

活化 T 细胞核因子在皮肤疾病发生与发展中的作用 *

徐玉荣 廖文俊[△] 刘启方 易秀莉

(第四军医大学西京皮肤医院 陕西 西安 710032)

摘要 活化 T 细胞核因子(nuclear factor of activated T cell,NFAT)作为细胞信号转导中的一类重要因子,最早被认为是一种能结合和上调 T 细胞中 IL-2 基因启动子的诱导性核因子,现发现它不仅在免疫系统中发挥功能,在肿瘤发生、发展中也起着关键性作用。近年来,越来越多的研究显示 NFAT 与人类皮肤疾病的发生、发展密切相关。在多种皮肤疾病患者真皮成分中,NFAT 异常表达,促进 T 细胞活化、表皮细胞增殖及自身免疫反应的形成,甚至促进肿瘤形成和浸润转移。本文旨在阐述研究发现的 NFAT 在皮肤疾病中发挥的重要作用,涉及 T 细胞活化、自身免疫反应形成、肿瘤形成及其浸润转移,以及 NFAT 在皮肤疾病中作用机制,预测这些研究结果对于皮肤病的治疗有着重要意义。

关键词 活化 T 细胞核因子 皮肤疾病 肿瘤 自身免疫反应

中图分类号 R751 **文献标志码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 19-3794-03

Role of NFAT in Occurance and Development of Skin Diseases*

XU Yu-rong, LIAO Wen-jun[△], LIU Qi-fang, YI Xiu-li

(Xijing Dermatology Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT: Nuclear factor of activated T cell(NFAT)is an important factor in cellular signal pathways and was thought to be a induced nuclear factor which could Combine and up-regulate IL-2 gene promoter of T cell. It plays a key role in the immune system as well as tumor development and progression. Studies have shown that NFAT is closely related to the occurrence and development of human skin diseases. There is abnormal expression NFAT in derma and Epidermis Components of patients with skin diseases. It activates T cell and promotes autoimmunity formation, even promotes tumor formation and metastasis. This article aims to explain the important role played by NFAT in skin diseases, which involved T cell activation, autoimmunity formation, tumor formation and invasion and metastasis, and mechanisms of NFAT in skin diseases. These findings may be of great significance for the treatment of skin diseases.

Key words: Nuclear factor of activated T cell(NFAT); Skin disease; Tumor; Autoimmunity

Chinese Library Classification: R751 **Document code:** A

Article ID:1673-6273 (2012) 19-3794-03

前言

活化 T 细胞核因子 (nuclear factor of activated T cells, NFAT) 普遍存在、表达于哺乳动物细胞内,被认为与机体生长发育及复杂的细胞相互作用关联紧密,与人体内的多条信号通路有关。它可调控细胞周期的演进、生长和分化^[1,2]。活化 T 细胞核因子具有双重作用:一是对细胞稳定有重要调控作用,二是它具有致癌的潜力。研究显示,NFAT 与皮肤肿瘤形成和浸润转移密切相关,NFAT 异常表达可促进 T 细胞的活化及自身免疫反应形成,导致了一些皮肤病的发生、发展。本文主要将最近研究的皮肤疾病与 NFAT 之间的关系作一综述。

1 NFAT 的分类、结构和分布

目前已发现的活化 T 细胞核因子分为 NFAT1 (NFATc2)、NFAT2 (NFATc1)、NFAT3 (NFATc4)、NFAT4 (NFATc3) 和 NFAT5 (TonEBP)。NFAT 最早被认为是一种能结合和上调 T 细胞中 IL-2 基因启动子的诱导性核因子,但研究发现所有的细胞和组织内均有其亚型的广泛表达。此外,每种亚型经过氨基和羧基端的选择性剪接而有不同的变体。钙离子

均可调控前四种亚型,因为这四种亚型均具有 NFAT 同源区 (NFAT-homology region,NHR)和 Rel 同源区(Rel-homology region,RHR),这两个区域均非常保守。NHR 能与钙调节蛋白磷酸酶结合,并位于激活的调节区的 DNA 结合域的氨基端,RHR 的结构非常相似于 Rel 家族转录因子的 DNA 结合区。而 NFAT5 对钙离子及下游的钙调节蛋白磷酸酶不敏感,原因是其只有与钙调亚型同源的 RHR 区及具有特殊的功能域结构^[3]。NHR 能够结合启动子区然后启动基因的转录是因其含有 NFAT 的活化功能区。NFAT 如果去磷酸化,就可穿梭于胞质及胞核之间并具有调控下游靶分子转录活性的功能。但在静息细胞中 NFAT 能被多种蛋白激酶磷酸化是因为含有大量的丝氨酸残基。其亚型不仅在免疫系统被发现,研究显示广泛表达于肿瘤和构成肿瘤微环境的细胞内。在免疫细胞、肿瘤细胞及肿瘤组织中的均能在蛋白及 mRNA 水平检测到所有亚型^[4-6]。T 淋巴细胞中较多见 NFAT1、NFAT2、NFAT4,在心脏等组织细胞中较多见 NFAT3。

