

IL-1 β 诱导甲状腺细胞 UGRP1 表达及其与 Fas/FasL 介导凋亡的相关性

陈翠萍¹, 李阿楠¹, 任翠平², 沈际佳², 左春林¹

摘要 目的 探讨白细胞介素-1 β (IL-1 β) 诱导甲状腺细胞子宫球蛋白相关蛋白 1 (UGRP1) 的表达及其与 Fas/FasL 介导细胞凋亡的相关性。方法 设立对照组、IL-1 β 组、IL-1 β + 抗 FasL 抗体组, 体外培养大鼠甲状腺细胞 (FRTL-5 细胞), 采用 Real-time PCR 法检测各组细胞 UGRP1 及 Fas mRNA 表达水平; 采用流式细胞术检测各组细胞凋亡率。结果 与对照组比较, IL-1 β 组、IL-1 β + 抗 FasL 抗体组 UGRP1 及 Fas mRNA 表达水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$);

与对照组比较, IL-1 β 组甲状腺细胞早期凋亡率升高 ($7.49\% \pm 1.91\%$ vs $28.46\% \pm 3.17\%$), 差异有统计学意义 ($P < 0.001$); 与 IL-1 β 组比较, IL-1 β + 抗 FasL 抗体组甲状腺细胞早期凋亡率降低 ($28.46\% \pm 3.17\%$ vs $19.20\% \pm 1.75\%$), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 IL-1 β 组比较, IL-1 β + 抗 FasL 抗体组 UGRP1 mRNA (2.22 ± 0.31 vs 2.66 ± 0.28) 及 Fas mRNA (2.75 ± 0.18 vs 3.03 ± 0.16) 表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 IL-1 β 诱导甲状腺细胞 UGRP1 与 Fas 高表达以及细胞凋亡, UGRP1 高表达与 Fas/FasL 介导的细胞凋亡不相关。

关键词 白细胞介素-1 β ; 子宫球蛋白相关蛋白 1; Fas/FasL 通路; 凋亡; 自身免疫性甲状腺病

中图分类号 R 581.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)07-1073-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.07.011

2022-05-18 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81270864)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院内分泌科, 合肥 230022

² 安徽医科大学基础医学院微生物与寄生虫学教研室, 合肥 230032

作者简介: 陈翠萍, 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

自身免疫性甲状腺病(autoimmune thyroid dis-

Design and implementation of retinal blood vessel segmentation system combining region growth and U-Net

Jiang Mengduo¹, Zhang Pengyu², Zhang Shuhe³, Sun Xinyue⁴, Tao Liming², Zhou Jinhua¹

(¹ *Anhui Medical University, School of Biomedical Engineering, Hefei 230032;*

² *Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Ophthalmology, Hefei 230601;*

³ *University Eye Clinic Maastricht, Maastricht University Medical Center, Netherlands 6202AZ;*

⁴ *Anhui Medical University, Second Clinical School of Medicine, Hefei 230022*)

Abstract Objective This research aimed to explore the application of the combination of region growth and U-Net in the retinal vessel segmentation system, retinal vessels were automatically segmented through the developed system. This research provides doctors with accurate information on changes in the retinal blood vessel structure, which will improve the efficiency of diagnosis and treatment. **Methods** Combined with U-Net network and region growth, the pre-processed retinal blood vessels were automatically segmented, and the algorithms were integrated into the retinal blood vessel segmentation system through the design of controls. **Results** The average values of blood vessel segmentation performance indexes—accuracy, sensitivity, and specificity were 0.977 7, 0.768 4, and 0.982 1, respectively, and regional iterative growth could improve the segmentation effect of fine retinal blood vessels. **Conclusion** The system has the characteristics of simple interface and convenient operation. It realizes automatic retinal blood vessel segmentation with high precision and visualization, provides an effective application platform for doctors to observe the changes of retinal vascular structure, and also provides a thinking direction for doctors to judge the nature of lesions.

