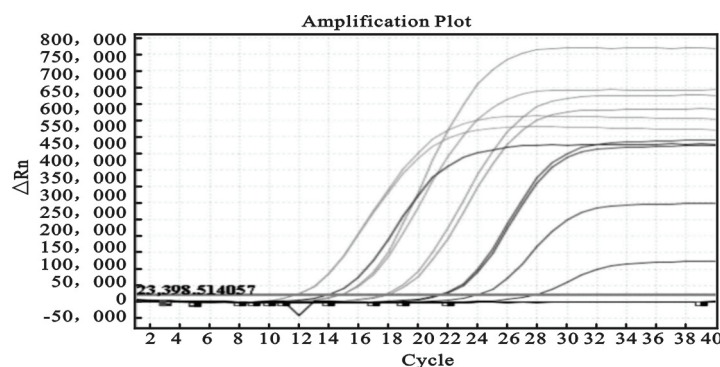
1.3.8 $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{+}$ T 细胞比例与 FOXP3 TSDR PCR 拷贝换算:将对照组分离的 $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{+}$ T 细

胞计数分为 10 000,5 000,2 500,1 250 和 625 细胞群,分别混于 2×10^6 单个粒细胞群,对应 $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{+}$ T 细胞频率比例为 0.5%,0.25%,0.13%,0.06%和 0.03%。将上述混合后细胞群提取基因组 DNA,实时定量 PCR 分析时对应的 FOXP3 TSDR 模板拷贝为 56,28,14,7 和 3.5 copies。

1.4 统计学分析 应用 spss16.0 软件统计分析实验所得数据。利用独立样本 *t*-test 分析对照组和研究组 0 周时 FOXP3 TSDR 去甲基化(调节 T 细胞频率)差异;利用单因素重复测量方差分析分析研究组治疗后各时间段差异,用 Barlett 法和 Levene 检验判断方差齐性。利用完全随机设计方差分析(Dunnett *t*-test 检验)研究组抗酸染色结果各组间 FOXP3 TSDR 去甲基化(调节 T 细胞频率)差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒标准品 FOXP3 TSDR 去甲基化实时定量 PCR 分析 见图 1。



从左至右代表浓度 20 000,2 000,200 和 20 质粒拷贝,每标准品重复 2 次。

图 1 质粒标准品 FOXP3 TSDR 去甲基化实时定量 PCR 分析

2.2 初诊时两组抗酸染色及对应 FOXP3 TSDR 去甲基化结果 初诊时 47 例研究组抗酸染色均为阳性,对照组均为阴性。以抗酸染色结果分组见表 1,抗酸(2+)组与对照组调节 T 细胞频率差异无

统计学意义($P < 0.05$),抗酸(3+)组与对照组调节 T 细胞频率差异有统计学意义($P > 0.05$)。各组之间 FOXP3 TSDR 去甲基化(调节 T 细胞频率)总体差异方差参差不齐。

表 1 初诊时 47 例研究组和对照组抗酸染色及对应 FOXP3 TSDR 去甲基化结果

组 别	抗酸染色阴性	抗酸染色(1+)	抗酸染色(2+)	抗酸染色(3+)	抗酸染色(4+)
对照组	40	0	0	0	0
研究组	0	3	17	21	6
调节 T 细胞频率(%)	1.63 \pm 0.70	1.96 \pm 0.10	1.32 \pm 0.32	0.86 \pm 0.21	0.53 \pm 0.12

2.3 对照组和研究组及治疗后外周血 FOXP3 TSDR 去甲基化结果 各组人群 FOXP3 TSDR 去甲基化(调节 T 细胞频率,Treg frequency)均值(范围)及 95%可信区间见表 2。对照组与研究组 0 周时人群调节 T 细胞频率之间差异有统计学意

义($t=4.669$, $P < 0.05$),治疗时间对研究组外周血调节 T 细胞频率水平变化有影响($F=347.2$, $P < 0.001$, $df=3$);组内因素效应对研究组外周血调节 T 细胞频率有影响($F=407.4$, $P < 0.001$, $df=3$)且治疗时间和分组交互效应呈线性关系($F=$

678.2, $P < 0.001$, $df = 1$), 见图 2。

表 2 治疗不同时间段各组调节 T 细胞频率均值(范围)及 95%可信区间(CI)(%)

组别	n	0 周			2 周			4 周			8 周		
		均值	范围	CI	均值	范围	CI	均值	范围	CI	均值	范围	CI
对照组	40	1.63	0.38~3.0	1.41, 1.85	—	—	—	—	—	—	—	—	—
研究组	47	1.05	0.32~2.03	0.93, 1.18	2.04	0.95~3.95	1.85, 2.24	3.44	2.35~4.95	3.27, 3.61	2.79	1.02~4.27	2.60, 2.98

