



组蛋白去乙酰化酶3对外周CD4⁺ T细胞分化的影响*

郭 晗¹⁾ 李文婷²⁾ 张 婷¹⁾ 张爱红³⁾ 郑爱华³⁾ 田 枫^{2)**} 郑全辉^{1)**}

(¹⁾ 华北理工大学基础医学院, 河北省慢性疾病基础医学重点实验室, 唐山 063210; (²⁾ 北京大学医学部实验动物科学部, 北京 100083;

(³⁾ 唐山市工人医院重症医学科, 唐山 063000)

摘要 目的 探讨组蛋白去乙酰化酶3 (HDAC3) 对外周CD4⁺ T细胞分化及功能的调控作用。方法 采用CD4^{cre}酶介导Hdac3杂合基因缺失小鼠 (Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre/+}) 及其野生型正常对照小鼠 (Hdac3^{fl/fl}, WT), 流式细胞术检测HDAC3缺失对外周CD4⁺和CD8⁺ T细胞比例和数量的影响; 在体外佛波酯 (PMA) 和离子霉素 (Ionomycin) 刺激条件下, 流式细胞术检测HDAC3缺失对CD4⁺ T细胞中IFN- γ 、IL-4和IL-17A的表达以及Tfh细胞产生的影响; 采用ELISA检测HDAC3缺失对小鼠血清IFN- γ 、IL-4和IL-17表达的影响; 分选Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre/+}和WT小鼠外周初始CD4⁺ T细胞, 分别在Th1和Th2分化条件下培养, 细胞内染色检测HDAC3缺失对Th1、Th2以及Th17相关细胞因子及其特异转录因子表达的影响; 采用Microarray检测HDAC3缺失对CD4⁺ T细胞分化亚群相关基因表达的影响; 采用链脲佐菌素 (STZ) 处理小鼠构建I型糖尿病 (T1DM) 疾病模型, 检测HDAC3缺失对T1DM发病的影响。结果 与WT小鼠相比, Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre/+}小鼠外周CD4⁺和CD8⁺ T细胞的比例和数量显著降低。Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre/+}小鼠CD4⁺ T细胞及血清中IFN- γ 的表达显著降低, 而IL-4和IL-17A的表达显著增加, Tfh细胞比例也显著增加; HDAC3缺失抑制体外培养CD4⁺ T细胞向Th1分化但促进其向Th2分化; Microarray检测发现HDAC3缺失导致Th1型细胞谱系基因表达降低, 而Th2、Th17以及Tfh细胞谱系基因表达增加; 在STZ诱导条件下, HDAC3缺失抑制小鼠T1DM的发生和CD4⁺ T细胞向Th1分化。结论 HDAC3促进外周CD4⁺ T细胞向Th1细胞分化并加重T1DM的发生。

关键词 组蛋白去乙酰化酶3, CD4⁺ T细胞, 细胞分化

中图分类号 R392.3

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0045

CD4⁺ T细胞的发育、分化与多种免疫相关疾病 (如肿瘤、自身免疫病、超敏反应性疾病) 的发生、发展密切相关。在内外因素作用下, CD4⁺ T细胞可进一步分化为不同亚群, 进而发挥不同的免疫功能^[1-2]。其中, Th1细胞主要发挥抗细胞内病毒或细菌感染以及抗肿瘤免疫等, 病理状态下参与炎症性疾病的发生及发展^[3]。Th2细胞分泌的细胞因子可激活肥大细胞、嗜酸性粒细胞及嗜碱性粒细胞, 参与过敏反应和抗寄生虫感染的发生, 而Th1型细胞因子对Th2反应具有拮抗作用^[4-5]。Th17细胞可通过产生细胞因子IL-17参与抗细胞外细菌和真菌感染, 过度或持续活化时参与了各种炎症性疾病的病理过程^[6]。滤泡辅助T细胞 (T follicular helper cells, Tfh cells) 是一类独特的亚群, 促进免疫球蛋白亲和力和成熟和重链类别转换, 并最终促进长寿命浆细胞和记忆B细胞的高亲和力抗体的产生。Tfh细胞的异常分化也会引起自身抗体的产生

和自身免疫病的发展^[7-8]。

目前研究表明, 表观遗传调控在T细胞的发育、分化过程中发挥重要作用^[9]。组蛋白去乙酰化酶3 (histone deacetylase 3, HDAC3) 是一种重要的表观遗传调控蛋白, 通过催化组蛋白或非组蛋白特异性赖氨酸的去乙酰化来调节染色质结构或基因表达^[10]。HDAC3在机体广泛表达, 参与多种组织细胞发育、分化的调控作用^[11-12]。近年来, HDAC3在T细胞发育分化过程中的作用已被广泛研究。胸腺细胞发育过程中需要HDAC3进行阳性选择, 并且HDAC3是外周T细胞成熟所必需的^[13-14]。HDAC3对小鼠外周CD4⁺ T细胞的激活以

* 河北省卫健委 (20190105) 和国家自然科学基金 (81373111) 资助项目。

** 通讯联系人。

郑全辉 Tel: 0315-8805516, E-mail: 1078209929@qq.com

田枫 Tel: 010-82802602, E-mail: tianfeng@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2022-02-08, 接受日期: 2022-06-06

抑制胆固醇流出也至关重要^[15]。此外, HDAC3是调节CD8⁺ T细胞发挥效应功能和分化的关键因子^[16]。HDAC3在活化早期抑制CD8⁺ T细胞的细胞毒性, 并且是急性感染消退后活化CD8⁺ T细胞持续存在所必需的。最近有研究表明^[17], HDAC3通过抑制miR-296-5p启动子活性介导的*Bcl-xl*上调增强了淋巴细胞的抗凋亡能力, 从而加速了1型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1DM)的发生。T1DM是一种自身免疫性疾病, 冠心病是导致与胰岛素抵抗密切相关的T1DM患者死亡的主要因素^[18]。因此, 研究HDAC3对外周CD4⁺ T细胞分化和功能的调控作用对开发新型有效的自身免疫病治疗手段具有重要意义。

以往的研究采用*CD4cre*酶介导的*Hdac3* T细胞特异基因敲除小鼠, 结果发现, HDAC3敲除导致外周免疫器官中CD4⁺ T细胞极度降低, 同时iNKT以及CD8⁺ T细胞几乎完全缺失^[19-20]。为进一步明确HDAC3在外周T细胞分化及功能中的作用, 本研究采用了*CD4cre*酶介导的*Hdac3*杂合基因缺失小鼠, 深入探讨在HDAC3表达降低条件下对外周不同CD4⁺ T细胞亚群分化及功能的影响。

1 材料与方法

1.1 小鼠

选取6~8周龄雄性*Hdac3*基因外显子4~7两侧插入floxp序列的C57BL/6背景小鼠(*Hdac3*^{fl/fl}, 购自美国Jackson实验室)与*CD4*基因启动子/增强子驱动*cre*酶表达的C57BL/6背景小鼠(*CD4*^{cre+}, 购自美国Jackson实验室)连续杂交筛选3代以上, 获得*Hdac3*在CD4⁺ T细胞的杂合基因缺失小鼠(*Hdac3*^{fl/fl}*CD4*^{cre+/-}), 将*Hdac3*^{fl/fl}小鼠(WT)作为正常对照。所有小鼠均在华北理工大学实验动物中心SPF级动物房饲养、繁殖。

