

• 临床检验研究论著 •

桥本甲状腺炎患者外周血 CD4⁺T 细胞瘦素检测及临床意义*

徐庆雷¹, 朱宝林¹, 马小波¹, 张巍¹, 刘玲玲¹, 王胜军², 陈建国²

(1. 沭阳县人民医院检验科, 江苏沭阳 223600; 2. 江苏大学附属人民医院检验科, 江苏镇江 212002)

摘要:目的 检测桥本甲状腺炎(HT)患者外周血 CD4⁺T 细胞瘦素(LP)表达的水平,探讨其在 HT 发生、发展中的作用。方法 收集 HT 患者和健康对照者外周血标本,分离外周血单核细胞(PBMC),再用 CD4⁺T 细胞免疫磁珠分离 CD4⁺T 细胞,体外进行培养,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测上清液中 LP 水平。采用实时定量 PCR(qRT-PCR)方法检测 PBMC 中孤儿核受体 γ t(ROR γ t)相对表达量。结果 HT 患者 CD4⁺T 细胞培养液中 LP 水平明显高于健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。HT 患者 CD4⁺T 细胞培养液中 LP 水平与 ROR γ t 相对表达量呈正相关。结论 HT 患者 CD4⁺T 细胞 LP 水平升高,与疾病的发生发展关系密切。

关键词:甲状腺炎,自身免疫性; 瘦素; 酶联免疫吸附测定

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.05.010

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)05-0531-02

Detection and clinical significance of peripheral blood CD4⁺T cell-derived leptin in patients with Hashimoto's thyroiditis*

Xu Qinglei¹, Zhu Baolin¹, Ma Xiaobo¹, Zhang Wei¹, Liu Lingling¹, Wang Shengjun², Chen Jianguo²

(1. Department of Clinical Laboratory, Shuyang County People's Hospital, Shuyang, Jiangsu 223600, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212002, China)

Abstract: **Objective** To detect the level of CD4⁺T cell-derived leptin(LP) in peripheral blood mononuclear cells(PBMC) from the patients with Hashimoto's thyroiditis(HT) and to investigate its role in the occurrence and development of HT. **Methods** The peripheral blood samples in the patients with HT and the healthy controls were collected and separated for obtaining PBMC. The CD4⁺T cells magnetic beads was adopted to separate CD4⁺T cells for culturing *in vitro*. The LP level in supernatant was detected by ELISA. The relative expression amount of the orphan nuclear receptor ROR γ t was detected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR) method. **Results** The LP level of CD4⁺T cell culture liquid in the HT patients was markedly higher than that in the healthy control group, difference was statistically significant($P < 0.05$). Furthermore, the LP level in CD4⁺T cell culture liquid was positively related with the relative expression amount of ROR γ t in HT patients. **Conclusion** The CD4⁺T cell-induced leptin level is increased in HT patients, which is closely related with the occurrence and development of HT.

Key words: thyroiditis, autoimmune; leptin; enzyme-linked immunosorbent assay

桥本甲状腺炎(HT),是一种常见的器官特异性自身免疫病。以往认为 CD4⁺T 细胞尤其是 Th1 在其发病中发挥重要作用^[1]。新近发现 Th17 升高可能与 HT 发病有关^[2-3]。瘦素(LP)是由肥胖基因(*ob*)编码、与白细胞介素 6 等细胞因子结构高度相似的肽类激素^[4-6]。近年来的研究表明,LP 作为一种新型的免疫调节因子与多种自身免疫病的发生、发展密切相关。本研究通过检测 LP 在 HT 患者血浆及外周血 CD4⁺T 细胞培养液中的水平并分析其与 Th17 细胞特征性转录因子孤儿核受体 γ t(ROR γ t)mRNA 表达的相关性,探讨其在 HT 发病中的作用机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2011 年 12 月至 2012 年 11 月沭阳县人民医院经临床诊断和实验室检查证实为 HT 患者 27 例(HT 组),其中女 24 例,男 3 例,平均年龄(47.6 $\pm$ 11.3)岁;体质指数(BMI)为(22.94 $\pm$ 2.81)kg/m²,甲状腺功能正常均为初诊未治疗的患者;选取同期的 25 例健康体检者作为健康对照组,其中女 22 例,男 3 例,平均年龄(45.7 $\pm$ 9.2)岁;BMI 为(23.67 $\pm$ 3.17)kg/m²。