Key words retinal vessels; U-Net network; region growth; automatic segmentation; system implementation

eases , AITD) 是一种器官特异性自身免疫性疾病 , 主要包括 Graves 病(Graves' disease , GD) 和桥本甲状腺炎(Hashimoto' s thyroiditis , HT) 两种临床类型^[1]。子宫球蛋白相关蛋白 1(uteroglobin-related protein 1 , UGRP1) 由 SCGB3A2 基因编码 , 主要在气管、支气管的上皮细胞中表达 , 在甲状腺组织中也有少量表达^[2]。人类 UGRP1 基因定位在染色体 5q31-33 这是一个包含一组编码大量 Th2 细胞因子且具有 GD 易感位点的基因区域^[3-4]。前期研究^[5-6]显示 88.4% HT 及 24.7% GD 患者甲状腺细胞中表达 UGRP1 而正常甲状腺细胞及甲状腺肿瘤细胞中不表达或低表达 UGRP1。GD 和 HT 患者甲状腺组织 UGRP1 与自杀相关因子(factor associated suicide , Fas) 共表达 , 并且 UGRP1 阳性甲状腺组织中 IL-1 β 的表达量高于 UGRP1 阴性者。IL-1 β 主要是一种促炎细胞因子^[7] , 它在 HT 患者甲状腺组织中大量表达 , 是唯一诱导甲状腺细胞 Fas 表达的细胞因子 , 通过与广泛存在的 FasL 结合诱导甲状腺细胞凋亡^[8-9]。在 AITD 患者尤其是 HT 患者的甲状腺组织中 UGRP1 高表达 , 且 UGRP1 高表达的甲状腺细胞中 Fas 表达也增高 , 但 UGRP1 高表达的具体机制、UGRP1 高表达与 Fas 共表达之间是否存在关联尚不清楚。Fas/FasL 介导的凋亡是经典的 AITD 致病机制 , 本研究通过应用 IL-1 β 诱导甲状腺细胞 , 探讨甲状腺细胞 UGRP1 表达及其与 Fas/FasL 介导细胞凋亡的相关性。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂 大鼠甲状腺细胞 FRTL-5 (美国 ATCC 公司) ; 重组人 IL-1 β (吴江近岸蛋白质科技有限公司) ; 抗 FasL 抗体 (美国 R&D 公司) ; 胎牛血清、RPMI-1640 培养基 (美国 Gibco 公司) ; 0.25% 胰酶细胞消化液 (上海碧云天生物技术有限公司) ; TRIzol 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司) ; 逆转录试剂盒 (美国 Thermo 公司) ; SYBR Premix ExTaq II 定量 PCR 试剂盒 (大连宝生物工程有限公司) ; Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒 (上海贝博公司) ; 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及干预 将 FRTL-5 细胞置于含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的 RPMI-1640 培养基中 , 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 浓度的恒温培养箱中培养。当细胞生长密度达 70% 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 , 或者按照合适浓度接种至细胞培养板中。用不同浓度 (10、20、40 ng/ml) IL-1 β 刺激细胞 , 同时设置对照组 (未加 IL-1 β) 继续培养 48 h , 收集细胞用于后期检测。用 IL-1 β (40 ng/ml) 刺激细胞 , 分别培养 12、24、48 h , 并设置对照组 (0 h) , 收集细胞用于后期检测。用抗 FasL 抗体 (5 μ g/ml) 预处理细胞 45 min 后 , 再加入 IL-1 β (40 ng/ml) 刺激细胞 , 同时设立对照组 (未加 IL-1 β 及抗 FasL 抗体) 、IL-1 β (40 ng/ml) 组继续培养 48 h , 收集细胞用于后期检测。

1.2.2 Real-time PCR 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 Real-time PCR 仪 (Bio-Rad CFX96) 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: GTCCTGCCTCTGGTGCTTGC
	R: TTCACGAACGCTCCTCTTCAACTC
UGRP1	F: CAGTGTCCCTCTTCTGTTGAC
	R: CCCAGCTCATTACAGCACTT
GAPDH	F: TTGTGCAGTGCCAGCCTC
	R: GGTAACCAAGCGCTCCGATAC

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡 将细胞接种于 6 孔板中 , 设置对照组、IL-1 β 组和 IL-1 β + 抗 FasL 抗体组。对照组 (未加 IL-1 β 及抗 FasL 抗体) 和 IL-1 β 组 (40 ng/ml) 继续培养 48 h , IL-1 β + 抗 FasL 抗体组先予以抗 FasL 抗体 (5 μ g/ml) 预孵 45 min , 再添加终浓度为 40 ng/ml 的 IL-1 β 继续培养 48 h。使用不含 EDTA 的胰酶细胞消化液消化收集细胞。按照 Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒说明书进行操作 , 用流式细胞仪 (BECKMAN COULTER) 检测。记录各组的细胞凋亡率 , 实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 及 GraphPad Prism 8.0 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 , 多组均数间的比较采用单因素方差分析。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-1 β 对 FRTL-5 细胞 Fas mRNA 表达水平