1.2 小鼠基因型鉴定

采用鼠尾组织, 提取DNA并进行PCR扩增。所用引物如下: *HDAC3* MF, 5'-TGG TGG TGA ATG GCT TTA ATC-3'; *HDAC3* MR, 5'-TAA CGG GAG CAG AAC TCG AA-3'。 *CD4cre* Com, 5'-GTT CTT TGT ATA TAT TGA ATG TTA GCC-3'; *CD4cre* WT, 5'-TAT GCT CTA AGG ACA AGA ATT GAC A-3'; *CD4cre* Mu, 5'-CTT TGC AGA GGG CTA ACA GC-3'。

1.3 流式细胞术

选取6~8周龄雄性*Hdac3*^{fl/fl}*CD4*^{cre+/-}和WT小鼠,

每组3~5只, 分离脾脏和淋巴结并制备成单细胞悬液, 用于细胞表面或细胞内染色。使用荧光素标记的单克隆抗体如下: Anti-mouse-CD4-APC antibody (BD Biosciences, 553051)、Anti-mouse-CD4-PerCP antibody (Biolegend, 100433)、Anti-mouse-CD8-PerCP antibody (BD Biosciences, 551162)、Anti-HDAC3 antibody (Abcam, ab32369)、Goat anti-rabbit-IgG-PE antibody (Santa Cruz Biotechnology, A1314)、Anti-mouse-IFN- γ -FITC antibody (eBioscience, E00862-1632)、Anti-mouse-IL-4-APC antibody (Biolegend, 504105)、Anti-mouse-IL-17A-FITC antibody (eBioscience, 4291420)、Anti-mouse-CXCR5-APC antibody (Biolegend, 145505)、Anti-mouse-PD-1-PE antibody (Tonbo Biosciences, C9985072420503)、Anti-mouse-T-bet-PE antibody (BD Biosciences, 561265)、Anti-mouse-GATA3-PE antibody (BD Biosciences, 560074)。为检测WT和*Hdac3*^{fl/fl}*CD4*^{cre+/-}小鼠CD4⁺ T细胞中HDAC3的表达, 先对T细胞进行CD4表面染色, 细胞经固定、打孔后首先加入兔抗小鼠HDAC3抗体(一抗), 再加入荧光标记的羊抗兔IgG(二抗)进行染色和流式细胞术检测, 以不加HDAC3一抗, 但加入荧光标记二抗的CD4⁺ T细胞作为非特异荧光本底对照(Control)。为了检测细胞因子的产生, 分别分离*Hdac3*^{fl/fl}*CD4*^{cre+/-}和WT小鼠脾脏并制备成单细胞悬液, 按 2×10^6 /孔加入6孔板中, 在37°C、5%CO₂条件下用佛波酯(PMA, 50 μ g/L, Cayman-No.10008014)和离子霉素(Ionomycin, 500 μ g/L, Cayman-No.11932)在体外充分刺激5 h, 离心收集细胞, 首先采用抗小鼠CD4抗体进行细胞表面染色, 然后用Cytotfix/Cytoperm固定/渗透溶液试剂盒(BD Biosciences, 554722)固定和渗透细胞后进行不同细胞因子染色。采用Beckman流式细胞仪收集标本, 采用Summit 5.2软件进行数据分析。

1.4 酶联免疫吸附实验(ELISA)

分别分离*Hdac3*^{fl/fl}*CD4*^{cre+/-}和WT小鼠血清, 采用细胞因子ELISA检测试剂盒, Mouse IFN- γ ELISA Kit (MultiSciences, 70-EK280/3-96)、Mouse IL-4 ELISA Kit (MultiSciences, 70-EK204/2-96)、Mouse IL-17A ELISA Kit (MultiSciences, 70-EK217/2-96), 按100 μ l/每孔加入*Hdac3*^{fl/fl}*CD4*^{cre+/-}和WT小鼠血清及倍比稀释的标准血清至相应ELISA板中, 每个样品做3个复孔, 室温孵育

2 h。PBS洗涤后加入底物显色, 在450 nm处测定吸光度值, 并根据标准曲线计算血清中IFN- γ 、IL-4及IL-17的含量($\mu\text{g/L}$)。

1.5 小鼠CD4⁺ T细胞体外培养

流式细胞仪分选*Hdac3*^{fl/fl}CD4^{cre+/-}和WT小鼠外周初始CD4⁺ (CD4⁺CD62⁺CD44⁻) T细胞, 加入预先包被抗CD3抗体(1 mg/L, BioXcell, 145-2 C11)和抗CD28抗体(3 mg/L, BioXcell, BE0015)的6孔细胞培养板中, 1 $\times 10^6$ /孔, 然后分别在Th0、Th1和Th2分化条件下培养。Th0: 不再加入其他细胞因子和抗体; Th1: IL-12 (5 $\mu\text{g/L}$, PeproTech, Cat #210-12)、抗IL-4抗体(5 mg/L, BD Biosciences, 554433); Th2: IL-4 (5 $\mu\text{g/L}$, PeproTech, Cat #214-14)、抗IL-12抗体(5 mg/L, BD Biosciences, 551219)、抗IFN- γ 抗体(5 mg/L, BD Biosciences, 554409)。置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂培养箱中进行培养, 72 h后收集细胞, 采用流式细胞仪进行分析。

1.6 基因表达谱分析

采用流式细胞仪分选*Hdac3*^{fl/fl}CD4^{cre+/-}和WT小鼠外周CD4⁺ T细胞, 加入预先包被抗CD3抗体(1 mg/L)和抗CD28抗体(3 mg/L)的6孔细胞培养板中, 3 $\times 10^6$ /孔, 培养24 h, 分别提取细胞总RNA (QIAGEN, 74536), 采用Microarray

(Illumina, RS-122-2001)检测HDAC3缺失后CD4⁺ T细胞分化亚群基因表达谱变化。实验重复3次。采用GraphPad Prism v8.0软件绘图并进行数据分析。

1.7 STZ诱导小鼠T1DM

选取6~8周龄雄性*Hdac3*^{fl/fl}CD4^{cre+/-}和WT小鼠, 分别分为溶剂对照组和链脲佐菌素(STZ, 150 mg/kg, Sigma, 18883-66-4)处理组。STZ溶于柠檬酸钠缓冲液(0.1 mol/L, pH=4.5), 腹腔注射以诱导T1DM。每两天监测一次小鼠随机血糖浓度, 连续监测两周后分离小鼠脾脏用于流式细胞仪检测。以连续两次小鼠末梢血糖浓度>13.9 mmol/L作为T1DM的判断标准。

1.8 统计分析

采用SPSS 22.0统计软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示且均符合正态分布, 两组间比较采用两独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 Hdac3杂合基因缺失小鼠鉴定

Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre+/-}小鼠鼠尾DNA采用HDAC3引物经PCR扩增产生700 bp扩增片段, WT小鼠产生534 bp扩增片段(图1a左)。*Hdac3*^{fl/fl}CD4^{cre+/-}小鼠