1.2 方法

1.2.1 采集方法 抽取清晨空腹肘静脉血 3~5 mL,肝素钠抗凝,随后用 Ficoll-Hypaque 人淋巴细胞分离液(天津灏阳生物制品有限公司)梯度离心得到人外周血单个核细胞(PB-

MC);同时离心分离血浆,保存在-80℃待测。

1.2.2 CD4⁺T 细胞分离、纯化和增殖 利用 Ficoll-Hypaque 人淋巴细胞分离液梯度离心得到人外周血单个核细胞(PBMC),再用 CD4⁺T 细胞免疫磁珠分离试剂盒(Miltenyi Biotec GmbH 公司)进行分离,经流式细胞仪检测,纯度在 95%以上。在含 10 mg/mL anti-CD3 mAb、2 mg/mL anti-CD28 mAb、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素、10%胎牛血清的 1640 培养液中,37℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养 72 h 后,吸取上清液做 LP 测定。

1.2.3 样本 ROR γ t 相对表达量检测 采用人淋巴细胞分离液分离 PBMC,提取总 mRNA。按照 TOYOCO 试剂盒说明书逆转成 cDNA。合成的 cDNA 存于-20℃冰箱备用。依照 Bio-Rad SYBR Green Super Mix 说明书,使用 CFX 96 实时荧光 PCR 仪检测。所用引物序列:ROR γ t 上游引物为 5'-CCT GGG CTC CTC GCC TGA CC-3',下游引物为 5'-TCT CTC TGC CCT CAG CCT TGC C-3', β -actin 上游引物为 5'-CAC GAA ACT ACC TTC AAC TCC-3',下游引物为 5'-CAT ACT CCT GCT TGC TGA TC-3'。每份样本采用相同反应体系及条件同时进行 PCR 扩增 3 次,以 β -actin 为参照校准 ROR γ t 的相对表达。

1.2.4 LP 测定 血浆和 CD4⁺T 细胞培养液中的 LP 采用酶联免疫吸附实验(ELISA)试剂盒(R&Dsystem 公司),按照说

* 基金项目:江苏省卫生厅科研资助项目(H200952)。 作者简介:徐庆雷,男,主任技师,主要从事临床免疫学检验及研究。

说明书进行操作,酶标仪采用 Bio-Tek Instruments 公司 uQuant 型。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析。正态分布的资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用非配对 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组 CD4⁺T 细胞培养液和血浆中 LP 水平比较 见表 1。

表 1 两组 CD4 ⁺ T 细胞培养液和血浆中 LP 水平比较			
组别	<i>n</i>	血浆 LP(ng/mL)	CD4 ⁺ T 细胞培养液 LP(pg/mL)
HT 组	27	16.4±4.8	59.9±13.4*
健康对照组	25	14.2±3.7	32.8±5.8

*: $P < 0.05$,与健康对照组比较。

2.2 相关性分析 采用直线相关分析了 HT 患者 CD4⁺T 细胞培养液中 LP 水平与其外周血单个核细胞 ROR γ t 表达的相关性,结果见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)显示 CD4⁺T 细胞培养液中 LP 水平与 ROR γ t 之间呈正相关($r = 0.672, P < 0.01$);而血浆中的 LP 水平与 ROR γ t 之间则相关性不明显($r = 0.294, P = 0.136$),结果见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

3 讨 论

近年来,人们发现了一种新型的 CD4⁺T 细胞亚群,其具有独特的分化途径和转录因子(ROR γ t)称为 Th17 细胞,以分泌 IL-17 为特征。越来越多的证据支持以往认为由 Th1 细胞介导的多种炎症性自身免疫反应,在其中发挥关键作用的是 Th17 细胞^[7-8]。HT 属于器官特异性自身免疫性疾病,过去的研究也提示 Th1 在疾病中发挥重要作用。新近的研究发现 Th17 升高可能与 HT 的发病有关^[2-3]。本研究发现 HT 患者外周血 Th17 细胞的特异性转录因子 ROR γ t 的表达显著增高。提示 Th17 细胞与 HT 的发生相关。

