

网络出版时间: 2016-1-20 10:32:26 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160120.1032.028.html>

◇ 临床医学研究 ◇

## 凝集素芯片法分析桥本氏甲状腺炎患者外周血 DC 细胞膜糖蛋白的表达

袁媛<sup>1,2</sup> 唐晓磊<sup>3</sup> 张林杰<sup>1</sup>

**摘要** 目的 通过凝集素芯片法筛选桥本氏甲状腺炎(HT)患者外周血树突状细胞(DC)差异表达的膜表面糖蛋白,了解其在HT中的表达变化。方法 通过制备包含有32种凝集素的凝集素芯片对16例HT患者和22例健康者外周血DC细胞膜表面糖蛋白的表达进行分析;凝集素耦联葡聚糖拉下相应差异表达的糖蛋白并进行质谱鉴定;同时应用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)、Western blot法和流式细胞术对HT患者外周血DC中该糖蛋白的mRNA、蛋白表达及Galectin-9<sup>+</sup> DC比例进行分析。最后通过ELISA法检测DC与CD8<sup>+</sup>T细胞孵育上清液中IFN- $\gamma$ 、穿孔素、颗粒酶B浓度。结果 凝集素芯片检测结果显示凝集素脱落酸素(ABA)对应的糖蛋白在HT组显著低于健康组( $P < 0.01$ )。对凝集素ABA耦联葡聚糖拉下后洗脱的蛋白进行质谱鉴定,结果显示,众多洗脱蛋白中半乳糖结合蛋白-9(Galectin-9)所占比例较为丰富;随后通过qRT-PCR和Western blot进一步验证Galectin-9在HT组DC中的表达低于健康组;流式细胞术结果则显示HT组DC Galectin-9<sup>low</sup>比例高于健康组,且其均能

较健康组诱导CD8<sup>+</sup>T细胞产生3种高水平杀伤因子。结论 HT患者外周血Galectin-9<sup>low</sup> DC可能与HT相关。

**关键词** 桥本氏甲状腺炎;树突状细胞;凝集素芯片;半乳糖结合蛋白-9

中图分类号 R 392.12

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)02-0213-05

桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis, HT)是一种常见的自身免疫性甲状腺疾病(autoimmune thyroid diseases, AITD)。研究<sup>[1-2]</sup>表明辅助型T细胞以及T调节细胞(T regulatory cell, Treg)比例或功能失衡均能导致淋巴细胞侵入甲状腺腺体并产生针对自身抗原的抗体。树突状细胞(dendritic cell, DC)作为一种重要的抗原递呈细胞,还兼备调节固有免疫和适应性免疫的功能<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4-6]</sup>表明,外周血DC在系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)、多发性硬化(multiple sclerosis, MS)、自身免疫性甲状腺病(autoimmune thyroid disease, AITD)以及其它恶性疾病发生、发展中发挥着重要作用。自身免疫病患者体内一些异质性DC能够通过分泌高水平的白介素12(interleukin 12, IL-12)和IL-23从而增强Th1和辅助性T细胞17(T helper cell 17, Th17)细胞的免疫反应<sup>[7-8]</sup>。凝集素被广泛用于分析糖复合物上的糖链结构<sup>[9]</sup>。本实验参考ANGELONI S和RIDET JL的方法,应用的凝

2015-11-17 接收

基金项目:安徽高校省级自然科学研究重点项目(编号:KJ2011A167)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学免疫学教研室,合肥 230022

<sup>2</sup>蚌埠医学院第一附属医院核医学科,蚌埠 233004

<sup>3</sup>芜湖市第二人民医院检验科,芜湖 241000

作者简介:袁媛,女,硕士研究生;