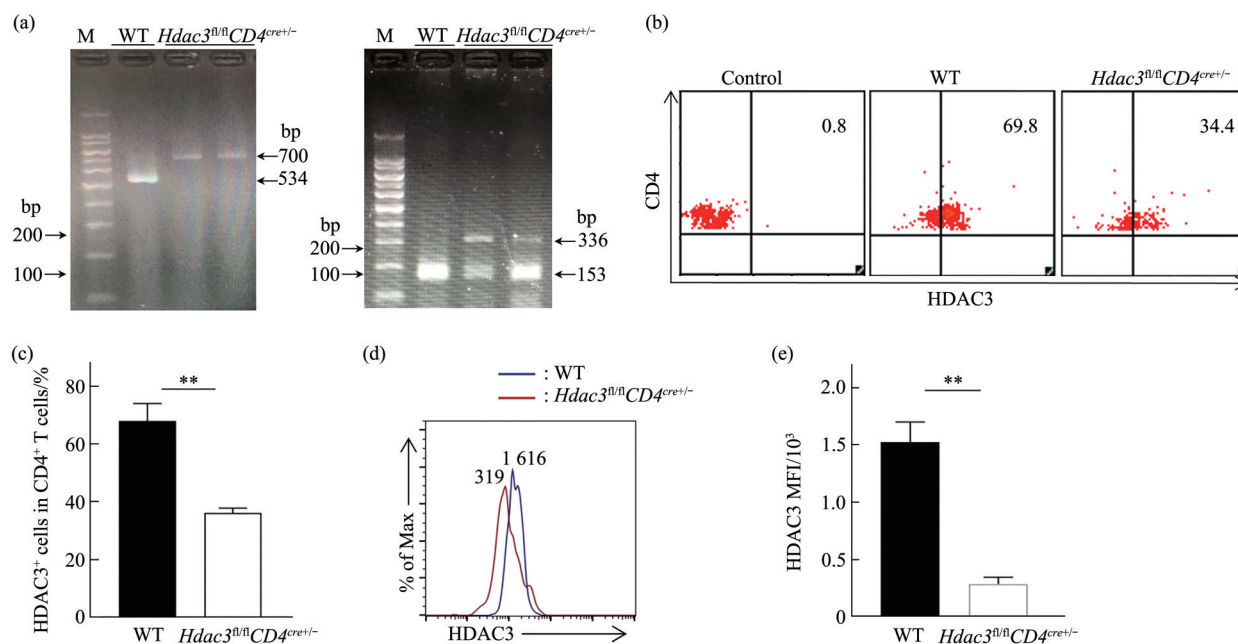


Fig. 1 Identification of *Hdac3* heterozygous gene deficiency mice

(a) PCR identification of WT and *Hdac3*^{fl/fl}CD4^{cre+/-} mice using HDAC3 primer (left) and CD4^{cre} primer (right). (b, c) The proportion of HDAC3 positive cell in CD4⁺ T cells of WT and *Hdac3*^{fl/fl}CD4^{cre+/-} mice was analyzed by intracellular staining and flow cytometry. (d, e) The expression of HDAC3 in CD4⁺ T cells of WT and *Hdac3*^{fl/fl}CD4^{cre+/-} mice was analyzed by intracellular staining and flow cytometry. ** $P < 0.01$.

鼠尾DNA采用CD4cre引物经PCR扩增产生153 bp和336 bp两条扩增片段, WT小鼠产生153 bp扩增片段(图1a右)。分离*Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre/+}*和WT小鼠脾脏细胞, 采用流式细胞术检测CD4⁺T细胞中HDAC3的表达变化。结果发现, 与WT小鼠相比, *Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre/+}*小鼠CD4⁺T细胞中HDAC3阳性细胞比例显著降低(图1b, c), 且HDAC3的表达显著降低(图1d, e), 差异具有统计学意义。

2.2 HDAC3缺失导致外周免疫器官T细胞比例和数量减少

分离*Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre/+}*和WT小鼠脾脏和淋巴结, 采用抗小鼠CD4、CD8抗体染色, 流式细胞仪检测*Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre/+}*和WT小鼠外周免疫器官中T细胞变化。结果发现, 与WT小鼠相比, *Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre/+}*小鼠脾脏和淋巴结中CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的比例(图2a, b)和数量显著降低(图2c), 差异具有统计学意义。

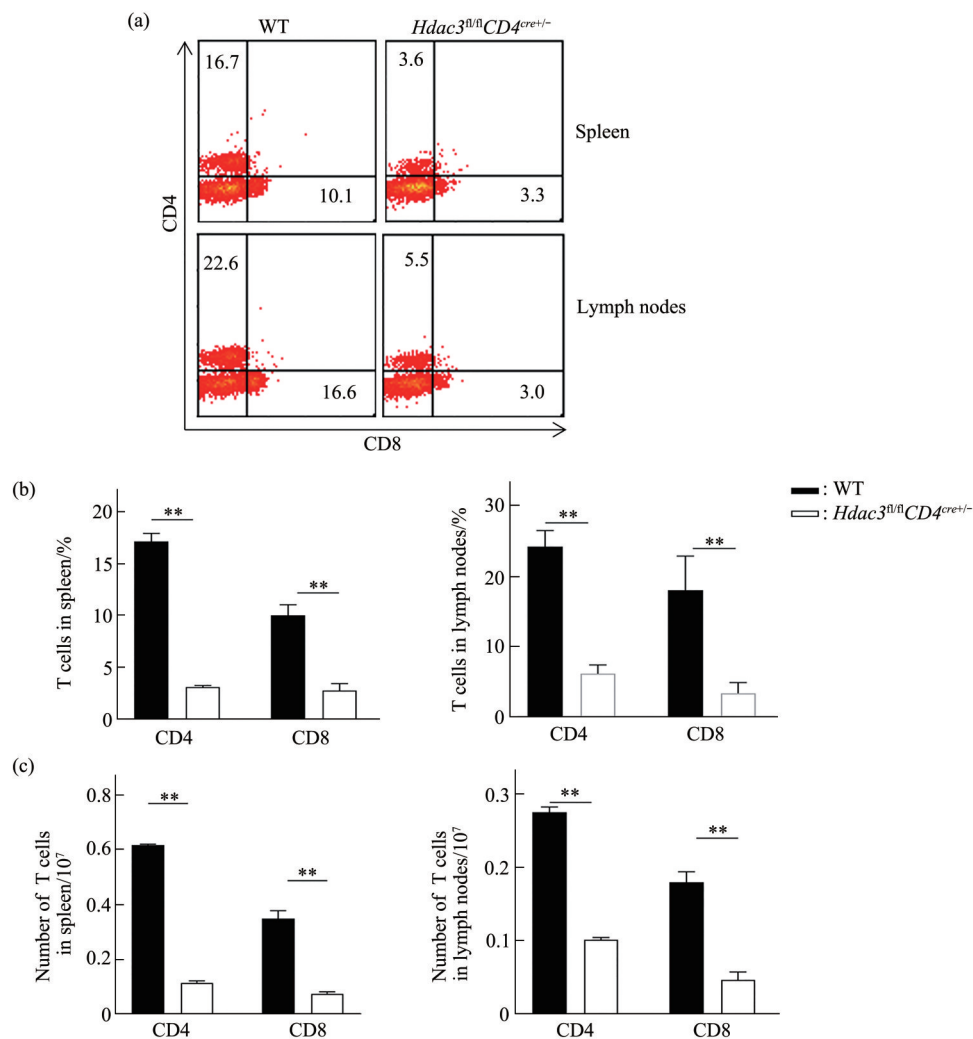


Fig. 2 HDAC3 deletion resulted in a decrease in the proportion and number of T cells in peripheral immune organs

(a,b) The proportion of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the spleen and lymph nodes of WT and *Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre/+}* mice were analyzed by flow cytometry. (c) The number of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the spleen and lymph nodes of WT and *Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre/+}* mice. ***P* < 0.01.

