

PDGF-BB 在 Graves 病患者外周血中的表达及意义

刘莹¹, 刘金涛², 高转转¹, 汪婧¹, 江峰¹

(皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 1.超声医学科; 2.麻醉科, 安徽 芜湖 241001)

【摘要】目的: 检测 PDGF-BB 在 Graves 病患者外周血中的表达, 探讨 PDGF 在 Graves 病进展中的作用和机制。方法: 收集 Graves 病患者外周血样本 41 例以及健康人群外周血样本 41 例。ELISA 法检测 PDGF-BB、HIF-1 α 的浓度; 流式细胞术检测两组外周血样本中单核巨噬细胞 CCR2 的表达。结果: PDGF-BB、HIF-1 α 在 Graves 病患者和健康人群外周血中均有表达。与健康对照组相比, PDGF-BB、HIF-1 α 在 Graves 病患者血清中的浓度增高, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。进一步流式细胞术检测显示, Graves 病患者外周血中 CCR2 阳性巨噬细胞的比例高于健康对照组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论: Graves 病患者体内 CCR2 巨噬细胞可能通过 HIF-1 α 途径促进 PDGF-BB 的表达, 而 PDGF-BB 的高表达则可能是引起 Graves 病进展的重要参与因素。

【关键词】血小板衍生生长因子; Graves 病; 巨噬细胞; 免疫

【中图分类号】R 581.1 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2016.04.013

PDGF-BB expression and its implications in the peripheral blood of patients with Graves' disease

LIU Ying, LIU Jintao, GAO Zhuanzhuan, WANG Jing, JIANG Feng

Department of Ultrasound, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

【Abstract】Objective: To determine the expression of platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) in peripheral blood of patients with Graves' disease, and investigate the mechanism of this factor in pathogenesis of Graves' disorder. **Methods:** Peripheral blood was obtained respectively from 41 patients with Graves' disease and 41 healthy subjects. ELISA was used to determine the blood concentration of PDGF-BB and HIF-1 α , and flow cytometry was performed to detect the expression of CCR2. **Results:** PDGF-BB and HIF-1 α were expressed in the peripheral blood of the two groups, yet the concentration of PDGF-BB and HIF-1 α was significantly elevated in the blood from patients with Graves' disease($P < 0.05$). Flow cytometry detection further indicated that patients with Graves' disease had higher level of CCR2-positive macrophages in peripheral blood than the healthy controls($P < 0.05$). **Conclusion:** CCR2-positive macrophages may induce the expression of PDGF-BB through HIF-1 α signal, and high PDGF-BB expression may be involved in the pathogenesis of Graves' disease.

【Key words】 PDGF; Graves' disease; macrophages; immunology

Graves 病(graves' disease, GD) 属于自身免疫性疾病, 目前针对该疾病的研究主要聚焦于其免疫学发病机制。血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF) 属于血管内皮生长因子家族, 其中 PDGF-BB 是 PDGF 家族中类似 VEGF 的分子^[1], 具有极强的促纤维化、促平滑肌生长以及促血管新生的能力^[2]。研究发现, PDGF-BB 可能参与到 Graves 病发病的病理过程^[3], 但 PDGF-BB 在 Graves 病患者外周血的表达情况鲜见报道。因此本研究选择 Graves 病患者为研究对象, 通过测定其血清中 PDGF-BB 的表达含量以及其可能的诱导因素,

探讨 Graves 病与 PDGF-BB 在外周血中表达的相关性, 为 Graves 病的防治提供有价值的实验依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象 2013 年 10 月~2015 年 6 月由超声科初诊并经内分泌科确诊的 Graves 病初发住院患者 41 例, 其中女性 24 人, 男性 17 人, 平均年龄(34 ± 12.6) 岁。健康人群样本来自本院体检中心 41 例, 女性 27 人, 男性 14 人, 平均年龄(36 ± 10.3) 岁。两组间年龄差异无统计学意义。Graves 病的诊断标准^[4]: ①临床甲亢症状和体征; ②甲状腺弥漫性肿

收稿日期: 2015-09-29

作者简介: 刘莹(1989-), 女, 2013 级硕士研究生, (电话) 15155368229, (电子信箱) sag1002@126.com;

