论著

文章编号:1000-5404(2006)17-1804-03

细胞间黏附分子-1在桥本甲状腺炎中的表达及其影响因素

曾晓华,刘长安,王继见,印国兵 (重庆医科大学附属第二医院普通外科,重庆 400010)

提 要:目的 检测桥本甲状腺炎患者甲状腺组织中细胞间黏附分子-1(CD54)的表达和离体的甲状腺滤泡上皮细胞在不同刺激因子作用下CD54表达水平的变化。**方法** 对41例桥本甲状腺炎组织采用免疫组化S-P法染色,图像分析系统对染色强度进行定量分析测定CD54在甲状腺组织中阳性表达率和表达面积。经过分离培养的甲状腺细胞,在不同浓度IL-1β和NaI干预下,采用流式细胞仪检测其CD54表达的变化。**结果** 桥本甲状腺炎CD54阳性表达率明显高于正常对照组($P<0.05$);其阳性面积也明显高于正常对照组($P<0.05$)。离体的桥本甲状腺炎甲状腺细胞CD54表达水平虽然较正常对照高,但并无显著差异;桥本甲状腺炎细胞在不同干预因素下CD54表达水平都明显高于正常对照组($P<0.05$);在IL-1β干预下,发现高水平的IL-1β可以使正常甲状腺细胞CD54的表达明显升高,但桥本甲状腺炎甲状腺细胞对IL-1β的敏感性更强,低剂量的IL-1β可以显著增加CD54的表达,加入NaI后CD54表达明显增加。**结论** CD54在桥本甲状腺炎中的升高可能是一种继发反应,与IL-1β和NaI有关,在桥本甲状腺炎的发病机制中起重要作用。

关键词:胞间黏附分子-1;桥本甲状腺炎

中图法分类号:R341;R392.11;R581.402 **文献标识码**:A

Expression and influencing factors of CD54 in Hashimotos thyroiditis

ZENG Xiao-hua, LIU Chang-an, WANG Ji-jian, YIN Guo-bing (Department of General Surgery, The Second Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To dectect the expression of CD54 in thyroid tissue of Hashimotos thyroiditis patients, and expression changes of CD54 on thyroid cells interferred by different agents. **Methods** The thyroid tissues from 41 cases of Hashimotos thyroiditis were collected and 26 normal thyroid tissues served as normal controls. All thyroid tissues were identified by pathological examination. The positive expression rate and area of CD54 were investigated by immunohistochemical method and quantitative analysis of image analysis system in all thyroid tissues. The expression changes of CD54 in the isolated thyroid cells interferred by 100, 500, 1 000 pg/ml IL-1β or 10 mg/L NaI or 1 000 pg/ml IL-1β and 10 mg/L NaI for 48 h were detected by flow cytometry. **Results** The positive expression rate of CD54 in Hashimotos thyroiditis tissues was much more than that of control tissues ($P<0.05$), and positive areas incresesd as well ($P<0.05$). The expression of CD54 in the isolated thyroid cells of Hashimotos thyroiditis tissues was more than that of control tissues, but without significant difference. Being interferred by different agents, the isolated cells from Hashimotos thyroiditis tissues expressed more CD54 than that from control tissues ($P<0.05$). IL-1β of high concentration could stimulate higher CD54 expression in cells from control tissues, and IL-1β even of low concentration had a more stronger effect on the cells from Hashimotos thyroiditis tissues. The combination of NaI and IL-1β increased CD54 expression more significantly. **Conclusion** It was a secondary response that CD54 expression increases in Hashimotos thyroiditis, and may be related to IL-1β and NaI. CD54 plays an important role in pathogeny of Hashimotos thyroiditis.