2.3 HDAC3缺失影响外周CD4⁺T细胞分化

分离*Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre/+}*和WT小鼠脾脏并制备成单细胞悬液, 采用PMA和Ionomycin在体外充分刺激5 h, 离心收集细胞, 首先采用抗小鼠CD4抗体进行表面染色, 固定和渗透细胞后采用细胞内染色

和流式细胞仪分析*Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre/+}*和WT小鼠CD4⁺T细胞中Th1、Th2及Th17相关细胞因子IFN-γ、IL-4及IL-17A的表达。结果发现, 与WT小鼠相比, *Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre/+}*小鼠CD4⁺T细胞中IFN-γ表达显著降低(图3a), 而IL-4及IL-17A表

达显著增加 (图 3b, c)。采用细胞表面染色和流式细胞仪分析 $Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre/+}$ 和 WT 小鼠 CD4⁺ T 细胞中 CXCR5⁺PD-1⁺ Tfh 细胞比例变化。结果发现, 与 WT 小鼠相比, $Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre/+}$ 小鼠外周 Tfh 细胞比例显著增加 (图 3d)。采用 ELISA 检测

$Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre/+}$ 和 WT 小鼠血清中 IFN- γ 、IL-4 及 IL-17 表达水平, 结果发现, 与 WT 小鼠相比, $Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre/+}$ 小鼠血清中 IFN- γ 表达显著降低, 而 IL-4 及 IL-17 表达显著增加 (图 3e)。差异均具有统计学意义。

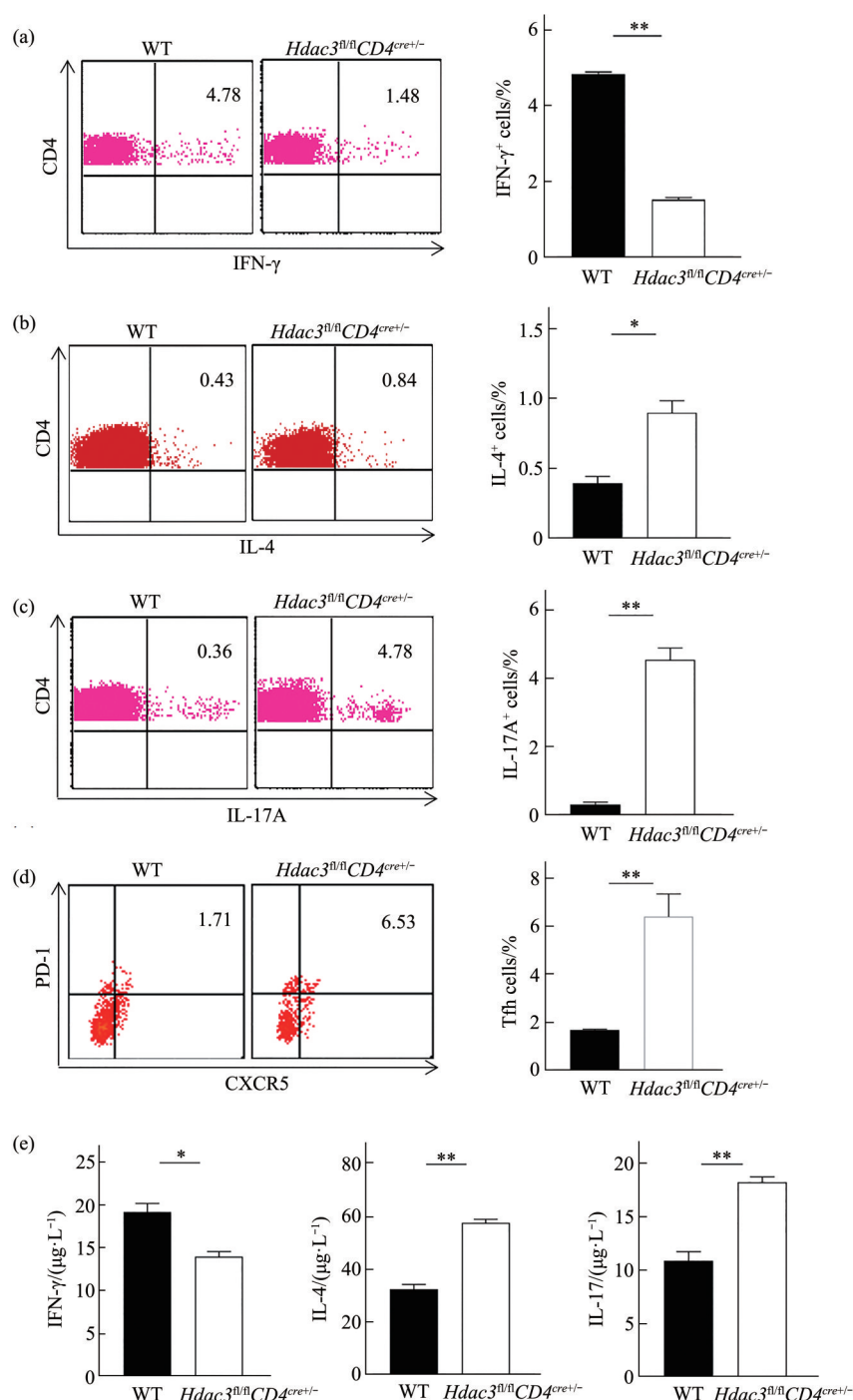


Fig. 3 HDAC3 deletion affected the differentiation of peripheral CD4⁺ T cell

(a, b, c) The expression of IFN- γ 、IL-4 and IL-17A in peripheral CD4⁺ T cells of WT and $Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre/+}$ mice was analyzed by intracellular staining and flow cytometry after *in vitro* stimulation with PMA and Ionomycin for 5 h. (d) The proportions of Tfh cell in peripheral CD4⁺ T cells of WT and $Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre/+}$ mice were analyzed by flow cytometry. (e) The expression of IFN- γ 、IL-4 and IL-17 in serum of WT and $Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre/+}$ mice was analyzed by ELISA. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.4 体外HDAC3促进CD4⁺ T细胞向Th1细胞分化

接下来检测HDAC3缺失在体外对CD4⁺ T细胞分化的影响。采用流式细胞仪分选 *Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre/+}* 和 WT 小鼠外周初始CD4⁺ T细胞，在用抗CD3和抗CD28抗体活化基础上，分别采用Th1、Th2分化培养基体外培养72 h，采用细胞内染色检测细胞

因子IFN- γ 、IL-4以及Th1、Th2细胞特异转录因子T-bet、GATA3表达变化。结果发现：在Th1分化培养条件下，与WT小鼠相比，*Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre/+}* 小鼠CD4⁺ T细胞IFN- γ 和T-bet表达显著降低（图4a, b）；而在Th2分化培养条件下，与WT小鼠相比，*Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre/+}* 小鼠CD4⁺ T细胞IL-4和GATA3表

