基础研究 文章编号:0253-3626(2009)12-1640-03

表达人 Fas 配体的质粒治疗 Graves 病模型小鼠

随 华[1],刘 纯[1],张 徽[2],李秀娟[1],何 云[1],张 琳[1],詹升华[2]
(1. 重庆医科大学附属第一医院内分泌科;2. 重庆医科大学基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察表达人 Fas 配体的质粒治疗 Graves 病模型小鼠的效果。方法:小鼠分为 3 组。对照组(10 只)用空质粒 pcDNA3.1(+)活化的脾细胞免疫后,以空质粒治疗;模型组和治疗组(各 19 只)均以人 TSH 受体(Human thyrotropin receptor, hTSHR)活化的脾细胞进行免疫,前者不予治疗,后者甲状腺注射表达 hFasL 的质粒 pcDNA3.1(+)/hFasL。结果:模型组 47.4%的甲状腺细胞出现增生、肥大,以及甲状腺滤泡腔胶质减少,与对照组相比,TT4、TRAb 升高、TSH 降低($P<0.05$)。治疗组仅 15.8%有类似甲状腺功能亢进改变,电镜下见细胞核异染色质边集,TT4、TSH、TRAb 回复至对照组水平。结论:表达人 Fas 配体的质粒治疗 Graves 病模型小鼠取得一定效果。

【关键词】Graves 病;基因治疗;Fas 配体
【中国图书分类法分类号】R581.11 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-12-16

Therapeutic application of plasmid DNA coding for human Fas ligand in animal model of Graves disease

SUI Hua, et al
(*Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe therapeutic effects of plasmid pcDNA3.1/hFasL on mice with Graves' disease. *Methods*: Three groups were set in this study. Animals in the control group (10 mice) were immunized with splenocytes sensitized by blank plasmid pcDNA3.1(+), and then treated with pcDNA3.1(+). Animals in the model group (19 mice) and treated group (19 mice) were all immunized with splenocytes sensitized by hTSHR, then the latter were injected with pcDNA3.1(+)/hFasL. *Results*: 47.4% of thyroid follicular epithelia in the model group displayed hypertrophy and hyperplasia, and the follicles cavity contained little colloid. Compared with the control group, elevated TT4 and TRAb and reduced TSH levels($P<0.05$) were also observed in the model group. In the treated group, only 15.8% of thyroid follicular epithelia showed pathologic changes of GD with heterochromatin margination. There was no statistical significance in the levels of TT4, TRAb, and TSH between the treated group and the control group. *Conclusion*: Gene therapy by administration of plasmid pcDNA3.1/hFasL has made a curative therapeutic effects on Graves' disease in animal model.

【Key words】Graves disease; Gene therapy; Fas ligand

Graves 病是一种常见的自身免疫性甲状腺功能亢进疾病,临床特征有甲状腺弥漫性肿大、突眼等。目前 Graves 病的病因不清,其发病机制与自身抗原的出现、免疫调节异常、细胞凋亡异常、遗传因素及环境等多种因素有关,临床治疗包括药物、手术、同位素碘放射治疗和甲状腺血管栓塞等方法。由于每一种治疗方法均有其局限性,从而促使人们去寻找新的治疗手段。

基因治疗是指通过在特定的靶细胞中表达本来不(或较少)表达的基因,达到治疗疾病的目的。Sera N 等观察到 Fas 配体(Fas Ligand)基因在 Graves 病甲状腺细胞中表达减少[1]。本实验活体直接转移表达人 Fas 配体的质粒,观察其对 GD 模型小鼠模型的影响,旨在探求一种治疗 Graves 病的新途径。

作者介绍:随 华(1976-),男,主治医师,硕士,研究方向:自身免疫性甲状腺疾病的治疗。
通讯作者:刘 纯,女,教授,E-mail:liuchun200157@sina.com。
基金项目:重庆市卫生局重点科研基金资助项目(编号:01-1-104);重庆医科大学附属第一医院回国人员院内课题启动基金(编号:2005-6)。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 清洁级雌性 BALB/c 小鼠,6~8 周龄,分 2 批购自重庆医科大学实验动物中心。

1.1.2 菌株 分别含质粒 pcDNA3.1、重组质粒 pcDNA3.1/hTSHR、重组质粒 pcDNA3.1/hFasL 的 3 种 *E.coli DH*5a 菌株。本课题组已构建[2,3]，-70℃保存。

1.1.3 试剂 质粒抽提试剂盒（德国 QIAGEN 公司）；小鼠单个核细胞分离液（北京北方同正生物技术发展公司）；小鼠 TSH 酶联免疫试剂盒（美国 BPB 生物技术有限公司）；TT4 放射免疫试剂盒（中国原子能科学研究院同位素研究所）；TRAb 放射免疫试剂盒（美国 Diasorin 公司）。

