

DCs 及其膜糖蛋白在慢性淋巴细胞性甲状腺炎中的临床研究

杜 静 赵 迪 万晓娟 王淑雅 刘理峰

摘 要 **目的** 就甲状腺组织树突状细胞(DCs)数量及患者外周血 DCs 细胞膜糖蛋白变化在慢性淋巴细胞性甲状腺炎(HT)患者病理过程中的意义进行分析研究。**方法** 研究选取确诊 HT 患者 113 例,为观察组,同时选取同期健康体检者 120 例作为对照组;收集患者手术中的甲状腺组织以及外周血进行 DCs 计数以及 DCs 膜糖蛋白 Galectin-9 表达情况进行分析讨论。**结果** 本研究中观察组受试对象 113 例,对照组 120 例受试对象基本情况可比性良好。观察组患者分型参照 Woolner's 分类法,包含 L-型(lymphoid type)39 例,O-型(oxyphilic type)37 例,P-型(pronounced type)37 例。L-型 HT 患者 DCs 细胞计数为 $(6.54 \pm 1.37) \times 10^6/L$,O-型 HT 患者 DCs 细胞计数为 $(9.55 \pm 1.08) \times 10^6/L$,P-型 HT 患者 DCs 细胞计数为 $(3.59 \pm 1.33) \times 10^6/L$,全部 HT 患者的平均 DCs 细胞计数为 $(7.27 \pm 1.35) \times 10^6/L$;均高于对照组的水平 $(1.12 \pm 0.34) \times 10^6/L$,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。使用流式细胞仪检测 DCs 中 Galectin-9 蛋白表达比例水平,结果提示 L-型 HT 患者 DCs 中 Galectin-9 蛋白表达比例为 24.66%,O-型 HT 患者 DCs 中 Galectin-9 蛋白表达比例为 21.29%,P-型患者为 20.54%,全部患者的平均 DCs 中 Galectin-9 蛋白表达比例则为 24.32%;均高于对照组的 7.20%。同时,DCs 膜表面糖蛋白 Galectin-9 表达的 Western blot 法检测结果也提示观察组显著高于对照组。**结论** 在 HT 病理过程中存在者 DCs 细胞的参与,故可见几种常见类型患者 DCs 细胞计数均高于健康对照组;同时健康人 DCs 中 Galectin-9 蛋白量表达高于 HT 患者水平,可能与 HT 患者存在过度免疫有关。

关键词 树突状细胞 细胞膜糖蛋白 慢性淋巴细胞性甲状腺炎

中图分类号 R581

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.09.039

Clinical Study of DCs and Its Membrane Glycoprotein in Hashimoto's Thyroiditis. Du Jing, Zhao Di, Wan Xiaojuan, et al. Department of Endocrinology, The Yellow River Central Hospital, Henan 450003, China

Abstract **Objective** To analyze the significance of the number of DCs in thyroid tissue and the changes of DCs in peripheral blood of patients with Hashimoto's thyroiditis. **Methods** A total of 113 patients with HT were selected as the observation group and 120 healthy subjects were selected as the control group. The thyroid tissue and the peripheral blood were collected and the expression of Galectin-9 was detected. **Results** In the study group, 113 cases were observed in the observation group and 120 cases in the control group were comparatively good. In the observation group, the patients were classified into 35 cases (lymphoid type), 37 cases of O-type (oxyphilic type) and 37 cases of P-type (pronounced) type $(6.54 \pm 1.37) \times 10^6/L$. DCs cells in O-type HT patients were $(9.55 \pm 1.08) \times 10^6/L$, DCs in P-type HT patients were $(3.59 \pm 1.33) \times 10^6/L$, and the mean of all patients with HT DCs were $(7.27 \pm 1.35) \times 10^6/L$, which were higher than those in the control group $(1.12 \pm 0.34) \times 10^6/L$. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). The expression of Galectin-9 protein in DCs was 24.66% in DCs of L-type HT patients, and the expression of Galectin-9 protein in DCs of O-type HT patients was 21.29%. And P-type patients were 20.54%. The proportion of Galectin-9 protein in the mean DCs of all patients was 24.32%, which was higher than that of the control group (7.20%). At the same time, the expression of Galectin-9 in DCs was also significantly higher than that in the control group. **Conclusion** The number of DCs cells in several common types of patients is higher than that of healthy controls. The expression of galectin-9 protein in healthy human DCs is higher than that in HT patients, which may be related to HT patients Excessive immunity is associated.

