

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.24.012

文章编号: 1005-8982(2017)24-0058-04

新进展研究·论著

Graves 病患者血清 TLR4、NF- κ B 和 Treg/Th17 相关细胞因子表达变化及意义

王建国¹, 史春云², 丑广程¹, 陈占良¹, 冯惠清¹, 王淑仙¹

(1. 河北大学附属医院 检验科, 河北 保定 071000; 2. 河北省保定市儿童医院 内三科, 河北 保定 071051)

摘要:目的 探讨 Graves 病患者血清 Toll 样受体 4(TLR4)、核因子- κ B(NF- κ B)和调节性 T 细胞/辅助性 T 细胞 17(Treg/Th17)相关细胞因子表达变化及意义。**方法** 选取 62 例初步确诊为 Graves 病的患者和 45 例健康者(对照组),采用电化学发光法检测血清中促甲状腺素(TSH)、游离三碘甲状腺原氨酸(FT₃)、游离四碘甲状腺原氨酸(FT₄)和促甲状腺素受体抗体(TRAb)水平,利用双抗体酶联免疫吸附试验(ELISA 法)对血清中 TLR4、NF- κ B、TGF- β ₁、IL-10、IL-6 和 IL-17 水平进行检测。**结果** Graves 病患者血清 TSH 水平低于对照组,而血清 FT₃、FT₄ 和 TRAb 水平则高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);Graves 病患者血清 TLR4、NF- κ B、IL-10、IL-6 和 IL-17 水平均高于对照组,而 TGF- β ₁ 水平则低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);Pearson 相关分析显示,Graves 病患者血清 TSH 与 TLR4、NF- κ B、IL-10、IL-6 和 IL-17 均呈负相关($P < 0.05$),而与 TGF- β ₁ 呈正相关($P < 0.05$),血清 FT₃ 和 FT₄ 均与 TLR4、NF- κ B、IL-10、IL-6 和 IL-17 呈正相关($P < 0.05$),而与 TGF- β ₁ 呈负相关($P < 0.05$);Graves 病患者血清 TLR4 与 NF- κ B 呈正相关($P < 0.05$),且与 IL-10、IL-6 和 IL-17 呈正相关($P < 0.05$),而与 TGF- β ₁ 呈负相关($P < 0.05$)。**结论** Graves 病患者血清 TLR4、NF- κ B、IL-10、IL-6 和 IL-17 水平升高,而 TGF- β ₁ 水平降低,NF- κ B 信号通路激活和 Treg/Th17 平衡失调可能共同参与 Graves 病发病过程。

关键词: Graves 病;Toll 样受体 4;核因子- κ B;调节性 T 细胞/辅助性 T 细胞 17;细胞因子

中图分类号: R581.4

文献标识码: A

Involvement of circulating TLR4, NF- κ B and Treg/Th17 related cytokines in Graves' disease

Jian-guo Wang¹, Chun-yun Shi², Guang-cheng Chou¹, Zhan-liang Chen¹,
Hui-qing Feng¹, Shu-xian Wang¹

(1. Department of Laboratory, Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding, Hebei 071000, China; 2. Department of Children's Internal Medicine, Baoding Children's Hospital, Baoding, Hebei 071051, China)

Abstract: Objective To investigate the concentration of Toll-like receptor 4 (TLR4), nuclear factor κ B (NF- κ B) and regulatory T cells (Treg) / T helper cell 17 (Th17) related cytokines in patients with Graves' disease and their potential correlations. **Methods** A total of 62 patients initially diagnosed with Graves' disease and 45 healthy volunteers were involved in this study. The serum levels of thyroid stimulating hormone (TSH), free triiodothyronine (FT₃), free tetraiodothyronine (FT₄) and thyrotropin receptor antibody (TRAb) were measured by Electrochemiluminescence. The serum levels of TLR4, NF- κ B, transforming growth factor β (TGF- β), interleukin 10 (IL-10), interleukin 6 (IL-6) and interleukin 17 (IL-17) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The serum levels of TSH in patients were increased while FT₃, FT₄ and TRAb were decreased significantly when compared with those in volunteers ($P < 0.05$). Blood

