

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.01.017

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.01.017>

## CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low/-</sup>髓系来源抑制性细胞在Graves病中的检测及临床意义

谈银生, 刘尚全, 王芝涛, 田丽芳, 陈望, 刘心苑

(安徽医科大学第三附属医院内分泌科, 合肥 230061)

**[摘要]** 目的: 检测Graves病(Graves' disease, GD)患者外周血中髓系来源抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)表达情况, 探讨MDSCs在GD发生、发展中的作用。方法: 收集52例初诊GD患者和30例健康志愿者外周血, 以CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low/-</sup>作为MDSCs的免疫标记, 分别应用流式细胞术及ELISA方法检测外周血中MDSCs的比例及血浆细胞因子Arg-1, IL-6, G-CSF浓度; 并分析MDSCs与GD患者甲状腺功能相关性。结果: GD患者外周血MDSCs比例明显升高, 相比对照组差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 且GD患者病情平稳后, MDSCs水平较治疗前明显下降( $P < 0.05$ ); MDSCs水平与GD患者甲状腺功能未见明显相关性; GD患者外周血浆Arg-1水平未见明显升高, IL-6及G-CSF浓度显著升高( $P < 0.05$ )。结论: GD患者外周血MDSCs升高, 可能是GD发生和发展的重要因素。

**[关键词]** Graves病; 髓系来源抑制性细胞; 免疫抑制

## Detection and clinical significance of CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low/-</sup> myeloid-derived suppressor cells in patients with Graves' disease

TAN Yinsheng, LIU Shangquan, WANG Zhitao, TIAN Lifang, CHEN Wang, LIU Xinyuan

(Endocrinology Department, Third Affiliated Hospital of AHMU, Hefei 230061, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the expression and role of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in the patients with Graves' disease (GD). **Methods:** A total of 52 newly diagnosed GD patients and 30 healthy controls were enrolled in the study. CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low/-</sup> was used as molecular markers for MDSCs in this study. The frequency of MDSCs in GD patients and healthy controls were determined by flow cytometry. ELISA was used for detecting the concentrations of plasma cytokines Arg-1, IL-6 and G-CSF. The correlation between the frequency of MDSCs and the function of thyroid was also analysed. **Results:** The frequency of MDSCs significantly increased in GD patients, compared with that in healthy controls. This frequency also obviously decreased in GD patients when treated with <sup>131</sup>I ( $P < 0.05$ ). There was no significant correlation between the frequency of MDSCs and the function

收稿日期 (Date of reception): 2016-10-09

通信作者 (Corresponding author): 刘尚全, Email: shangquanliu@yahoo.com.cn

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金 (30840106). This work was supported by National Natural Science Foundation of China (30840106).

of thyroid. The concentrations of plasma cytokines IL-6 and G-CSF significantly increased, in comparison with the healthy controls, while this was not existed in Arg-1. **Conclusion:** The increased frequency of MDSCs may play an important role in the occurrence and development of Graves' disease.

**Keywords** Graves' disease (GD); myeloid-derived suppressor cells (MDSCs); immune suppression

Graves病(Graves' disease, GD)是一种常见的自身免疫性疾病, 主要因宿主免疫功能亢进, 自身反应性T淋巴细胞过度活化, 促使B细胞产生了针对自身甲状腺组织的TSH受体抗体而发病。在GD的发病过程中, 不仅有自身反应性T细胞的过度活化, 也与参与抑制免疫反应的抑制性细胞亚群的功能缺陷或数量降低有关。

髓系来源的抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)是一群具有负向免疫调控功能的细胞亚群, 在维持机体免疫耐受, 避免自身免疫病发生中起着重要作用<sup>[1]</sup>。MDSCs可以通过细胞间直接接触, 或者分泌I型精氨酸酶(Arg-1)、诱导性一氧化氮合酶(iNOS)等抑制T细胞的增殖和分化<sup>[2]</sup>。此前, 有关MDSCs的研究多集中在肿瘤方向<sup>[3]</sup>, 其在自身免疫性疾病领域, 尤其是在维持GD患者免疫稳态方面鲜有报道。本研究旨在分析检测GD患者外周血MDSCs的表达状况, 探讨该细胞亚群在GD发生发展中所起的作用, 为该疾病的临床诊治提供新的思路。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

