

网络出版时间:2024-02-01 15:59:41 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240201.1114.015

桥本甲状腺炎 UGRP1 与 Fas 介导的凋亡通路的相关性研究

马珊珊,吴月,朱莉,陆晨阳,左春林

摘要 目的 探讨桥本甲状腺炎(HT)中子宫球蛋白相关蛋白1(UGRP1)与Fas介导的凋亡通路的相关性。方法 免疫组化(IHC)法检测正常人、HT患者甲状腺细胞UGRP1的表达。在体外用质粒转染大鼠甲状腺细胞(FRTL-5细胞),分别为空载体质粒组、UGRP1质粒组、Fas质粒组,采用实时荧光定量逆转录PCR(RT-qPCR)方法检测各组细胞Fas、UGRP1基因表达水平的变化。结果 HT患者甲状腺细胞UGRP1表达呈阳性,正常人甲状腺细胞UGRP1表达呈阴性。转染UGRP1质粒组的Fas基因表达水平较空载体质粒组无明显变化(1.0850 ± 0.1249 vs 1.0210 ± 0.1139),转染Fas质粒组的UGRP1基因表达水平较空载体质粒组显著升高($P < 0.0001$, 1.58070 ± 0.3232 vs 0.7527 ± 0.0760)。结论 桥本甲状腺炎UGRP1高表达可能与Fas介导的凋亡通路相关。

关键词 子宫球蛋白相关蛋白1; Fas/FasL通路; 桥本甲状腺炎

中图分类号 R 581.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)02-0289-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.02.017

桥本甲状腺炎(hashimoto thyroiditis, HT)为自身免疫性甲状腺炎的一种亚型,主要临床表现为甲状腺功能减退。Fas/FasL介导的细胞凋亡为HT患者甲状腺功能减退的原因之一^[1]。子宫球蛋白相关蛋白1(uteroglobulin-related protein 1, UGRP1)是一种分泌性蛋白,由SCGB3A2基因编码,在气管、支气管和肺泡上皮细胞中高表达,在甲状腺中表达较少。UGRP1是甲状腺转录因子1(thyroid transcription factor-1, TTF-1)的下游靶点,TTF-1基因在AITD患者的甲状腺中表达升高^[2],表明UGRP1可能与AITD疾病相关。既往研究^[1]表明HT患者的甲状腺组织中Fas、UGRP1表达呈阳性,UGRP1表达阳性的甲状腺细胞较UGRP1表达阴性的甲状腺细

胞IL-1 β 强表达,并在人原代甲状腺细胞的体外实验中验证了IL-1 β 可时间、剂量依赖性上调甲状腺细胞Fas、UGRP1表达。在HT疾病发展中IL-1 β 可促进甲状腺细胞Fas表达上调,Fas为凋亡因子,能够与FasL结合并介导细胞凋亡;而目前UGRP1的功能以及其与Fas介导的凋亡通路是否相关尚不明确。该研究检测了桥本甲状腺炎患者UGRP1表达水平并验证了UGRP1与Fas介导的凋亡通路的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例资料 正常人甲状腺细胞、HT患者甲状腺细胞取自医院肿瘤学细胞室的甲状腺穿刺细胞学的甲状腺细胞。本研究通过医院伦理委员会批准(PJ 2012-02-08),受试者均签署了知情同意书。

1.1.2 细胞系及主要试剂 大鼠甲状腺细胞FRTL-5(美国ATCC公司);UGRP1质粒、Fas质粒、空载体质粒(汉尹生物科技上海有限公司);胎牛血清(维森特生物技术南京有限公司);高糖DMEM培养基(上海源培生物技术股份有限公司);0.25%胰酶细胞消化液(上海碧云天生物技术有限公司);HiFectPlus转染试剂(南京艾科舛生物科技有限公司);SYBR qPCR Master MIX(上海吐露港生物科技有限公司);逆转录试剂盒(翌圣生物科技上海有限公司);引物由上海生工生物工程有限公司合成;甲状腺应用VividE95彩色多普勒超声诊断仪器、探头频率7.0~12.0 MHz进行检查;免疫组化一抗:兔抗人ugrp1多克隆抗体购自北京博森生物技术有限公司;二抗:PV6000山羊抗兔IgG/HRP聚合物、DAB试剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)方法 选取正常人、HT患者各5人,每人的穿刺细胞学甲状腺细胞取2张样本玻片,分别进行HE染色和UGRP1免疫组化染色。实验步骤:37℃温箱条件下石蜡切片予内源性过氧化物酶阻断剂孵育30 min,0.3% TRIton-X100溶液30 min;加入一抗