张林杰,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: zlj33@vip.sina.com

(5, 50 and 250 ppm). All pregnant mice were sacrificed on GD18. For each litter, the number of live fetuses, dead fetuses and resorptions were counted. Live fetuses in each litter were weighed, crown-rump lengths were examined, and cadmium concentration in maternal serum was detected by GFAAS. **Results** Cadmium concentration in maternal serum was significantly increased in cadmium-exposed (50 and 250 ppm) mice when compared to the controls ( $P < 0.05$ ). No significant difference in maternal weight gain was observed among four groups. Average crown-rump length of fetuses was markedly decreased in cadmium-exposed (50 and 250 ppm) mice as compared with the controls ( $P < 0.05$ ). Moreover, Maternal cadmium exposure (250 ppm) obviously decreased average body weight of fetuses in mice ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Maternal exposure to higher levels of cadmium by drinking water results in fetal growth retardation in mice.

**Key words** cadmium; intrauterine growth retardation; mice; placenta; drinking water

集素芯片基本原理最终获得此生物样品的糖链结构信息<sup>[10]</sup>。该研究拟通过能够与不同糖型特异性结合的各种凝集素与高通量微阵列的优势相结合,对 HT 患者外周血 DC 细胞膜蛋白进行初步研究,旨在发现差异表达的膜糖蛋白,进而探索其差异表达在 AITD 中的意义。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 选取蚌埠医学院第一附属医院核医学科 2014 年 2 月~2014 年 8 月就诊的 AITD 患者。其筛选条件为初次就诊,年龄 25~45(36.8±4.6)岁,男女性别比为 1:1;根据 1975 年 fisher 提出的 5 项诊断指标:① 甲状腺弥漫性肿大;② TGAb、TMAb 阳性;③ 血 TSH 升高;④ 甲状腺扫描有不规则浓聚或稀疏;⑤ 过氯酸钾释放试验阳性。入选 16 名均有 4 项及以上符合;22 名健康者来源于体检人群,年龄 25~45(32.6±5.1)岁,男女性别比为 1:1,均不符合上述 5 项中任何一项。

**1.2 主要试剂及仪器** 32 种凝集素分别购自美国 Sigma 公司、美国 EY 公司和美国 Vector 公司;细胞膜提取试剂盒购自长沙碧云天生物公司;Cy3-NHS 蛋白标记荧光染料购自美国 Lumina 公司;大鼠抗人 Galectin-9 抗体购自美国 Abcam 公司;环氧基芯片、芯片点样仪和芯片扫描仪均购自北京博奥芯片生物有限公司;质谱分析由上海中科新生命有限公司承做。FcR 阻断剂及半抗原(青霉素 G)以及抗青霉素 G 半抗原抗体均购自上海华壹生物公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 外周血 DC 的分离** 使用 Ficoll 分离液分离 HT 组和健康组人群的全血,每组各 100 ml 全血得到  $6 \times 10^8$ /L 外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),加入 FcR 阻断剂以及联有半抗原的抗体混合液,4℃混匀孵育 20 min,3 000 r/min 离心 10 min,洗去多余的半抗原抗体复合物,再以磁珠耦联的针对半抗原的抗体与之 4℃混匀孵育 20 min,通过磁力架吸附后,缓冲液冲洗、收集细胞悬液,即富含 DC 的细胞悬液。将该悬液与磁珠耦联的抗人 CD4<sup>+</sup> 单克隆抗体 4℃混匀孵育 20 min,通过磁力架吸附后弃上清液,将磁珠结合的细胞收集,共计  $1.5 \times 10^7$ /L 细胞<sup>[11]</sup>。

**1.3.2 DC 细胞膜蛋白的荧光标记** 按照购买的 Cy3-NHS 操作说明进行。

**1.3.3 凝集素芯片制备与检测** 将 32 种凝集素使用无菌 PBS 配制为 1 mg/ml,使用芯片点样仪将配

制的凝集素点于环氧基玻片上,4℃、湿度 60% 孵育过夜,封闭液封闭芯片后,加入 Cy3 标记的 DC 细胞膜蛋白,4℃、湿度 60% 孵育 1 h, PBST 洗涤后置入芯片扫描仪检测荧光强度<sup>[12-13]</sup>。

