

# 调节性 T 细胞和 TGF- $\beta_1$ 在自身免疫性甲状腺疾病中的作用

郑领涛<sup>1</sup>, 于世鹏<sup>2\*</sup>, 王娜<sup>2</sup>, 伊鹏飞<sup>2</sup>

(1 天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2 济宁医学院附属医院)

**摘要:**目的 观察初发自身免疫性甲状腺疾病(AITD)患者外周血中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞(Treg)数量和功能变化及转化生长因子  $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )水平,探讨其在 AITD 发病机制中的作用。方法 收集初发 Graves 病(GD)组 30 例、初发桥本甲状腺炎(HT)组 20 例、健康对照组 20 例,用流式细胞仪分析各组外周血 CD4<sup>+</sup>T 细胞及 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 占 CD4<sup>+</sup>的百分比,RT-PCR 法检测各组外周血 PBMC 中 FOXP3 mRNA 表达量,ELISA 法检测血清 TGF- $\beta_1$ 含量。结果 初发 GD、初发 HT 患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 占 CD4<sup>+</sup>T 细胞的比率、FOXP3 mRNA 表达水平均明显低于对照组( $P$ 均 < 0.05),初发 GD、初发 HT 患者外周血清中 TGF- $\beta_1$ 水平较对照组均显著升高( $P$ 均 < 0.05)。结论 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg、FOXP3 及 TGF- $\beta_1$ 可能参与了 AITD 的发生、发展过程,Treg 数量减少或 FOXP3 表达不足可反馈性引起血清 TGF- $\beta_1$ 水平升高。

**关键词:** 甲状腺疾病,自身免疫性;T 淋巴细胞,调节性;FOXP3;转化生长因子  $\beta_1$

**中图分类号:** R581 **文献标志码:** B **文章编号:** 1002-266X(2012)01-0081-02

大量研究证实,调节性 T 细胞(Treg)和 TGF- $\beta_1$ 在稳定机体的免疫平衡、维持机体免疫耐受中起重要作用,两者在数量上或者功能上的缺陷均可导致自身免疫病的发生。然而目前对 Treg 和 TGF- $\beta_1$ 在自身免疫性甲状腺疾病(AITD)发病中的作用认识不足,两者在 AITD 中的相互关系缺乏研究。本文对此进行了探讨。

## 1 资料与方法

**1.1 临床资料** 2011 年 2 月~2011 年 7 月在济宁医学院附属医院就诊的初发 Graves 病(GD)、桥本甲状腺炎(HT)患者 50 例,均符合《内科学》(7 版)中的诊断标准。排除肝肾疾病、恶性肿瘤及其他传染性疾病,未使用免疫抑制剂。初发 GD 组 30 例,男 10 例、女 20 例,平均年龄 38 岁。初发 HT 组 20 例,男 6 例、女 14 例,平均年龄 39 岁。健康对照组 20 例来自济宁医学院附属医院同期健康查体人群,男 7 例、女 13 例,平均年龄 35 岁。

## 1.2 方法

**1.2.1 试剂与仪器** 人淋巴细胞分离液购自上海朗顿生物科技有限公司,抗人 CD4-PE、CD25-APC 单克隆抗体均购自美国 eBioscience 公司,TGF- $\beta_1$ 试剂盒购自美国 R&D 公司,Trizol(Invitrogen)购自 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒(TaKaRa)、SYBRgreen-Mixer(TaKaRa)购自 Fermentas(MBI),核酸定量仪

(Pharmacia),RT-PCR 仪(罗氏公司)。

## 1.2.2 CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 数量检测

采集 EDTA 抗凝外周静脉血 2 mL,检测时先在流式试管中加入 100  $\mu$ L 抗凝血,再加入 CD4-PE、CD25-APC 各 5  $\mu$ L,混匀,室温避光反应 30 min。加入 3 mL 溶血素混匀,室温避光反应 10 min,离心半径 15 cm,1 500 r/min,离心 5 min。加冷 PBS 洗涤 1 次,重新悬浮于 1 mL PBS 中,重新悬浮细胞后上流式细胞仪检测,数据采用 Cell Quest 软件进行分析。

**1.2.3 FOXP3 mRNA 表达水平测定** 按说明书进行,用相对吸光度单位表示 mRNA 表达量,相对吸光度单位 = FOXP3 吸光度单位/ $\beta$ -actin 吸光度单位  $\times 100\%$ 。

**1.2.4 TGF- $\beta_1$  含量检测** ELISA 法检测血清 TGF- $\beta_1$ 含量,按试剂盒说明书进行。

**1.2.5 统计学方法** 采用 SPSS13.0 软件,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异用两样本均数的  $t$  检验进行比较,多组间比较采用单因素方差分析。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 CD4<sup>+</sup>T 细胞和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 的数量变化** 三组 CD4<sup>+</sup>T 细胞数量无统计学差异( $P > 0.05$ )。GD、HT 组患者外周血中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 占 CD4<sup>+</sup>T 细胞的百分比均明显低于对照组( $P$ 均 < 0.05)。见表 1。

**2.2 各组 FOXP3 mRNA、TGF- $\beta_1$  水平比较** 由于

\* 通讯作者

内参照管家基因在细胞中表达相对恒定,目的基因与管家基因的比值越低,说明目的基因的表达量越低。GD、HT 组患者外周血 FOXP3 mRNA 表达水平与对照组比较均显著降低( $P$  均  $< 0.05$ )。GD、HT 组外周血血清中 TGF- $\beta_1$  水平与对照组比较均明显升高( $P$  均  $< 0.05$ )。见表 2。