的影响 与对照组相比,IL-1 β 组 FRTL-5 细胞 Fas mRNA 的表达水平呈剂量-时间依赖性增加。在不同浓度刺激下,20 ng/ml 组(1.88 \pm 0.22)和 40 ng/ml 组(2.86 \pm 0.52)高于对照组(1.01 \pm 0.19),差异有统计学意义($F = 19.35$, $P = 0.0005$),如图 1A。在不同时间作用下,12 h 组(1.92 \pm 0.51)、24 h 组(2.38 \pm 0.09)和 48 h 组(3.63 \pm 0.28)高于对照组(1.00 \pm 0.08),差异有统计学意义($F = 40.31$, $P < 0.0001$),如图 1B。

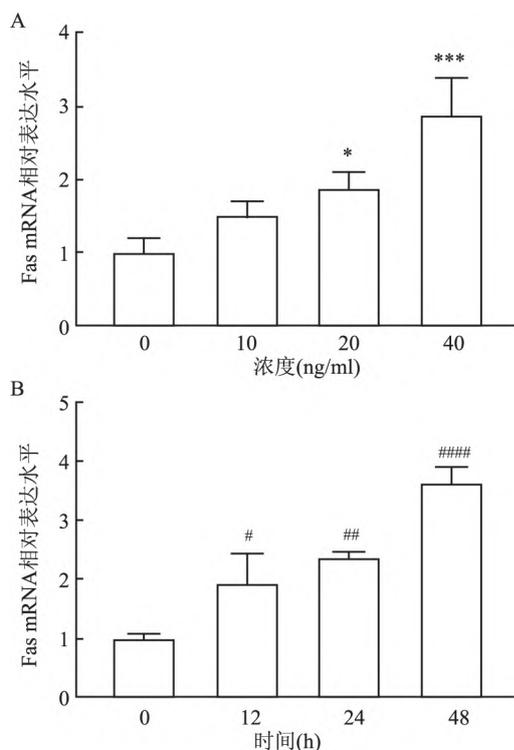


图1 IL-1 β 对 FRTL-5 细胞 Fas mRNA 表达水平的影响

A: 不同浓度 IL-1 β 对 FRTL-5 细胞 Fas mRNA 表达水平的影响; B: 不同时间作用下 IL-1 β 对 FRTL-5 细胞 Fas mRNA 表达水平的影响; 与 0 ng/ml 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$; 与 0 h 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.0001$

2.2 IL-1 β 对 FRTL-5 细胞 UGRP1 mRNA 表达水平的影响 与对照组相比,IL-1 β 组 FRTL-5 细胞 UGRP1 mRNA 的表达水平呈剂量-时间依赖性增加。在不同浓度刺激下,10 ng/ml 组(1.74 \pm 0.27)、20 ng/ml 组(2.34 \pm 0.45)和 40 ng/ml 组(2.94 \pm 0.22)高于对照组(1.01 \pm 0.18),差异有统计学意义($F = 23.11$, $P = 0.0003$),如图 2A。在不同时间作用下,24 h 组(1.85 \pm 0.17)和 48 h 组(2.12 \pm 0.12)高于对照组(1.01 \pm 0.18),差异有统计学意义($F = 24.96$, $P = 0.0002$),如图 2B。