**1.3.4 DC 细胞膜蛋白提取与拉下分析** Sephadex 耦联凝集素 ABA 将提取的细胞膜蛋白调至 5 mg/ml 与 100 μl Sephadex 耦联凝集素 ABA 充分混合,室温下结合 1 h, PBS 洗涤 sephadex 结合物,将其结合蛋白加入 Galβ1,4GalNAc 竞争性洗脱结合的糖蛋白进行质谱鉴定。

**1.3.5 qRT-PCR 检测** 将收集的 DC 使用 TRIzol 处理后提取总 RNA,使用逆转录试剂盒将提取 mRNA 逆转录为 cDNA,设计 Galectin-9 引物(F: 5'-CATCCAAGTCCATCCTCCTGTC-3'; R: 5'-TGAGCTTCACACAAGATCCACAC-3')进行 94℃ 2 min, 94℃ 45 s, 61℃ 40 s, 72℃ 1 min, 共 28 个循环后, 72℃ 5 min;扩增产物为 235 bp,同时设置 β-actin 作为参照。

**1.3.6 DC 膜 Galectin-9 的检测** Western blot: 取每个个体的等量 DC,将 HT 组和健康组检测对象进行组内随机组合,每组个体随机分为 3 个小组,将提取的细胞膜蛋白调至 1 mg/ml,加入等体积上样缓冲液,100℃加热 3 min, SDS-PAGE 电泳后转至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉 4℃封闭过夜,使用大鼠抗人 Galectin-9 抗体结合 37℃ 1 h, HRP-羊抗大鼠 IgG 作为二抗 37℃ 1 h, 每次均需要 TBST 洗涤 3 次,每次 5 min,最后加入化学发光底物显影;流式细胞术:使用 FITC-抗人 CD41c 与 APC-抗人 Galectin-9 与 PBMC 室温下避光孵育 20 min, PBS 洗涤 2 次后上机检测,比较 DC Galectin-9<sup>low</sup> 比例。

**1.3.7 DC Galectin-9<sup>low</sup> 对 CD8<sup>+</sup>T 细胞杀伤作用的影响** 取脐带血分离 CD8<sup>+</sup>T 细胞,将 HT 组和健康组 DC 分别与 CD8<sup>+</sup>T 细胞 1:5 混合,与终浓度 100 ng/ml LPS 共同孵育 12 h,同时设置 CD8<sup>+</sup>T 细胞与 LPS 对照组,使用 ELISA 试剂盒分别检测培养上清中干扰素-γ(interferon-γ, IFN-γ)、穿孔素(Perforin)、颗粒酶 B(Granzyme B)的相对浓度。

**1.4 统计学处理** 使用 SAS 8.0 软件进行统计分析,组间比较使用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 凝集素芯片检测** 芯片经扫描后对荧光值进行计算,结果显示凝集素 AAL、LCA、PTL、RCA120、

GS-I-A4、NPA、ABA、PSA 对应结合 DC 膜表面糖蛋白在 HT 组中表达低于健康组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 而凝集素 STL、DBS、HHA 对应结合 DC 膜表面糖蛋白在 HT 组中表达高于健康组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 比较两组中凝集素结合糖蛋白之间差异, 凝集素 ABA 对应结合的 DC 膜表面糖蛋白的荧光值差异高达 1.89 倍。见图 1。