选择2015年1月至2015年9月于我院门诊初次就诊的52例GD患者(GD组), 年龄(39.1±8.2)岁, 男12例, 女40例。健康对照(healthy control, HC)组30例, 均为我院健康体检中心志愿者, 男6例, 女24例, 年龄(37.5±7.9)岁。两组受检者的性别、年龄差异无统计学意义。GD的诊断标准: 1)有典型或不典型高代谢症候群; 2)体检和(或)彩超提示弥漫性甲状腺肿大, 有或无突眼; 3)实验室检查提示TSH降低, FT3和FT4升高, TSH受体抗体(TRAbs)阳性; 4)排除亚急性甲状腺炎、毒性结节性甲状腺肿、桥本氏甲状腺炎等其它原因所致甲状腺毒症。GD组和HC组排除标准: 凡伴急慢性感染、肿瘤及其他自身免疫性疾病者均予排除。其中, 23例初诊GD患者经抗甲状腺药物(甲巯咪唑10 mg tid, 治疗期间每隔4周复查甲状腺激素、相关抗体及肝肾功能、血常规, 并根据相关化验结果调整抗甲状腺药物的治疗剂量)治疗半年后,

定期于我院门诊就诊。所有受试者均签署书面知情同意书, 研究方案经安徽医科大学第三附属医院伦理委员会批准。

### 1.2 甲状腺功能测定

采用化学发光免疫分析法检测外周血中游离三碘甲状腺原氨酸(FT3)、游离甲状腺素(FT4)、促甲状腺素(TSH)水平; 采用放射免疫分析法检测外周血中促甲状腺激素受体抗体(TRAbs)水平。

### 1.3 外周血 CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low/-</sup> MDSCs 测定

抽取静脉血5 mL加入肝素抗凝管, 500 r/min离心25 min, 留存血浆2 mL于-80 °C冰箱中备用。离心后剩余细胞采用Ficoll-Hypaque密度梯度离心法, 分离人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)。取1×10<sup>6</sup>个细胞, 加入CD14-FTTC、HLA-DR-PE单克隆抗体各20 μL, 室温避光孵育30 min后, 洗涤2次, 加入500 μL染色缓冲液混匀, 用流式细胞仪(FC500 MPL, Beckman Coulter公司)收集10 000个细胞/管, Flowjo软件获取数据, 分析CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low/-</sup> MDSCs细胞占CD14<sup>+</sup>细胞百分比。

### 1.4 细胞因子检测

血浆细胞因子Arg-1、白介素-6(IL-6)、人粒细胞集落刺激因子(G-CSF)检测采用酶联免疫吸附法(ELISA法)测定, 试剂盒均购于美国R&D公司, 并严格按照说明书进行操作。

### 1.5 统计学处理

统计分析软件采用SPSS 17.0; 数据以均数±标准差( $\bar{x}±s$ )表示; 采用独立样本t检验或者配对t检验进行两组间差异比较, 采用Pearson检验分析相关性。P<0.05认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 GD患者甲状腺功能检测结果

与对照组相比, GD组血浆FT3, FT4,

TRAb水平明显高于健康对照组( $P<0.01$ ), TSH水平明显低于对照组( $P<0.01$ ), 差异具有统计学意义(表1)。

## 2.2 GD 患者外周血 CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low/-</sup> MDSCs 检测结果

GD组和健康对照组外周血中CD14<sup>+</sup>细胞占PBMCs比例分别为20.43%±5.97%, 18.98%±6.15%, 两组数据之间未见明显差异( $t=-0.396$ ,  $P=0.694$ )。GD组外周血中CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low/-</sup>MDSCs占CD14<sup>+</sup>细胞比例为15.29%±4.43%, 与对照组9.33%±2.31%

比较明显升高, 差异具有统计学意义( $t=-7.99$ ,  $P<0.01$ ; 图1)。

## 2.3 GD 患者经抗甲状腺药物治疗后, 外周血 CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low/-</sup> MDSCs 变化

23例初诊GD患者经抗甲状腺药物治疗半年后, 病情控制平稳。23例GD患者外周血中CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low/-</sup> MDSCs比例为16.46%±3.74%, 治疗后为12.15%±2.17%, 治疗后MDSCs比例明显下降, 两组数据比较差异具有统计学意义( $t=6.50$ ,  $P<0.01$ ; 图2)。