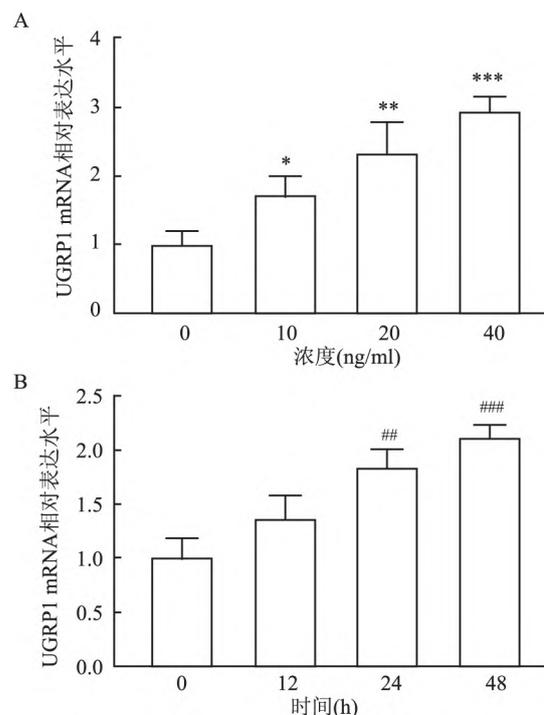


图2 IL-1 β 对 FRTL-5 细胞 UGRP1 mRNA 表达水平的影响

A: 不同浓度 IL-1 β 对 FRTL-5 细胞 UGRP1 mRNA 表达水平的影响; B: 不同时间作用下 IL-1 β 对 FRTL-5 细胞 UGRP1 mRNA 表达水平的影响; 与 0 ng/ml 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 0 h 组比较: ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

2.3 IL-1 β 及抗 FasL 抗体对 FRTL-5 细胞凋亡率的影响 流式细胞术检测细胞凋亡率结果显示 IL-1 β (40 ng/ml)组细胞的早期凋亡率较对照组升高(7.49 \pm 1.91% vs 28.46 \pm 3.17%; $t = 9.814$, $P = 0.0006$),IL-1 β (40 ng/ml) + 抗 FasL 抗体组细胞的早期凋亡率较 IL-1 β (40 ng/ml)组降低(28.46 \pm 3.17% vs 19.20 \pm 1.75%; $t = 4.433$, $P = 0.0114$),如图 3。

2.4 抗 FasL 抗体对 FRTL-5 细胞 Fas mRNA 及 UGRP1 mRNA 表达水平的影响 与对照组相比,IL-1 β (40 ng/ml)组 FRTL-5 细胞 Fas mRNA(1.01 \pm 0.09 vs 2.75 \pm 0.18; $t = 15.09$, $P = 0.0001$)和 UGRP1 mRNA(1.00 \pm 0.07 vs 2.22 \pm 0.31; $t = 6.687$, $P = 0.0026$)表达水平增加;与对照组相比,IL-1 β (40 ng/ml) + 抗 FasL 抗体组 Fas mRNA(1.01 \pm 0.09 vs 3.03 \pm 0.16; $t = 19.38$, $P < 0.0001$)和 UGRP1 mRNA(1.00 \pm 0.07 vs 2.66 \pm 0.28; $t = 9.856$, $P = 0.0006$)表达水平增加;与 IL-1 β (40 ng/ml)组相比,IL-1 β (40 ng/ml) + 抗 FasL 抗体组 Fas mRNA(2.75 \pm 0.18 vs 3.03 \pm 0.16; $t = 2.072$, $P = 0.107$)和 UGRP1 mRNA(2.22 \pm 0.31 vs 2.66 \pm

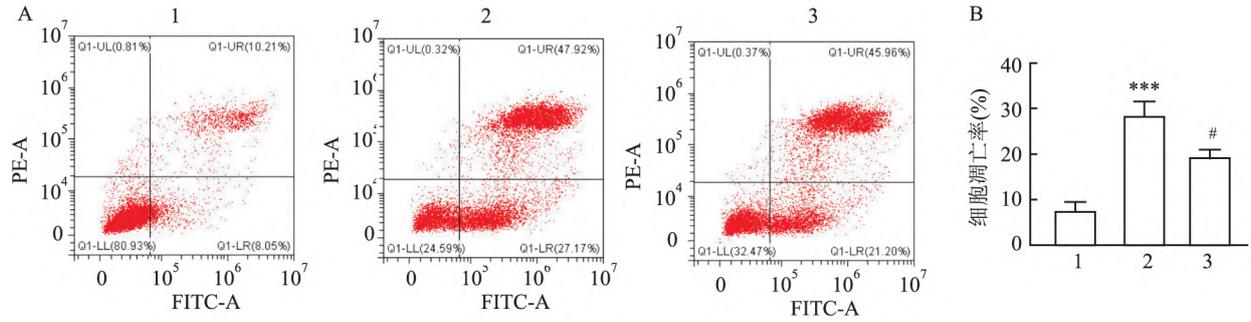


图3 IL-1β及抗FasL抗体对FRTL-5细胞凋亡率的影响

A: 流式细胞术检测细胞凋亡; B: 细胞凋亡率柱状图; 1: 对照组; 2: IL-1β组; 3: IL-1β + 抗FasL抗体组; 与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与IL-1β组比较: # $P < 0.05$