Key words DCs; Cell membrane glycoprotein; Hashimoto's thyroiditis

慢性淋巴细胞性甲状腺炎(Hashimoto's thyroidi-

tis, HT) 属于一种自身免疫性甲状腺疾病,病理过程中出现以自身甲状腺组织作为抗原的变化,出现相应抗体包括甲状腺球蛋白抗体以及甲状腺过氧化物酶抗体等,是一种慢性疾病^[1,2]。HT 患者常可见甲状腺功能减低的临床表现,同时甲状腺肿大,腺体内出

作者单位:450003 郑州,黄河中心医院内分泌科(杜静、万晓娟、王淑雅);450052 郑州大学第一附属医院内分泌科(赵迪);510080 广东省人民医院内分泌科(刘理峰)

通讯作者:杜静,电子信箱:wlp2930001752@163.com

现淋巴细胞、浆细胞的浸润,还可见腺泡细胞的退行性病变等特征表现与症状^[3,4]。近年来国内外研究结果提示树突状细胞(DCs)因为参与自身免疫等过程的启动而成为HT的可能发病机制之一^[5,6]。DCs是功能极强的一种可激活初始型T细胞的抗原类细胞,参与在T细胞的分化,已经证实其在如系统性红斑狼疮、多发性硬化症等疾病的发生、发展中均起到重要作用,主要作用机制包括捕获抗原并将其转移至淋巴结以及激活T细胞等作用^[7]。与此同时,细胞膜以及细胞识别、黏着、迁移以及退行性变和病理变化等都有密切关联,而DCs细胞表面糖蛋白作为细胞膜的主要成分之一,既受糖蛋白本身性质和功能结构的影响,也与HT等疾病的发生存在一定关联,比如细胞膜糖蛋白中寡糖链结构即成为相关机制研究的关注点之一,且有研究提示其与HT的发生确实存在联系^[8,9]。本研究拟就甲状腺组织DCs数量及患者外周血DCs细胞膜糖蛋白变化在慢性淋巴细胞性甲状腺炎病理过程中的意义进行分析研究。

对象与方法

1. 一般资料:研究选取2010年1月~2016年12月间笔者医院就诊的确诊HT患者,诊断标准参考甲状腺弥漫性肿大,TGAb、TMAb阳性,血TSH升高,甲状腺扫描有不规则浓聚或稀疏以及过氯酸钾释放试验阳性;且最终经手术或粗针穿刺病理确诊,研究纳入患者113例,为观察组。同时选取同期健康体检者120例作为对照组。纳入标准:①笔者医院就诊的确诊HT患者;②患者均接受手术治疗并留取组织样本;③受试对象病历资料等完整且能配合本研究进行;④受试对象知情同意;排除标准:①并发或以往曾患自身免疫性疾病患者;②其他甲状腺疾患患者;③各种原因不能配合本研究始终的受试对象。本研究经笔者医院伦理委员会批准后进行。

2. 研究方法:研究收集患者手术中的甲状腺组织以及外周血进行DCs计数以及DCs膜糖蛋白Galectin-9蛋白表达情况进行分析讨论。研究中留取患者手术中的甲状腺组织标本,10%甲醛溶液固定,石蜡制片,组织标本染色后使用兔抗人S-100蛋白(树突状细胞)完成S-100阳性细胞绝对数的计数(光镜,每高倍视野×400,每例取10个视野的平均值)。同时采集受试对象外周血DCs的分离使用Ficoll分离液完成,分离全血,单个核细胞加入FcR阻断剂以及抗体混合液,孵育、离心得到DCs细胞悬液;DCs细胞膜蛋白荧光标记按照Cy3-NHS说明严格进行;使

用凝集素和无菌PBS配制为1mg/ml的溶液,经芯片点样仪点样完毕后孵育过夜并封闭芯片,加入Cy3标记的DCs细胞膜蛋白,孵育洗涤后进行荧光轻度检测;分析偶联凝集素,将细胞膜蛋白与偶联凝集素充分混合后静置并洗涤结合物,加入Galβ1等洗脱结合的糖蛋白。采用Western blot法检测DCs膜Galectin-9,具体细则:提取细胞膜蛋白调至1mg/ml,加入缓冲液后加热并进行电泳,加5%脱脂奶粉4℃过夜,与鼠抗人Galectin-9抗体结合(HRP-羊抗大鼠IgG为二抗)TBST洗涤,并加入化学发光底物以便显影;使用APC-抗人Galectin-9室温下避光孵育、洗涤后使用流式细胞术上机检测,比较DCs Galectin-9比例情况。