收稿日期: 2017-02-20

[通信作者] 王淑仙, E-mail: 402767260@qq.com; Tel: 13111666605

concentration of TLR4, NF- κ B, IL-10, IL-6 and IL-17 in patients was upregulated while concentration of TGF- β_1 was downregulated in comparison with the healthy control group ($P < 0.05$). Pearson correlation analysis showed that TSH was negatively correlated with TLR4, NF- κ B, IL-10, IL-6 and IL-17 ($P < 0.05$), but positively correlated with TGF- β_1 ($P < 0.05$). FT₃ and FT₄ were positively correlated with TLR4, NF- κ B, IL-10, IL-6 and IL-17, but negatively correlated with TGF- β_1 ($P < 0.05$). TLR4 was positively correlated with NF- κ B, IL-10, IL-6 and IL-17 ($P < 0.05$), but negatively correlated with TGF- β_1 ($P < 0.05$). **Conclusions** The serum levels of TLR4, NF- κ B, IL-10, IL-6 and IL-17 in patients with Graves' disease are increased while level of TGF- β_1 is decreased. Activation of NF- κ B signaling pathway and Treg/Th17 imbalance might be involved in the pathogenesis of Graves' disease.

Keywords: Graves' disease; toll-like receptor 4; nuclear factor kappa B; CD4⁺, CD25⁺ regulatory T cells/ T helper cell 17; cytokines

Graves 病作为临床常见病和多发病,是一种器官特异性免疫性疾病,约 80%~86% 的甲状腺功能亢进症(甲亢)是由该病引起,并可导致多器官损害^[1],该病发病年龄不具有特异性,且近年来发病率呈上升趋势,严重影响患者生存质量^[2]。目前,该病发生机制尚未完全清楚,有研究指出^[3],细胞免疫功能紊乱与 Graves 病发生及进展密切相关。而免疫细胞发挥作用则主要是通过相关细胞因子发挥作用^[4],有研究指出^[5],Toll 样受体 4(toll-like receptor 4,TLR4)、核因子 κ B(nuclear factor kappa B,NF- κ B)信号通路在自身免疫性疾病发生中发挥重要作用。CD4⁺、CD25⁺ 调节性 T 细胞(CD4⁺、CD25⁺ regulatory T cells,Treg)/ 辅助性 T 细胞 17 (T helper cell 17, Th17)作为新近发现的 CD4⁺ 细胞重要的亚群,其平衡在免疫调节及与免疫相关疾病发生中发挥重要作用^[6]。本研究拟对初诊 Graves 病患者血清 TLR4、NF- κ B 和 Treg/Th17 相关细胞因子表达水平进行分析,探讨该病发病中的意义,以期为临床实践提供基础资料。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2015 年 2 月 -2016 年 8 月在本院确诊为 Graves 病的患者 62 例。其中,男性 22 例,女性 40 例;平均年龄(38.7 \pm 10.6)岁。病例纳入标准:①均符合《中国甲状腺疾病诊治指南》^[7];②年龄 19~65 岁;③均未接受过 Graves 病相关治疗。排除标准:①既往糖尿病史、肝功能异常和血液系统疾病者;②合并其他自身免疫系统疾病者;③急慢性感染、恶性肿瘤、妊娠和过敏性疾病,以及近 30 d 内使用过糖皮质激素者。同期,从医院体检中心选取健康者 45 例作为对照组,均排除甲状腺疾病和家族史者、自身免疫性疾病者和使用免疫抑制剂者。其中,男性 17 例,

女性 28 例;平均年龄(39.4 \pm 11.2)岁。本研究通过医院伦理委员会批准,所有患者均行知情同意。

1.2 方法

1.2.1 样本采集 所有研究对象均抽取晨起空腹静脉血 6 ml,<30 min 于 3 000 r/min 离心 15 min,留取血清,置于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻保存备检。