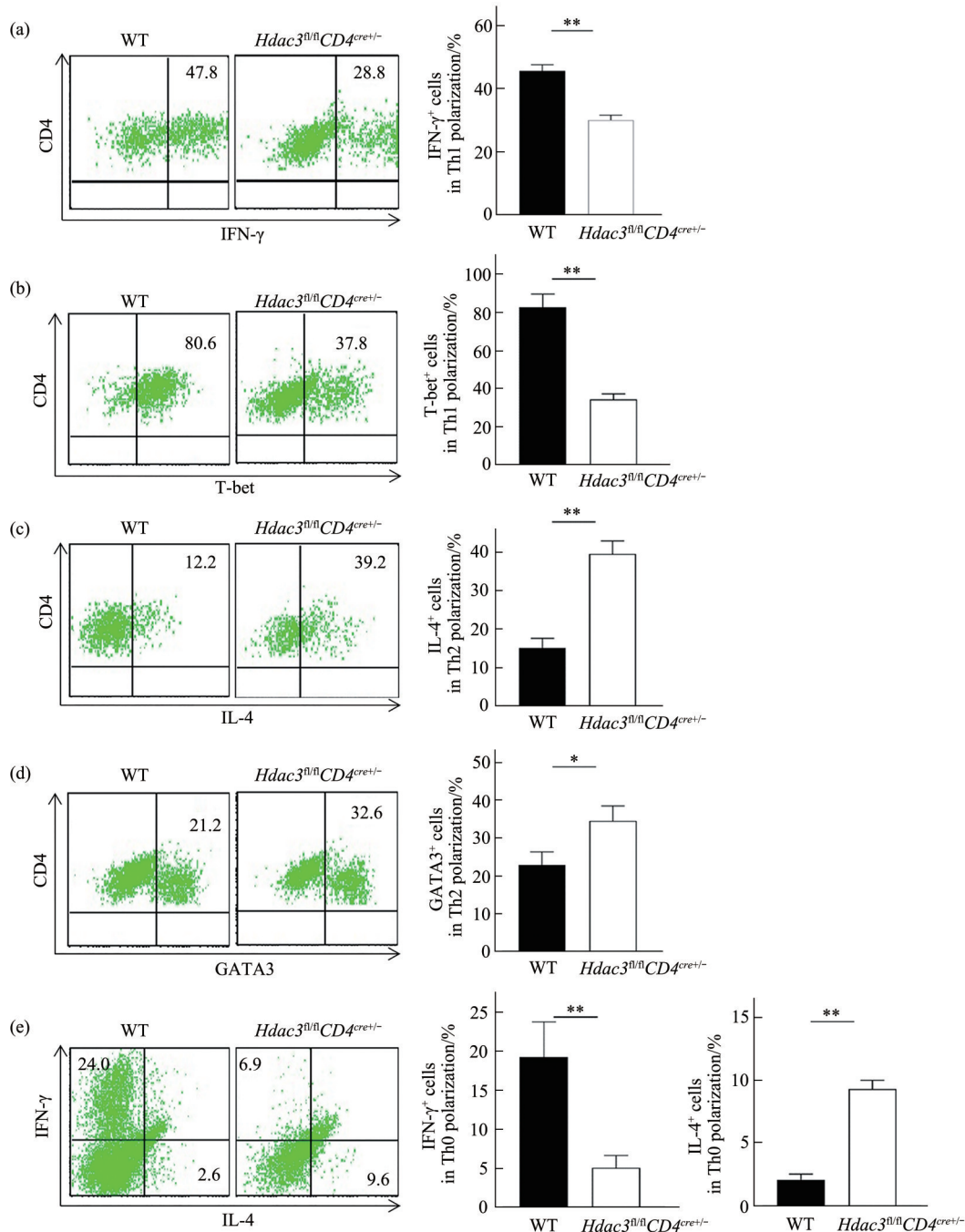


Fig. 4 HDAC3 promotes the differentiation of CD4⁺ T cells to Th1 *in vitro*

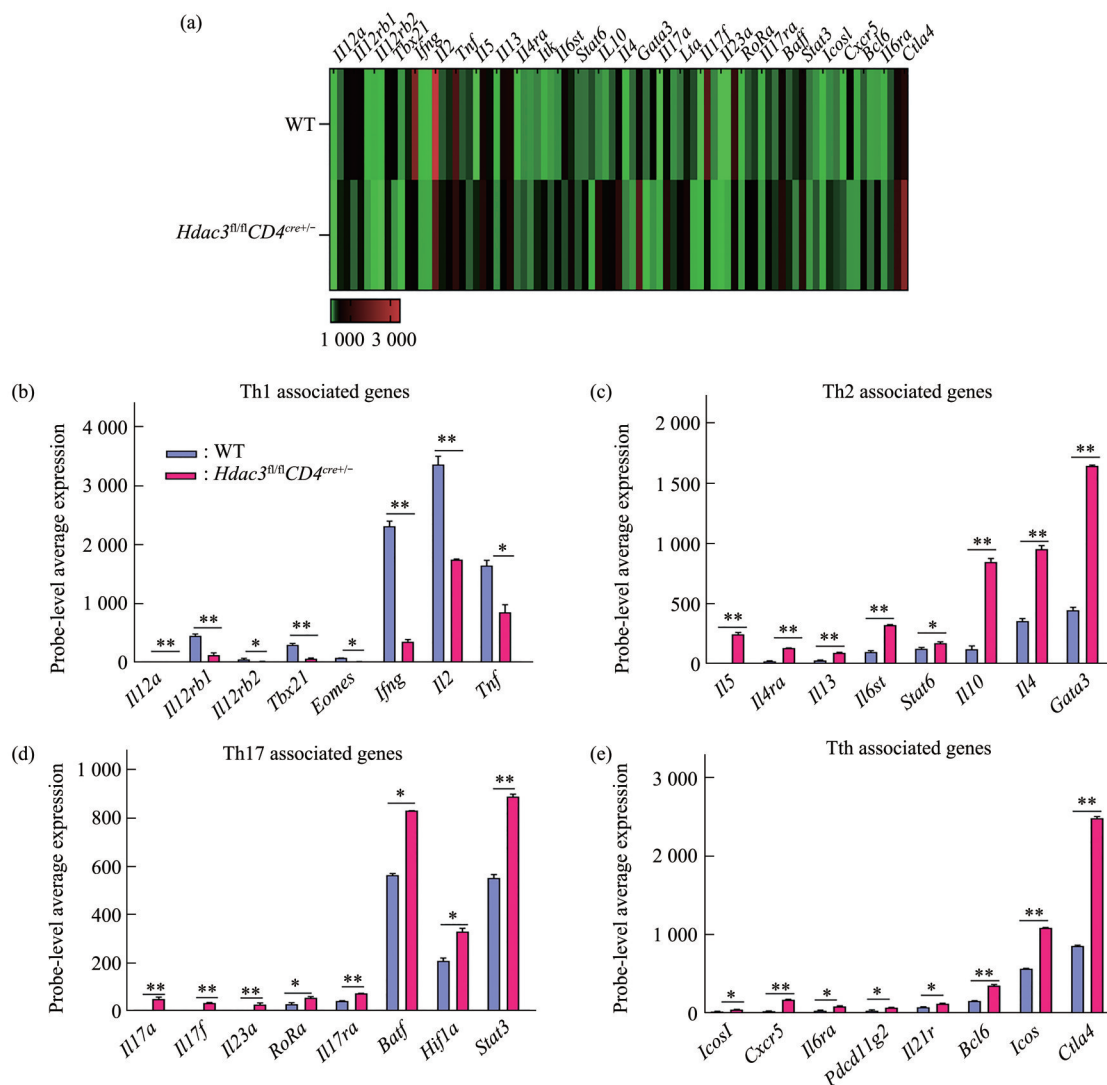
(a,b) The expression of IFN- γ and T-bet in naive CD4⁺ T cells of WT and *Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre/+}* mice was analyzed by intracellular staining and flow cytometry after culture in Th1 differentiation conditions for 72 h. (c,d) The expression of IL-4 and GATA3 in naive CD4⁺ T cells of WT and *Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre/+}* mice was analyzed by intracellular staining and flow cytometry after culture in Th2 differentiation conditions for 72 h. (e) The expression of IFN- γ and IL-4 in naive CD4⁺ T cells of WT and *Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre/+}* mice was analyzed by intracellular staining and flow cytometry after culture in Th0 differentiation conditions for 72 h. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

达显著增加 (图 4c, d); 即使在中性培养条件下 (Th0), 与 WT 小鼠相比, *Hdac3*^{fl/fl}*CD4*^{cre/+} 小鼠 CD4⁺ T 细胞也表现为 IL-4 表达增加, IFN- γ 表达降低 (图 4e)。差异均具有统计学意义。