江峰, 男, 主任医师, 硕士生导师, (电子信箱) yjsjf@126.com, 通信作者。

大(经临床触诊和超声证实),少数病例可以无肿大;③血清 TSH 降低,甲状腺激素升高;④眼球突出和其他浸润性眼征;⑤胫前黏液性水肿;⑥ TRAb 或 TSAb 阳性。以上标准中,①~③项为诊断必备条件,④~⑥项为诊断辅助条件。

1.2 主要试剂 小牛血清(calf serum,CS)、PBS 缓冲液购自美国 GIBCO 公司;PDGF-BB 以及 HIF-1 α ELISA 检测试剂盒购自美国 R&D 公司;PE 标记兔抗人 CCR2、FITC 标记兔抗人 CD68 抗体以及同型对照抗体 IgG 购自美国 BD 公司;溶血剂购自美国 Invitrogen 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 主要仪器 百胜 Mylab90 型超声仪;Beckman FC500 型流式细胞仪;酶标仪;离心机。

1.4 方法

1.4.1 彩超诊断 Graves 病 采用百胜 Mylab90 型超声仪,高频线阵探头,频率 8~13 MHz。患者取仰卧位,充分暴露检查区域,进行纵切面、横切面检查。彩超观察甲状腺大小、形态、回声特点、血流信号及周围组织情况,取标准切面分别测量左右叶前后径、上下径、左右径、峡部厚度,以及甲状腺上动脉收缩期峰值流速 PSV、阻力指数 RI。

1.4.2 外周血样本的采集 用抗凝管收集患者外周血样本约 2 mL。1800 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,用移液器收集上层澄清的血清,-80 $^{\circ}$ C 低温保存,用于后续的 ELISA 实验。抗凝管中剩余的血细胞经红细胞裂解液处理 10 min。加入 1 mL 蒸馏水混匀,1800 r/min,常温下离心 5 min,红细胞发生裂解,溶于蒸馏水中。倒出蒸馏水,获取的细胞沉淀为混合的单个核细胞,用于后续的流式细胞术检测。

1.4.3 ELISA 法测定外周血血清中 PDGF-BB 以及 HIF-1 α 的表达 外周血血清样本的检测按 R&D 公司 ELISA 试剂盒操作说明进行。操作完成后,ELISA 检测仪检测 450 nm 波长的吸光度(A_{450})值。通过标准蛋白曲线的制定,计算各个样本 A_{450} 值所对应的浓度值。

1.4.4 流式细胞术检测外周血单核巨噬细胞 CCR2 的表达 外周血样本经红细胞裂解液处理 10 min,1800 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,清除破碎的红细胞。将细胞调成 2×10^5 /mL 浓度的细胞悬液,每个试验反应细胞数为 5×10^4 ;将一份标本分成 2 份(其中 1 份作为同型对照)细胞悬液中加入目标抗体 CD68 以及 CCR2 4 $^{\circ}$ C 避光反应 30 min。同型对照组加入兔 IgG 同型对照。反应结束后,PBS 离心洗涤,制备成悬液上流式细胞仪检测。

1.4.5 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件进行

统计分析。计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验分析;计数资料采用 χ^2 检验分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 受试者临床基本情况 41 例 Graves 病患者均有心动过速、心悸、食欲亢进等高代谢综合征。甲状腺明显肿大。有 37 例患者出现了不同程度的突眼,发生率 90.2%,其中 1 例为浸润性,发生率 2.4%。患者血游离 T3、T4 均高于正常值,其中 7 例明显增高, >30.80 pmol/L。41 例中促甲状腺激素受体刺激性抗体(TSAb)阳性率为 95%。健康对照组各项指标均正常。

2.2 患者超声检查结果 二维超声显示,Graves 病组患者甲状腺体积明显增大(峡部一般无明显增厚)形态饱满,包膜完整,边界清晰,回声增强,分布均匀。彩色多普勒示甲状腺腺体内血流丰富,血流信号明显增多且呈搏动闪烁亮点“火海征”(图 1A)。甲状腺上动脉扩张(正常内径 <2 mm),脉冲多普勒可探及高速低阻湍流频谱(图 1B)。

