

网络出版时间: 2020-8-22 11:24 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200820.1450.013.html>

# 白细胞介素-1 $\beta$ 诱导甲状腺细胞凋亡机制的研究

李阿楠<sup>1</sup> 张晓序<sup>1</sup> 任翠平<sup>2</sup> 沈际佳<sup>2</sup> 左春林<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨在桥本甲状腺炎(HT)中白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )诱导甲状腺细胞凋亡及其可能的作用机制。方法

① 不同浓度、不同时间 IL-1 $\beta$  刺激大鼠甲状腺细胞系(FRTL-5 细胞),采用实时荧光定量 PCR 方法检测 FRTL-5 细胞自杀因子(Fas) mRNA 的表达。② 设立对照组、IL-1 $\beta$  组、IL-1 $\beta$  + caspase-8 抑制剂(Z-ETD-FMK)组,采用流式细胞术检测各组的甲状腺细胞凋亡率。结果 ① 定量 PCR 结果显示 IL-1 $\beta$  与 FRTL-5 细胞 Fas mRNA 表达水平存在剂量-时间依赖关系,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。② 流式细胞术结果显示,与对照组比较,IL-1 $\beta$  作用后,甲状腺细胞的凋亡率增加( $P < 0.05$ )。联合加入 Z-ETD-FMK 后,可抑制 IL-1 $\beta$  诱导甲状腺细胞凋亡率的增加( $P < 0.05$ )。结论 IL-1 $\beta$  可能通过 Fas 和 caspase-8 途径导致甲状腺细胞的凋亡。

**关键词** 桥本甲状腺炎; 凋亡; 白细胞介素-1 $\beta$ ; FRTL-5 细胞; 自杀相关因子

中图分类号 R 581.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)09-1385-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.09.013

桥本甲状腺炎(Hashimoto thyroiditis, HT) 又称

慢性淋巴细胞性甲状腺炎,是由多种因素导致的一种器官特异性自身免疫性甲状腺疾病<sup>[1]</sup>。该病早期没有明显的临床症状,随着疾病进展则有甲状腺功能减退的表现。其病理特点主要表现为淋巴细胞的浸润,同时可伴有淋巴滤泡形成。研究<sup>[2]</sup>表明,自杀相关因子(factor associated suicide, Fas)介导的细胞凋亡可能是引起甲减的重要途径。Fas 的表达变化可能受局部炎性环境的影响,如促炎因子白细胞介素 1- $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、干扰素- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , INF- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )等<sup>[3-4]</sup>。前期研究<sup>[5]</sup>表明 IL-1 $\beta$  在 HT 患者甲状腺组织中高表达,可能与甲状腺细胞的 Fas 表达增加相关,但具体机制不明。该研究将通过体外培养大鼠甲状腺细胞系(FRTL-5 细胞),探究 IL-1 $\beta$  是否通过影响 Fas 和 caspase-8 的表达来调控甲状腺细胞凋亡,从而探讨 IL-1 $\beta$  在 HT 发病机制中的作用,为 HT 的临床治疗提供一个潜在的靶点。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 大鼠甲状腺细胞 FRTL-5(美国 ATCC 公司);重组人 IL-1 $\beta$ (美国 Sigma 公司);Z-ETD-FMK 抑制剂(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

2020-03-12 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81270864)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学第一附属医院内分泌科, 合肥 230022

<sup>2</sup> 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: 李阿楠, 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

evaluated by spectrophotometer turbidimetry. The biofilm model of the three strains was constructed *in vitro*, the morphology and structure of the biofilm were observed under scanning electron microscope( SEM), and the amount of biofilm formation was evaluated by crystal purple staining. **Results** Compared with HtrA gene-deficient strains, the bacterial concentration(OD<sub>600</sub> value) of HtrA high virulent strains and UA159 standard strains was higher than that of HtrA gene deficient strain in each stage of *S. mutans* proliferation in the three groups, and the differences were statistically significant( $P < 0.05$ ). Under scanning electron microscope, the density of HtrA high virulence strain was the highest, followed by UA159 standard strain, and the density of HtrA deficient strain was the lowest. Semi-quantitative determination of biofilm crystal purple for 4, 8, 12, 24 h, there was significant difference in OD<sub>600</sub> value between HtrA high virulence strain and HtrA gene deficient strain( $P < 0.001$ ). **Conclusion** The formation of *S. mutans* biofilm is affected by HtrA, and the deletion of HtrA gene reduces bacterial adhesion and slows biofilm formation.