2.5 HDAC3 缺失导致 CD4⁺ T 细胞分化亚群相关基因表达变化

采用 Microarray 检测 HDAC3 缺失对活化 CD4⁺ T 细胞分化亚群相关基因表达的影响 (图 5a)。与 WT 小鼠相比, *Hdac3*^{fl/fl}*CD4*^{cre/+} 小鼠 CD4⁺ T 细胞中

Th1 相关基因 *Il2*、*Tbx21*、*Tnf* 等表达显著降低 (图 5b); Th2 相关基因 *Il4*、*Il5*、*Il10* 等表达显著增加 (图 5c); Th17 相关基因 *Il17a*、*Il17f*、*Il23a*、*Batf* 等表达显著增加 (图 5d); Tfh 相关基因 *Cxcr5*、*Bcl6*、*Icos* 等表达显著增加 (图 5e)。差异均具有统计学意义。以上结果进一步表明, HDAC3 缺失导致活化 CD4⁺ T 细胞向 Th1 分化减弱, 而向 Th2、Th17 及 Tfh 分化增强。



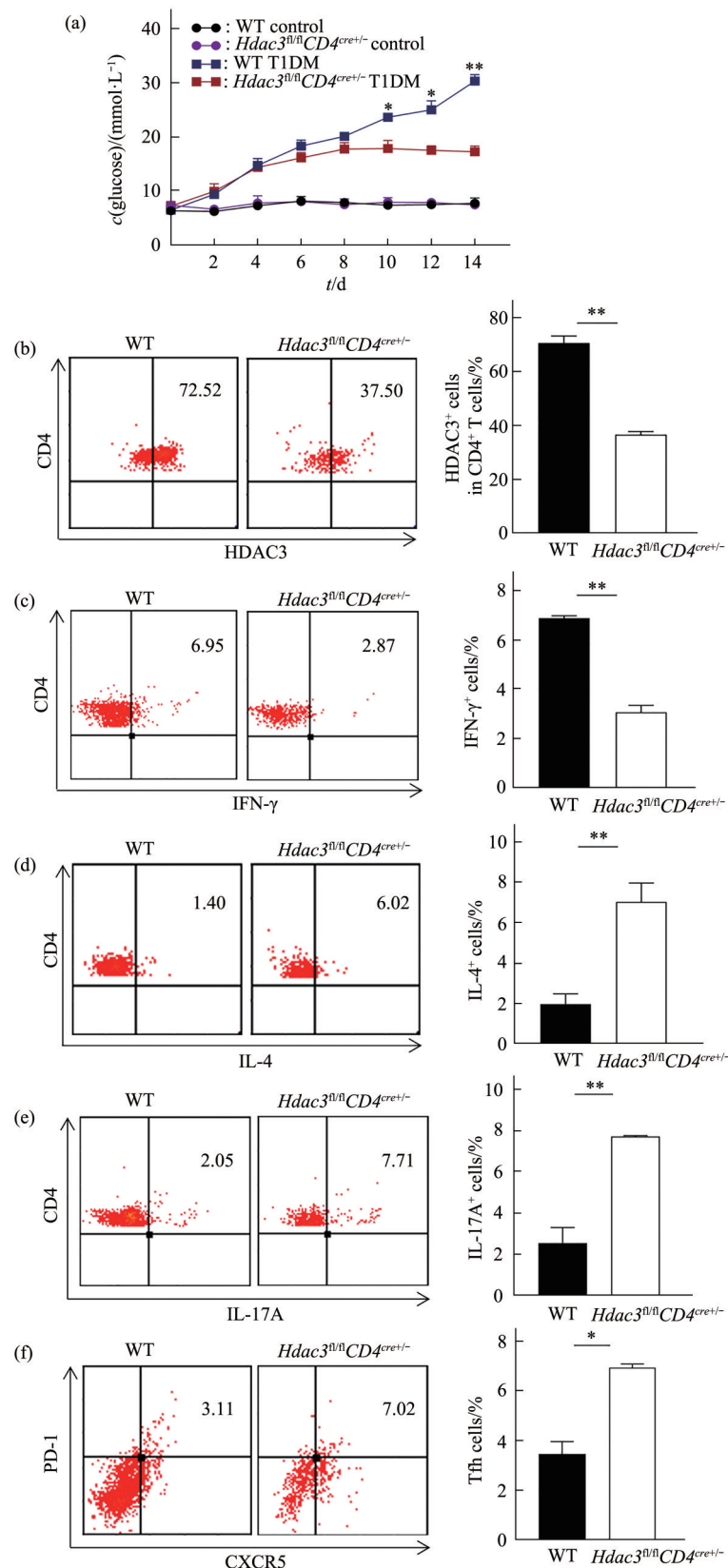


Fig. 6 HDAC3 promotes Th1 cell differentiation and aggravates T1DM

(a) Random blood glucose levels in STZ-treated and control group of WT and *Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre+/-}* mice. (b) The proportion of HDAC3 positive cell in CD4⁺ T cells of STZ-treated WT and *Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre+/-}* mice was analyzed by intracellular staining and flow cytometry. (c-e) The expression of IFN-γ, IL-4 and IL-17A in peripheral CD4⁺ T cells of STZ-treated WT and *Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre+/-}* mice was analyzed by intracellular staining and flow cytometry after *in vitro* stimulation with PMA and Ionomycin for 5 h. (f) The proportions of Tfh cell in peripheral CD4⁺ T cells of STZ-treated WT and *Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre+/-}* mice were analyzed by flow cytometry. **P*<0.05, ***P*<0.01.

和流式细胞仪检测 *Hdac3*^{fl/fl}CD4^{cre+/-} 和 WT 小鼠 CD4⁺ T 细胞中 HDAC3 阳性细胞比例。结果发现, 与 WT 小鼠相比, *Hdac3*^{fl/fl}CD4^{cre+/-} 小鼠 CD4⁺ T 细胞中 HDAC3 阳性细胞显著降低 (图 6b)。分离 T1DM 小鼠脾脏并制备成单细胞悬液, 采用 PMA 和 Ionomycin 在体外充分刺激 5 h, 离心收集细胞, 首先采用抗小鼠 CD4 抗体进行表面染色, 固定和渗透细胞后采用细胞内染色和流式细胞仪分析 *Hdac3*^{fl/fl}CD4^{cre+/-} 和 WT 小鼠 CD4⁺ T 细胞中 Th1、Th2 以及 Th17 相关细胞因子 IFN- γ 、IL-4 及 IL-17A 的表达水平。结果发现, 与 WT 小鼠相比, *Hdac3*^{fl/fl}CD4^{cre+/-} 小鼠 CD4⁺ T 细胞中 IFN- γ 表达显著降低 (图 6c), 而 IL-4 及 IL-17A 表达显著增加 (图 6d, e)。采用细胞表面染色和流式细胞仪分析 *Hdac3*^{fl/fl}CD4^{cre+/-} 和 WT 小鼠 CD4⁺ T 细胞中 CXCR5⁺PD-1⁺ Tfh 细胞比例变化。结果发现, 与 WT 小鼠相比, *Hdac3*^{fl/fl}CD4^{cre+/-} 小鼠外周 Tfh 细胞比例显著增加 (图 6f)。