2 NFAT 的活化及信号机制

2.1 钙调磷酸酶活化 NFAT

* 基金项目 国家自然科学基金项目 (81072235)

作者简介 徐玉荣 (1978),男,硕士研究生,主要研究方向:黑素瘤 Wnt 信号通路,E-mail:1240496856@qq.com

[△]通讯作者 廖文俊,教授,主任医师,E-mail:1iaowj@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2012-02-23 接受日期 2012-03-18)

步骤为先是 NFAT 去磷酸化,由胞浆向核内转移,然后结合于相应区域的 DNA。具体是当某些因素升高胞浆钙离子水平后,发生去磷酸化的 NFAT 由胞浆向胞核内转移并结合于特定 DNA。静止细胞中由于钙离子水平等因素未发生变化, NFAT 不发生去磷酸化基本不发生核转位。上游的钙调磷酸酶在 NFAT 的去磷酸化和活化中起重要作用。钙调磷酸酶的特异性阻断剂环孢菌素 A(CsA)和他克莫司(FK506)都可以阻断钙离子内流引起的 NFAT 的活化。体外实验也证明钙调磷酸酶可以催化纯化的 NFAT 蛋白、重组 NFAT 蛋白,以及 NFAT 免疫沉淀物的磷酸化。对 NFAT 分子的分段表达证明,NFAT 的 NHR 结构中存在与钙调磷酸酶结合的序列,并具有可作为后者底物的丝/苏氨酸残基。某些因素刺激、活化细胞后,升高钙离子水平,活化钙调蛋白(CaM)并结合于钙调磷酸酶 C 端,最后使钙调磷酸酶的活性中心暴露。磷酸化的 NFAT 的氨基酸残基在活化的钙调磷酸酶作用下,发生去磷酸化。暴露出 NFAT 的 DNA 和核定位序列,发生由胞浆向胞核移位,与靶基因结合使其调控功能得到发挥^[7],细胞静止时,非活化的钙调磷酸酶结合于 NFAT 的 NHR 结构域。NFAT 没有发生去磷酸化主要是因为钙调磷酸酶 A 链掩盖了自身的催化活性中心, NFAT 的与 DNA 结合的关键氨基酸残基和核定位序列被自身结构所掩盖。

2.2 NFAT 活化途径

多种途径都可通过诱导钙离子内流而引起 NFAT 的活化,还有一些因素则通过诱导 AP-1 等诱导 NFAT 的活化。①如在 T 细胞中,TCR 受到活化刺激后,引起 Lck、ZAP-70、和 Vav 的磷酸化,Vav 进而通过 SH2 结构域与 SLP-76 结合。ZAP-70 和 SLP-76 都可以引起钙离子内流,再通过钙调磷酸酶诱导 NFAT 的活化。②PMA 在 T 细胞中最主要的作用是活化 PKC、Ras 和 Raf。其中 Ras 通过 Raf→MKK→ERK→Elk→SRF→c-Fos,最终活化 AP-1 的另一组分 c-jun,也通过 AP-1 活化 NFAT^[8]。③除了钙调磷酸酶外,钙离子内流还可以引起 Ca^{2+} /CaM 依赖的蛋白激酶(CaMK)。CaMK 可以通过 SRF 激活 c-Fos,再通过 AP-1 活化 NFAT。④另外,PKA 激活剂、糖皮质激素、TGF- β 等都可以在 T 细胞活化 NFAT。