**Key words** *Streptococcus mutans*; high temperature requirement serine proteinase A; biofilm

Thermo 公司); 荧光定量 PCR 检测试剂盒(日本 TaKaRa 公司); Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(上海贝博公司); 八连管及八连管盖(美国 ABI 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** 将 FRTL-5 细胞置于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的恒温培养箱中, 细胞呈贴壁生长。当细胞生长密度达到 70% ~ 80% 时, 可用胰酶消化、传代, 或按所需浓度接种到培养板中。

**1.2.2 细胞干预** 将对数生长期的 FRTL-5 细胞以  $5 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 6 孔板中, 用不同浓度(10、20、40 ng/ml) 的 IL-1 $\beta$  处理细胞, 同时设置对照组(不加 IL-1 $\beta$ ) 继续培养 48 h 后, 收集细胞用于后期检测; 接上步检测, 用 20 ng/ml 的 IL-1 $\beta$  处理细胞, 再分别培养 6、12、24、48 h, 并设置对照组(0 h 处理), 收集细胞用于后期检测。

**1.2.3 FRTL-5 细胞总 RNA 提取和 RT-PCR** 用预冷的 PBS 洗涤 2 ~ 3 次, 按照 TRIzol 试剂盒说明书提取各组细胞的总 RNA。采用 Nano Drop 仪器检测 RNA 浓度后, 根据 Thermo 逆转录酶说明书将总 RNA 逆转录成 cDNA, 以此为模板, 使用 RT-PCR 仪检测相关基因的表达。RT-PCR 反应条件: 95 °C、10 s 预变性; 95 °C、15 s、60 °C、40 s 扩增 40 循环; 95 °C、15 s、60 °C、1 min 95 °C、15 s 延伸(熔解曲线)。以  $\beta$ -actin 作为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法比较分析目的基因表达。引物见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5'-3')
Fas	F: GTCCTGCCTCTGCTGCTTGC R: TTCACGAACGCTCTCTTCAACTC
$\beta$ -actin	F: TGTCACCAACTGGGACGATA R: GGGGTGTGAAGGTCTCAAA

**1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡** 将对数生长期的 FRTL-5 细胞以  $5 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 6 孔板中, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 待细胞生长至 70% ~ 80% 时, 分别设置对照组(含 0.5% BSA)、IL-1 $\beta$  10 ng/ml 和 IL-1 $\beta$  20 ng/ml 诱导组及 Z-ETD-FMK 20  $\mu$ mol/L 组。对照组和 IL-1 $\beta$  组于培养箱中继续培养 24 h。Z-ETD-FMK 组先以 20  $\mu$ mol/L 预孵 1 h 后, 再添加终浓度为 20 ng/ml 的 IL-1 $\beta$ , 于培养箱中继续培养 24 h。用不含 EDTA 胰酶消化后离心, 收集细胞于 EP 管中。用预冷的 PBS

洗涤 1 ~ 2 次, 进行离心 4 °C、1 000 r/min、5 min。加入 1  $\times$  Annexin V 结合液调整细胞密度为  $1 \times 10^6$  个/ml。在细胞悬浮液中加入 5  $\mu$ l Annexin V-FITC 染色液, 轻轻混匀, 于 2 ~ 8 °C 避光孵育 15 min 后, 加入 10  $\mu$ l PI 染色液, 避光孵育 5 min。1 h 内用流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司)检测。记录 4 组细胞凋亡细胞百分率, 实验重复 3 次。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间均数的比较采用  $t$  检验; 多组均数的比较采用单因素方差分析(ANOVA)。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 IL-1 $\beta$  对 FRTL-5 细胞 Fas mRNA 表达水平的影响** RT-PCR 测定结果显示, 与对照组比较, IL-1 $\beta$  刺激组 FRTL-5 细胞 Fas mRNA 的表达量呈剂量依赖性增加。其中 20 ng/ml 组和 40 ng/ml 组高于对照组, 差异有统计学意义( $t = 10.61$ ,  $P < 0.05$ ;  $t = 4.309$ ,  $P < 0.05$ ), 如图 1A。Fas mRNA 的表达量与 IL-1 $\beta$  作用呈时间依赖性, 与对照组相比, 予 20 ng/ml 浓度 IL-1 $\beta$  作用 6、12、24、48 h 时 Fas mRNA 表达均增高, 差异有统计学意义( $F = 9.29$ ,  $P < 0.05$ ), 如图 1B。