动物研究表明 LP 在自身免疫性疾病中起着前炎症性细胞因子的作用,能够刺激 T 细胞的增殖和促进 Th1 型免疫反应^[9]。也有研究表明 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞能够通过自分泌方式产生较高水平的 LP 和高表达 LP 受体来调控其自身的增殖^[10]。在 LP 基因缺失(*ob/ob*)和 LP 受体缺失(*db/db*)的小鼠,LP 阻断能够延缓 EAE 的发生和发展,并且显示 LP 水平与 Treg 细胞呈负相关^[11]。这些研究结果均表明 LP 调控着 Treg/Teff 细胞间的平衡。

由于 IL-6 在调节 Th17/Treg 细胞间的平衡中发挥重要作用^[12-13],而 LP 与 IL-6 结构和又高度相似^[5],因此在 HT 发病过程中,LP 可能对 Th17 起着一定的调节作用。有学者在研究绝经后骨质疏松症发生、发展过程中 IL-17 作用时发现 IL-17 负反馈调节 LP 的表达^[14];最近在对系统性红斑狼疮(SLE)的研究还表明,*ob/ob* 和 *db/db* 小鼠体内因 LP/LP 受体轴缺陷而引起 IL-17 降低;同时,LP 在体内和体外均能增加 Th17 细胞比例且呈剂量依赖性;另外,LP 还可诱导 Th17 细胞的特异性转录因子 ROR γ t 转录并增加其表达;人外周血单个核细胞(PBMC)培养,增加 LP 可以提高 Th17 细胞的数量和 IL-17 水平且也呈剂量依赖^[15]。这些研究均表明 LP 确实调控着 Th17 细胞。研究结果显示 HT 患者外周血 CD4⁺T 细胞培养液中 LP 较对照组有明显升高,且与 Th17 细胞的特异

性转录因子 ROR γ t 的表达呈正相关,但血浆 LP 增加却无统计学意义且与 ROR γ t 表达的相关性不明显,用抗 LP 单克隆抗体进行体外 LP 阻断试验显示 ROR γ t 的表达下降。本研究提示,在 HT 的发病机制中可能是 CD4⁺T 细胞 LP 而非血浆 LP 促进 Th17 细胞的致病作用。有关其调节 Th17 细胞的分子机制尚需进一步研究。

参考文献

[1] Nanba T, Watanabe M, Inoue N, et al. Increases of the Th1/Th2 cell ratio in severe Hashimoto's disease and in the proportion of Th17 cells in intractable Graves' disease[J]. Thyroid, 2009, 19(5):495-501.

[2] Figueroa-Vega N, Alfonso-Pérez M, Benedicto I, et al. Increased circulating proinflammatory cytokines and Th17 lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(2):953-962.

[3] Shi Y, Wang H, Su Z, et al. Differentiation imbalance of Th1/Th17 in peripheral blood mononuclear cells might contribute to pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis[J]. Scand J Immunol, 2010, 72(3):250-255.

[4] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue[J]. Nature, 1994, 372(6505):425-432.

[5] Baumann H, Morella KK, White DW, et al. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(16):8374-8378.

[6] Lam QL, Lu L. Role of leptin in immunity[J]. Cell Mol Immunol, 2007, 4(1):1-13.

[7] Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, et al. Divergent pro-and anti-inflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation[J]. J Exp Med, 2003, 198(12):1951-1957.

[8] Yen D, Cheung J, Scheerens H, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6[J]. J Clin Invest, 2006, 116(5):1310-1316.

[9] Lord GM, Matarese G, Howard JK, et al. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression[J]. Nature, 1998, 394(6696):897-901.

[10] De Rosa V, Procaccini C, Cali G, et al. A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation[J]. Immunity, 2007, 26(2):241-255.

[11] Matarese G, Carrieri PB, La Cava A, et al. Leptin increase in multiple sclerosis associates with reduced number of CD4⁺CD25⁺regulatory T cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(14):5150-5155.

[12] Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance[J]. Eur J Immunol, 2010, 40(7):1830-1835.

[13] Taflin C, Favier B, Baudhuin J, et al. Human endothelial cells generate Th17 and regulatory T cells under inflammatory conditions[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(7):2891-2896.

[14] Goswami J, Hernández-Santos N, Zuniga LA, et al. A bone-protective role for IL-17 receptor signaling in ovariectomy-induced bone loss[J]. Eur J Immunol, 2009, 39(10):2831-2839.

[15] Yu Y, Liu Y, Shi FD, et al. Leptin-induced ROR γ t expression in CD4⁺T cells promotes Th17 responses in systemic lupus erythematosus[J]. J Immunol, 2013, 190(7):3054-3058.