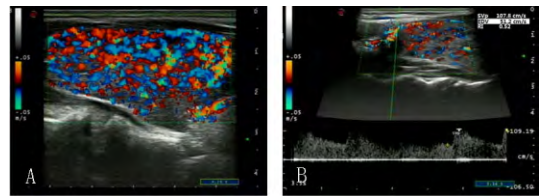


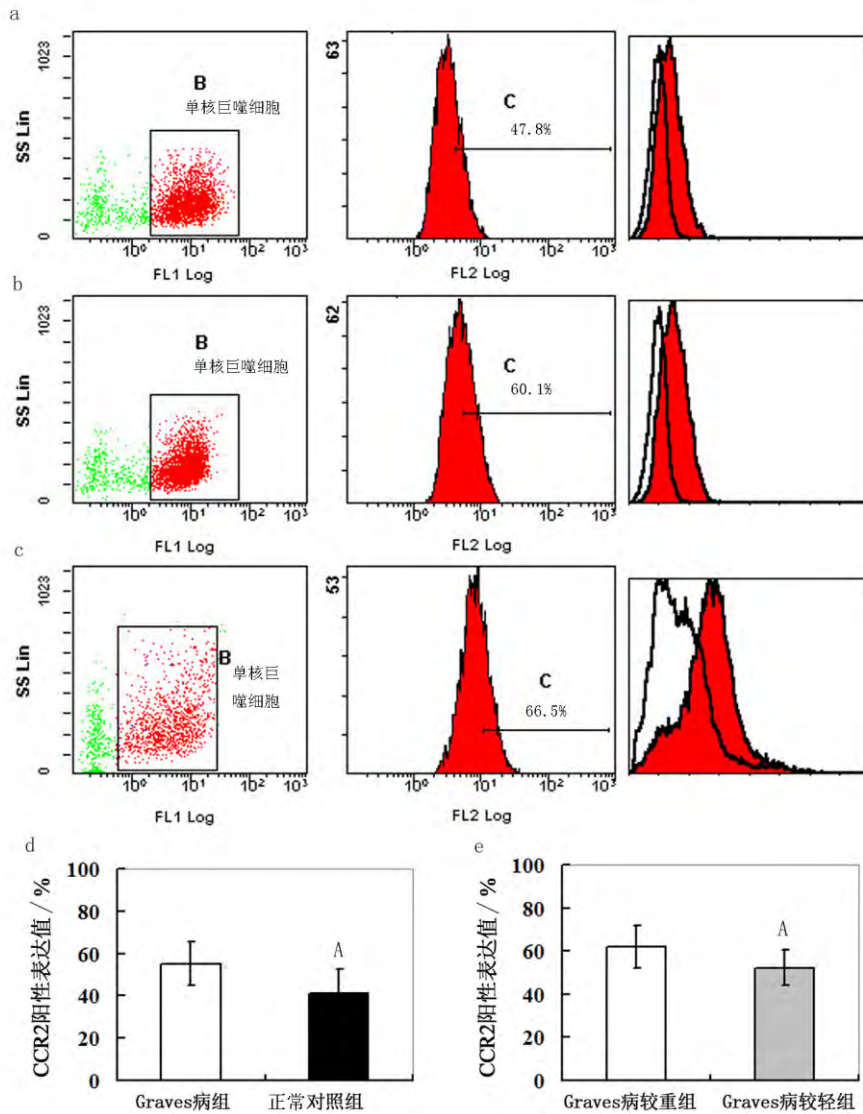
图 1 Graves 病患者甲状腺彩色多普勒及脉冲多普勒超声声像图表现

2.3 外周血中 PDGF-BB 以及 HIF-1 α 的表达 ELISA 检测结果显示,Graves 病组患者外周血血清中 PDGF-BB 及 HIF-1 α 的浓度分别为(189.16 ± 22.37) pg/mL、(239.69 ± 32.97) pg/mL;健康对照组血清中 PDGF-BB 及 HIF-1 α 的浓度分别为(121.12 ± 29.38) pg/mL、(106.45 ± 44.39) pg/mL。Graves 病组 PDGF-BB、HIF-1 α 浓度明显高于对照组,对应 *t* 值分别为 3.696、3.651, P 值分别为 0.021、0.022,差异有统计学意义($P < 0.05$)。统计显示,T3 值最高的 7 例患者血清中 PDGF-BB 以及 HIF-1 α 的浓度为(241.35 ± 51.22) pg/mL、(287.32 ± 37.46) pg/mL,高于 Graves 病患者血清的平均值。分别对 PDGF-BB、HIF-1 α 浓度进行组内比较,与其他 34 例 Graves 病比较, t 值分别为 3.374、3.640, P 值分别为 0.028、0.022,7 例患者血清中 PDGF-BB 以及 HIF-1 α 的浓度升高趋势差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 外周血中单核巨噬细胞 CCR2 的表达 通过