3 NFAT 的转录激活活性

3.1 NFAT 与 DNA 的结合

在三维结构上活化 T 细胞核因子的 DNA 结合结构域类似于 Rel 家族蛋白,只是前者存在形式为单体且与 DNA 结合的形式也为单体,后者存在形式为二聚体且与 DNA 结合的形式亦是二聚体。活化 T 细胞核因子依赖的启动子和增强子都具有多个 NFAT 位点,这说明相互协同存在于 NFAT 分子之间,如白介素 2、白介素 4 启动子和粒-巨噬细胞集落刺激因子增强子等,长度在 250bp 左右,活化 T 细胞核因子位点包含 4 个左右。有学者将活化 T 细胞核因子的名称改为单体 Rel 蛋白,主要是因为 Rel 蛋白结合的 κB 位点活化 T 细胞核因子也可结合,活化 T 细胞核因子的一个单体结合 κB 位点的 3' 端,另一个单体结合 5' 端,两者之间并不发生作用。

3.2 NFAT 与 AP-1 的相互作用

两者之间的协同作用是活化 T 细胞核因子的一个重要特点。活化 T 细胞核因子与 DNA 结合的区域和 AP-1 与 DNA 结合的区相近,复合物在二者相互作用下形成,单独 NFAT 与

DNA 的结合物比这种复合物的稳定性要低很多。AP-1 的 Jun 和 Fos 固定的排列存在于复合物中且有一定的方向性,Fos 在另外一边,而活化 T 细胞核因子相邻于 Jun 蛋白^[9]。这种方向性在 DNA 与 AP-1 单独结合的产物中却不存在。活化 T 细胞核因子与 AP-1 的相互作用见于白介素 2、白介素 4、白介素 5、白介素 13、粒-巨噬细胞集落刺激因子、 γ 干扰素等多种基因的启动子和增强子。二者的相互作用空间结构上体现为与在 DNA 结合的位置相邻,结果是有力地增强了与 DNA 结合的亲和力和稳定性,并增强了对下游靶基因转录的调控。

4 NFAT 与皮肤疾病

4.1 黑素瘤

黑素瘤是致死率最高的皮肤肿瘤,特点是恶性度高、易于转移、预后较差、死亡率高,目前没有满意的治疗方法。大量的实验研究显示出 Wnt/ β -catenin 与黑素瘤的发生密切相关,但 β -catenin 的表达变化与肿瘤浸润、发展阶段没有明显相关性,Dejmek 等^[10]证实乳腺癌细胞中 Wnt5a 可以通过 Ca^{2+} 信号活化 NFAT1,并促进癌细胞的转移。Juhász^[11]发现,黑素瘤细胞系中钙调磷酸酶的活性能够被免疫抑制剂 CsA 所抑制,出现细胞代谢活性及增殖率降低、细胞形态学变化、细胞内肌动蛋白结构改变,最后增加死亡率,因而推测钙调磷酸酶在黑素瘤细胞的生物学功能方面起较为重要的作用。作为 NFAT 下游靶分子的 COX-2 在浅表及转移性黑素瘤的表达相对于色素痣明显升高。Flockhart 等^[12]发现,人黑素瘤细胞系表达 NFAT2、NFAT4 和 BRAFV600E,特别是 BRAF 突变的细胞中,而用特异性 MEK 抑制剂 PD98059 抑制 BRAF/MEK/ERK 信号通路后,NFAT 的转录活性明显降低,NFAT 的活化还可调控 COX-2 的启动子活性及其蛋白表达,作者认为 NFAT 的表达可能是通过 MEK/ERK 信号的 BRAFV600E 调控,而 COX-2 是 NFAT 的下游靶基因。最近 Ling Zhang^[13]等发现运用含有 NFAT 结合基序的合成启动子载体在黑素瘤体局部靶向调控并促进 IL-12 的表达,在 B16 黑素瘤鼠模型治疗中疗效明显,能明显使肿瘤体积缩小并延长寿命^[14]。我们实验组运用 RT-PCR、western-blot 等发现黑素瘤中 Calcineurin、NFAT2、COX-2、VEGF-A 分子表达较正常黑素细胞明显增高,运用免疫组化发现黑素瘤组织中 Calcineurin-B、NFAT2 阳性率较高,而在色素痣组织中为阴性表达,提示可能 NFAT 介导的信号通路在黑素瘤发生、发展中起重要作用^[15]。