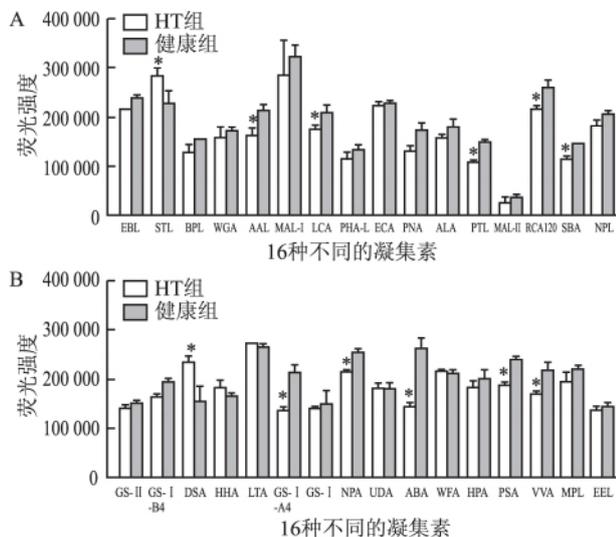


图 1 DC 膜糖链的凝集素芯片检测结果  
与健康组比较: \*  $P < 0.05$

**2.2 拉下检测与鉴定结果** 使用 Gal $\beta$ 1、4GalNAc 竞争性洗脱 sephadex 偶联 ABA 结合的 DC 膜蛋白进行质谱鉴定, 结果显示 Galectin-9 为主要含量蛋白。见图 2。将提取的 DC 膜蛋白与 ABA 结合后剩余蛋白以及竞争洗脱蛋白行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色显示在 35 ku 处有明显条带, 随后使用 Western blot 法鉴定凝集素 ABA 结合的 DC 膜蛋白, 在 34 ku 附近有条带, 与预测分子量大小符合。见图 3。

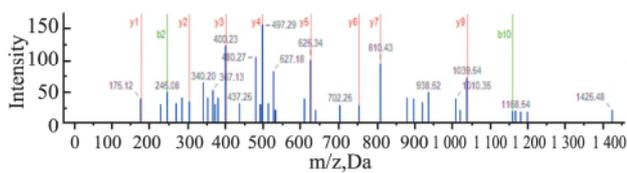


图 2 Galectin-9 蛋白的质谱鉴定图谱

**2.3 qRT-PCR 检测 DC Galectin-9 mRNA 的表达** 将 22 例健康者与 16 例 HT 患者分离获得等量 DC, 使用 TRIzol 裂解后逆转录为 cDNA, 实时荧光定量 PCR 扩增 Galectin-9 和  $\beta$ -actin 基因, 计算结果。数据显示, 健康组 Galectin-9 mRNA 表达显著高于 HT 组, 差异有统计学意义 ( $t = 4.241, P <$

0.01)。见图 4。

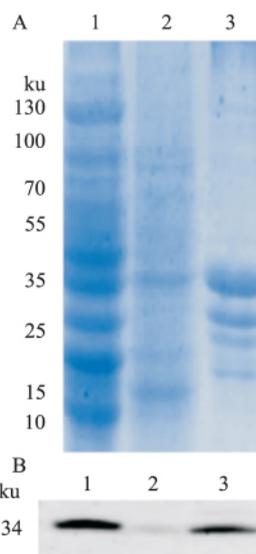


图 3 凝集素 ABA 结合的 DC 膜蛋白鉴定结果

A: SDS-PAGE 鉴定; B: Western blot 鉴定; 1: 提取的 DC 膜蛋白; 2: 凝集素 ABA 结合蛋白后剩余上清液; 3: Gal $\beta$ 1、4GalNAc 竞争性洗脱下来的蛋白

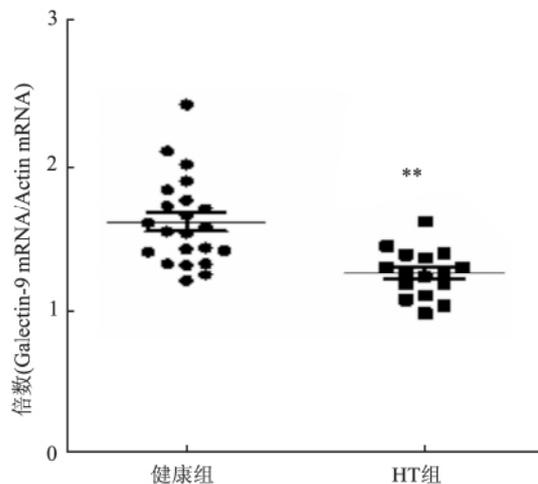


图 4 DC Galectin-9 mRNA qRT-PCR 结果  
与健康组比较: \*\*  $P < 0.01$

**2.4 检测 DC Galectin-9 表达** Western blot 显影后, 密度扫描结果显示健康者 DC 中 Galectin-9 蛋白量高于 HT 患者; 流式细胞术结果显示 HT 患者外周血 DC Galectin-9<sup>low</sup> 比例高于健康者 (24.3% vs 7.5%  $P < 0.01$ ), 见图 5、6。