表 1 各组 CD4<sup>+</sup> 和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 数量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	CD4 <sup>+</sup> T 细胞	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Treg/CD4 <sup>+</sup>
GD 组	30	40.74 ± 8.08	15.94 ± 5.02*
HT 组	20	35.59 ± 7.93	14.42 ± 3.06*
对照组	20	38.12 ± 7.29	23.23 ± 4.72

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$

表 2 各组 FOXP3 mRNA 和 TGF- $\beta_1$  比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	FOXP3 mRNA(%)	TGF- $\beta_1$ (ng/L)
GD 组	30	0.17 ± 0.05*	138.71 ± 27.21*
HT 组	20	0.14 ± 0.05*	112.47 ± 22.16*
对照组	20	0.27 ± 0.06	88.71 ± 14.69

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$

### 3 讨论

Treg 的缺乏可引起多种自身免疫性疾病。已有大量动物实验证实,Treg 在自身免疫性疾病的发生中具有重要意义。Saitoh 等<sup>[1]</sup>研究表明,在去除 CB57BL/6 鼠体内的 Treg 后,该鼠对 TSH 受体腺病毒诱导的 GD 抵抗作用消失,从而诱发 GD。小鼠实验性自身免疫性甲状腺炎是人类 HT 的动物模型,研究发现将 Treg 与病理性的 CD25<sup>-</sup>T 细胞共同注射正常小鼠,可抑制病理性 T 细胞诱导的 HT 的发生<sup>[2]</sup>。

FOXP3 是叉状头/翅膀状螺旋转录因子家庭成员之一,主要表达于机体的 Treg 上,是这类细胞的特征性标志,是 Treg 的调控基因,在 Treg 发育过程和维持阶段都是必不可少的<sup>[3-4]</sup>。有学者发现,GD 患者 Treg 数量无明显改变,而 FOXP3 表达减少,认为 GD 的发病机制主要是由于 Treg 功能缺陷所致<sup>[5]</sup>。因此,在研究自身免疫病发病机制时既要检测 Treg 数量的变化,同时也要观察 FOXP3 表达量。

TGF- $\beta_1$  对 Treg 功能状态的维持有重要意义。Marie 等利用 TGF- $\beta_1$  缺陷小鼠模型证实 TGF- $\beta_1$  在维持外周 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 表达 FOXP3、发挥免疫抑制功能等方面具有重要作用<sup>[6]</sup>。此外有研究表明,人外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Treg 在高浓度 TGF- $\beta_1$  诱导下可转化为 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg,并表达 FOXP3,发挥与胸腺中自然发育的 Treg 相似的功能,FOXP3 的蛋白产物被证实存在于 Treg 中,并能使原始 T 细胞转变为 Treg<sup>[7]</sup>。

本研究结果提示,初发 GD 和 HT 患者中外周血

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 的数量和 FOXP3 基因表达水平较正常组相比均明显降低,导致 Treg 对效应性 T 细胞抑制功能不足,持续激活患者体内的自身反应性 T 细胞,可能是 AITD 发病的重要原因之一。此外本研究结果还表明无论是 HT 组还是 GD 组,外周血清中 TGF- $\beta_1$  的水平均高于对照组。推测在 AITD 患者中由于 Treg 数目减少和(或) FOXP3 表达量减少,从而引起外周血 TGF- $\beta_1$  反馈性升高,诱导 FOXP3 表达于 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 细胞上并进一步转化为 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg,试图抑制或减轻自身免疫反应。因此,细胞因子 TGF- $\beta_1$  水平升高从另一方面也反映了 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 数目或功能的降低。GD 和 HT 两种疾病中都存在着 Treg 数量功能的减低,但却表现为两者截然不同的结果。研究认为 GD 主要为 Th2 细胞引起的免疫反应,伴随 TRAb 的产生和腺体的增生,最终导致甲状腺功能亢进;而 HT 主要为 Th1 细胞介导的免疫反应,伴随 T 淋巴细胞的浸润、甲状腺细胞的进行性破坏及 TGAb 和 TPOAb 抗体的出现,最终导致甲状腺功能减退<sup>[8]</sup>。Treg 的缺陷如何导致机体 Th1 和 Th2 亚群分化的异常仍需进一步研究。

### 参考文献:

- [1] Saitoh O, Nagayama Y. Regulation of Graves' s hyperthyroidism with naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>regulatory T cell in a mouse model [J]. Endocrinology, 2006, 147(5): 2417-2422.
- [2] 王胜军,许化溪,邵启祥,等. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞抑制小鼠自身免疫性甲状腺炎的发生[J]. 中国免疫学杂志, 2005, 21(2): 102-104.
- [3] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>regulatory T cells[J]. Nat Immunol, 2003, 4(4): 330-336.
- [4] Khattry R, Cox T, Yasayko SA, et al. An essential role for scurf in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>regulatory T cells[J]. Nat Immunol, 2003, 4(4): 337-342.
- [5] Wang H, Zhao S, Tang X, et al. Changes of regulatory T cells in Graves' disease[J]. Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2006, 26(5): 545-547.
- [6] Marie JC, Letterio J, Gavin M, et al. TGF- $\beta_1$  maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>regulatory T cells [J]. J Exp Med, 2005, 201(7): 1061-1067.
- [7] Huan J, Culbertson N, Spencer L, et al. Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients[J]. J Neurosci Res, 2005, 81(1): 45-52.
- [8] Chazenbalk GD, Pichurin P, Chen CR, et al. Thyroid-stimulating autoantibodies in Graves disease preferentially recognize the free A subunit, not the thyrotropin holoreceptor[J]. J Clin Invest, 2002, 110(2): 209-217.

(收稿日期: 2011-11-12)