4.2 系统性红斑狼疮

系统性红斑狼疮是一种累及全身器官的自身免疫性疾病。近年来国内外的基因芯片研究表明,在系统性红斑狼疮的外周血单个核细胞中有多个干扰素诱导基因的显著性高表达,IFN 及其信号传导通路上的有关分子是潜在的临床药物靶点,有学者发现干扰素诱导蛋白 3 (IFIT3) 既是活动性表达基因,又是过表达基因,IFIT3 表达的增高对 SLE 患者疾病诊断和病情活动性的判断均有一定的特异性,研究认为 IFIT3 活化 T 细胞后的作用通路为“致病因子刺激机体 I 型 IFN 的表达增加进而诱导 IFIT3 表达增加,IFIT3 引起 CD3 和 CD154 的表达增加,经过胞内信号的级联传递,最后激活转录因子 NFAT、c-myc、c-fos、c-jun 等^[16]”,NFAT 等转录因子进入胞核作用于效应基因 IL2r、IL4 等的调控序列,进而促进 IL2r、IL4 基因的表达,IL2r、IL4 基因的表达活化 T 细胞,引起 IFN γ 表达增加,促进自身免疫反

应的形成。还有研究发现 SLE 患者 T、B、单核细胞 PBX1 基因表达量明显低于正常人,通过构建含 PBX1 基因的腺病毒载体,并将该病毒转染到 Jurkat 细胞中,同时用抗 CD3 和 CD28 共同激活已转染 PBX1 基因的 Jurkat 细胞,通过 Real-TimePCR 及基因芯片观察转录因子的变化,结果发现 PBX1 过度表达可抑制 NFAT、NFkB、IFN γ 等的表达^[17]。提示 SLE 中 PBX1 表达下降,可能通过 NFAT、Fli1、IFN γ 表达增加,淋巴细胞活化促使 SLE 发病。

4.3 银屑病

目前研究认为在真皮上层的 T 辅助细胞活化导致细胞因子产生,如 IL-2、IL-8、IFN- γ 、肿瘤坏死因子(TNF)- α ,上述细胞因子导致炎症反应并刺激 T 细胞浸润和增殖,而这些 T 细胞在银屑病的发病机制中起到重要作用,它启动免疫反应导致表皮细胞特别是角质形成细胞增殖。Wael I Al-Daraji^[18]等在 mRNA 及蛋白水平发现 NFAT2 表达于正常皮肤及银屑患者皮肤,而在后者表达明显升高,运用分化促进因子可以诱导人角质形成细胞内钙离子升高而使 NFAT1 及 NFAT2 核转位,但是它们的动力学不一样,认为 NFAT2 在人角质形成细胞的增殖及分化的调节中发挥重要作用。Al-Daraji WI^[19]等用相似方法发现 NFAT3 在银屑患者的表达相对于正常皮肤明显升高,亦认为 NFAT3 在人角质形成细胞的增殖及分化的调节中发挥重要作用。当前外用大环内酯类免疫调节剂他克莫司(钙调磷酸酶抑制剂)取得良好效果,主要机制认为是抑制了 NFAT 发生去磷酸化及核转位达到治疗目的^[20]。

5 展望

NFAT 开始被认为是一种能结合和上调 T 细胞中 IL-2 基因启动子的诱导性核因子,现发现它作为细胞信号转导中的中间途径因子在免疫系统及肿瘤发生、发展中也起重要作用。目前在多种皮肤疾病中发现 NFAT 异常表达,研究显示与表皮细胞增殖、自身免疫反应的形成、肿瘤形成及浸润转移关系密切。NFAT 信号活化的步骤表现为由胞浆向胞核移位,结合于相应 DNA 区域,调控多种下游靶基因的转录表达。对 NFAT 在皮肤病患者真表皮及肿瘤细胞中的表达及其作用的进一步研究有助于皮肤疾病的诊断、治疗。为了深入探讨在皮肤疾病的发生、发展中 NFAT 所起的作用,而大部分试验为体外试验是目前对皮肤疾病进展中 NFAT 作用的研究一个主要限制,因此建立动物模型在目前急需解决。由于其亚型之间具有特异性及重复性功能,多个亚型干涉掉后,难于准确评估疾病进展情况,单个亚型干涉掉后结果常是缺少明显的表现型。现在仍不太清楚 NFAT 与皮肤疾病之间的相关关系,研究显示部分亚型甚至具有相反的功能。随着 NFAT 与皮肤疾病关系的阐明,有望为皮肤疾病的治疗提供新的思路。

参考文献(References)