对 41 例 Graves 病组患者以及健康对照组各外周血样本的流式检测,发现外周血单个核细胞中 CD68 的表达比例达到(13.19±4.55) % ,阳性细胞即为巨噬细胞。以 CD68 的阳性率设门,检测 CCR2 的表达。结果显示:健康对照组 CCR2 的阳性率为(41.21±11.26) % (图 2a) ,Graves 病组患者 CCR2 的表达率为(55.25±10.44) % (图 2b) 。Graves 病组 CCR2 的表达高于对照组, *t* 值为 3.280, *P* 值为

0.031, 差异有统计学意义(*P*<0.05) (图 2d) 。统计显示, T3 值最高的 7 例患者外周血中 CCR2 的表达为(62.16±9.85) % (图 2c) ,高于 Graves 病患者的平均值。进行组内统计,与其他 34 例 Graves 病比较, *t* 值为 2.921, *P* 值为 0.043, 7 例患者外周血中 CCR2 的表达的升高趋势差异具有统计学意义(*P*<0.05) (图 2e) 。



a: 正常对照组 b: Graves 病组 c: Graves 病较重组; FL1 Log 为 FITC(异硫氰酸荧光素) 荧光通道, FL2 Log 为 PE(藻红蛋白) 荧光通道; a、b、c 中红色圈 B 内为阳性巨噬细胞, C 的百分比为 CCR2 的阳性表达值; d、e 中 A 表示两组之间差异具有统计学意义(*P*<0.05) 。

图 2 外周血中阳性巨噬细胞 CCR2 表达的测定

2.5 PDGF-BB 与阳性巨噬细胞 CCR2 表达的相关性检验 本研究对 Graves 病组患者以及健康对照组的 PDGF-BB 表达值与阳性巨噬细胞 CCR2 表达值进行了相关性分析,统计结果显示 r^2 值为 0.5777 (图 3) ,提示 PDGF-BB 表达与阳性巨噬细胞 CCR2 表达呈正相关。

3 讨论

本文研究 PDGF-BB 在 Graves 患者外周血的表达情况,同时分析其表达变化的可能机制,证实 PDGF-BB 在 Graves 患者外周血中表达呈升高趋势,其升高水平可能与外周血内 HIF-1 α 的升高引起 CCR2 阳性巨噬细胞增生活跃、促进 VEGF、PDGF-

BB 分泌等作用相关。目前分子靶向治疗是临床控制疾病发展的重要手段。PDGF-BB 分子在 Graves 患者外周血中的异常表达,为临床以 PDGF-BB 为分子靶点,通过阻抑其分子信号通路,达到有效控制疾病的治疗方法提供有价值的实验依据。

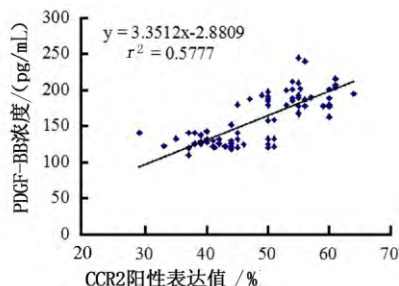


图3 PDGF-BB 表达与阳性巨噬细胞 CCR2 表达的相关性

Graves 病是临床上较难根治的疾病之一,其重要表现是甲亢。甲亢能加剧机体的免疫紊乱,免疫调节紊乱又能反过来加重甲状腺毒症,形成恶性循环^[5]。国外有研究发现 PDGF-BB 参与 Graves 病的发病过程^[6],研究数据分析得出,PDGF-BB 可被视为 Graves 病尤其是 Graves 眼病病理生理过程的重要调控因子。但 PDGF-BB 在患者外周血中表达情况以及其具体作用机制还有待进一步深入研究。因此,本试验首先检测了 PDGF-BB 在患者外周血中的表达情况,与对照组比较,Graves 病患者外周血中 PDGF-BB 的表达显著升高。而在 Graves 病患者之间进行比较,疾病进展较严重的患者外周血 PDGF-BB 的表达高于症状较轻的患者。结果表明,PDGF-BB 在外周血中表达的高低可能与 Graves 病发生发展相关。