3. 统计学方法:研究使用SPSS 19.0统计学软件进行统计分析。计数资料采用样本率比较的 χ^2 检验;计量资料使用t检验或方差分析完成,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般情况:本次研究中观察组受试对象113例,平均年龄 32.48 ± 3.77 岁,120例对照组受试对象的平均年龄为 32.04 ± 4.08 岁,年龄差异无统计学意义($P > 0.05$)。观察组患者分型参照Woolner's分类法,包含L-型(lymphoid type)39例,O-型(oxyphilic type)37例,P-型(pronounced type)37例。此外,观察组和对照组中男性受试对象的比例分别为27.43%和29.17%,差异无统计学意义($P > 0.05$)。两组受试对象基本情况可比性良好,详见表1。

表1 受试对象一般情况描述 $[\bar{x} \pm s, n(\%)]$

项目	观察组 (n=113)	对照组 (n=120)	统计量	P
平均年龄(岁)	32.48 ± 3.77	32.04 ± 4.08	0.854	0.394
男性比例	31(27.43)	35(29.17)	0.086	0.769
L-型	39(34.51)	-	-	-
O-型	37(32.74)	-	-	-
P-型	37(32.74)	-	-	-

2. 两组受试对象树突状细胞计数水平分布:本研究中L-型HT患者DCs细胞计数为 $(6.54 \pm 1.37) \times 10^6/L$,O-型HT患者DCs细胞计数为 $(9.55 \pm 1.08) \times 10^6/L$,P-型HT患者DCs细胞计数为 $(3.59 \pm 1.33) \times 10^6/L$,全部HT患者的平均DCs细胞计数为 $(7.27 \pm 1.35) \times 10^6/L$;均高于对照组的水平 $(1.12 \pm 0.34) \times 10^6/L$,差异有统计学意义($P < 0.05$,表2)。

表 2 两组受试对象树突状细胞计数水平分布($\bar{x} \pm s, \times 10^6/L$)

/HPF(×400)	观察组(n=113)	对照组(n=120)	统计量	P
L-型	6.54±1.37	-	41.992	0.000
O-型	9.55±1.08	-	81.341	0.000
P-型	3.59±1.33	-	19.675	0.000
合计	7.27±1.35	1.12±0.34	48.309	0.000

HPF. 高倍视野 (high power fiel, ×400)

3. 两组受试对象使用流式细胞仪检测 DCs 中 Galectin-9 蛋白表达比例水平及 Western blot 法检测结果:同时使用流式细胞仪检测 DCs 中 Galectin-9 蛋白表达比例水平,结果提示 L-型 HT 患者 DCs 中 Galectin-9 蛋白表达比例为 24.66%,O-型 HT 患者 DCs 中 Galectin-9 蛋白表达比例为 21.29%,P-型患者为 20.54%,全部患者的平均 DCs 中 Galectin-9 蛋白表达比例则为 24.32%;均高于对照组的 7.20%,见表 3。同时,DCs 膜表面糖蛋白 Galectin-9 表达的 Western blot 法检测结果也提示观察组显著高于对照组,见图 1。

表 3 两组受试对象使用流式细胞仪检测 DCs 中 Galectin-9 蛋白表达比例水平(%)

Galectin-9 蛋白表达比例	观察组(n=113)	对照组(n=120)
L-型	24.66	-
O-型	21.29	-
P-型	20.54	-
平均	24.32	7.52



图 1 DCs 膜表面糖蛋白 Galectin-9 表达的 Western blot 法检测结果

讨 论

HT 甲状腺炎也称慢性淋巴细胞性甲状腺炎,因为学者 Hashimoto 在 20 世纪初首先报道了相关病例而得名,HT 病理过程中出现以自身甲状腺组织为抗原的免疫反应,产生甲状腺球蛋白抗体和甲状腺过氧化物酶抗体,属于一种慢性的自身免疫性疾病^[10-12]。研究结果提示从免疫学角度来说本病是体液免疫和细胞免疫共同参与的一种疾病,发病机制与免疫、环境和遗传等因素均有关联^[13-15]。DCs 广泛分布于血液、肝脏、脾脏、淋巴结等组织和器官中,是一类具有抗原递呈功能的细胞,可以表达黏附分子及共刺激分子等,进而启动激活 T 细胞相关的免疫应答;随