表1 临床资料及甲状腺功能检测指标

Table 1 Clinical data and test index of thyroid function

组别	例数	年龄/岁	FT3/(pmol/L)	FT4/(pmol/L)	TSH/(μIU/mL)	TRAb/(IU/L)
GD组	52	39.1 ± 8.2	14.32 ± 3.29	33.35 ± 5.56	0.12 ± 0.05	3.66 ± 0.84
对照组	30	37.5 ± 7.9	5.01 ± 0.74	15.95 ± 2.33	2.56 ± 1.24	1.39 ± 0.32
<i>P</i>		0.37	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

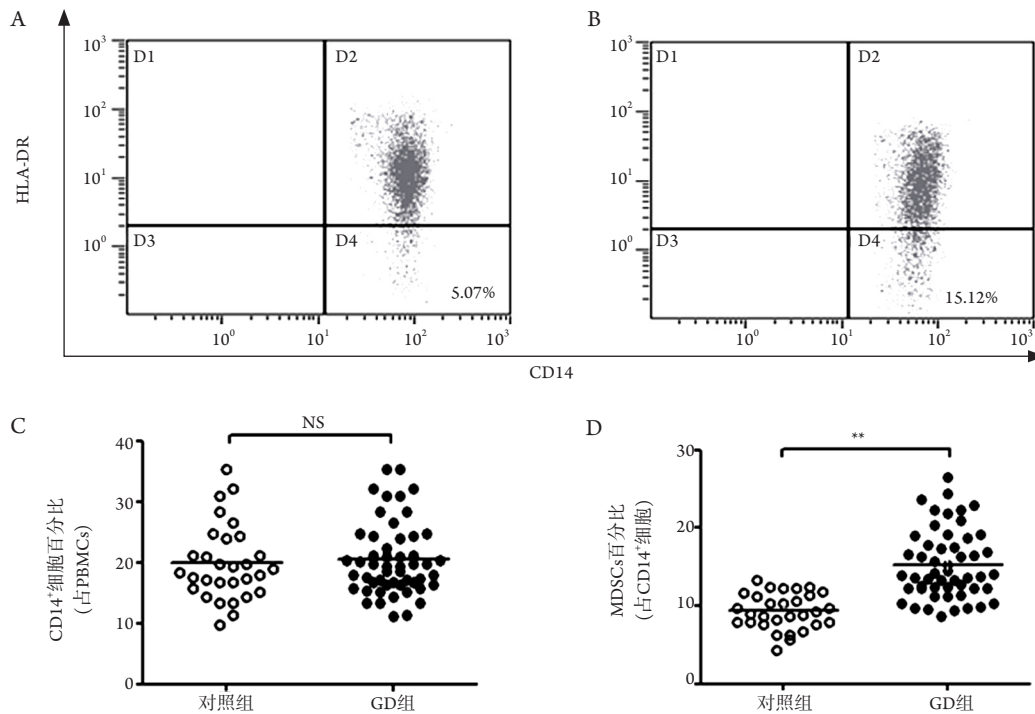


图1 GD患者和对照组CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low/-</sup> MDSCs检测结果

Figure 1 Comparison of CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low/-</sup> MDSCs in healthy controls and GD patients

(A)对照组细胞示例流式散点图; (B)GD患者MDSCs细胞示例流式散点图; (C)GD患者和对照组CD14<sup>+</sup>细胞检测结果对比; (D)GD患者和对照组MDSCs检测结果对比。NS,  $P>0.05$ ; \*\* $P<0.01$ 。

Representative flow cytometry dot plots demonstrate the expression of MDSCs in healthy controls (A) and GD patients (B); (C) the levels of CD14<sup>+</sup> monocytes in healthy controls and GD patients; (D) the levels of MDSCs in healthy controls and GD patients. NS,  $P>0.05$ ; \*\* $P<0.01$ .

