

• 临床检验研究论著 •

桥本甲状腺炎患者外周血 Th17 与 Treg 细胞及其相关因子表达的研究^{*}

李 志¹, 杨婷婷², 尹 昂³, 徐维家^{1△}, 王 波¹

(1. 大连市中心医院检验科, 辽宁大连 116033; 2. 辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁大连 116029;

3. 大连医科大学医学检验系, 辽宁大连 116044)

摘 要:目的 研究桥本甲状腺炎(HT)患者外周血中 Th17、Treg 细胞及其细胞因子 IL-17、TGF- β 的表达情况, 探讨 Th17 与 Treg 细胞在 HT 发病机制中的作用及其临床意义。方法 选择 42 例 HT 患者(HT 组)和 20 例对照组为研究对象, 采用流式细胞术检测 HT 组和对照组外周血单个核细胞(PBMCs)中 Th17 和 Treg 细胞的比例; 应用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清中 Th17 的相关因子 IL-17 和 Treg 的相关因子 TGF- β 含量。结果 HT 组患者 PBMCs 中 Th17 细胞比例明显高于对照组($P < 0.01$), Treg 细胞比例明显低于对照组($P < 0.01$); HT 组患者血清 IL-17 含量较对照组显著升高($P < 0.05$), TGF- β 含量较对照组略低, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 在 HT 患者中, Th17、Treg 细胞的变化可能在 HT 发病机制中发挥重要作用; 对 Th17/Treg 的观察可用于 HT 疾病进展情况监测及疗效观察。

关键词: 甲状腺炎, 自身免疫性; 细胞学技术; 流式细胞术; 酶联免疫吸附测定

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.08.014

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)08-0945-02

Expression of Th17, Treg cells and cytokine in peripheral blood of patients with hashimoto thyroiditis^{*}

Li Zhi¹, Yang Tingting², Yin Ang³, Xu Weijia^{1△}, Wang Bo¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Dalian Municipal Central Hospital, Dalian, Liaoning 116033, China;

2. Life Science College of Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning 116029, China;

3. Department of Clinical Laboratory, Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116044, China)

Abstract: Objective To examine the serum levels of IL-17, TGF- β and the proportion of peripheral of Th17 cells and Treg cells in patients with Hashimoto thyroiditis(HT), and to discuss the role of Th17 and Treg cells in the pathogenesis of HT. **Methods** Flow cytometric assay were used to analyse the percentages of Th17 and Treg cells in 42 cases of HT patients and 20 normal controls. The levels of IL-17 and TGF- β in plasma were measured by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). **Results** The percentages of Th17 cells in patients with HT was significantly higher than that of normal controls($P < 0.01$) and the Treg percentages decreased obviously($P < 0.01$). The serum levels of IL-17 were higher than control($P < 0.05$), serum concentrations of TGF- β is a little lower than controls, but there was no statistical difference($P > 0.05$). **Conclusion** Th17 and Treg cells may play an important role in the pathogenesis of HT. The examination of Th17/Treg cells can be used in the survey of disease state and curative effect of HT.

Key words: thyroiditis, autoimmune; cytological techniques; flow cytometry; enzyme-linked immunosorbent assay

桥本甲状腺炎(HT)又称为慢性淋巴细胞性甲状腺炎^[1]。HT 为器官特异性自身免疫病, 具有遗传倾向, 发病机制可能是在某种遗传因素和环境因素的作用下, 免疫系统对正常甲状腺组织的自身耐受状态被打破, 产生了自身抗体及相关细胞因子^[2]。HT 以血清中存在甲状腺特异性自身抗体为特征^[3-4]。Th17 和 Treg 细胞是新鉴定的具有相反功能的 CD4⁺T 细胞亚群, 近年来对 Th17/Treg 失衡与自身免疫性疾病的关系研究已成为热点。本研究通过检测 HT 患者外周血 Treg 与 Th17 细胞亚群比例及其相关细胞因子的变化, 探讨 Treg、Th17 细胞的异常在 HT 发病中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2012 年 6~10 月大连市中心医院的门诊和住院 HT 患者共 42 例(HT 组)。HT 的诊断标准采用《中国甲状腺疾病诊治指南》(中华医学会内分泌学会, 2008 年), 同时排除肝炎、结核病、糖尿病、肾病等其他内科疾病及其他禁忌使用激素的患者。其中男 5 例, 女 37 例; 年龄 24~57 岁, 平均