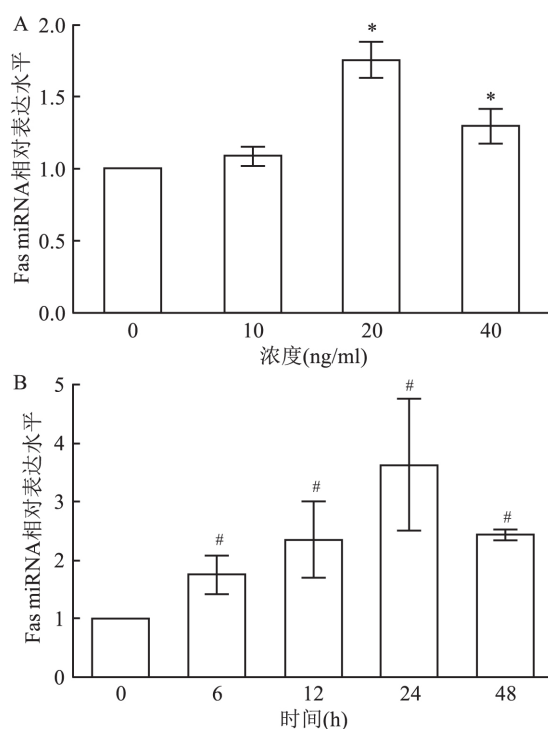


图 1 IL-1 $\beta$  对 FRTL-5 细胞 Fas mRNA 表达水平的影响

A: 不同剂量 IL-1 $\beta$  对 FRTL-5 细胞 Fas mRNA 表达水平的影响; B: 不同时间 IL-1 $\beta$  对 FRTL-5 细胞 Fas mRNA 表达水平的影响; 与对照组(0 ng/ml) 比较: \*  $P < 0.05$ ; 与对照组(0 h) 比较: #  $P < 0.05$

**2.2 Z-IETD-FMK 对 IL-1 $\beta$  诱导 FRTL-5 细胞凋亡的影响** 不同浓度(10 ng/ml IL-1 $\beta$  及 20 ng/ml IL-1 $\beta$ ) 分别干预 FRTL-5 细胞 24 h 后,甲状腺细胞凋亡率分别为(11.45%  $\pm$  1.826%) 和(21.60%  $\pm$  3.00%) 其中,IL-1 $\beta$  干预组(20 ng/ml) 与对照组(7.74%  $\pm$  1.68%) 比较,差异有统计学意义( $F = 98.99$ ,  $P < 0.05$ )。预先给予 caspase-8 抑制剂 Z-IETD-FMK 1 h 后再予 IL-1 $\beta$  干预细胞 24 h,结果显示,甲状腺细胞凋亡率为(9.18%  $\pm$  2.83%),与 IL-1 $\beta$  干预组(20 ng/ml) 比较,甲状腺细胞的细胞凋亡率下降,差异有统计学意义( $F = 61.51$ ,  $P < 0.05$ )。如图 2。