Key words: intercellular adhesion molecule; Hashimotos thyroiditis

细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule,ICAM-1)即CD54,为免疫球蛋白超家族成员之一,它的主要功能是与其天然配基LFA-1结合介导不同细胞与细胞的黏附,正常情况下CD54很少表达或不表达,但当受到炎症因子和内毒素刺激后可表达于多种细胞表面,近年研究表明它在各种自身免疫性疾病特别是自身免疫性甲状腺疾病(autoimmunity thyroid disease,AITD)中起重要作用[1]。桥本甲状腺炎是以

作者简介:曾晓华(1970-),男,四川省广安市人,硕士,副主任医师,主要从事甲状腺、胰腺和乳腺的基础和临床方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)63784162,E-mail:qq-zxh@126.com

收稿日期:2005-09-10;修回日期:2005-11-10

淋巴细胞浸润和甲状腺自身抗体的出现为特征，CD54 可能在其发病中起重要作用。本研究分析了桥本甲状腺炎（Hashimoto thyroiditis，HT）患者和正常人甲状腺组织中 CD54 表达的差异，以及离体情况下甲状腺滤泡上皮细胞在不同刺激因子作用下 CD54 表达水平的变化。

1　材料与方法

1.1　材料

收集重庆医科大学附属第二医院、附属第一医院和壁山县人民医院普外科手术标本，其中桥本甲状腺炎 41 例（女性 30 例，男性 11 例）作为实验组，正常对照组 26 例（女性 18 例，男性 8 例）为甲状腺腺瘤周围正常的甲状腺组织和创伤死亡的正常人甲状腺组织，均经病理切片证实诊断，部分组织石蜡固定后用于免疫组化检测，部分组织用于细胞培养和体外干预。

1.2　方法

1.2.1　甲状腺组织 CD54 表达情况检测　　采用免疫组化 S-P 法。石蜡切片先脱蜡、复水，80% 丙酮 4 ℃固定 10 min，浸于 3% 过氧化氢甲醇 10 min，以消除内源性过氧化物酶的活性。滴加 3% 非免疫血清，室温孵育 15 ~ 20 min。加鼠抗人 CD54 单抗工作液，4℃置湿盒过夜，PBS 充分冲洗；加二抗，室温孵育 30 min，PBS 冲洗，加辣根酶标记链霉卵白素工作液，室温孵育 10 ~ 15 min，PBS 冲洗；DAB 显色 5 ~ 15 min，显微镜观察显色，自来水充分冲洗，复染、脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。用 TD2000 真彩色病理细胞图像分析系统，在 400 倍显微镜下随机选取 10 个视野，对免疫组织化学染色阳性反应物进行定量检测，测定阳性反应细胞数和面积，并计算出 CD54 的阳性百分率。

1.2.2　IL-1β 和 NaI 对离体甲状腺细胞表达 CD54 的影响　　常规分离甲状腺细胞，具体分离和培养步骤参见刘东方等[2]。细胞传至 3 代，用浓度为 100、500、1 000 pg/ml 的 IL-1β 和 10 mg/L 的 NaI 以及 1 000 pg/ml IL-1β 和 10 mg/L NaI 联合干预对数生长期细胞 48 h，流式细胞仪检测 CD54 表达的变化。

免疫组化相关试剂和鼠抗人 CD54 单抗由北方同正公司提供，FITC 标记鼠抗人 CD54 单抗及同型对照由美国 Ancell 公司提供。

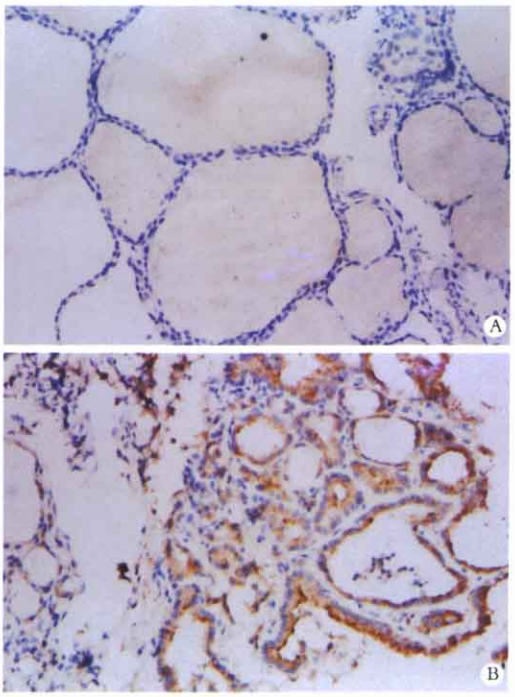
1.3　统计学方法

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件行 t 检验。

2　结　果

2.1　桥本甲状腺炎和正常甲状腺组织 CD54 表达水平比较

桥本甲状腺炎 CD54 的阳性表达率为（39.38 ± 13.82）%，明显高于正常对照组的（4.50 ± 1.46）%，（$P < 0.05$）；其阳性面积（405.68 ± 203.40）也明显高于正常对照组的（68.25 ± 18.94），（$P < 0.05$），见图 1。