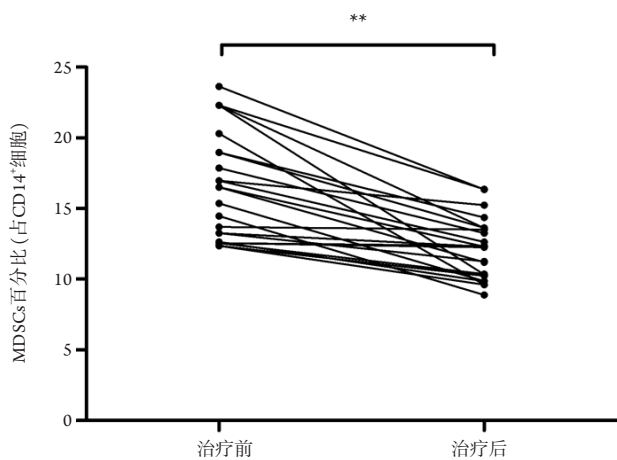


图2 GD患者抗甲状腺药物治疗前后MDSCs水平比较

Figure 2 Comparison of the level of MDSCs before and after treatment

\*\* $P < 0.01$ .

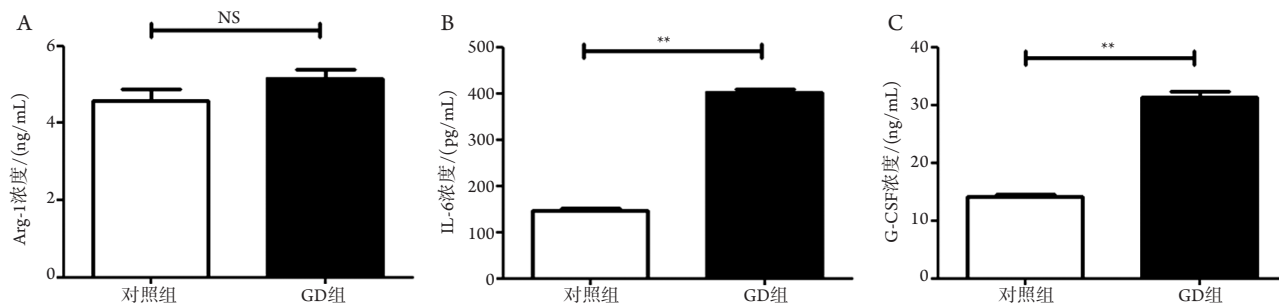


图3 GD组和对照组外周血中Arg-1, IL-6和G-CSF水平

Figure 3 Level of Arg-1, IL-6, G-CSF in healthy controls and GD patients

NS,  $P > 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

### 3 讨论

自身免疫性疾病是自身免疫系统过度应答时, 所导致的以自身组织器官损伤或功能障碍为临床表现的疾病。宿主的免疫功能紊乱是自身免疫性疾病发生的前提条件。而目前越来越多的研究<sup>[4]</sup>表明: 具有负向免疫调节作用的髓系来源抑制性细胞在维持宿主免疫稳态方面具有重要作用。GD是宿主自身免疫耐受缺陷和体内免疫微环境平衡紊乱共同作用的结果, 活化的 $CD4^+$ ,  $CD8^+$ T细胞通过抗体依赖介导的细胞毒作用而引起自身甲状腺组织的损伤<sup>[5]</sup>。

MDSCs可以对多种免疫细胞通过多种不同的机制发挥免疫抑制作用, 从而导致宿主固有免疫和获得性免疫功能的下降。因此, 先前关于MDSCs的报道多集中在肿瘤领域, 数量增多的

#### 2.4 GD患者外周血 $CD14^+HLA-DR^{low/-}$ MDSCs与甲状腺功能相关性

GD组患者外周血 $CD14^+HLA-DR^{low/-}$  MDSCs百分比与FT3( $r=0.011$ ,  $P=0.938$ ), FT4( $r=-0.127$ ,  $P=0.371$ ), TSH( $r=-0.244$ ,  $P=0.082$ ), TRAb( $r=-0.109$ ,  $P=0.443$ )均无明显相关性。

