

## • 临床检验研究论著 •

## 桥本甲状腺炎患者外周血 Th17 与 Th1 细胞及其相关因子表达水平研究

杨婷婷<sup>1</sup>, 朴敬爱<sup>1</sup>, 李志<sup>2</sup>, 徐维家<sup>2</sup>, 朴君<sup>1△</sup>

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

**摘要:** 目的 研究桥本甲状腺炎(HT)患者外周血中 Th17 与 Th1 细胞及其因子的表达情况及其意义。方法 流式细胞方法检测 42 例 HT 患者和 20 例健康对照者外周血单个核细胞(PBMC)中 Th17 和 Th1 细胞的比例, ELISA 检测血清中相关细胞因子 IL-17 及 IFN- $\gamma$  的含量。结果 HT 患者 PBMC 中 Th17 比例显著高于对照组( $P<0.01$ ), Th1 细胞也高于对照组( $P<0.05$ ); 此外, HT 患者血清中 IL-17 和 IFN- $\gamma$  的含量高于对照组, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 Th17 和 Th1 细胞可能在 HT 发病机制中发挥重要作用。

**关键词:** 甲状腺炎, 自身免疫性; T 淋巴细胞亚群; 血液

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.23.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)23-2830-02

### Expression of Th17 and Th1 cells in peripheral blood of patients with Hashimoto thyroiditis

Yang Tingting<sup>1</sup>, Piao Jing'ai<sup>1</sup>, Li Zhi<sup>2</sup>, Xu Weijia<sup>2</sup>, Piao Jun<sup>1△</sup>

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

2. Department of Clinical Laboratory, Dalian Municipal Central Hospital, Dalian, Liaoning 116033, China)

**Abstract: Objective** To determine the proportions of Th17 and Th1 in the peripheral blood and levels of interleukin(IL)-17 and interferon(IFN)- $\gamma$  in the plasma of patients with Hashimoto thyroiditis(HT). **Methods** Flow cytometric assay were used to analyse the percentages of Th17 and Th1 cells in 42 cases of HT patients and 20 normal controls. Concentrations of IL-17 and IFN- $\gamma$  in plasma were used by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). **Results** The percent of Th17 in patients with HT was significantly higher than that of normal controls( $P<0.01$ ) and Th1 was also higher( $P<0.05$ ); Concentrations of IL-17 and IFN- $\gamma$  in plasma were higher than controls( $P<0.05$ ). **Conclusion** Th17 and Th1 may play an important role in the pathogenesis of HT.

**Key words:** thyroiditis, autoimmune; T-lymphocyte subsets; blood

桥本甲状腺炎(HT)又称慢性淋巴细胞性甲状腺炎, 是器官 1 种特异性自身免疫性疾病, HT 是在某种遗传因素和环境因素作用下, 免疫系统对正常甲状腺组织成分的自身耐受状态被打破, 产生自身抗体及相关细胞因子, 血清中存在甲状腺特异性自身抗体。目前在多种自身免疫性疾病的研究中均发现有 Th1 和 Th17 及相关细胞因子的参与, 说明这两种 T 细胞亚群可能参与这类疾病的发生发展<sup>[1-3]</sup>。本研究通过检测 HT 患者外周血 Th17、Th1 细胞及相关因子表达水平, 探讨 Th17 与 Th1 细胞平衡动态变化及其在 HT 发病中的意义。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 患者组为大连市中心医院 2011 年 3 月至 2011 年 12 月门诊和住院 HT 患者共 42 例。HT 的诊断标准采用《中国甲状腺疾病诊治指南》<sup>[4]</sup>, 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。42 例患者中男 5 例, 女 37 例; 年龄 24~57 岁, 平均(39.5±12)岁。20 例健康体检者作为对照组(男 3 例, 女 12 例), 平均(41.2±10)岁。两组对象一般资料比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

**1.2 仪器与试剂** CD3-FITC, CD4-PC5 及固定破膜剂购自美国 Beckman 公司, PE-IL-17, PE-IFN- $\gamma$  购自美国 eBioscience 公司, 佛波酯(PMA)、离子霉素(Ionomycin)、莫能霉素(monensin)购自美国 Sigma 公司, IL-17 和 IFN- $\gamma$  的 ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司, 流式细胞仪, 酶标仪仪器为瑞典 SUNRISE 酶标仪。