A：正常对照组；B：桥本甲状腺炎

图 1　CD54 在甲状腺组织中的表达　（S-P × 200）

2.2　IL-1β 和 NaI 对正常和桥本甲状腺炎细胞 CD54 表达的影响

离体的桥本甲状腺炎甲状腺细胞 CD54 表达水平虽然较正常对照组高，但并无显著差异；桥本甲状腺炎细胞在 100、500、1 000 pg/ml 的 IL-1β 和 10 mg/L 的 NaI 以及 1 000 pg/ml IL-1β 和 10 mg/L NaI 联合处理因素下，CD54 表达水平都明显高于正常对照组，（$P < 0.05$）；正常对照组在 1 000 pg/ml IL-1β 时 CD54 的表达明显高于 IL-1β 在 100、500 pg/ml 时正常对照组 CD54 的表达（$P < 0.05$）；而正常对照组使用 NaI 处理对 CD54 的表达没有明显作用，但若同时用 IL-1β 和 NaI 处理，CD54 的表达显著增加。桥本甲状腺炎细胞组用 IL-1β 处理后，随浓度增加 CD54 的表达有增高的趋势，与未处理组相比差异有统计学意义，但不同浓度之间差异无统计学意义，加入 NaI 后桥本甲状腺炎细胞组的 CD54 表达明显增加，以 NaI 联合 IL-1β 处理组表达水平最高，见表 1。

表 1　IL-1β 和 NaI 对正常和桥本甲状腺炎细胞 CD54 表达的影响[（$\bar{x} \pm s$）%]

组别	0	100 pg/ml IL-1β	500 pg/ml IL-1β	1 000 pg/ml IL-1β	10 mg/L NaI	10 mg/L NaI + 1 000 pg/ml IL-1β
正常对照组	10.33 ± 1.17	9.98 ± 1.00	11.80 ± 0.90	24.37 ± 2.42^{abc}	10.08 ± 1.37^{d}	37.93 ± 2.88^{abce}
桥本甲状腺炎组	14.85 ± 1.32	28.77 ± 3.38^{a}	36.05 ± 4.20^{a}	39.78 ± 4.89^{a}	53.22 ± 6.56^{acd}	70.83 ± 9.79^{abcde}

a：$P < 0.05$，与 0 比较；b：$P < 0.05$，与 100 pg/ml IL-1β 比较；c：$P < 0.05$，与 500 pg/ml IL-1β 比较；d：$P < 0.05$，与 1 000 pg/ml IL-1β 比较；e：$P < 0.05$，与 10 mg/L NaI 比较

3 讨论

在循环的T细胞移出及定位到自身免疫炎症部位并与内皮细胞、靶细胞黏附，辅助T细胞与B细胞及抗原呈递细胞的相互作用等免疫过程中，CD54(ICAM-1)/LFA-1黏附系统起着重要作用。本研究表明，在正常的甲状腺组织中几乎没有发现甲状腺上皮细胞(thyroid endothelial cell，TEC)表达CD54，在桥本甲状腺炎患者甲状腺组织中发现较高水平的CD54表达，这与其他研究者的发现一样[1]，这表明CD54可能在桥本甲状腺炎的发病机制中起一定作用，但到目前为止，人们并没有进一步探讨影响CD54等免疫蛋白升高的因素，本研究对此进行了进一步的离体研究。