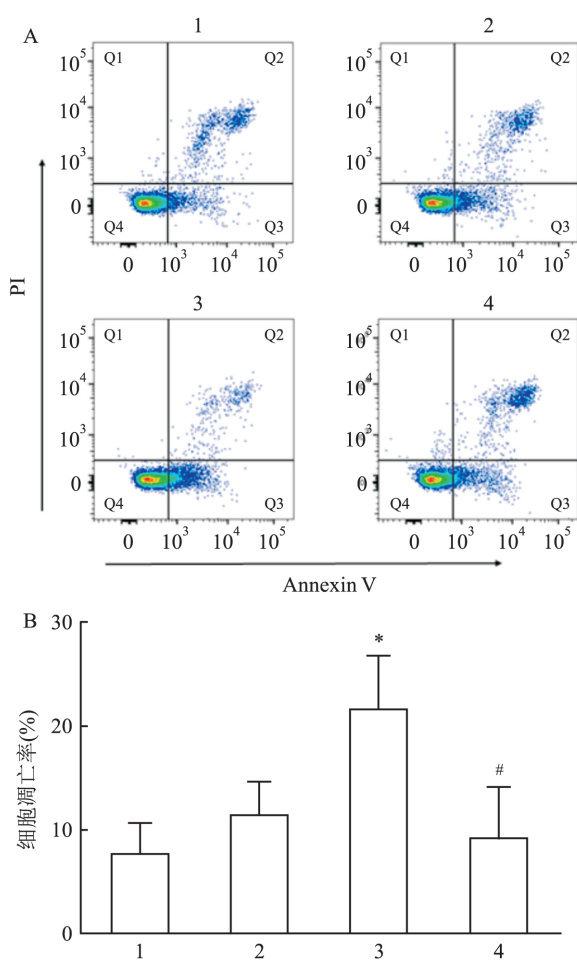


图2 IL-1 $\beta$  通过 caspase 途径介导 FRTL-5 细胞的凋亡

A: 流式检测细胞凋亡; B: 细胞凋亡率柱状图; 1: 对照组; 2: 10 ng/ml IL-1 $\beta$  组; 3: 20 ng/ml IL-1 $\beta$  组; 4: 20  $\mu$ mol/L Z-IETD-FMK + 20 ng/ml IL-1 $\beta$  组; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 20 ng/ml IL-1 $\beta$  组比较: #  $P < 0.05$

### 3 讨论

HT 是常见的自身免疫性甲状腺疾病之一,其发

病机制尚未完全明了,可能与遗传、环境因素及自身免疫异常有关<sup>[1,6-7]</sup>。HT 患者甲状腺组织中存在细胞凋亡,主要特征有甲状腺细胞存在胞核分裂、胞质浓缩、胞膜水肿、内源性核酸内切酶所致的 DNA 断裂等。Fas 介导的细胞凋亡在 HT 发病过程中起着重要的作用, Giordano et al<sup>[8]</sup> 发现 Fas 在 HT 患者甲状腺组织中的表达较甲状腺肿患者显著增加,细胞凋亡也明显增加。在凋亡相关受体如 Fas、DR4 和 DR5 等介导的细胞凋亡途径中, caspase-8 可能是关键的启动子,活化后的 caspase-8 能够引发 caspase 蛋白酶级联反应,最终导致细胞凋亡。并且 caspase-8 几乎能激活所有凋亡级联反应下游的 caspase 而诱发凋亡<sup>[9]</sup>。

炎症细胞因子在 HT 的发病过程中起着重要作用<sup>[10-11]</sup>,主要包括 Th1 细胞分泌的 IL-2、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  以及 Th2 细胞分泌的 IL-4、IL-6、IL-13 等。IL-1 家族成员在多种疾病的免疫发病机理中起关键作用,其中细胞因子( IL-1 $\beta$ 、IL-18、IL- $\alpha$ 、IL-33 等) 具有促炎活性。IL-1 $\beta$  是其家族中的一种异构形式,主要由活化的单核细胞和巨噬细胞产生,参与多种疾病的发生发展,如糖尿病、阿尔茨海默病、癫痫等<sup>[12-14]</sup>。本课题组的前期研究<sup>[15]</sup> 显示,尽管 HT 和格雷夫斯病( Graves' disease, GD) 患者血清 IL-1 $\beta$  水平与正常人比较差异无统计学意义,但小样本外周血单个核细胞分离后, HT 患者 IL-1 $\beta$  mRNA 表达高于 GD 患者和正常人,提示 IL-1 $\beta$  可能是参与 HT 而非 GD 发病的炎症因子之一,但目前缺乏相关的大样本临床研究。该研究结果显示 IL-1 $\beta$  上调甲状腺细胞 Fas 的表达,启动 Fas 途径诱导甲状腺细胞凋亡。IL-1 $\beta$  诱导的甲状腺细胞凋亡被 caspase-8 抑制剂所阻遏,提示 IL-1 $\beta$  引起甲状腺细胞的凋亡可能通过 Fas 和 caspase 途径而发挥作用。

### 参考文献

- [1] Lee Y J, Cheon C K, Yeon G M, et al. Melkersson-Rosenthal syndrome with Hashimoto thyroiditis in a 9-year-old girl: an autoimmune disorder[J]. *Pediatr Neurol*, 2014, 50(5): 503-6.
- [2] Inoue N, Watanabe M, Ishido N, et al. Involvement of genes encoding apoptosis regulatory factors (FAS, FASL, TRAIL, BCL2, TNFR1 and TNFR2) in the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases[J]. *Hum Immunol*, 2016, 77(10): 944-51.
- [3] Inoue N, Watanabe M, Nakaguchi A, et al. Functional polymorphisms affecting Th1 differentiation are associated with the severity of autoimmune thyroid diseases [J]. *Endocr J*, 2017, 64(7): 695-703.
- [4] 孙瑞芳, 方泽钦, 郑建廷, 等. Fas 基因在共固定化细胞因子

- TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  诱导 HeLa 细胞凋亡中的表达 [J]. 生物医学工程杂志, 2009, 26(3): 615-9.
- [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] Ibrahim W N, Hasony H J, Hassan J G. Human parvovirus B19 in childhood acute lymphoblastic leukaemia in Basrah [J]. *J Pak Med Assoc*, 2014, 64(1): 9-12.
- [7] 李大鹏. 碘过量通过诱导 Th17 细胞分化促进桥本氏甲状腺炎发病机制的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- [8] 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.
- [9] Chen Q, Zhang H, Wu M, et al. Discovery of a potent hedgehog pathway inhibitor capable of activating caspase8-dependent apoptosis[J]. *J Pharmacol Sci*, 2018, 137(3): 256-64.
- [10] Lu Q, Luo X, Mao C, et al. Caveolin-1 regulates autophagy activity in thyroid follicular cells and is involved in Hashimoto's thyroiditis disease [J]. *Endocr J*, 2018, 65(9): 893-901.
- [11] Nanba T, Watanabe M, Inoue N, et al. Increases of the Th1/Th2 cell ratio in severe Hashimoto's disease and in the proportion of Th17 cells in intractable Graves' disease [J]. *Thyroid*, 2009, 19(5): 495-501.
- [12] 常微微, 姚新明, 梁伟, 等. 血清可溶性肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体、单核细胞趋化蛋白1、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白介素1 $\beta$ 水平的变化及其与2型糖尿病的相关性研究[J]. *中国糖尿病杂志*, 2018, 26(9): 752-5.
- [13] 方剑乔, 朱书秀, 张英, 等. 电针对阿尔茨海默病模型大鼠额叶与海马区磷酸化 P38 丝裂原活化蛋白激酶和白介素-1 $\beta$  mRNA 的影响[J]. *针刺研究*, 2013, 38(1): 35-9.
- [14] Vezzani A, Fujinami R S, White H S, et al. Infections, inflammation and epilepsy [J]. *Acta Neuropathol*, 2016, 131(2): 211-34.
- [15] Sun L, Zhang X, Dai F, et al. Elevated interleukin-4 $\beta$  in peripheral blood mononuclear cells contributes to the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases, especially of Hashimoto thyroiditis [J]. *Endocr Res*, 2016, 41(3): 185-92.

## Research on the mechanism of interleukin-4 $\beta$ induced apoptosis of thyroid cells

Li Anan<sup>1</sup>, Zhang Xiaoxu<sup>1</sup>, Ren Cuiping<sup>2</sup>, et al

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

**Abstract** *Objective* To investigate the interleukin-4 $\beta$  (IL-4 $\beta$ ) induced apoptosis of thyroid cells in Hashimoto thyroiditis (HT) and its potential mechanism. *Methods* ① Factor associated suicide (Fas) mRNA expression in FRTL-5 cells were detected by real-time PCR under different concentration and reacting time of IL-4 $\beta$ . ② The control group, IL-4 $\beta$  group, IL-4 $\beta$  + caspase8 inhibitor (Z-IETD-FMK) group were set up, and the apoptosis rate of each group was analysed by flow cytometry. *Results* ① The result of real-time PCR showed that there was a dose-time dependent relationship between IL-4 $\beta$  and Fas mRNA expression levels of FRTL-5 cells ( $P < 0.05$ ); ② Flow cytometry results showed that compared with the control group, the apoptosis rate of thyroid cells increased after IL-4 $\beta$  induction ( $P < 0.05$ ) and the increase of IL-4 $\beta$ -induced thyroid cell apoptosis was inhibited after combined with Z-IETD-FMK ( $P < 0.05$ ). *Conclusion* IL-4 $\beta$  may induce apoptosis of thyroid cells through Fas and caspase 8 pathways.

**Key words** Hashimoto thyroiditis; apoptosis; interleukin-4 $\beta$ ; FRTL-5 cell; factor associated suicide