3 讨 论

以往研究发现, *Hdac3* 基因纯合缺失导致小鼠外周 T 细胞活化诱导的细胞凋亡显著增强和细胞数量极度减少^[14, 19]。为获得足够外周 T 细胞进行 HDAC3 对 T 分化和功能影响的研究, 本研究采用了 *Hdac3* 在 CD4⁺ T 细胞中的杂合基因缺失小鼠。研究结果发现, *Hdac3* 杂合基因缺失也可导致 HDAC3 在 CD4⁺ T 细胞中的表达降低, 同时导致小鼠外周 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞比例和数量下降。本研究还发现, HDAC3 缺失可导致 CD4⁺ T 细胞中 Th1 分化相关基因、细胞因子及特异转录因子的表达显著降低, 而 Th2 和 Th17 分化相关基因和细胞因子的表达以及 Tfh 细胞比例显著增加。更为重要的是, HDAC3 缺失对小鼠 T1DM 的发病具有明显抑制作用, 这可能与 HDAC3 缺失导致的 CD4⁺ T 细胞向 Th1 分化显著降低有关。而 Th2、Th17 和 Tfh 尽管在 HDAC3 缺失的 CD4⁺ T 细胞中所占比例增加, 由于总 CD4⁺ T 细胞在 HDAC3 缺失小鼠中数量的降低, Th2、Th17 和 Tfh 在 HDAC3 缺失小鼠中的数量变化可能并不明显。因此, 与 Th1 相比, Th2、Th17 和 Tfh 在 HDAC3 缺失导致的 T1DM 发病抑制中可能不发挥主要作用。有关不同效应性 CD4⁺ T

细胞亚群在 HDAC3 缺失小鼠 T1DM 发病中的确切调控机制仍需在以后研究中进一步阐明。

CD4⁺ T 细胞分化依赖多种表观遗传机制的调控^[21]。有研究表明, *Hdac1* 基因的 T 细胞特异敲除导致小鼠对胶原诱导关节炎 (CIA) 具有抵抗作用, 并且血清中炎症细胞因子 IL-17 和 IL-6 的表达显著降低, 表明 HDAC1 在炎症条件下调节 Th17 相关通路^[22]。Tfh 细胞依赖 Tcf1 固有的 HDAC 活性来抑制 CTLA4 的表达并辅助 B 细胞功能的发挥^[23]。此外, Philips 等^[13] 研究表明, 在缺乏 HDAC3 的情况下, RORC 启动子乙酰化增加, 导致外周 CD4⁺ T 细胞过度分化为 ROR γ t⁺ 的 Th17 细胞, 并发展为炎症性肠病。本研究发现, HDAC3 在小鼠外周 CD4⁺ T 细胞分化和功能中发挥关键作用, HDAC3 缺失导致 Th1 分泌的细胞因子 IFN- γ 及其特异性转录因子 T-bet 表达显著降低。同样, 基因表达 Microarray 分析发现, HDAC3 缺失导致活化 CD4⁺ T 细胞中 Th1 相关基因表达显著降低。以上结果表明, 外周 CD4⁺ T 细胞的分化依赖 HDAC3 的表观遗传调控, HDAC3 通过促进外周 CD4⁺ T 细胞向 Th1 细胞分化, 从而影响外周 CD4⁺ T 细胞的效应功能。

CD4⁺ T 细胞通过激活和辅助其他免疫细胞, 在感染、炎症和自身免疫性疾病中发挥重要作用。其中 Th2 细胞介导的免疫反应在过敏性气道炎症和炎症性关节炎中起重要作用^[24-25]。Tfh 细胞的异常活化和分化可扰乱生发中心对于 B 细胞的选择, 从而影响自身抗体的分泌, 参与多种自身免疫病的发生^[8, 26]。而 Th1 和 Th17 细胞与炎症和自身免疫病的发病机制密切相关。有研究报道^[27], EriB 通过抑制 Th1 和 Th17 细胞分化在自身免疫性脑脊髓炎中发挥有效的抗炎作用。另有研究表明^[28], SAA 蛋白诱导 Th17 细胞分化并促进炎症性疾病的发生。T1DM 的发生与自身反应性 T 细胞介导的胰岛细胞破坏, 以及 Th1 和 Th2 细胞分化不平衡介导的胰岛素分泌受损密切相关^[29]。Hu 等^[17] 实验表明, HDAC3 可通过限制 miR-296-5p 在 T 细胞中的表达加重 T1DM 的发生。本研究也发现, HDAC3 可通过促进外周 CD4⁺ T 细胞向 Th1 分化加重 T1DM 的发生。此外, 本文还分析了其他效应性 CD4⁺ T 细胞亚群变化, 结果表明 HDAC3 对 Th2、Th17 和

Tfh 细胞分化具有抑制作用, 但这些细胞亚群对 HDAC3 相关 T1DM 发病的影响目前未知。HDAC3 是组织中炎症基因表达调控所必需的, HDACs 的药理学抑制已经成为治疗各种过敏和炎症反应的有效手段^[30-32]。这与本文的研究结果相似, 降低 HDAC3 表达可抑制小鼠外周 CD4⁺ T 细胞向 Th1 细胞分化, 并对 T1DM 的发展具有抵抗作用。HDAC3 调控不同效应性 CD4 T 细胞亚群分化的具体分子机制仍有待进一步研究。

4 结 论

本研究探讨了 HDAC3 在外周 CD4⁺ T 细胞分化和功能中的作用, 表明 HDAC3 促进外周 CD4⁺ T 细胞向 Th1 细胞分化并加重 T1DM 的发生, 研究结果为开发以 HDAC3 为靶点的自身免疫病治疗手段提供了新的理论依据。