着近年来研究的深入,目前已知其与多种肿瘤、慢性感染性疾病以及自身免疫类疾病有关联^[14,15]。

本研究对 DCs 数量在慢性淋巴细胞性甲状腺炎患者病理上的意义进行了分析,研究中观察组受试对象 113 例,平均年龄 32.48±3.77 岁,120 例对照组受试对象的平均年龄为 32.04±4.08 岁,年龄比较差异无统计学意义。观察组患者分型参照 Woolner's 分类法,包含 L-型(lymphoid type)39 例,O-型(oxyphilic type)37 例,P-型(pronounced type)37 例。此外,观察组和对照组中男性受试对象的比例分别为 27.43% 和 29.17%。两组受试对象基本情况可比性良好。研究中提示 L-型 HT 患者 DCs 细胞计数为(6.54±1.37)×10⁶/L,O-型 HT 患者 DCs 细胞计数为(9.55±1.08)×10⁶/L,P-型 HT 患者 DCs 细胞计数为(3.59±1.33)×10⁶/L,全部 HT 患者的平均 DCs 细胞计数为(7.27±1.35)×10⁶/L;均高于对照组的水平。与此同时,研究提示自身免疫病患者体内常可见一些异质性 DCs 通过分泌高水平的因子,比如白介素等起到增强 Th1 和辅助性 T 细胞免疫反应的效果^[10,12],研究测定过程中因为凝集素可以通过特异性识别用于分析糖复合物上的糖链结构,因此使用凝集素芯片法可以对 DCs 膜糖蛋白表达差异进行比较,凝集素芯片结果显示,ABA 特异性结合的糖蛋白中 Galectin-9 含量高,Galectin-9 作为半乳糖凝集素家族中成员,在多种自身免疫病中都可以通过下调 Th1、Th17 等抑制 Treg 细胞的一些功能,Galectin-9 在一些炎症和自身免疫研究中还表现出抗炎症的效果^[16]。

本研究也利用了这个原理分析了 DCs 膜表面糖蛋白 Galectin-9 的表达情况,本次研究中使用流式细胞仪检测 DCs 中 Galectin-9 蛋白表达比例水平,结果提示 L-型 HT 患者 DCs 中 Galectin-9 蛋白表达比例为 24.66%,O-型 HT 患者 DCs 中 Galectin-9 蛋白表达比例为 21.29%,P-型患者为 20.54%,全部患者的平均 DCs 中 Galectin-9 蛋白表达比例则为 24.32%;均高于对照组的 7.20%。同时,DCs 膜表面糖蛋白 Galectin-9 表达的 Western blot 法检测结果也提示密度扫描结果对照组 DCs 中 Galectin-9 蛋白量高于 HT 患者,可能与 HT 患者存在过度免疫有关。

综上所述,在 HT 病理过程中存在者 DCs 细胞的参与,故可见几种常见类型患者 DCs 细胞计数均高于健康对照;同时健康人 DCs 中 Galectin-9 蛋白量表达高于 HT 患者水平,可能与 HT 患者存在过度免疫有关。

(下转第 175 页)

综合征模型大鼠肝肾组织中 GRP78/94 mRNA 表达降低、TLR4 mRNA 表达增强;经不同剂量五味子乙素治疗后,GRP78/94 mRNA 表达升高、TLR4 mRNA 表达减弱。说明肝肾组织 GRP78/94 表达降低也许诱导了 TLR4 炎症通路的活化,还可能与肝肾综合征相关,与前期报道十分相似。综上所述,五味子乙素可以改善肝肾综合征模型大鼠,其作用可能与调控肝肾组织中 GRP78/94 及 TLR4 基因表达水平相关。

参考文献

- 1 杨东旭,成亮,徐平湘,等. 加味真武汤对肝肾综合征模型大鼠肝肾功能的影响[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(3): 573-574
- 2 晏春根,朱冬芳,王锋. 热休克蛋白 72 和 Toll 样受体 4 在肝肾综合征大鼠肾组织中的表达及作用研究[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(12): 705-708
- 3 晏春根,任光圆,朱冬芳,等. 同型半胱氨酸介导的内质网应激对肝细胞脂质代谢的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(12): 2414-2418
- 4 Lin Q, Qin X, Shi M, *et al.* Schisandrin B inhibits LPS-induced inflammatory response in human umbilical vein endothelial cells by activating Nrf2[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 49(12):142-147
- 5 Zhu N, Cai C, Zhou A, *et al.* Schisandrin B prevents hind limb from ischemia-reperfusion-induced oxidative stress and inflammation via