#### 2.5 GD患者外周血 $CD14^+HLA-DR^{low/-}$ MDSCs相关细胞因子检测

GD患者外周血Arg-1浓度为( $5.16 \pm 1.70$ ) ng/mL, 与对照组( $4.59 \pm 1.54$ ) ng/mL相比未见明显差异( $t=-1.57$ ,  $P=0.122$ )。外周血IL-6浓度为( $402.78 \pm 42.75$ ) pg/mL, 较对照组( $146.35 \pm 26.51$ ) pg/mL明显升高( $t=-33.05$ ,  $P < 0.01$ ); 同样, GD患者外周血G-CSF浓度为( $31.35 \pm 6.90$ ) ng/mL, 与对照组( $14.06 \pm 2.96$ ) ng/mL相比亦明显升高( $t=-15.73$ ,  $P < 0.01$ ; 图3)。

MDSCs与肿瘤的发生及进展密切相关<sup>[6-8]</sup>。由此, 我们猜想, 由宿主自身免疫功能亢进而导致的GD患者外周血, 是否存在MDSCs数量的降低?

本研究发现, GD患者外周血 $CD14^+$ 细胞数量未见明显异常, 而 $CD14^+HLA-DR^{low/-}$  MDSCs比例明显升高, 差异具有统计学意义。另外, 经抗甲状腺药物治疗后, GD患者外周血MDSCs比例较前明显下降。这与我们先前的推测不一致, 数量没有降低反而异常升高的MDSCs, 不仅未能有效抑制GD的发生, 反而随着病情的恢复, MDSCs数量降低; 提示MDSCs在GD的发生、发展中起到一定的作用。有研究称, 在一些自身免疫性疾病中, 如自身免疫性脑脊髓炎<sup>[9]</sup>、类分湿关节炎<sup>[10]</sup>、炎症性肠病<sup>[11]</sup>中, MDSCs比例均异常升高, 与本研究结果一致。这群细胞能通过直接或者间接途径抑制T细胞增殖, 延缓自身免疫性相关疾病进展。



MDSCs通过多种途径抑制宿主固有免疫及获得性免疫。目前认为, MDSCs对免疫细胞的抑制作用是通过细胞之间的直接接触; 或者是通过分泌多种细胞因子间接发挥作用, 如Arg-1, IL-10等<sup>[12-13]</sup>。MDSCs高表达的Arg-1可作用于L-精氨酸, 使其水平降低。而L-精氨酸是T细胞活化所必需的氨基酸, 其缺乏可以使细胞内Cyclin D3和CDK4的表达水平降低, 细胞周期停滞, 从而抑制T细胞的增殖<sup>[14]</sup>。本研究中, GD患者外周血Arg-1水平未见明显升高。因此, 我们推测数量升高的MDSCs可能存在功能缺陷, 未能表达高水平Arg-1。

正常生理状况下, 髓系祖未成熟髓样细胞(immature myeloid cells, IMCs)会发育成各类成熟细胞, 如粒细胞、DC细胞及巨噬细胞等。但在肿瘤、感染及炎症等病理状态下, IMCs分化受阻并被激活成具有抑制性功能的细胞亚群, 这就导致了MDSCs表达增加<sup>[15]</sup>。此过程中, 炎性细胞因子IL-6, G-CSF等具有重要诱导分化作用。本研究中, GD患者外周血IL-6, G-CSF水平明显升高, 差异具有统计学意义。有研究<sup>[16]</sup>报道: 高水平的IL-6, G-CSF在GD患者体内诱导MDSCs大量扩增, 说明MDSCs在炎症微环境下显著增多。

因此, 我们推测GD患者外周血异常升高的MDSCs来源于其自身体内炎症性的微环境, 大量炎性因子及趋化因子(如IL-6, G-CSF, CCL2, CXCL-2等), 诱导IMCs在炎性部位聚集, 在IMCs分化受阻的同时被激活产生了具有负向调控作用的MDSCs。当GD患者病情稳定以后, 由于炎性细胞因子水平降低, 以及阻碍MDSCs分化成熟的因素消除, MDSCs的比例也随之降低。但是数量异常升高的MDSCs未能有效延缓GD病情, 可能与多种因素有关。我们推测可能是因为: GD患者活动期存在T细胞的过度激活, 激活的T细胞分泌大量炎性因子, 如IL-6, G-CSF等, 其中部分炎性因子能够诱导MDSCs的扩增。而GD控制后T细胞功能恢复后MDSCs的扩增也得到抑制。综上所述, GD患者外周血MDSCs水平异常升高, 可能与疾病的发生、发展密切相关。有关MDSCs在GD发病中的具体机制, 仍有待后续实验进一步研究, 以便为GD的诊疗提供新的思路和方法。