(39.5 $\pm$ 12)岁。20 例健康体检者作为对照组, 其中男 5 例, 女 15 例, 平均年龄(41.2 $\pm$ 10)岁。两组一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 试剂与仪器 固定破膜剂 IntraprepTM、异硫氰酸荧光素(FITC)标记-抗人 CD3 单克隆抗体, FITC 标记-抗人 CD4 单克隆抗体, 藻红蛋白青色素 5.1(PC5)标记-抗人 CD4 单克隆抗体, PC5 标记-抗人 CD25 单克隆抗体购自美国 Beckman 公司, 藻红蛋白(PE)标记-抗人 IL-17 单克隆抗体及同型, PE 标记-抗人 Foxp3 单克隆抗体及同型购自美国 eBioscience 公司, 固定破膜剂 Foxp3 Fix/perm Buffer 购自 Biolegend 公司, 佛波酯(PMA)、离子霉素(inomycin)、莫能霉素(monensin)购自美国 Sigma 公司, 流式细胞仪 Epics-xl 型(Beckman coulter), 酶标仪仪器为瑞典 SUNRISE 酶标仪, IL-17、TGF- β ELISA 试剂盒购于大连宝生物公司。

1.3 标本采集和处理 受检者均于入院后第 2 天清晨空腹静脉采血 5~6 mL 于肝素抗凝管中, 密度梯度离心法分离 PB-

^{*} 基金项目: 大连市医药卫生科学研究项目(2010051005)。 作者简介: 李志, 男, 副主任技师, 主要从事临床肿瘤免疫和分子生物学研究。

[△] 通讯作者, E-mail: xuweijia@dl.cn。

MC 用于 Th17 细胞的流式检测,分离血清于-20℃冻存用于细胞因子检测。所有标本均无乳糜、无溶血。

1.4 实验方法

1.4.1 Th17 细胞的染色 细胞胞外染色:将 CD3-FITC 和 CD4-PC5 单抗加入到分离出的 PBMCs 中,混匀,避光室温孵育 20 min。细胞培养:将孵育后的 PBMCs 用 RPMI-1640 培养液洗涤后加入到 RPMI-1640 培养体系中(含 10%新生牛血清、50 ng/mL PMA、1 μg/mL ionomycin、3 μmmol/L monensin)稀释细胞终浓度至 1×10⁶/mL,37℃培养箱中孵育 18 h。细胞固定破膜及胞外染色:用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤培养后的细胞,固定破膜剂进行固定、破膜(按试剂盒说明书)之后加入 PE-抗人 IL-17,对照管加入同型对照抗体,孵育 30 min。PBS 洗涤两次后加入 500 μL PBS 悬浮细胞。

1.4.2 Treg 细胞的染色 胞外染色及溶血:取外周血 200 μL 入 CD4-FITC 和 CD25-PC5 单抗,混匀,避光室温孵育 20 min;加入溶血素溶解红细胞后,PBS 洗涤两次。细胞固定破膜及胞外染色:将 PBS 洗涤后的细胞用固定破膜剂进行固定、破膜加入 PE-抗人 FoxP3 单抗,对照管加入同型对照抗体,孵育 30 min。PBS 洗涤两次后加入 500μL PBS 悬浮细胞。

1.4.3 流式细胞仪检测 Th17 和 Treg 细胞 应用 Epics-xl 型流式细胞仪测定淋巴细胞内和胞膜各种荧光素的荧光强度,Th17 (CD3⁺、CD4⁺、IL-17⁺)和 Treg 细胞(CD4⁺、CD25⁺、Foxp3⁺)。

1.4.4 ELISA 检测血清中 IL-17 和 TGF-β 的含量 对于 IL-17 和 TGF-β 的测定要严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作。

1.5 统计学处理 采用 SPSS12.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间数据用独立样本 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Th17 与 Treg 细胞的检测结果 见表 1。

表 1 各组外周血中 Th17 及 Th1 细胞所占比例($\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	Th17/CD4 ⁺ T 细胞(%)	Treg/CD4 ⁺ T 细胞(%)
HT 组	42	1.56±0.71*	2.24±0.44*
对照组	20	0.43±0.29	5.71±1.42