2024-01-09 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81270864)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院内分泌科,合肥 230022

作者简介:马珊珊,女,硕士研究生;

左春林,男,主任医师,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: zuochl@163.com

(1 : 500) ,4 ℃ 冰箱过夜;滴加即用型二抗孵育 30 min,DAB 显色液 2 min,纯水冲洗,苏木精复染 30 s,纯水冲洗,自然风干后中性树脂封片。

1.2.2 细胞培养 将 FRTL-5 细胞置于含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的高糖 DMEM 培养基中,在 37 ℃、5% CO₂ 浓度的恒温培养箱中培养。当细胞生长密度达 80% 左右时,用胰酶细胞消化液消化,按 1/2 或 1/3 进行传代培养。

1.2.3 细胞转染 选取对数生长期的 FRTL-5 细胞,用 HiFectPlus 分别转染空载体质粒、UGRP1 质粒及空载体质粒、Fas 质粒,在 37 ℃、5% CO₂ 条件下转染 12 h,构建空载体质粒组、UGRP1 质粒组;空载体质粒组、Fas 质粒组($n=6$)。实验重复 3 次。

1.2.4 RT-qPCR 法检测 mRNA 采用 TRIzol 法提取各组细胞总 RNA,使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,参考荧光定量 PCR 检测试剂盒说明书使用实时荧光定量仪检测相关基因的表达水平。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法比较分析目的基因 mRNA 表达水平。引物见表 1。

表 1 引物序列(5'-3')

基因	引物序列
Fas	F: GTCCTGCCTCTGCTGCTTGC
	R: TTCACGAACGCTCCTCTTCAACTC
UGRP1	F: CAGTGTCCCTCTTCTGTTGAC
	R: CCCAGCTCATTACAGCACTT
GAPDH	F: TTGTGCAGTGCCAGCCTC
	R: GGTAACCAGCGCTCCGATAC

1.3 实验结果判定标准 在光镜下分析,排除非特异染色的前提下,甲状腺细胞胞质内有黄色、棕黄色或棕褐色颗粒为 UGRP1 阳性细胞。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 及 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数间的比较采用 t 检验及 t' 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UGRP1 在正常人与 HT 患者甲状腺组织中的表达 正常人甲状腺组织 UGRP1 表达阴性,HT 患者 UGRP1 呈阳性表达。见图 1。

2.2 FRTL-5 细胞转染 UGRP1 质粒后 UGRP1 mRNA 及 fas mRNA 表达的变化 FRTL-5 细胞转染 UGRP1 质粒后,UGRP1 质粒转染组 UGRP1 mRNA 相对值较空载体转染组升高($P < 0.000 1, t = 15.69$),UGRP1 质粒转染组 Fas mRNA 相对值较空

载体转染组差异无统计学意义($P = 0.732, t = 0.354 6$)。见图 2。

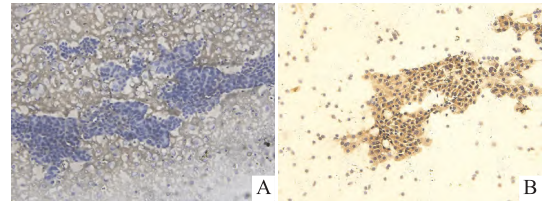


图 1 正常人与 HT 患者甲状腺组织 UGRP1 的表达 IHC $\times 200$
A:UGRP1 在正常人甲状腺组织中的表达;B:UGRP1 在 HT 患者甲状腺组织中的表达