参 考 文 献

- [1] Zhu J. T helper cell differentiation, heterogeneity, and plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, **10**(10): a030338
- [2] Caza T, Landas S. Functional and phenotypic plasticity of CD4(+) T cell subsets. *Biomed Res Int*, 2015, **2015**: 521957
- [3] Rasouli J, Casella G, Yoshimura S, *et al.* A distinct GM-CSF(+) T helper cell subset requires T-bet to adopt a T(H)1 phenotype and promote neuroinflammation. *Sci Immunol*, 2020, **5**(52): eaba9953
- [4] Paul W E, Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified?. *Nat Rev Immunol*, 2010, **10**(4): 225-235
- [5] Muehling L M, Lawrence M G, Woodfolk J A. Pathogenic CD4(+) T cells in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, **140**(6): 1523-1540
- [6] Cosmi L, Liotta F, Maggi E, *et al.* Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy*, 2011, **66**(8): 989-998
- [7] Sun Z, Yao Y, You M, *et al.* The kinase PDK1 is critical for promoting T follicular helper cell differentiation. *Elife*, 2021, **10**: e61406
- [8] Wang Z, Zhao M, Yin J, *et al.* E4BP4-mediated inhibition of T follicular helper cell differentiation is compromised in autoimmune diseases. *J Clin Invest*, 2020, **130**(7): 3717-3733
- [9] Schmidl C, Delacher M, Huehn J, *et al.* Epigenetic mechanisms regulating T-cell responses. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, **142**(3): 728-743
- [10] He Y, Li X, Gao M, *et al.* Loss of HDAC3 contributes to meiotic defects in aged oocytes. *Aging Cell*, 2019, **18**(6): e13036
- [11] Gkatzamanidou M, Terpou E, Kentepozidis N, *et al.* Targeting the interplay between HDACs and DNA damage repair for myeloma therapy. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(19): 10406
- [12] Stengel K R, Bhaskara S, Wang J, *et al.* Histone deacetylase 3 controls a transcriptional network required for B cell maturation. *Nucleic Acids Res*, 2019, **47**(20): 10612-10627
- [13] Philips R L, Chen M W, McWilliams D C, *et al.* HDAC3 is required for the downregulation of ROR γ t during thymocyte positive selection. *J Immunol*, 2016, **197**(2): 541-554
- [14] Hsu F C, Belmonte P J, Constans M M, *et al.* Histone deacetylase 3 is required for T cell maturation. *J Immunol*, 2015, **195**(4): 1578-1590
- [15] Wilfahrt D, Philips R L, Lama J, *et al.* Histone deacetylase 3 represses cholesterol efflux during CD4(+) T-cell activation. *Elife*, 2021, **10**: e70978
- [16] Tay R E, Olawoyin O, Cejas P, *et al.* Hdac3 is an epigenetic inhibitor of the cytotoxicity program in CD8 T cells. *J Exp Med*, 2020, **217**(7): e20191453
- [17] Hu Q, Che G, Yang Y, *et al.* Histone deacetylase 3 aggravates type 1 diabetes mellitus by inhibiting lymphocyte apoptosis through the microRNA-296-5p/Bcl-xl Axis. *Front Genet*, 2020, **11**: 536854
- [18] Bjornstad P, Schäfer M, Truong U, *et al.* Metformin improves insulin sensitivity and vascular health in youth with type 1 diabetes mellitus. *Circulation*, 2018, **138**(25): 2895-2907
- [19] Wang S, Tian F, Qian Y, *et al.* HDAC3 maintains peripheral T cell homeostasis by refraining from AICD. *Prog Biochem Biophys*, 2018, **45**(1): 79-90
- [20] 郑全辉, 雷冰, 袁鸿儒, 等. 组蛋白去乙酰化酶 3 对恒定型自然杀伤性 T 细胞发育和功能的调控作用. *吉林大学学报(医学版)*, 2020, **46**(2): 205-213
- Zheng Q H, Lei B, Yuan H R, *et al.* *Journal of Jilin University (Medicine Edition)*, 2020, **46**(2): 205-213
- [21] Kanno Y, Vahedi G, Hirahara K, *et al.* Transcriptional and epigenetic control of T helper cell specification: molecular mechanisms underlying commitment and plasticity. *Annu Rev Immunol*, 2012, **30**: 707-731
- [22] Göschl L, Preglej T, Boucheron N, *et al.* Histone deacetylase 1 (HDAC1): a key player of T cell-mediated arthritis. *J Autoimmun*, 2020, **108**: 102379
- [23] Li F, Zhao X, Zhang Y, *et al.* TFH cells depend on Tcf1-intrinsic HDAC activity to suppress CTLA4 and guard B-cell help function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, **118**(2): e2014562118
- [24] Tibbitt C A, Stark J M, Martens L, *et al.* Single-cell RNA sequencing of the T helper cell response to house dust mites defines a distinct gene expression signature in airway Th2 cells. *Immunity*, 2019, **51**(1): 169-184.e165
- [25] Chen Z, Andreev D, Oeser K, *et al.* Th2 and eosinophil responses suppress inflammatory arthritis. *Nat Commun*, 2016, **7**: 11596
- [26] Felix K M, Teng F, Bates N A, *et al.* P2RX7 deletion in T cells promotes autoimmune arthritis by unleashing the Tfh cell response. *Front Immunol*, 2019, **10**: 411
- [27] Lu Y, Chen B, Song J H, *et al.* Eriocalyxin B ameliorates

experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing Th1 and Th17 cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(6): 2258-2263

[28] Lee J Y, Hall J A, Kroehling L, *et al.* Serum amyloid A proteins induce pathogenic Th17 cells and promote inflammatory disease. *Cell*, 2020, **183**(7): 2036-2039

[29] Li P, Chen Y, Luo L, *et al.* Immunoregulatory effect of *Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr. polysaccharide on T1DM mice. *Drug Des Devel Ther*, 2021, **15**: 2629-2639

[30] Ghiboub M, Zhao J, Li Yim A Y F, *et al.* HDAC3 mediates the inflammatory response and LPS tolerance in human monocytes and macrophages. *Front Immunol*, 2020, **11**: 550769

[31] Nguyen H C B, Adlanmerini M, Hauck A K, *et al.* Dichotomous engagement of HDAC3 activity governs inflammatory responses. *Nature*, 2020, **584**(7820): 286-290

[32] Zhang W, Sun X, Ba G, *et al.* RGFP966, a selective HDAC3 inhibitor, ameliorates allergic and inflammatory responses in an OVA-induced allergic rhinitis mouse model. *Int Immunopharmacol*, 2021, **93**: 107400

The Effects of HDAC3 on The Differentiation of Peripheral CD4⁺ T Cells*

GUO Han¹⁾, LI Wen-Ting²⁾, ZHANG Ting¹⁾, ZHANG Ai-Hong³⁾, ZHENG Ai-Hua³⁾,
TIAN Feng²⁾**, ZHENG Quan-Hui¹⁾**

¹⁾School of Basic Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China;

²⁾Department of Laboratory Animal Science, Health Science Center, Peking University, Beijing 100083, China;

³⁾Intensive Care Unit, Worker's Hospital of Tangshan, Tangshan 063000, China)

Abstract Objective To investigate the role of histone deacetylase 3 (HDAC3) in the differentiation and function of peripheral CD4⁺ T cells. **Methods** *CD4cre* enzyme mediated HDAC3 heterozygous gene deletion mice (*Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre+/-}*) and wild-type normal control (*Hdac3^{fl/fl}*, WT) mice were used. The effects of HDAC3 deletion on the proportion and number of peripheral CD4⁺ and CD8⁺ T cells were detected by flow cytometry. The effects of HDAC3 deletion on the expression of IFN- γ , IL-4 and IL-17A in CD4⁺ T cells and Tfh cells were detected under the *in vitro* PMA and Ionomycin stimulation. The effects of HDAC3 deletion on the expression of IFN- γ , IL-4 and IL-17 in serum were detected by ELISA. The naive CD4⁺ T cells of *Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre+/-}* and WT mice were sorted and cultured in Th1 and Th2 differentiation conditions respectively. The effects of HDAC3 deletion on the expression of Th1, Th2 and Th17 related cytokines and their specific transcription factors were detected by intracellular staining. The effects of HDAC3 deletion on the expression of genes related to CD4⁺ T cell differentiation subsets were detected by gene expression microarray. The mice treated with streptozotocin (STZ) were used to construct type 1 diabetes mellitus (T1DM) disease model, and the effects of HDAC3 deletion on the pathogenesis of T1DM were detected. **Results** Compared with WT mice, the proportion and number of peripheral CD4⁺ and CD8⁺ T cells in *Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre+/-}* mice decreased significantly. The expression of IFN- γ in CD4⁺ T cells and serum of *Hdac3^{fl/fl}CD4^{cre+/-}* mice decreased significantly, while the expression of IL-4 and IL-17A increased significantly, and the proportion of Tfh cells also increased significantly. HDAC3 deletion inhibited the differentiation of CD4⁺ T cells into Th1 cells, but promoted their differentiation into Th2 cells. Microarray analysis showed that the deletion of HDAC3 resulted in the decrease of gene expression in Th1 cell lineage, while the increase of gene expression in Th2, Th17 and Tfh cell lineage. Under the condition of STZ induction, HDAC3 deletion inhibited the development of T1DM and the differentiation of CD4⁺ T cells into Th1. **Conclusion** HDAC3 promotes the differentiation of peripheral CD4⁺ T cells into Th1 cells and aggravates the occurrence of T1DM.

Key words histone deacetylase 3, CD4⁺ T cell, cell differentiation

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0045

* This work was supported by grants from the Research Subject of Medical Science from Health Commission of Hebei Province (20190105) and The National Natural Science Foundation of China (81373111).

** Corresponding author.

ZHENG Quan-Hui. Tel: 86-315-8805516, E-mail: 1078209929@qq.com

TIAN Feng. Tel: 86-10-82802602, E-mail: tianfeng@bjmu.edu.cn

Received: February 8, 2022 Accepted: June 6, 2022