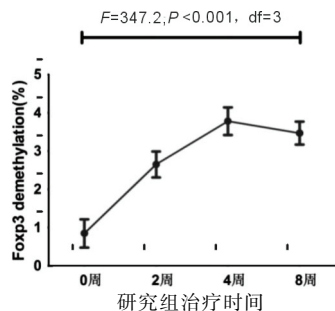


图 2 治疗时间对研究组外周血调节 T 细胞频率水平变化的影响

3 讨论 调节性 T 细胞 ($CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ Treg) 是针对自身和外来抗原下调抗原特异性 T 细胞应答, 抑制免疫病理损伤 $CD4^+$ T 细胞亚群^[8,9]。Treg 细胞对结核分枝杆菌感染的宿主免疫反应发挥着重要的调节作用已经形成共识, 但具体的机理仍不清楚。Foxp3 又称叉头状/翅膀状螺旋转录因子家族 (the forkhead transcription factor family, TF) 成员之一, 在调控调节性 T 细胞的发育和功能中起重要作用^[10,11]。Foxp3 基因组位置 Xp11.23, NCBI 基因 ID: 50943, NC_000023.11 (49250436.49265738, complement) 由 12 外显子构成。外显子-2b 和-1 被 5 000 bp 分割, 这个片段存在几个顺式作用元件^[12]。Hori^[13] 和 Ohkura 等^[14] 已证实 Foxp3 在调节 T 细胞在免疫应答中起关键作用 (细胞谱系的形成)。

依据 Foxp3 的启动子和基因内在增强子区域的后天修饰可以区分 Tconv 和 Treg 细胞, Treg 的基因内在增强子区域被称为调节 T 细胞去甲基化区域 (Treg-specific demethylated region, TSDR)^[15]。TSDR 的调节顺式作用原件出现在非编码外显子-2b 和-1 之间被称为基因内在增强子, 主要作用是调节 Foxp3 表达, 在其 +4 201~+4 500 bp 范围存在 CpG 残基, 天然 $CD4^+ CD25^-$ T 细胞表现为完全的甲基化, 而 Treg 表现为完全的去甲基化。TSDR 的-2 786~-5 558 bp 间存在 CpG 岛上游增强子, 天然外周 $CD4^+ CD25^-$ T, 活化的 $CD4^+$ T 细胞和分泌 TGF- β 的 Foxp3 $^+$ Treg 细胞表现为甲基化, 而 Treg 表现为去甲基化。TSDR 这些基因

片段是 Treg 和其他表达 Foxp3 的 T 细胞辨别标志物。常规评价细胞功能依靠细胞培养及流式细胞检测技术, 方法繁琐, 技术要求高, 一般医院均无法完成。上述理论提供一种替代方案, FOXP3 TSDR 检测结果与细胞培养和染色结果应高度一致。我们采用 Wieczorek^[7] 研究团队建立的 FOXP3 TSDR 实时定量 PCR 技术。该技术的关键是标准曲线的建立, 质粒标准品构建需要 PCR 扩增、酶切、克隆等过程以及 $CD4^+ CD25^+$ T 细胞比例与 FOXP3 TSDR PCR 拷贝换算。依据 Wieczorek 研究团队换算机制, 实际检测过程需要高分辨率的试剂, 操作人员技术要娴熟, 我们实际应用中将单个粒细胞群减少 10 倍, 整体的检测数据刚好处于技术检测限范围内, 结果质量得到保证。

结核分枝杆菌感染方便、快捷的诊断方法为痰涂片, 虽然阳性率仅为 30% 左右。为了比较疗效以及使实验数据更明确更具有可比性, 我们课题选取痰涂片阳性的继发性肺结核患者。我们分析初诊时两组抗酸染色及其对应的 FOXP3 TSDR 结果, 分析发现调节 T 细胞的数量是与痰涂片的阳性情况 (抗酸染色结果) 有关。基础免疫学理论认为结核感染一般 $CD4^+$ T 细胞减少, 我们实验数据部分支持该观点。我们分析研究组 0, 2, 4 和 8 周时的调节 T 细胞频率的范围、均值及 95% 的置信区间, 治疗时间对调节 T 细胞频率有影响, 随着治疗时间的延长调节 T 细胞频率逐渐升高, 4 周后又逐渐下降。我们推测由于结核分枝杆菌的免疫方式导致感染初期抑制调节 T 细胞的分化, 导致其数量减少, 这有利于结核分枝杆菌对机体的免疫损伤, 临床宏观表现为结核空洞肺等。随着肺结核标准化学治疗方案 2HRZSE/4~6HRE 的应用, 继发性肺结核患者结核分枝杆菌被杀灭, 体内调节 T 细胞数量逐渐恢复并且增加, 这有利于机体对免疫损伤的调节和恢复, 随着治疗时间的延长, 机体出现一种稳态, 调节 T 细胞数量较治疗初期有所下降, 这应该是机体免疫自稳的结果, 本实验结果也证实了我们的推测, 但还需要流式细胞技术证实。由于条件及资金限制, 本研究