0.28; $t = 1.811, P = 0.144$ 4) 的表达水平变化均无统计学差异。见图4A、B。

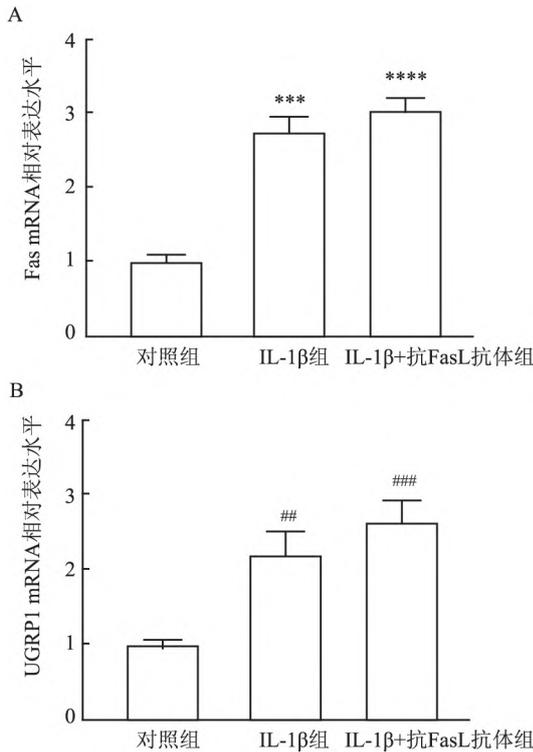


图4 抗FasL抗体对FRTL-5细胞Fas mRNA及UGRP1 mRNA表达水平的影响

A: 三组间Fas mRNA表达水平变化; B: 三组间UGRP1 mRNA表达水平变化; 与对照组比较, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; 与对照组比较, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

3 讨论

AITD是由遗传因素、环境因素等相互作用而发生发展的一种自身免疫性疾病,辅助性T细胞在调节AITD患者甲状腺免疫反应中的重要性已得到充

分证实,GD主要以Th2细胞引起的体液免疫为主,HT主要以Th1细胞引起的细胞免疫为主^[10]。UGRP1作为一种功能机制尚未明确的蛋白,已被证实是甲状腺转录因子1的下游靶基因,该基因在AITD患者的甲状腺中表达升高^[11]。

AITD患者,尤其HT患者甲状腺组织高表达UGRP1^[5],甲状腺细胞UGRP1阳性HT患者血清TPOAb及TgAb阳性滴度高于UGRP1阴性患者^[6],而甲状腺细胞UGRP1阳性的GD患者经过¹³¹I治疗后更容易发生甲状腺功能减退^[12],提示甲状腺细胞UGRP1阳性GD患者倾向于HT的自然转归,推测UGRP1可能作为AITD特别是HT的一种新型生物学标志物,而且对于GD患者的甲减风险有一定预警意义。UGRP1与Fas在AITD患者的甲状腺细胞中共表达,在UGRP1阳性的GD患者中,其甲状腺组织中浸润的单核细胞和巨噬细胞中IL-1β的表达量亦高于UGRP1阴性的患者^[5]。本研究应用IL-1β刺激大鼠甲状腺细胞,结果显示在mRNA水平UGRP1和Fas表达呈升高趋势,与AITD患者甲状腺细胞UGRP1与Fas共表达且周围浸润的IL-1β高表达相吻合。长期以来Fas/FasL凋亡途径是AITD尤其是HT的经典通路,既往研究^[9]表明IL-1β是唯一一种通过Fas/FasL通路诱导甲状腺细胞凋亡的细胞因子,为了探讨UGRP1高表达与Fas/FasL介导细胞凋亡的相关性,本研究予抗FasL抗体预孵甲状腺细胞,阻断FasL与Fas相结合^[13],降低IL-1β诱导的细胞凋亡,结果显示抗FasL抗体预孵的甲状腺细胞早期凋亡率降低,但UGRP1表达水平并未出现显著性变化。这一结果说明IL-1β诱导甲状腺细胞UGRP1高表达与Fas/FasL介导的细胞凋亡不相关。