## 参考文献

1. Yang H, Bi Y, Han F, et al. Myeloid-derived suppressor cells in immunity and autoimmunity[J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2015, 11(8): 911-999.
2. Dai J, El Gazzar M, Li GY, et al. Myeloid-derived suppressor cells: paradoxical roles in infection and immunity[J]. *J Innate Immun*, 2015, 7(2): 116-126.
3. Wang Z, Zhang L, Wang H, et al. Tumor-induced CD14+HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells correlate with tumor progression and outcome of therapy in multiple myeloma patients[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2015, 64(3): 389-399.
4. Beury DW, Parker KH, Nyandjo M, et al. Cross-talk among myeloid-derived suppressor cells, macrophages, and tumor cells impacts the inflammatory milieu of solid tumors[J]. *J Leukoc Biol*, 2014, 96(6): 1109-1118.
5. 孙伟莉, 申勇, 李卫鹏, 等. Graves病患者CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞功能初探[J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(2): 202-205.  
SUN Weili, SHEN Yong, LI Weipeng, et al. Study on the function of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with Graves' disease[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2015, 50(2): 202-205.
6. Stanojevic I, Miller K, Kandolf-Sekulovic L, et al. A subpopulation that may correspond to granulocytic myeloid-derived suppressor cells reflects the clinical stage and progression of cutaneous melanoma[J]. *Int Immunol*, 2016, 28(2): 87-97.
7. Zhang G, Huang H, Zhu Y, et al. A novel subset of B7-H3<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-/low</sup> myeloid-derived suppressor cells are associated with progression of human NSCLC[J]. *Oncoimmunology*, 2015, 4(2): e977164.
8. Giallongo C, Parrinello N, Tibullo D, et al. Myeloid derived suppressor cells (MDSCs) are increased and exert immunosuppressive activity together with polymorphonuclear leukocytes (PMNs) in chronic myeloid leukemia patients[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101848.
9. Mildner A, Mack M, Schmidt H, et al. CCR2+Ly-6Chi monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system[J]. *Brain*, 2009, 132(Pt 9): 2487-2500.
10. Fujii W, Ashihara E, Hirai H, et al. Myeloid-derived suppressor cells play crucial roles in the regulation of mouse collagen-induced arthritis[J]. *J Immunol*, 2013, 191(3): 1073-1081.
11. Kim YJ, Chang SY, Ko HJ. Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease[J]. *Intest Res*, 2015, 13(2): 105-111.
12. Pallett LJ, Gill US, Quaglia A, et al. Metabolic regulation of hepatitis B immunopathology by myeloid-derived suppressor cells[J]. *Nat Med*, 2015, 21(6): 591-600.
13. Greten TF, Manns MP, Korangy F. Myeloid derived suppressor cells in human diseases[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(7): 802-7.
14. Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression[J]. *Blood*, 2007, 109(4):

- 1568-1573.
15. Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, et al. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(1): 425.
16. Lechner MG, Liebertz DJ, Epstein AL. Characterization of cytokine-

induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells[J]. *J Immunol*, 2010, 185(4): 2273-2284.

**本文引用:** 谈银生, 刘尚全, 王芝涛, 田丽芳, 陈望, 刘心苑. CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low/-</sup>髓系来源抑制性细胞在Graves病中的检测及临床意义[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(1): 91-96. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.01.017

**Cite this article as:** TAN Yinsheng, LIU Shangquan, WANG Zhitao, TIAN Lifang, CHEN Wang, LIU Xinyuan. Detection and clinical significance of CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low/-</sup> myeloid-derived suppressor cells in patients with Graves' disease[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(1): 91-96. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.01.017