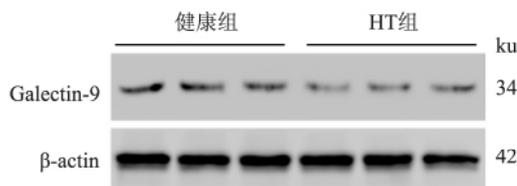


图 5 Western blot 检测 DC 膜表面 Galectin-9 蛋白表达

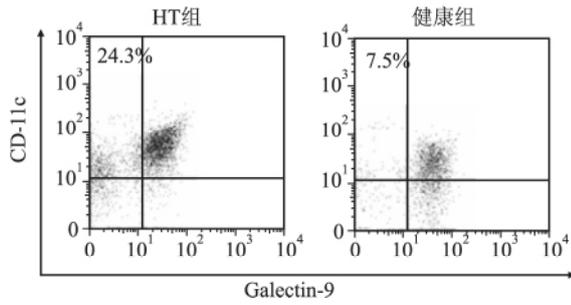


图6 流式细胞术检测 DC 膜表面 Galectin-9 蛋白表达

**2.5 DC Galectin-9<sup>low</sup> 对 CD8<sup>+</sup>T 细胞杀伤作用的影响** DC 与 CD8<sup>+</sup>T 细胞混合,与 LPS 共同孵育后 ELISA 法检测细胞因子水平,结果显示 HT 患者来源的 DC Galectin-9<sup>low</sup> 能够显著促进 CD8<sup>+</sup>T 细胞分泌 IFN- $\gamma$ 、Perforin、Granzyme B ( $P < 0.01$ )。见图 7。

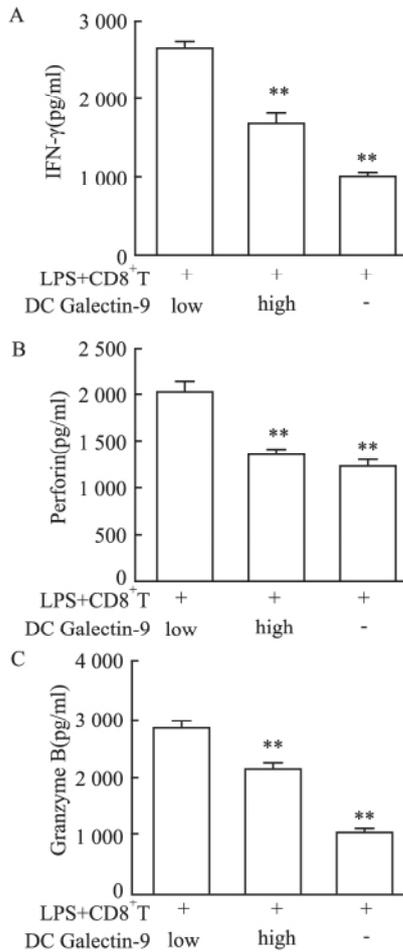


图7 Galectin-9<sup>low</sup> DC 对 CD8<sup>+</sup>T 细胞的杀伤功能影响

A: IFN- $\gamma$ ; B: Perforin; C: Granzyme B; 与 DC Galectin-9<sup>low</sup> 比较: \*\*  $P < 0.01$