- MAPK/NF- κ B pathways in rats[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 3(12):53-64
- 6 Thandavarayan RA, Giridharan VV, Arumugam S, *et al.* Schisandrin B prevents doxorubicin induced cardiac dysfunction by modulation of DNA damage, oxidative stress and inflammation through inhibition of MAPK/p53 signaling[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3):e0119214
- 7 王飞. 沙棘油和五味子乙素对镉致大鼠肝肾损伤影响的实验研究[M]. 沈阳: 中国医科大学, 2009
- 8 Egerod Israelsen M, Gluud LL, Krag A. Acute kidney injury and hepatorenal syndrome in cirrhosis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015, 30(2):236-243
- 9 Janicko M, Veseliny E, Senajova G, *et al.* Predictors of hepatorenal syndrome in alcoholic liver cirrhosis[J]. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2015, 159(4):661-665
- 10 Fabrizi F, Aghemo A, Messa P. Hepatorenal syndrome and novel advances in its management[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2013, 37(6):588-601
- 11 Zhu G, Wang M, Spike B, *et al.* Differential requirement of GRP94 and GRP78 in mammary gland development[J]. *Sci Rep*, 2014, 4(11):5390-5398
- 12 Wang SH, Lee AC, Chen IJ, *et al.* Structure-based optimization of GRP78-binding peptides that enhances efficacy in cancer imaging and therapy[J]. *Biomaterials*, 2016, 94:31-44

(收稿日期:2017-11-08)

(修回日期:2017-11-28)

(上接第 167 页)

参考文献

- 1 Borkhuu O, 乌云图,金山. 桥本氏病患者甲状腺组织受损机制[J]. 中华内分泌外科杂志, 2015, 9(1):73-75
- 2 初平,王琴,邵雱,等. 甲状腺过氧化物酶表达在桥本氏甲状腺炎诊断价值的 Meta 分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2014, 21(1):6-11
- 3 袁媛,唐晓磊,张林杰. 凝集素芯片法分析桥本氏甲状腺炎患者外周血 DC 细胞膜糖蛋白的表达[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(2):213-217
- 4 柳迎昭,彭辉勇,王丽,等. 桥本甲状腺炎患者外周血 IL-23 水平及意义[J]. 江苏大学学报:医学版, 2015(4):331-334
- 5 袁媛. Galectin-9~(low) DC 在桥本甲状腺炎中作用的研究[D]. 合肥:安徽医科大学, 2015
- 6 王赛,周国华. 树突状细胞发育与迁移机制的研究进展[J]. 临床消化病杂志, 2015, 20(6):389-391
- 7 蒋应明,万涛,陈国友,等. 树突状细胞来源的钙粘着相关蛋白新基因的克隆、表达及功能研究[C]. 中国免疫学会学术大会会议议程及论文摘要集, 2002, 4:331-334
- 8 潘开宇. 甘露聚糖结合凝集素(MBL)阻遏人巨细胞病毒感染 MD-DC 细胞的研究[D]. 宁波:浙江大学, 2011

- 9 赵冉,周凤真,冯传强,等. 中西医对桥本氏甲状腺炎的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘:连续型电子期刊, 2016, 16(8):91-92
- 10 马倩倩,于世鹏,MAQainqain,等. CD4⁺T 淋巴细胞与桥本氏甲状腺炎[J]. 济宁医学院学报, 2015, 11(6):434-437
- 11 张晨晨. 全国第十三次中西医结合影像学术研讨会全国中西医结合影像学研究进展学习班福建省第八次中西医结合影像学术研讨会论文汇编[C]. 中国中西医结合学会医学影像专业委员会, 2014:7
- 12 黄慧,马瑞婷,闫哲. 雌激素在桥本氏甲状腺炎中的作用[J]. 西部医学, 2015, 27(10):1441-1444
- 13 李大鹏. 碘过量通过诱导 Th17 细胞分化促进桥本氏甲状腺炎发病机制的研究[D]. 武汉:华中科技大学, 2013
- 14 王平,王建凤,刘善新,等. 桥本氏甲状腺炎发病机制及治疗方法研究进展[J]. 药学研究, 2015, 17(10):599-603
- 15 易露露. 系统性红斑狼疮合并桥本氏甲状腺炎的临床分析[D]. 昆明:昆明医科大学, 2016
- 16 幸世涛,吴燕霞. Galectin-3、CK19 在桥本氏甲状腺炎中的表达及意义[J]. 中国现代医生, 2012, 50(29):86-87

(收稿日期:2017-11-13)

(修回日期:2017-12-22)