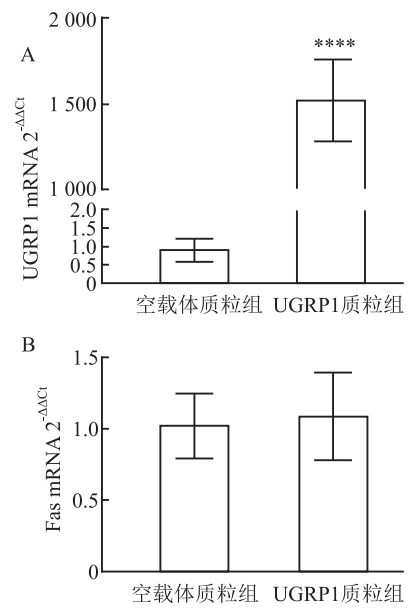


图 2 FRTL-5 细胞转染 UGRP1 质粒后 UGRP1 mRNA、Fas mRNA 表达的变化

A:FRTL-5 细胞转染 UGRP1 质粒后 UGRP1 mRNA 表达的变化; B:FRTL-5 细胞转染 UGRP1 质粒后 Fas mRNA 表达的变化;与空载体质粒组比较:**** $P < 0.000 1$

2.3 FRTL-5 细胞转染 Fas 质粒后 Fas mRNA 及 UGRP1 mRNA 表达的变化 FRTL-5 细胞转染 Fas 质粒后,Fas 质粒转染组 Fas mRNA 相对值较空载体转染组升高($P < 0.000 1, t = 42.27$),Fas 质粒转染组 UGRP1 mRNA 相对值较空载体转染组差异有统计学意义($P < 0.000 1, t = 15.22$)。见图 3。

3 讨论

自身免疫性甲状腺病(autoimmune thyroid disease, AITD)是免疫系统异常激活并允许自身反应性 B 细胞和 T 细胞靶向甲状腺所导致的自身免疫性疾病。AITD 主要包括格雷夫斯病(Graves'

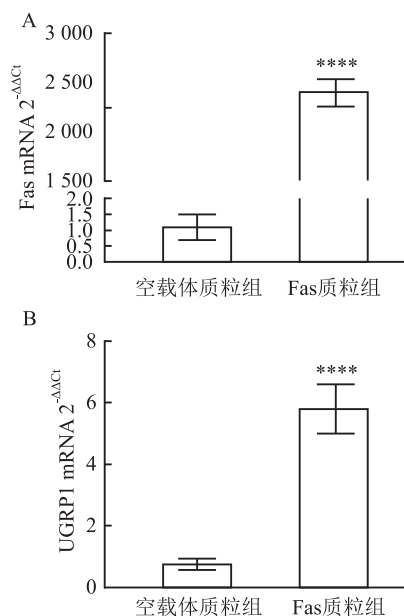


图3 FRTL-5细胞转染Fas质粒后Fas mRNA、UGRP1 mRNA表达的变化

A: FRTL-5细胞转染Fas质粒后Fas mRNA表达的变化; B: FRTL-5细胞转染Fas质粒后UGRP1 mRNA表达的变化; 与空载体质粒组比较: **** $P < 0.0001$

disease, GD) 和 HT, 其中 GD 以甲状腺毒症为主要表现, 但部分 GD 患者在自然病程中可表现为甲状腺功能减退^[3], 这一甲状腺功能表现多为 HT 患者的临床表现。之前的研究^[4]显示甲状腺组织 UGRP1 阳性表达的 GD 患者经过碘 131 治疗后更容易发生甲状腺功能减退, 且 UGRP1 阳性的 GD 患者的甲状腺组织中体积较大、胞质呈深嗜酸性和细颗粒状、核仁明显的细胞增多, 这一特征与 HT 患者增多的 Hürthle 细胞相似^[1], 表明 UGRP1 可能为 AITD 转化为 HT 的潜在预测因子。HT 的发生发展与遗传易感性、环境、免疫等因素相关, 体液免疫及细胞免疫共同参与导致甲状腺组织淋巴浆细胞浸润、甲状腺细胞损伤及萎缩、纤维化组织产生, 最终临床表现为甲状腺功能减退^[5]。HT 患者甲状腺组织中仅少数 (2% ~ 3%) CD8⁺ 细胞对 TG/TPO 具有特异性^[5], 且其 FasL 表达较弱^[6], 因此淋巴细胞浸润所产生的直接细胞毒性并非 HT 患者甲状腺功能减退的主要原因。浸润的淋巴细胞所释放的各种细胞因子、趋化因子可改变甲状腺细胞膜蛋白完整性^[7] 及免疫^[8], 甲状腺激素异位合成、甲状腺细胞分泌 CX-CL10 等可导致局部氧化应激反应、炎症因子级联放大等, 持续的免疫反应介导甲状腺细胞 Fas 表达及 FasL 的表达上调, 最终促使了甲状腺细胞凋亡。本