### 3 讨论

DC 作为机体内重要的抗原递呈细胞,其表面存在众多有免疫调节性的分子,了解这些 DC 表面分

子对其它免疫细胞功能的影响,进而从 DC 角度阐述该分子对 HT 发生、发展的影响。基于此目的,首先要了解这些表面分子的表达变化,筛选出差异表达分子。因为这些分子多为糖基化蛋白,鉴于蛋白质的种类众多且仍存在许多未知的蛋白分子,本研究依据凝集素与糖的特异性识别,使用凝集素芯片法,对 HT 患者与健康者外周血中 DC 膜糖蛋白表达差异进行比较。该方法具有较高的灵敏度,能够对微小差异进行检测,且有芯片的高通量属性。

凝集素芯片结果显示 ABA 特异性结合的糖蛋白在健康组显著高于 HT 组,因此对 sephadex-ABA 结合的特异性糖蛋白进行质谱分析,发现其中 Galectin-9 含量最为丰富,同时还存在其它一些糖蛋白。Galectin-9 是半乳糖凝集素家族中的一员,有研究<sup>[14-15]</sup>报道其在自身免疫病中能够通过 Tim-3 下调 Th1、Th17,同时能够抑制 Treg 细胞的功能。Galectin-9 在一些炎症和自身免疫病动物模型的研究<sup>[15-16]</sup>中也呈现出了抗炎症的功效。本研究的结果显示,HT 患者 DC Galectin-9<sup>low</sup> 比例较高,推测其可能与 HT 的过度免疫有一定相关性。本研究通过 HT 与健康者外周血 DC 与新生儿脐带血 CD8<sup>+</sup>T 细胞共同培养,以 LPS 作为外刺激,随后在 CD8<sup>+</sup>T 细胞分泌的细胞因子和杀伤毒素层面进行了检测。初步研究结果显示,DC Galectin-9<sup>low</sup> 能够刺激 CD8<sup>+</sup>T 细胞分泌高水平的杀伤因子,提示 Galectin 水平与免疫反应自限性有关。而 DC 细胞表面 Galectin 在 HT 发病过程中发挥作用的机制及其表达的水平与 HT 患者的病情之间的相关性还有待于进一步探索,同时甲状腺腺体内 DC 在 HT 是否也如此,仍亟需解答。

本研究首次运用凝集素芯片技术对 HT 患者 DC 膜糖蛋白差异表达进行了探索,筛选出 Galectin-9 并验证其在 HT 患者与健康者外周血 DC 表达水平的差异,为 HT 体内循环系统 DC 免疫负性调节功能的研究提供了线索。

### 参考文献

- [1] Zivancevic-Simonovic S, Mihaljevic O, Majstorovic I, et al. Cytokine production in patients with papillary thyroid and associated autoimmune Hashimoto thyroiditis [J]. Cancer Immunol Immunother 2015 64(8): 1011-9.
- [2] Li D, Cai W, Gu R, et al. Th17 cell plays a role in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis in patients [J]. Clin Immunol, 2013, 149(3): 411-20.
- [3] Swafford D, Manicassamy S. Wnt signaling in dendritic cells: its