## 1.3 方法

**1.3.1 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 PBMC 用于 Th17 和 Th1 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。

**1.3.2 细胞检测** 将分离出的 PBMC 加入 CD3-FITC 和 CD4-PC5, 混匀, 避光室温孵育 20 min, 用 RPMI-1640 培养液洗涤后, 加入 RPMI-1640 培养液(含 50 ng/mL PMA、1  $\mu$ g/mL 伊屋诺霉素、3  $\mu$ mol/L 莫能菌素)稀释细胞终浓度至  $1\times10^6$ /mL, 37℃ 培养箱中孵育 18 h。将培养后的细胞转移至流式管, PBS 洗两次, 固定破膜后进行胞内因子 IL-17 和 IFN- $\gamma$  的染色, 对照管加入同型对照抗体, 孵育 30 min。洗涤后, 应用流式细胞仪检测 Th17 和 Th1 细胞。对于 IL-17 和 IFN- $\gamma$  的测定要严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作。

**1.4 统计学处理** 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 HT 患者组与对照组外周血中 Th17、Th1 细胞亚群的表达情况比较** HT 患者组外周血中 Th17 细胞( $CD3^+CD4^+IL-17^+$ )占  $CD4^+$  T 细胞的比例高于对照组( $P<0.01$ ), 同时 HT 患者组 Th1( $CD3^+CD4^+IFN-\gamma^+$ )/ $CD4^+$  T 细胞的比例也高于对照组, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 1。

**2.2 HT 组与对照组血清中 IL-17 和 IFN- $\gamma$  含量的比较** HT 患者组血清中 IL-17 和 IFN- $\gamma$  的含量高于对照组, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 见表 2。

表 1 各组外周血中 Th17 及 Th1 细胞所占比例

组别	n	Th17/CD4 <sup>+</sup> T 细胞(%)	Th1/CD4 <sup>+</sup> T 细胞(%)
HT 组	42	1.72±0.71 <sup>**</sup>	17.95±7.67 <sup>*</sup>
对照组	20	0.54±0.29	15.69±5.38

<sup>\*\*</sup>: P<0.01, <sup>\*</sup>: P<0.05, 与对照组比较。

表 2 各组血清中 IL-17 和 IFN- $\gamma$  的含量

组别	n	IL-17(pg/mL)	IFN- $\gamma$ (pg/mL)
HT 组	42	9.47±2.25 <sup>*</sup>	28.78±4.24 <sup>*</sup>
对照组	20	7.08±1.54	10.34±2.25

<sup>\*</sup>: P<0.05, 与对照组比较。

### 3 讨 论

桥本甲状腺炎是 1 种常见的自身免疫病, 病程中从患者血清中可检出效价很高的抗甲状腺各种成分的自身抗体, 如甲状腺微粒体抗体, 甲状腺球蛋白抗体等, 关于其发病机制有众多学者曾做过研究, 被国内外认可的解释是 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群失衡与 HT 发病及病理损伤密切相关。曾经的 Th1/Th2 平衡理论被广泛研究, 该理论认为 HT 患者的 Th1/Th2 平衡被打破, 平衡向 Th1 方向偏离, 患者外周血及甲状腺组织内 Th1 细胞及其相关细胞因子较对照组均有所增加<sup>[5]</sup>。因为 Th1 类细胞因子 IFN- $\gamma$  可以增强甲状腺上皮细胞 HLA-II 类抗原的表达, 激活免疫细胞, 趋化大量的单核细胞和 T 淋巴细胞进入甲状腺内, 增强细胞毒性作用, 诱导 B 细胞分化、成熟, 促进自身抗体的产生触发自身免疫的发生<sup>[6]</sup>, 本实验在细胞及细胞因子水平检测了 Th1 细胞的表达, 在患者外周血中的确可以检测到较高的 IFN- $\gamma$  浓度, 说明 Th1 细胞作为致病因子在疾病的发病及病情发展中起到重要作用; 然而, Shi 等<sup>[7]</sup> 研究却得到不同的结论, 他们发现 HT 患者 Th1 细胞连同其特异性转录因子 T-bet 和 IFN- $\gamma$  的含量相比对照组大大降低了, 导致 Th1/Th17 的平衡被破坏进而诱导或者加重病情。分析以上所述不同结论的原因, 可能是患者的所处的病程阶段不同, 有人曾报道过在疾病初期与高峰期能检测出较高的 IFN- $\gamma$  和 IL-2 水平, 而随着疾病的缓解, 原先的紊乱环境可能发生不同的变化, 不同细胞因子的水平也随之改变。其次, Barin 等<sup>[8]</sup> 曾发现 IFN- $\gamma$  在自身免疫性甲状腺炎有免疫激活和免疫抑制双重活性, 哪一种活性在优势取决于 IFN- $\gamma$  的分泌时间和部位。再次, 自身免疫性甲状腺疾病(AITD)分类比较混乱, 同一患者可能患两种或者两种以上 AITD, 这些因素都可能造成细胞检测结果的不同。