- [1] Caetanom S, Vieira-De-Abreu A, Teixeira K, et al. NFATC2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression [J]. FASEB J, 2002, 16 (14):1940-1942
- [2] Horsley V, Aliprantisa O, Polak L, et al. NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells [J]. Cell, 2008, 132 (2): 299-310
- [3] Jauliac S, Lopez-Rodriguez C, Shawl M, et al. The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion [J]. Nat Cell Biol, 2002, 4 (7):540-544
- [4] Foldynova-Trantirkova S, Sekyrova P, Tmejova K, et al. Breast can-

- cer-specific mutations in CK1epsilon inhibit Wnt/beta-catenin and activate the Wnt/Rac1/JNK and NFAT pathways to decrease cell adhesion and promote cell migration [J]. Breast Cancer Res, 2010, 12 (3): 30
- [5] Hogan PG, Chen L, Nardone J, et al. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT [J]. Genes Dev, 2003, 17(18):2205-2232
- [6] Larue L, Delmas V. The WNT/Beta-catenin pathway in melanoma [J]. Front Biosci, 2006, 11:733-742
- [7] 金伯泉主编. 细胞与分子免疫学 [M]. 西安: 科学出版社, 2001: 578-580
- Jin Bo-quan. Cellular and Molecular Immunology [M]. Xi'an: Science Press, 2001:578-580
- [8] Robbs BK, Cruz AL, Werneck MB, et al. Dual roles for NFAT transcription factor genes as oncogenes and tumor suppressors [J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(23):7168-718
- [9] Saneyoshi T, Kume S, Amasaki Y, et al. The Wnt/calcium pathway activates NFAT and promotes ventral cell fate in Xenopus embryos [J]. Nature, 2002, 417(6886):295-299
- [10] Dejmeck J, Sahholm A, Nielsen CK, et al. Wnt-5a/Ca $^{2+}$ -Induced NFAT Activity Is Counteracted by Wnt-5a/Yes-Cdc42-Casein Kinase 1 Signaling in Human Mammary Epithelial Cells [J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(16):6024-6036
- [11] Juhász T, Matta C, Veress G, et al. Inhibition of calcineurin by cyclosporine A exerts multiple effects on human melanoma cell lines HT168 and WM35 [J]. Int J Oncol, 2009, 34(4):995-1003
- [12] Flockhart RJ, Armstrong JL, Reynolds NJ, et al. NFAT signalling is a novel target of oncogenic BRAF in metastatic melanoma [J]. Br J Cancer, 2009, 101(8):1448-1455
- [13] Zhang L, Kerkar SP, Yu Z, et al. Improving Adoptive T Cell Therapy by Targeting and Controlling IL-12 Expression to the Tumor Environment [J]. Molecular therapy, 2011, 19(4):751-759
- [14] Lee YS, Kim DW, Kim S, et al. Downregulation of NFAT2 promotes melanogenesis in B16 melanoma cells [J]. Anat Cell Biol, 2010, 43(4): 303-309
- [15] 徐玉荣, 廖文俊, 简强, 等. Calcineurin、NFAT2、COX-2 及 VEGF-A 在正常黑素细胞和不同黑素瘤细胞系中的表达 [J]. 中国皮肤性病科学杂志(待刊)
- Xu Yu-rong, Liao Wen-jun, Jian Qiang, et al. The Expression of Calcineurin, NFAT2, COX-2 and VEGF-A in Normal Melanocytes and Melanoma Cells [J]. Chinese Journal of Dermatology and Venereology (Pending the issue)
- [16] Yiu GK, Tokar A. NFAT induces breast cancer cell invasion by promoting the induction of cyclooxygenase-2 [J]. J Biol Chem, 2006, 281 (18):12210-12217
- [17] Buchholz M, Ellenrieder V. An Emerging Role for Ca $^{2+}$ /Calcineurin/NFAT Signaling in Cancerogenesis [J]. Cell Cycle, 2007, 6(1): 16-19
- [18] Wael I Al-Daraji, Tamer T Malak, Richard J Prescott, et al. Expression, localisation and functional activation of NFAT-2 in normal human skin, psoriasis, and cultured keratinocytes [J]. Int J Clin Exp Med, 2009, 2(2):176-192
- [19] Al-Daraji WI, Tugrul S, Dempsey E, et al. A preliminary examination of the role of NFAT 3 in human skin, cultured keratinocytes and dermal fibroblasts [J]. Cutan Pathol, 2010, 37(9):e21-36
- [20] Courtwright A, Siamakpour-Reihani S. Secreted frizzled-related protein 2 stimulates angiogenesis via a calcineurin/NFAT signaling pathway [J]. Cancer Res, 2009, 69(11):4621-4628