*:*P*<0.01,与对照组比较。

2.2 IL-17 与 TGF-β 的表达 见表 2。

表 2 各组血清中 IL-17 和 TGF-β 的含量($\bar{x} \pm s$,pg/mL)		
组别	IL-17	TGF-β
HT 组	9.47±2.25*	15.61±2.10
对照组	7.08±1.54	16.25±3.36

*:*P*<0.05,与对照组比较。

3 讨 论

HT 为常见的器官特异性自身免疫性疾病之一。对 HT 发病机制的研究一直为研究热点。早期研究认为,HT 是由 Th1 细胞介导发生的,并且 Th1/Th2 细胞免疫平衡倾向于 Th1 细胞而引起相关的细胞因子分泌异常在其中起关键作用^[5]。但随着新的效应 T 细胞亚群的发现,人们对自身免疫的理解发生了新的变化。Th17 和 Treg 细胞是两类新近发现的 CD4⁺ T 细胞亚群,Treg 细胞可以介导免疫耐受、抑制炎症,Th17 有促炎作用,这两种细胞在功能和分化过程上相互对抗,

对维持免疫内环境的稳定起重要作用^[6]。

Th17 细胞自 2005 年由 Langrish 等^[7]提出,此亚群由 IL-23 诱导分化生成,分泌 IL-17、IL-17F、IL-22 和 TNF-α 等细胞因子发挥致病效应,并能诱导其他细胞分泌化学因子和促炎因子。现已经证实 Th17 细胞及其细胞因子参与多种自身免疫性疾病的发生过程。在多发性硬化症、原发性胆汁性肝硬化、系统性红斑狼疮等自免疫性疾病的患者的外周血及病灶处均检测到大量的 Th17 细胞。本实验初步研究了 Th17 及 IL-17 在 HT 患者外周血中的表达,结果显示 Th17 及 IL-17 相比对照组均呈高表达,结果与国内外研究结果相符^[8-10]。HT 表现为甲状腺滤泡上皮细胞的破坏,而 IL-17 可以诱导产生 IL-6、急性反应蛋白、前列腺素 E2 等炎症因子,与炎症因子 TNF-α 等发挥协同效应,放大炎症反应。目前尚无文献报道 HT 中 IL-17 的变化和作用,但是结合 IL-17 的强促炎因子的作用,可以推测:IL-17 可能导致甲状腺组织的炎症并促使更多炎症因子的释放,趋化炎症细胞,加重甲状腺局部炎症反应,从而在 HT 起到破坏性作用。

体内存在一类可对免疫应答发挥负调控作用的 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞亚群命名为 Treg 细胞。Foxp3 是 Treg 细胞的特异性标志。通过对自身免疫病机制的不断研究,人们已经认识到 Treg 细胞不仅能够参与产生自身免疫耐受,防止自身免疫疾病的发生,而且能够限制免疫防御中 T、B 细胞过度活化,避免造成组织损伤。Treg 细胞通过细胞-细胞接触模式和分泌抑制性因子等机制发挥免疫抑制作用。TGF-β 对 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞、巨噬细胞等多种细胞有抑制作用,在诱导和维持机体免疫耐受的诱导和维持方面起了很大作用。近年来许多研究表明,多种自身免疫病中出现 Treg 数量的减少和功能的缺陷,Treg 在自身免疫性疾病的发生中具有重要意义。在本研究中,HT 患者 Treg 细胞相比对照组呈低表达,TGF-β 含量低于对照组但差异无统计学意义,这与已有研究结果相符合。本实验中 HT 患者 IL-17 与 Th17 表达一致而 TGF-β 与 Treg 表达不完全一致,可能是因为 IL-17 在体内主要由 Th17 细胞分泌;而 TGF-β 可以由如 Tr1、Th、成骨细胞、Kupffer 细胞等许多细胞分泌,骨组织是其最大的来源。因此 Treg 细胞的减少对 TGF-β 的数量不会造成太大影响。CD4⁺ T 细胞亚群之间往往在功能和分化过程的互相抑制现象(如:Th1 和 Th2 细胞),这是维持机体免疫系统平衡的机制之一。Th17/Treg 细胞亚群就存在典型的互相抑制现象。TGF-β 与人 Th17 细胞的发育无关,但它有维持 Foxp3 在 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞表达的作用,并可以诱导 CD4⁺ CD25⁻ T 细胞表达 Foxp3,使其转变为具有功能活性的 Treg 细胞。Foxp3 可以抑制 Th17 的功能,作用机制为直接与 Th17 细胞的关键转录因子 RORγt 结合,后者主要介导 IL-17A mRNA 的转录。Fopx3 通过影响 IL-17 的分泌起到实现对 Th17 功能的抑制。结合本实验结果分析,HT 患者 Treg 细胞表达过低,不能够通过对 RORγt 转录的抑制来限制 Th17,与此同时相对较低水平的 TGF-β 不能有效地诱导 Treg 细胞的分化发育,对 TGF-β 不反应使 Th17 易于逃离 Treg 细胞的免疫抑制等多方面机制导致 Treg 对效应性 T 细胞抑制不足,有促炎作用的 Th17 细胞异常增殖,进而引起甲状腺的炎症反应。