本研究表明，经过培养的TEC CD54表达较甲状腺组织好，在培养的正常TEC中也有一定表达，有的研究者认为这种现象或许是由于培养介质和培养器皿刺激了甲状腺细胞的CD54表达以便增加细胞与培养器皿的黏附[3]。研究也进一步证实了离体的桥本甲状腺炎甲状腺细胞CD54表达水平虽然较正常对照高，但并无显著差异，这可以理解为离体细胞脱离了机体的某些因子后表达也下降，也就是说CD54在桥本甲状腺炎中的升高可能是一种继发反应。那么CD54的升高究竟与哪些因素相关呢？IL-1β主要由活化的单核/巨噬细胞产生，树突状细胞、内皮细胞等亦可以表达。它是T细胞激活的协同刺激因子，可促使T细胞产生IL-2，并可直接促进B细胞的增生和分化，因而在免疫反应中起重要作用。近年有学者发现IL-1β在桥本甲状腺炎甲状腺局部的水平显著高于正常对照[4,5]，这提示IL-1β有可能在AITD的发病中起重要作用，本研究利用IL-1β处理正常和桥本甲状腺炎甲状腺细胞，发现高水平的IL-1β可以使正常甲状腺细胞CD54的表达明显升高，但桥本甲状腺炎细胞似乎对IL-1β的敏感性更强，低剂量的IL-1β便可以显著增加桥本甲状腺炎甲状腺细胞CD54的表达，但其原因并不清楚，可能与遗传易感性有关。

有关碘在桥本甲状腺炎中的作用也是近年研究的热点，流行病学调查表明食盐加碘后AITD的发病率明显增加，但相关的原因不清楚[6,7]，本研究表明桥本甲状腺炎甲状腺细胞对碘致CD54表达的敏感性增加，单用NaI干预便可以显著增加CD54的表达，而正常对照单用碘干预没有作用。Bonita等[3]的在体研究也表明用高碘饲养的甲状腺炎易感NOD-H2h4小鼠除了甲状腺内淋巴细胞浸润，TEC还有高水平的CD54表达，他们首次证实对桥本甲状腺炎易感的NOD小鼠在用碘饲养发展成甲状腺炎以前甲状腺细胞就有高水平的CD54表达，这似乎表示CD54的异常表达在桥本甲状腺炎的免疫反应中具有启动作用，同时可以部分解释食盐加碘后桥本甲状腺炎等AITD发病率为什么会明显增加。但Arreaza等[8]将AITD患者的甲状腺移植到Nude鼠，原来高表达的CD54在甲状腺移植8周后明显下降，这说明离开了自身免疫环境CD54就明显下降了，CD54的表达也可能是一种继发反应。无论CD54的表达在桥本甲状腺炎发病中是否为启动自身免疫的因素，但可以肯定其在桥本甲状腺炎的免疫学发病机制中具有重要的地位。

参考文献：

[1] PESCE G, FIORINO N, RICCIO A M, *et al*. Different intrathyroid expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease: analysis at mRNA level and association with B7.1 costimulatory molecule[J]. J Endocrinol Invest, 2002, 25(3): 289-295.

[2] 刘东方，邓华聪，许改平，等. 人甲状腺原代细胞的长期培养[J]. 中华内分泌代谢杂志，2005，21(2)：181-183.

[3] BONITA R E, ROSE N R, RASOOLY L, *et al*. Adhesion molecules as susceptibility factors in spontaneous autoimmune thyroiditis in the NOD-H2h4 mouse[J]. Exp Mol Pathol, 2002, 73(3): 155-163.

[4] PAOLIERI F, SALMASO C, BATTIFORA M, *et al*. Possible pathogenetic relevance of interleukin-1 beta in "destructive" organ-specific autoimmune disease (Hashimoto's thyroiditis)[J]. Ann N Y Acad Sci, 1999, 876: 221-228.

[5] SERA N, KAWAKAMI A, NAKASHIMA T, *et al*. Fas/FasL mediated apoptosis of thyrocytes in Graves' disease[J]. Clin Exp Immunol, 2001, 124(2): 197-207.

[6] LIND P, KUMNIG G, HEINISCH M, *et al*. Iodine supplementation in Austria: methods and results[J]. Thyroid, 2002, 12(10): 903-907.

[7] 刘东方，邓华聪，许汉平，等. 正常人和自身免疫性甲状腺疾病患者甲状腺细胞对碘致抗原表达的不同敏感性[J]. 第三军医大学学报，2005，27(22)：2272-2275.

[8] ARREAZA G, YOSHIKAWA N, MUKUTA T, *et al*. Expression of intercellular adhesion molecule-1 on human thyroid cells from patients with autoimmune thyroid disease: study of thyroid xenografts in nude and severe combined immunodeficient mice and treatment with FK-506[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1995, 80(12): 3724-3731.

(编辑 栾 嘉)