(下转 91 页)

- [5] Agarwal SK. The genetics of systemic sclerosis[J]. *Discov Med*, 2010, 10(51):134-143.
- [6] Schachna L, Wigley FM, Morris S, et al. Recognition of granzyme B-generated autoantigen fragments in scleroderma patients with ischemic digital loss[J]. *Arthritis Rheum*, 2002, 46(7):1873-1884.
- [7] 武永康, 王兰兰, 彭晓东, 等. 抗着丝点抗体在自身免疫性疾病中的临床应用价值探讨[J]. *华西医学*, 2005, 20(4):650-652.
- Wu YK, Wang LL, Peng XD, et al. Clinical analysis and applicable value of anticentromere antibodies in autoimmune disease[J]. *West China Medical Journal*, 2005, 20(4):650-652.
- [8] 夏 晴, 仲人前, 范列英, 等. 385 例癌患者自身抗体检测结果分析[J]. *上海医学检验杂志*, 2001, 16(1):5-7.
- Xia Q, Zhong RQ, Fan LY, et al. Analysis of serum autoantibodies in 385 case of malignancies[J]. *Shanghai Journal of Medical Laboratory Sciences*, 2001, 16(1):5-7.
- [9] Vlachoyiannopoulos PG, Moutsopoulos HM. Anticentromere(ACA)-positive Sjögren's syndrome: a disease entity? [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2013, 31(2):163-164.

收稿日期:2016-01-04

修回日期:2016-03-13

(上接 87 页)无法研究其相关性。继发性肺结核治疗是长期的过程,疗程一般大于半年,本研究只是选取治疗 0~8 周时间段,主要考虑治疗后期是维持治疗,8 周后痰涂片结果都已转为阴性。本研究发现 FOXP3 TSDR 检测结果可以反映继发性肺结核患者治疗初期 Treg 的数量变化。

总之,我们利用 FOXP3 TSDR PCR 方法分析继发性肺结核患者初诊及各疗程时间点的调节 T 细胞频率,发现该方法对继发性肺结核患者治疗初期 Treg 的数量变化了解有一定的意义。

参考文献:

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2014[M]. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2014:08.
- [2] Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and maintenance of regulatory T cells[J]. *Immunity*, 2013, 38(3):414-423.
- [3] 钱 晨. 结核感染 T 细胞酶联免疫斑点试验与结核抗体试验在诊断骨关节结核中的临床应用价值[J]. *现代检验医学杂志*, 2015, 30(4):74-76.
- Qian C. Clinical value of tuberculosis infection T cell ELISPOT and TB antibody test in experimental tuberculosis of bones and joints[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2015, 30(4):74-76.
- [4] 赵英伦, 胡溪源, 李翠萍, 等. 肺结核患者血清 caspase-3 活性研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2014, 29(5):40-41, 43.
- Zhao YL, Hu XY, Li CP, et al. Serum caspase-3 activity in tuberculosis patients[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2014, 29(5):40-41, 43.
- [5] Ngalamika O, Liang G, Zhao M, et al. Peripheral whole blood FOXP3 TSDR methylation: a potential marker in severity assessment of autoimmune diseases and chronic infections[J]. *Immunol Invest*, 2015, 44(2):126-136.
- [6] 张贺秋, 赵雁林. 现代结核病诊断技术[M]. 北京:人民卫生出版社, 2013:47-55.
- Zhang HQ, Zhao YL. Modern TB diagnosis techniques[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2013:47-55.
- [7] Wieczorek G, Asemisen A, Model F, et al. Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(2):599-608.
- [8] Sakaguchi S, Setoguchi R, Yagi H, et al. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in self-tolerance and autoimmune disease[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006(305):51-66.
- [9] Plesa G, Zheng L, Medvec A, et al. TCR affinity and specificity requirements for human regulatory T-cell function[J]. *Blood*, 2012, 119(15):3420-3430.
- [10] Katoh H, Zheng P, Liu Y. FOXP3: genetic and epigenetic implications for autoimmunity[J]. *J Autoimmun*, 2013(41):72-78.
- [11] Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation[J]. *Cell*, 2010, 140(6):845-858.
- [12] Lal G, Bromberg JS. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expressing [J]. *Blood*, 2009, 114(18):3727-3735.
- [13] Hori S. Lineage stability and phenotypic plasticity of Foxp3+regulatory T cells[J]. *Immunol Rev*, 2014, 259(1):159-172.
- [14] Ohkura N, Hamaguchi M, Morikawa H, et al. T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development[J]. *Immunity*, 2012, 37(5):785-799.
- [15] Lopez-Pastrana J, Shao Y, Chernaya V, et al. Epigenetic enzymes are the therapeutic targets for CD4(+)CD25(+/high) Foxp3(+) regulatory T cells [J]. *Transl Res*, 2015, 65(1):221-240.

收稿日期:2015-12-03

修回日期:2016-03-29