综上所述,在 HT 患者中 Th17 细胞与 Treg 细胞的失衡可能导致甲状腺自身免疫功能的紊乱,进而诱导 HT 的产生,因此对 Th17/Treg 的观察可用于 HT 疾病进(下转第 949 页)

体具有非特异性抵抗力。hs-CRP 是临床实验室采用了超敏感检测技术,能准确的检测低浓度 C 反应蛋白,提高了试验的灵敏度和准确度。hs-CRP 检测最常用于各种急性炎症辅助诊断和疗效指标。在 49 例细菌培养的病例中,45 例 hs-CRP 为阳性,其敏感度达到 91.8%。4 例细菌培养阳性但 hs-CRP 为阴性,这可能是由于正常血浆中 CRP 含量极低,只有在机体受到炎症、损伤等刺激 4~6 h 后,CRP 才开始升高,24~72 h 才达高峰的原因^[5],这部分急性感染者由于感染时间短,血清 CRP 还未升高,故 CRP 显示为阴性。197 例 hs-CRP 阳性标本中只有 45 例细菌培养也为阳性,这是由于 CRP 为非特异性炎症标志物^[6],发生组织损伤、放射性损伤、手术创伤、心肌梗死、恶性肿瘤或者其他部位感染时,即使浆膜腔没有感染,CRP 也会上升,所以单独用 hs-CRP 诊断浆膜腔感染,其阳性预测值(0.228 4)及特异度(56.4%)均不如 BACT,容易造成误诊^[7-9]。

联合用 hs-CRP+BACT 诊断浆膜腔感染,特异度高达 95.7%,说明当 hs-CRP、BACT 均为阴性时,患者被诊断为浆膜腔感染的可能性很小;虽然灵敏度下降到了 81.6%,但阳性似然比(18.99)、阳性预测值(0.7273)、阴性预测值(0.9570)、Youden 指数(77.3)及诊断符合率(94.0%)均明显高于单独用 hs-CRP 或 BACT,说明 hs-CRP+BACT 阴性时,排除感染的能力优于单独使用 hs-CRP 或 BACT,从而使 hs-CRP 和 BACT 的诊断价值进一步得到提高。

hs-CRP+BACT 为阴性时,由于敏感性下降,部分患者细菌培养结果仍可能为阳性,说明即使联合检测 hs-CRP 和 BACT 提高了浆膜腔感染诊断价值,仍不能完全代替细菌培养。

ROC 曲线是以每一个检测结果作为可能的诊断界值,以计算得到相应的真阳性率(即灵敏度)为纵坐标,以假阳性率为横坐标绘制曲线,其曲线下面积(AUC)的大小表明了诊断试验准确度的大小^[10]。AUC 在 0.5~0.7 时有较低准确性,AUC 在 0.7~0.9 时有一定准确性,AUC 在 0.9 以上时有较高准确性。本实验中,用 hs-CRP 结果诊断浆膜腔细菌感染,其曲线下面积为 0.868,诊断价值一般;用 BACT 诊断,其曲线下面积为 0.929,具有较高的诊断价值。以 Youden 指数最大

值确定 hs-CRP 和 BACT 的最佳诊断点,并根据这两个诊断点计算,显示分别用 hs-CRP 和 BACT 对浆膜腔细菌性感染诊断,灵敏度均有所下降,漏诊的可能性会相应增加,但特异度明显增高,说明排除浆膜腔细菌感染的能力大为提高,另外,阳性似然比、阳性预测值和诊断符合率等指标也有明显的升高,说明确诊或排除浆膜腔感染的价值得到进一步的提高。