1.2.2 实验室检测 采用电化学发光法检测血清中甲状腺激素[促甲状腺素(thyrotropin,TSH)、游离三碘甲状腺原氨酸(free triiodothyronine,FT₃)、游离四碘甲状腺原氨酸(free tetraiodothyronine,FT₄)和促甲状腺素受体抗体(thyrotropin receptor antibody,TRAb)]水平,利用双抗体酶联免疫吸附试验(ELISA 法)对血清中 TLR4、NF- κ B、人转化生长因子 β_1 (human transforming growth factor beta1,TGF- β_1)、白细胞介素 10(interleukin,IL-10)、IL-6 和 IL-17 水平进行检测,试剂盒购自上海酶远生物公司,所有操作均按照试剂盒说明书在标准实验室内完成。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,比较采用 t 检验,计数资料以率(%)表示,比较用 χ^2 检验,相关分析用 Pearson 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料和甲状腺功能

Graves 病患者和对照组在性别、年龄差异无统计学意义($P > 0.05$),Graves 病患者血清 TSH 水平低于对照组,而血清 FT₃、FT₄ 和 TRAb 水平则高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 两组血清 TLR4、NF- κ B、TGF- β_1 、IL-10、IL-6 和 IL-17 水平

Graves 病患者血清 TLR4、NF- κ B、IL-10、IL-6 和 IL-17 水平均高于对照组,而 TGF- β_1 水平则低

于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 甲状腺功能与血清 TLR4、NF- κ B 和 Treg/Th17 的相关性

Pearson 相关分析显示,Graves 病患者血清 TSH 与 TLR4、NF- κ B、IL-10、IL-6 和 IL-17 均呈负相关($P < 0.05$),而与 TGF- β_1 呈正相关($P < 0.05$);血清 FT₃ 和 FT₄ 均与 TLR4、NF- κ B、IL-10、IL-6 和 IL-17

呈正相关($P < 0.05$),而与 TGF- β_1 呈负相关($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 Graves 病患者血清 TLR4、NF- κ B 与 Treg/Th17 相关细胞因子的相关性

Graves 病患者血清 TLR4 与 NF- κ B 呈正相关($P < 0.05$),且均与 IL-10、IL-6 和 IL-17 呈正相关($P < 0.05$),而与 TGF- β_1 呈负相关($P < 0.05$)。见表 4。

表 1 两组一般资料和甲状腺功能比较

组别	例数	男/女	年龄/(岁, $\bar{x} \pm s$)	TSH/(mIU/L, $\bar{x} \pm s$)	FT ₃ /(pmol/L, $\bar{x} \pm s$)	FT ₄ /(pmol/L, $\bar{x} \pm s$)	TRAb/(IU/L, $\bar{x} \pm s$)
Graves 病	62	22/40	38.70 \pm 10.60	0.04 \pm 0.01	24.18 \pm 8.65	56.27 \pm 11.32	28.96 \pm 4.87
对照组	45	17/28	39.40 \pm 11.20	1.92 \pm 0.53	4.85 \pm 0.46	11.89 \pm 1.85	1.32 \pm 0.14
t/χ^2 值		0.059	0.705	32.494	13.577	24.000	36.019
P 值		0.808	0.241	0.000	0.000	0.000	0.000

表 2 两组血清 TLR4、NF- κ B、TGF- β_1 、IL-10、IL-6 和 IL-17 比较

组别	例数	TLR4/(ng/ml, $\bar{x} \pm s$)	NF- κ B/(ng/ml, $\bar{x} \pm s$)	TGF- β_1 /(ng/L, $\bar{x} \pm s$)	IL-10/(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)	IL-6/(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)	IL-17/(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)
Graves 病	62	2.71 \pm 1.03	0.87 \pm 0.14	7.85 \pm 1.62	20.35 \pm 4.16	71.48 \pm 15.17	125.91 \pm 24.74
对照组	45	1.03 \pm 0.12	0.25 \pm 0.07	17.62 \pm 3.48	2.43 \pm 1.57	48.67 \pm 13.25	85.17 \pm 18.35
t 值		9.654	29.849	20.370	28.878	5.834	10.927
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表 3 甲状腺功能与血清 TLR4、NF- κ B 和 Treg/Th17 的相关性

指标	TLR4	NF- κ B	TGF- β_1	IL-10	IL-6	IL-17
TSH	-0.357	-0.308	0.364	-0.418	-0.506	-0.524
FT ₃	0.295	0.314	-0.287	0.386	0.447	0.492
FT ₄	0.318	0.332	-0.301	0.402	0.492	0.503