1.2 方法

1.2.1 质粒的抽提及定量 大量提取 pcDNA3.1(+)/hFasL、pcDNA3.1(+)/hTSHR 及 pcDNA3.1(+)。紫外分光光度法和 Quantity One 分析软件检测质粒溶液的纯度和浓度（附电泳结果，图 1）。

1.2.2 Graves 病模型小鼠及其对照的建立 参照本课题组先前建立 Graves 病模型小鼠以及甲状腺相关眼病模型小鼠方法[4,5]。分别以 pcDNA3.1(+)/hTSHR 及 pcDNA3.1(+)进行免疫，建立 Graves 病模型小鼠及其对照。

1.2.3 Graves 病模型小鼠及其对照的基因治疗 将建成模型的小鼠随机分为治疗组和模型组。小鼠麻醉后，手术钝性分离甲状腺包膜，暴露甲状腺，将 100 μg 质粒滴在甲状腺，1 min 后关闭创面。对照组和治疗组分别注射 pcDNA3.1(+)和 pcDNA3.1(+)/hFasL；模型组不予治疗。

1.2.4 观察基因治疗效果 甲状腺注射质粒 2 周后留取甲状腺及血清标本。甲状腺行光镜和电镜组织观察；TT4（μg/L）以放射免疫分析法检测；TRAb（U/L）以放射受体分析法检测；TSH 以 ELISA 法检测，结果用 A(450)值表示。

1.3 统计学分析

实验数据用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。应用 SPSS14.0 统计分析软件，作方差分析以及针对两两比较的 Bonferroni 法检验，$P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 甲状腺组织学观察结果

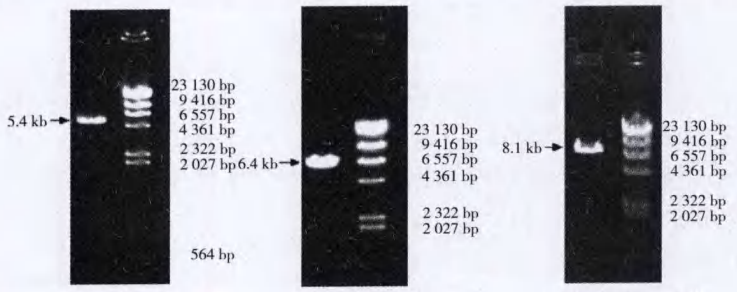
（1）模型组 19 只小鼠中有 9 只（47.4%）出现甲状腺滤泡增生，滤泡上皮细胞增多、变大呈立方形，滤泡腔内胶质含量相对较少；电镜显示甲状腺上皮细胞核呈立方形；内质网丰富，层状排列，伴明显扩张；线粒体数量增多、体积扩大，形成巨大线粒体或者畸形线粒体。（2）治疗组 19 只小鼠中仅有 3 只出现类似的甲状腺功能亢进的病理改变；电镜下见小鼠甲状腺上皮细胞核呈扁平状或者萎缩、畸形，内质网、线粒体数量相对较少，细胞浆大量胶质样的被包裹基质蓄积，细胞核内膜内侧有异染色质边集。（3）对照组小鼠甲状腺均无功能亢进病理改变。

2.2 血清学观察结果

模型组较对照组血清 TT4、TRAb 升高，TSH 降低（$P<0.05$），而治疗组上述变化与模型组相比显著减轻（$P<0.05$）（表 1）。

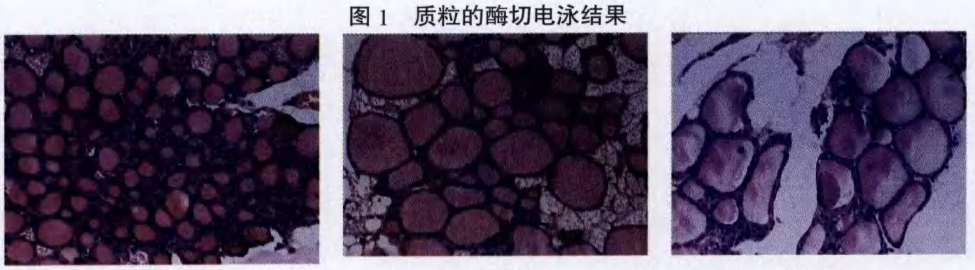
3 讨 论

TSH 受体在 Graves 病发病机制中具有的重要作用，转导 TSH 受体基因建立起的 GD 小鼠模型更符合人类特征。沿用本课题组先前建立 Graves 病模型小鼠以及甲状腺相关眼病模型小鼠方法[4,5]，我们再次建立起符合 Ludgate M 提出的 Graves 病动物模型[6]。与对照组相比较，模型组小鼠甲状腺激素水平升高、TSH 水平降低，促甲状腺素受体抗体阳性，并



1. pcDNA3.1（经 *Xba* Ⅰ酶切电泳）；2. pcDNA3.1/hFasL（经 *Hind*Ⅲ酶切电泳）；3. pcDNA3.1/hTSHR（经 *BamH* Ⅰ酶切电泳）