课题组前期研究^[1]表明 IL-1 β 可时间、剂量依赖性上调甲状腺细胞 Fas 和 UGRP1 的表达, 并采用免疫组化双染技术验证了 HT 患者的甲状腺组织中 Fas 与 UGRP1 在同一区域共表达。综合以上, 考虑 UGRP1 可能参与了 HT 疾病的发展, 但其具体功能及其与 Fas 介导的细胞凋亡的相关性仍未明确。

既往研究表明 HT 患者甲状腺组织中 Fas 表达呈阳性, 本研究表明 HT 患者组织中 UGRP1 表达亦呈阳性。在细胞实验中, UGRP1 与 Fas 介导的凋亡通路具有相关性。FRTL-5 细胞转染 UGRP1 后 Fas 基因的表达无明显变化, 表明 UGRP1 可能未直接参与 Fas 基因表达的调控; FRTL-5 细胞转染 Fas 后 UGRP1 基因的表达上调, 表明 UGRP1 可能为 Fas 下游的表达基因。

HT 患者外周血 UGRP1 水平较正常人、GD 患者显著增高, AITD 患者外周血 UGRP1 水平与 TSH、T₃、T₄、ATG、甲状腺体积无关, 与 TPOAb 正相关^[9]。在 AITD 患者的外周血^[9] 及甲状腺组织^[10] 中, UGRP1 阳性患者的甲状腺激素、促甲状腺激素水平与 UGRP1 阴性患者相比差异无统计学意义, 本研究中甲状腺细胞转染 UGRP1 质粒后 Fas 基因未见明显变化, 与之符合。甲状腺过氧化物酶 TPO 为位于甲状腺滤泡上皮顶端细胞膜上的膜结合糖蛋白, TPOAb 可通过抗体和补体依赖性细胞介导的细胞毒作用和致敏 T 细胞损伤甲状腺滤泡, 其水平升高表明了甲状腺局部炎症反应的增强^[11], 其高水平可见于 GD 和 HT 患者, 但有研究^[12]表明 TPOAb 水平明显升高的患者易发展为甲状腺功能减退。AITD 患者外周血^[9] 及甲状腺组织^[10] UGRP1 水平与 TPOAb 水平正相关, 提示 UGRP1 可能参与了 AITD 发展为甲状腺功能减退的过程。本研究表明甲状腺细胞转染 Fas 质粒后 UGRP1 基因表达上调, 表明桥本甲状腺炎 UGRP1 高表达可能与 Fas 介导的凋亡通路相关。Fas 是介导甲状腺细胞凋亡并致使 HT 患者甲状腺功能减退的重要分子标志物, 但只能在甲状腺组织中被检测出来, 而 UGRP1 是 Fas 介导凋亡通路的下游分子标志物, 在 HT 患者甲状腺组织及外周血中均可检测, 推测 UGRP1 可能作为 HT 患者易于检测的分子标志物。

UGRP1 为 SCGB3A2 编码的分泌性蛋白, 相关研究表明其有改善肺部炎症、抗肺部纤维化、促肺成熟、抑制 Lewis 肺癌生长^[13]、抑制香烟烟雾中的丙烯醛诱导的细胞凋亡^[14] 等作用, 提示 UGRP1 可能为一种作用广泛的保护性蛋白。本研究验证了

UGRP1 为 Fas 介导的凋亡通路的下游分子标志物,在 Fas 基因表达后,UGRP1 可能因其具有抗凋亡作用而保护性上调,或者 UGRP1 上调后发挥了促凋亡作用,又或者其仅作为一种伴随蛋白,这些机制目前仍不清楚,需进一步研究以明确 UGRP1 在 AITD 疾病发展中的作用。