综上所述,本研究结果表明IL-1β可以诱导甲

状腺细胞 UGRP1 与 Fas 高表达,并且可以促使甲状腺细胞凋亡,但 UGRP1 高表达与 Fas/FasL 介导的细胞凋亡不相关。UGRP1 与 Fas/FasL 介导的细胞凋亡之间的相关性仍有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Rebuffat S A, Kammoun-Krichen M, Charfeddine I, et al. IL-1 β and TSH disturb thyroid epithelium integrity in autoimmune thyroid diseases [J]. *Immunobiology*, 2013, 218(3): 285-91.
- [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] Song H D, Liang J, Shi J Y, et al. Functional SNPs in the SCGB3A2 promoter are associated with susceptibility to Graves' disease [J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(6): 1156-70.
- [4] Xue L, Han B, Pan C, et al. The association of SCGB3A2 polymorphisms with the risk of Graves' disease: a meta-analysis [J]. *Endocrine*. 2014, 45(3): 365-9.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Zhao R, Zhou H, Su S B. A critical role for interleukin-1 β in the progression of autoimmune diseases [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 17(3): 658-69.
- [8] 李阿楠, 张晓序, 任翠平, 沈际佳, 左春林. 白细胞介素-1 β 诱导甲状腺细胞凋亡机制的研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(9): 1385-18.
- [9] Giordano C, Stassi G, De Maria R, et al. Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis [J]. *Science*, 1997, 275(5302): 960-3.
- [10] Drugarin D, Negru S, Koreck A, et al. The pattern of a T(H)1 cytokine in autoimmune thyroiditis [J]. *Immunol Lett*, 2000, 71(2): 73-7.
- [11] 孙玲玲, 王艺, 黄薇. UGRP1 基因及其与疾病相关性的研究 [J]. *医学分子生物学杂志*, 2005(3): 185-9.
- [12] 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.
- [13] Yuan Y, Zhang Y, Zhao S, et al. Cadmium-induced apoptosis in neuronal cells is mediated by Fas/FasL-mediated mitochondrial apoptotic signaling pathway [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 8837.

Expression of UGRP1 in thyroid cells induced by IL-1 β and its correlation with Fas/FasL mediated apoptosis

Chen Cuiping¹, Li Anan¹, Ren Cuiping², Shen Jijia², Zuo Chunlin¹

(¹Dept of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022; ²Dept of Microbiology and Parasitology, School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the expression of uteroglobin-related protein 1 (UGRP1) in thyroid cells induced by interleukin-1 β (IL-1 β) and its correlation with Fas/FasL mediated apoptosis. **Methods** Control group, IL-1 β group and IL-1 β + anti-FasL antibody group were established, rat thyroid cells (FRTL-5 cells) were cultured *in vitro*. The expression levels of UGRP1 and Fas mRNA of each group were detected by real-time PCR and the apoptosis rate of each group was detected by flow cytometry. **Results** Compared with control group, the mRNA expression levels of UGRP1 and Fas in IL-1 β group and IL-1 β + anti-FasL antibody group increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with control group, the early apoptosis rate of thyroid cells in IL-1 β group increased ($7.49\% \pm 1.91\%$ vs $28.46\% \pm 3.17\%$), and the difference was statistically significant ($P < 0.001$). Compared with IL-1 β group, the early apoptosis rate of thyroid cells in IL-1 β + anti-FasL antibody group decreased ($28.46\% \pm 3.17\%$ vs $19.20\% \pm 1.75\%$), and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with IL-1 β group, the expression levels of UGRP1 mRNA (2.22 ± 0.31 vs 2.66 ± 0.28) and Fas mRNA (2.75 ± 0.18 vs 3.03 ± 0.16) in IL-1 β + anti-FasL antibody group were not significantly different ($P > 0.05$). **Conclusion** IL-1 β induces the high expression of UGRP1 and Fas and apoptosis of thyroid cells, the high expression of UGRP1 is not associated with Fas/FasL mediated apoptosis.

Key words interleukin-1 β ; uteroglobin-related protein 1; Fas/FasL pathway; apoptosis; autoimmune thyroid diseases