表 4 Graves 病患者血清 TLR4、NF- κ B 与 Treg/Th17 相关细胞因子的相关性

指标	TLR4	NF- κ B	TGF- β_1	IL-10	IL-6	IL-17
TLR4	-	0.517	-0.372	0.414	0.357	0.462
NF- κ B	0.517	-	-0.405	0.398	0.402	0.493

3 讨论

Graves 病发病较为复杂,是环境、遗传和自身免疫功能紊乱等多种因素导致的甲状腺发生特异性自身免疫反应,出现弥漫性甲状腺肿,甲状腺功能亢进^[9]。本研究对初次确诊而未治疗的 Graves 病患者甲状腺功能检测发现,Graves 病患者血清 TSH 水平低于对照组,而血清 FT₃、FT₄ 和 TRAb 水平则高于对照组,说明 Graves 病患者出现甲状腺功能紊乱,且血清中出现 TRAb 等自身抗体,提示免疫功能异常参与 Graves 病发病过程。

TLR4 作为 I 型跨膜糖蛋白,可与相应的受体结合,在下游信号传导中发挥重要作用,参与细菌感染

及自身免疫性疾病的发生^[9]。有研究指出^[10],TLR4 引发的胞内信号通路可导致 NF- κ B 活化,激活炎症转录程序,进而大量释放细胞炎症因子,产生级联炎症反应。NF- κ B 几乎在所有类型细胞及组织中均存在,在多种炎症反应信号通路中发挥重要作用,是调节炎症反应和免疫反应的关键性核转录因子^[11]。本研究显示,Graves 病患者血清 TLR4、NF- κ B 水平均高于对照组,说明 TLR4/NF- κ B 可能参与 Graves 病发病过程,相关分析亦显示,Graves 病患者血清 TLR4 与 NF- κ B 呈正相关,血清 TSH 与 TLR4、NF- κ B 均呈负相关血清 FT₃ 和 FT₄ 均与 TLR4、NF- κ B 呈正相关,进一步说明 TLR4/NF- κ B 信号通路介导的炎

症反应可能参与 Graves 病发病及进展过程。

Treg 作为维持免疫稳态的重要细胞,可通过细胞接触或分泌如 TGF- β 、IL-10 等相关细胞因子,而在负性调节免疫应答、维持免疫耐受及防止自身免疫发生中发挥重要作用^[12],Th17 作为 CD4⁺T 细胞中不同于 Th1、Th2 的细胞亚群,可被 TGF- β 等诱导分化,同时被 IL-6 增强,可通过产生 IL-17 而参与感染性疾病及免疫系统疾病发生^[13]。研究表明^[14],Treg/Th17 动态平衡维持免疫功能的稳定。本研究显示,Graves 病患者血清 IL-10、IL-6 和 IL-17 水平均高于对照组,而 TGF- β_1 水平则低于对照组,间接反映出 Graves 病患者 Treg/Th17 动态平衡可能被打破,出现自身免疫抑制功能下降,但血清中 IL-10 水平未降低反而升高,笔者分析,可能是 Treg 虽可分泌 IL-10,但并非 IL-10 的唯一来源,Th2 及 Th9 细胞亦可以分泌 IL-10^[15],从而导致血清中 IL-10 水平不升反降。Pearson 相关分析显示,Graves 病患者血清 TSH 与 IL-10、IL-6 和 IL-17 均呈负相关,而与 TGF- β_1 呈正相关,血清 FT₃ 和 FT₄ 均与 TLR4、NF- κ B、IL-10、IL-6 和 IL-17 呈正相关,而与 TGF- β_1 呈负相关,进一步说明了 Treg/Th17 分泌的细胞因子参与 Graves 病发病过程,可能与 Graves 病病程进程密切相关。有研究指出^[16],IL-17 和 NF- κ B 信号通路相互关系,IL-17 可激活 NF- κ B 信号通路而诱导炎症因子的释放,参与类风湿性关节炎的发生。有研究指出^[17],Th17/IL-23 通路是经由 NF- κ B 而参与银屑病致病。本研究相关分析显示,Graves 病患者血清 TLR4 与 NF- κ B 呈正相关,且均与 IL-10、IL-6 和 IL-17 呈正相关,而与 TGF- β_1 呈负相关,说明 TLR4/NF- κ B 信号通路参与 Graves 病发病过程,同时 Treg/Th17 产生的相关细胞因子亦可能通过 NF- κ B 信号通路而参与 Graves 病发病,但具体作用机制尚待进一步研究明确。