总之,hs-CRP 联合 BACT 诊断浆膜腔感染,可作为快速诊断浆膜腔感染的敏感指标,为患者的治疗争取时间。

参考文献

- [1] 朱柏珍,周林涛,雷艳英.感染性疾病相关实验室检查在临床应用的调查分析[J].检验医学与临床,2012,9(11):1334-1336.
- [2] 朱洪斌,孙耕耘.多指标联合检测鉴别渗出与漏出性胸腔积液的研究[J].国际呼吸杂志,2011,31(21):1621-1624.
- [3] 丛玉隆,马俊龙.当代尿液分析技术与临床[M].北京:中国科学技术出版社,1998:86-87.
- [4] 张爱华,杨继明,王小芳.超敏 C 反应蛋白和白细胞检测在儿科的临床应用[J].实验与检验医学,2011,29(1):82.
- [5] 朱新建,凌利芬,聂署萍,等.CRP、WBC 和 ESR 联合检测在儿童感染性疾病中应用及意义[J].中国热带医学,2008,8(12):2136-2137.
- [6] 魏书珍,张秋业.儿科疾病的临床检验[M].2 版.北京:人民卫生出版社,1998.
- [7] 张锡刚,艾辉胜,李光,等.极重度骨髓型急性放射病病人 MODS 的临床特征及成因分析[J].解放军医学杂志,2007,32(5):441-443.
- [8] 徐清芳,张美华,韩晨鹏,等.血清肌红蛋白、心肌肌钙蛋白 I 联合超敏 C 反应蛋白对老年急性心肌梗死诊断的临床价值[J].中国老年学杂志,2012,32(5):948-949.
- [9] 徐丹,高旭红,蒋莉,等.胸腹腔积液 CRP 与生化指标测定的临床意义[J].中国实验诊断学,2009,13(9):1229-1230.
- [10] 宋花玲,贺佳,虞慧婷,等.应用 ROC 曲线下面积对两相关诊断试验进行评价和比较[J].第二军医大学学报,2006,27(5):562-563.

(收稿日期:2012-11-09)

(上接第 946 页)

展情况监测及疗效观察。自身免疫性疾病的发病机制极其复杂,已有研究表明,Th1、Th2、Tr1 等多种 T 淋巴细胞与自身免疫性甲状腺疾病都有重大关联,但其具体的作用机制还有待于进一步的研究。

参考文献

- [1] 陆再英,终南山.内科学[M].7 版.北京:人民卫生出版社,2010:727.
- [2] 蔡永君,孙文倩.调节性 T 细胞的研究进展[J].浙江大学学报:医学版,2006,35(5):568-572.
- [3] Pearce EN, Farwell AP, Braverman LE. Thyroiditis[J]. N Engl J Med, 2003, 48(26):2646-2655.
- [4] 马静,李应琴.甲状腺自身抗体在常见甲状腺疾病中的临床意义[J].吉林医学,2012,33(33):7193.
- [5] Drugarin D, Negru S, Koreck A, et al. The pattern of a T(H)1 cytokine in autoimmune thyroiditis[J]. Immunol Lett, 2000, 71(2): 73-77.

- [6] 张蓝方,郝云良. Th17 细胞和 Treg 细胞与某些疾病关系的研究进展[J].临床血液学杂志,2011,24(2):189-192.
- [7] Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell regulation that induces auto-immune in inflammation[J]. J Exp Med, 2005, 201(2):233-240.
- [8] 陈紫君,刘纯,李强,等. Th17 细胞及相关细胞因子在自身免疫性甲状腺疾病中的变化及意义[J].免疫学杂志,2011,27(9):785-788.
- [9] 薛海波,马蕾,王秀云,等.桥本甲状腺炎患者外周血调节性 T 细胞/Th17 细胞平衡动态变化的研究[J].中华临床医师杂志:电子版,2012,6(8):88-92.
- [10] Figueroa-Vega N, Alfonso-Pérez M, Benedicto I, et al. Increased circulating pro-inflammatory cytokines and Th17 lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(2):953-952.

(收稿日期:2012-11-09)