- role in regulation of immunity and tolerance [J]. *Discov Med*, 2015, 19(105): 303–10.
- [4] Jin O, Kavikondala S, Sun L, et al. Systemic lupus erythematosus patients have increased number of circulating plasmacytoid dendritic cells, but decreased myeloid dendritic cells with deficient CD83 expression [J]. *Lupus*, 2008, 17(7): 654–62.
- [5] Stasiolek M, Bayas A, Kruse N, et al. Impaired maturation and altered regulatory function of plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis [J]. *Brain*, 2006, 129(Pt5): 1293–305.
- [6] Faget J, Bendriss-Vermare N, Gobert M, et al. ICOS-ligand expression on plasmacytoid dendritic cells supports breast cancer progression by promoting the accumulation of immunosuppressive CD4<sup>+</sup> T cells [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(23): 6130–41.
- [7] Oppmann B, Lesley R, Blom B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12 [J]. *Immunity*, 2000, 13(5): 715–25.
- [8] Agrawal S, Gupta S, Agrawal A. Human dendritic cells activated via dectin-1 are efficient at priming Th17, cytotoxic CD8 T and B cell responses [J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13418.
- [9] Ambrosi M, Cameron N R, Davis B G. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode [J]. *Org Biomol Chem* 2005, 3(9): 1593–608.
- [10] Angeloni S, Ridet J L, Kusy N, et al. Glycoprofiling with microarrays of glycoconjugates and lectins [J]. *Glycobiology*, 2005, 15(1): 31–41.
- [11] 唐岩, 唐军民, 李银生, 等. 免疫磁珠技术在分离人外周血树突状细胞中的应用 [J]. *解剖学杂志*, 2003, 26(3): 298–300.
- [12] Lei Y, Yu H, Dong Y, et al. Characterization of N-Glycan structures on the surface of mature dengue 2 virus derived from insect cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132122.
- [13] Yang G, Tan Z, Lu W, et al. Quantitative glycome analysis of N-glycan patterns in bladder cancer vs normal bladder cells using an integrated strategy [J]. *J Proteome Res*, 2015, 14(2): 639–53.
- [14] Chou F C, Shieh S J, Sytwu H K. Attenuation of Th1 response through galectin-9 and T-cell Ig mucin 3 interaction inhibits autoimmune diabetes in NOD mice [J]. *Eur J Immunol* 2009, 39(9): 2403–11.
- [15] Seki M, Oomizu S, Sakata K M, et al. Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis [J]. *Clin Immunol* 2008, 127(1): 78–88.
- [16] Arikawa T, Watanabe K, Seki M, et al. Galectin-9 ameliorates immune complex-induced arthritis by regulating Fc gamma R expression on macrophages [J]. *Clin Immunol* 2009, 133(3): 382–92.

## Analysis of glycoprotein in peripheral DC membrane from Hashimoto's thyroiditis by lectin microarray

Yuan Yuan<sup>1,2</sup>, Tang Xiaolei<sup>3</sup>, Zhang Linjie<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Immunology, Anhui Medical University, Hefei 230022; <sup>2</sup>Nuclear Medicine Dept, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004; <sup>3</sup>Clinical Laboratory, The Second People's Hospital of Wuhu, Wuhu 241000)

**Abstract Objective** To analyze the differential expression of cytomembrane glycoprotein of peripheral blood DC between healthy donors and HT patients through lectin microarray and to study their function in HT patients. **Methods** Cytomembrane glycoprotein of peripheral blood DC from 22 healthy donors and 16 HT patients were extracted and then detected by lectin microarray. After that differential glycoprotein-specific-binding lectin coupled sephadex were used to capture the glycoprotein which were then determined by mass spectrum. The expression of Galectin-9 and the proportion of Galectin-9<sup>low</sup> DC were analyzed by qRT-PCR, Western blot and FCM respectively. At last, the secretion of IFN- $\gamma$ , Perforin and Granzyme B in supernatants derived from DC co-culture with CD8<sup>+</sup> T cells were detected by ELISA. **Results** The data of lectin microarray showed that the glycoprotein which specifically bound to lectin ABA was down-regulated in HT patients ( $P < 0.01$ ). All kinds of glycoprotein were identified by mass spectrum and the results showed that there was a great probability that the glycoprotein which specifically bound to lectin ABA was Galectin-9. Lower expression of Galectin-9 in DC from HT patients was observed, and there was a higher proportion of Galectin-9<sup>low</sup> DC in HT patients. There was higher production of IFN- $\gamma$ , Perforin and Granzyme B in CD8<sup>+</sup> T cells which co-cultured with Galectin-9<sup>low</sup> DC from HT patients. **Conclusion** This study suggests Galectin-9<sup>low</sup> DC in peripheral blood associate with Hashimoto's thyroiditis.

**Key words** Hashimoto's thyroiditis; dendritic cell; lectin microarray; Galectin-9