综上所述,Graves 病患者血清 TLR4、NF- κ B、IL-10、IL-6 和 IL-17 水平升高,而 TGF- β_1 水平降低,NF- κ B 信号通路激活和 Treg/Th17 平衡失调可能共同参与 Graves 病发病过程,但具体相互作用机制有待进一步明确。

参 考 文 献:

- [1] WANG L, WANG B, CHEN S R, et al. Effect of selenium supplementation on recurrent hyperthyroidism caused by Graves' disease: a prospective pilot study[J]. *Horm Metab Res*, 2016, 48(9): 559-564.
- [2] HIROMATSU Y, EGUCHI H, TANI J, et al. Graves' ophthalmopathy: epidemiology and natural history[J]. *Intern Med*, 2014, 53(5): 353-360.
- [3] BURCH H B, COOPER D S. Management of Graves disease: A review[J]. *JAMA*, 2015, 314(23): 2544-2554.
- [4] QUISPEL W T, STEGEHUIS-KAMP J A, SANTOS S J, et al. Activated conventional T-cells are present in langerhans cell histiocytosis lesions despite the presence of immune suppressive cytokines[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2015, 35(10): 831-839.
- [5] SHEN W, GAO Y, LU B, et al. Negatively regulating TLR4/NF- κ B signaling via PPAR α in endotoxin-induced uveitis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842(7): 1109-1120.
- [6] BARBI J, PARDOLL D, PAN F. Metabolic control of the Treg/Th17 axis[J]. *Immunol Rev*, 2013, 252(1): 52-77.
- [7] 单忠艳.《中国甲状腺疾病诊治指南》导读[J]. *中国实用内科杂志*, 2008, 28(4): 260-261.
- [8] LI H X, XIANG N, HU W K, et al. Relation between therapy options for Graves' disease and the course of Graves' ophthalmopathy: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Endocrinol Invest*, 2016, 39(11): 1225-1233.
- [9] LIU Y, YIN H, ZHAO M, et al. TLR2 and TLR4 in autoimmune diseases: a comprehensive review[J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2014, 47(2): 136-147.
- [10] BARTUZI P, HOFKER M H, van de SLUIS B. Tuning NF- κ B activity: a touch of COMMD proteins[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1832(12): 2315-2321.
- [11] PANDAY A, INDA M E, BAGAM P, et al. Transcription factor NF- κ B: an update on intervention strategies[J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2016, 64(6): 463-483.
- [12] CAPRARA C, KINSEY G R, CORRADI V, et al. The influence of hemodialysis on T regulatory cells: a meta-analysis and systematic review[J]. *Blood Purif*, 2016, 42(4): 307-313.
- [13] SMITH J A, COLBERT R A. Review: the interleukin-23/interleukin-17 axis in spondyloarthritis pathogenesis: Th17 and beyond[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66(2): 231-241.
- [14] KUMAR P, SUBRAMANIAM G. Molecular underpinnings of Th17 immune-regulation and their implications in autoimmune diabetes[J]. *Cytokine*, 2015, 71(2): 366-376.
- [15] SIMONOVIC S Z, MIHALJEVIC O, MAJSTOROVIC I, et al. Cytokine production in peripheral blood cells of patients with differentiated thyroid cancer: elevated Th2/Th9 cytokine production before and reduced Th2 cytokine production after radioactive iodine therapy[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2015, 64(1): 75-82.
- [16] 郭江燕,高梓珊,姜姝姝,等. IL-17 和 NF- κ B 通路类风湿性关节炎的相关性研究 [J]. *长春中医药大学学报*, 2015, 31(1): 192-194.
- [17] 徐可佳. 银屑病全基因组关联的易感基因和信号通路的研究进展[J]. *重庆医学*, 2016, 45(26): 3725-3727.