PDGF-BB 表达的变化可能与 Graves 病的免疫调节紊乱相关,巨噬细胞具有异质性。目前已知高表达 CX3CR1 的阳性巨噬细胞能分泌 ADAMTS-1、TSP-1 等物质拮抗高表达 CCR2 的阳性巨噬细胞的作用^[7]。两者的平衡是维持免疫稳定的重要因素。本试验检测发现 Graves 病患者外周血中 CCR2 阳性巨噬细胞的表达比例显著升高,同时疾病严重的患者外周血中 CCR2 阳性巨噬细胞比例也高于疾病较轻的患者,表明 Graves 病患者体内 CCR2 阳性巨噬细胞数量发生了失调。巨噬细胞是 PDGF-BB 的主要分泌细胞。进一步对 PDGF-BB 与阳性巨噬细胞

CCR2 的表达值进行了相关性分析,结果提示两者呈正相关。由此表明,PDGF-BB 的表达改变可能与 CCR2 阳性巨噬细胞比例失调相关。

本研究还进一步检测了 HIF-1 α 在各个组别外周血中的表达情况。检测结果证实 HIF-1 α 的表达与 PDGF-BB 的表达趋势一致。以往研究表明,HIF-1 α 是巨噬细胞的重要刺激因子^[8]。在 HIF-1 α 刺激作用下,巨噬细胞能上调表达 VEGF 以及 PDGF-BB。因此,巨噬细胞可能是在 HIF-1 α 的刺激作用下,上调 PDGF-BB 的表达,从而参与 Graves 病发病的病理过程。

总之,本研究探讨了 Graves 病患者外周血中 PDGF-BB 的表达趋势以及其可能的调节机制,为进一步探索 PDGF-BB 参与 Graves 病的病理过程奠定了基础。

【参考文献】

[1] 李谦,马礼坤.血小板衍生生长因子信号途径在醛固酮致心肌纤维化中的作用及其可能的机制[J].心血管病学进展,2012,33(1):85-88.

[2] GIANNI-BARRERA R ,BARTOLOMEO M ,VOLLMAR B ,et al. Split for the cure: VEGF ,PDGF-BB and intussusception in therapeutic angiogenesis[J].Biochem Soc Trans ,2014 ,42(6) : 1637-1642.

[3] VAN STEENSEL L ,HOOIJKAAS H ,PARIDAENS D ,et al. PDGF enhances orbital fibroblast responses to TSHR stimulating autoantibodies in Graves' ophthalmopathy patients [J].J Clin Endocrinol Metab ,2012 ,97(6) : E944-953.

[4] 中华医学会内分泌学分会《中国甲状腺疾病诊治指南》编写组.中国甲状腺疾病诊治指南-甲状腺功能亢进症 [J].中华内科杂志 ,2007 ,46(10) : 876-882.

[5] MENCONI F ,MARCOCCI C ,MARINŌ M. Diagnosis and classification of Graves disease [J].Autoimmun Rev ,2014 ,13(4-5) : 398-402.

[6] SITA VIRAKUL ,LEENDERT VAN STEENSEL ,VIRGIL ASHDALM ,et al. Platelet-Derived Growth Factor: A Key Factor in the Pathogenesis of Graves' Ophthalmopathy and Potential Target for Treatment [J].Eur Thyroid J ,2014 ,3(4) : 217-226.

[7] 刘高勤,陈磊,陈源,等.趋化因子 CX3CL1 和 CCL2 对人单核细胞来源巨噬细胞的作用及意义 [J].中华实验眼科杂志 ,2014 ,32(3) : 206-210.

[8] SCHOLZ CC ,TAYLOR CT. Targeting the HIF pathway in inflammation and immunity [J].Curr Opin Pharmacol ,2013 ,13(4) : 646-653.