参考文献

- [1] Zhou Z, Zuo C L, Li X S, et al. Uterus globulin associated protein 1 (UGRP1) is a potential marker of progression of Graves' disease into hypothyroidism [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2019, 494: 110492.
- [2] Niimi T, Keck-Waggoner C L, Popescu N C, et al. UGRP1, a uteroglobin/Clara cell secretory protein-related protein, is a novel lung-enriched downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor [J]. *Mol Endocrinol*, 2001, 15 (11): 2021–36.
- [3] Oueslati I, Salhi S, Yazidi M, et al. A case of Hashimoto's thyroiditis following Graves' disease [J]. *Clin Case Rep*, 2022, 10 (10): e6466.
- [4] 朱莉, 官伟宁, 杜丹丹, 等. 应用 UGRP1 预测 Graves 病患者碘 131 治疗发生甲减风险 [J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(6): 946–9.
- [5] Ralli M, Angeletti D, Fiore M, et al. Hashimoto's thyroiditis: An update on pathogenic mechanisms, diagnostic protocols, therapeutic strategies, and potential malignant transformation [J]. *Autoimmun Rev*, 2020, 19(10): 102649.
- [6] 王毅, 施秉银, 戴亚丽, 等. 细胞凋亡与桥本氏甲状腺炎发病相关研究[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2003 (1): 47–9.
- [7] Marique L, Van Regemorter V, Gérard A C, et al. The expression of dual oxidase, thyroid peroxidase, and caveolin-1 differs according to the type of immune response (TH1/TH2) involved in thyroid autoimmune disorders [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(5): 1722–32.
- [8] Ruffilli I, Ferrari S M, Colaci M, et al. IP-10 in autoimmune thyroiditis [J]. *Horm Metab Res*, 2014, 46(9): 597–602.
- [9] 徐甜, 陈翠萍, 王丹, 等. 子宫球蛋白相关蛋白 1 与桥本甲状腺炎的相关性[J]. *标记免疫分析与临床*, 2022, 29(3): 370–4.
- [10] 吴月, 杜丹丹, 官伟宁, 等. UGRP1 与甲状腺结节性质、功能及 BRAF 基因的相关性[J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56 (5): 802–6.
- [11] Ząbczyńska M, Polak K, Kozłowska K, et al. The contribution of IgG glycosylation to antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and complement-dependent cytotoxicity (CDC) in hashimoto's thyroiditis: an *in vitro* model of thyroid autoimmunity [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(2): 171.
- [12] Keyhanian M, Sarvghadi F, Mehran L, et al. Long-term variations of antithyroperoxidase antibodies and its clinical significance [J]. *Horm Metab Res*, 2019, 51(6): 347–52.
- [13] Kimura S, Yokoyama S, Pilon A L, et al. Emerging role of an immunomodulatory protein secretoglobin 3A2 in human diseases [J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 236: 108112.
- [14] Kurotani R, Shima R, Miyano Y, et al. SCGB3A2 inhibits acrolein-induced apoptosis through decreased p53 phosphorylation [J]. *Acta Histochem Cytochem*, 2015, 48(2): 61–8.

Correlation between UGRP1 and apoptosis pathway mediated by Fas in hashimoto thyroiditis

Ma Shanshan, Wu Yue, Zhu Li, Lu Chenyang, Zuo Chunlin

(Dept of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the correlation between uterine globulin associated protein 1 (UGRP1) and Fas mediated apoptosis pathway in hashimoto thyroiditis (HT). **Methods** The expression of UGRP1 in thyroid cells of normal people and HT patients was detected by immunohistochemistry (IHC). FRTL-5 cells were transfected by plasmids *in vitro*, and control group, UGRP1 group, Fas group were established respectively. Real-time fluorescent quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression of Fas and UGRP1 mRNA in each group. **Results** UGRP1 expression was positive in thyroid cells of HT patients and negative in that of normal people. There were no significant differences between control group and UGRP1 group in Fas gene expression ($1.085\ 0 \pm 0.124\ 9$ vs $1.021\ 0 \pm 0.113\ 9$). Compared with the control group, the expression of UGRP1 gene increased significantly in Fas group ($P < 0.000\ 1$, $5.807\ 0 \pm 0.323\ 2$ vs $0.752\ 7 \pm 0.076\ 0$). **Conclusion** The high expression of UGRP1 in HT may be related to apoptosis pathway mediated by Fas.

Key words uterine globulin associated protein 1; Fas/FasL pathway; hashimoto thyroiditis