图 1 质粒的酶切电泳结果



模型组 治疗组 对照组

图 2 小鼠甲状腺组织的光镜观察（×200）



A.模型组　　B. 治疗组　　C.对照组

图 3　小鼠甲状腺组织的电镜观察(×8 000)

表 1　各组小鼠血清 TT4、TSH、TRAb 水平($\bar{x}\pm s$)

组别	例数 (n)	TT4 (μg/L)	TSH(A450)	TRAb (U/L)
模型组	19	58.3 ± 18.6▲	1.0 ± 0.3▲	29.4 ± 8.2▲
治疗组	10	19.4 ± 7.5*	1.4 ± 0.3*	24.6 ± 3.5*
对照组	19	24.8 ± 14.4	1.3 ± 0.3	24.0 ± 4.2

▲模型组与对照组比较，$P<0.05$；* 治疗组与模型组比较，$P<0.05$

存在显著的甲状腺功能亢进病理改变。

正常甲状腺滤泡上皮细胞几乎没有 Fas 表达。Graves 病甲状腺滤泡上皮细胞表达 Fas 较正常组织增多，但 Graves 病患者血液中可溶性 Fas 明显增多等抗凋亡因素，导致甲状腺细胞凋亡并不明显[7]。本实验旨在通过加强甲状腺细胞凋亡，探讨新的治疗手段。Mitsiades N 证实[8]：甲硫咪唑通过促进 Graves 病甲状腺细胞 FasL 基因表达增加，有助于病情缓解。依据 FasL 在人类和小鼠之间无种族特异性、有完全交叉反应性[9]，我们用表达 hFasL 的质粒对 GD 小鼠进行治疗。结果表明，与模型组相比，治疗组小鼠甲状腺组织学改变明显减轻，血清激素水平明显改善，取得了较为理想的治疗效果。

表达人 Fas 配体的质粒治疗 Graves 病模型小鼠取得一定效果。其机制推测如下：重组质粒 pcDNA3.1/hFasL 转导 BALB/c 小鼠体内后，可被小鼠抗原呈递细胞如巨噬细胞、淋巴细胞、树突状细胞等直接摄取并表达；也可在细胞因子如 IL-1β、IFN-γ 等[10](Graves 病甲状腺内浸润淋巴细胞、甲状腺滤泡上皮细胞均可分泌细胞因子)作用下被甲状腺滤泡上皮细胞摄取并表达。因此，小鼠甲状腺内浸润的淋巴细胞 FasL 作用于甲状腺上皮细胞的凋亡途径增强；同时表达 FasL 和(或)Fas 的甲状腺上皮细胞相互作用，互致凋亡途径增强。

(致谢：日本 Nagasaki 大学 Nagayama 教授提供质粒 pBluescript SK(−)/hTSHR，日本 Kanazawa 大学 Takashi Suda 教授提供质粒 pBluescript II KS(+)/hFasL，重庆医科大学肝炎研究所提供质粒 pcDNA3.1，本课题组前期成员詹升华成功构建重组质粒 pcDNA3.1/hTSHR[2]，李秀娟成功构建重组质粒 pcDNA3.1/hFasL[3]，何云成功构建 Graves 病小鼠模型[4]，使实验得以顺利完成。)

参 考 文 献

[1] 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.

[2] 詹升华，张　徽，刘　纯. pcDNA3.1/hTSHR 真核表达载体的构建及其在 COS-7 细胞中的表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2004，20(4)：11-14.

[3] 李秀娟，刘　纯，张　徽，等. pcDNA3.1(+)/hFasL 真核表达载体的构建及在 COS-7 细胞中的表达[J]. 重庆医科大学学报，2006，31(6)：808－811.

[4] 何　云，刘　纯，张　徽，等. 用 HTSHR 活化脾细胞免疫小鼠建立 GRAVES 病动物模型的研究[J]. 重庆医科大学学报，2008，33(11)：1013－1016.

[5] 张　琳，刘　纯，张　徽，等. 采用人促甲状腺激素受体活化的脾细胞免疫小鼠建立甲状腺相关眼病动物模型的研究[J]. 中华眼科杂志，2006，42(12)：1073-1077.

[6] Ludgate M. Animal models of Graves' disease[J]. Eur J Endocrinol., 2000, 142(1): 1-8.

[7] 随　华，刘　纯. 自身免疫性甲状腺疾病基因治疗的新进展[J]. 国际内分泌代谢杂志，2006，26(5)：330-331.

[8] Mitsiades N, Poulaki V, Tseleni-Balafouta S, et al. Fas ligand expression in thyroid follicular cells from patients with thionamide-treated Graves' disease [J]. Thyroid, 2000, 10(7): 527-532.

[9] Takahashi T, Tanaka M, Inazawa J, et al. Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity[J]. Int Immunol, 1994, 6(10): 1567-1574.

[10] 徐　春，白　耀，崔　莲. 甲状腺病学：基础与临床[M]. 北京：科学技术文献出版社，2003.146-168.

(责任编辑：冉明会)