此外, 随着对 T 细胞亚群的认识的不断深入, Th17 细胞作为独立效应的 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群被广泛研究, 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, 起到促进细胞释放炎症因子, 影响自身免疫性抗体产生, 与许多自身免疫病的发病都有重大关系。在 MS, PBC 等自身免疫疾病的患者的外周血及患病组织处均检测到大量的 Th17 细胞, 其主要通过释放 IL-17, IL-17F 和 IL-22 发挥致病效应, 并能诱导局部细胞合成化学因子和促炎因子<sup>[9]</sup>。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 相比对照组均高表达, 结果与已有的研究结果相符<sup>[10-12]</sup>, 说明 Th17 与 HT 的发病相关。HT 表现为甲状腺滤泡上皮细胞的破坏, 而 IL-17 是一种强大的前炎性因子, 通

过促进 IL-6, TNF- $\alpha$  等炎性介质和 T 细胞的增殖导致甲状腺组织炎症反应并促使更多的炎症因子释放, 导致自身抗体产生加重局部炎症反应<sup>[13]</sup>。众所周知 CD4<sup>+</sup> T 细胞不同亚群在分化成熟过程中和功能上往往存在相互抑制的现象, 这是免疫系统保持体内免疫平衡的机制之一。在 HT 的炎症反应过程中, Th17 和 Th1 可能在疾病的不同阶段发挥不同的作用, 协同诱导疾病的发生发展。

总之, Th1 及 Th17 在 HT 患者中异常分泌可能导致甲状腺自身免疫功能的紊乱, 进而诱导 HT 的发生发展, 但其具体的作用机制还有待于进一步的研究。

### 参考文献

- Jager A, Dardalhon V, Sobel RA, et al. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes[J]. J Immunol, 2009, 183(11): 7169-7177.
- Hu Y, Shen F, Crellin NK, et al. The IL-17 pathway as a major therapeutic target in autoimmune diseases[J]. Ann N Y Acad Sci, 2011, 1217(1): 60-76.
- Zhang L, Li YG, Li YH, et al. Increased frequencies of Th22 cells as well as Th17 cells in the peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis[J]. PLoS ONE, 2012, 7(4): e31000.
- 中华医学会内分泌学分会《中国甲状腺疾病诊治指南》编写组. 中国甲状腺疾病诊治指南—甲状腺功能亢进症[J]. 中华内科杂志, 2007, 46(10): 876-882.
- 李丽琴, 杨星, 冯珏. 自身免疫性甲状腺疾病与 Th1/Th2 细胞因子的关系[J]. 医学综述, 2006, 12(19): 1160-1163.
- 林夏鸿, 林玲, 李希圣. 自身免疫性甲状腺病 Th1/Th2 细胞因子平衡的偏离[J]. 医师进修杂志, 2005, 28(11): 38-39.
- 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.
- Barin JG, Afanasyeva M, Talor MV, et al. Thyroid-specific expression of IFN-gamma limits experimental autoimmune thyroiditis by suppressing lymphocyte activation in cervical lymph nodes[J]. J Immunol, 2003, 170(11): 5523-5529.
- Lovett-Racke AE, Yang Y, Racke MK. Th1 versus Th17: Are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1812(2): 246-251.
- 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.
- 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, 2012, 6(8): 88-92.
- 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): 953-962.
- 余玲, 吴汉妮, 屈新才, 等. IL-17 在桥本甲状腺炎甲状腺组织中的表达研究[J]. 中国免疫学杂志, 2009, 25(2): 185-187.

(收稿日期: 2012-08-12)