

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00229

## 凋亡相关蛋白 Livin、HSP90 $\alpha$ 在自身免疫性甲状腺疾病中的表达

### Expression of apoptosis-related protein Livin and HSP90 $\alpha$ in patients with autoimmune thyroid diseases

赵艳利, 张会娟\*

郑州大学第一附属医院内分泌科, 郑州 450052

[关键词] 格雷夫斯病; 桥本甲状腺炎; Livin; HSP90 $\alpha$ ; 免疫组织化学

[中图分类号] R 581 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2009)02-0229-02

Graves病(GD)和桥本甲状腺炎(Hashimoto thyroiditis, HT)是临床上最常见的自身免疫性甲状腺疾病(autoimmune thyroid diseases, AITD),但其发病机制尚未完全阐明。近年研究发现,细胞凋亡受体的激活及调节细胞凋亡的因子参与AITD的发病过程<sup>[1]</sup>。大量研究证实 Livin、HSP90 $\alpha$ 是体内重要的抗凋亡因子<sup>[2-3]</sup>,Livin蛋白主要通过抑制 caspase 途径、激活 TAK1/JNK1 信号转导途径发挥抗凋亡作用<sup>[4]</sup>,HSP90 $\alpha$ 蛋白通过阻止细胞分裂来发挥抗凋亡作用<sup>[5]</sup>。关于 Livin 和 HSP90 $\alpha$ 在 GD 及 HT 患者甲状腺中的表达情况,目前国内外均未见报道。本研究应用免疫组化 S-P 法对 GD 及 HT 甲状腺组织中凋亡相关蛋白 Livin、HSP90 $\alpha$ 的表达进行研究,从细胞凋亡水平探讨 GD 和 HT 的发病机制。

#### 1 资料和方法

1.1 一般资料 收集本院 2005~2006 年手术切除的甲状腺组织,均经病理确诊。其中 GD 26 例,男 8 例、女 18 例,年龄 12~60(30.88 $\pm$ 11.15)岁;HT 15 例,男 2 例、女 13 例,年龄 40~80(52.67 $\pm$ 10.98)岁。另取良性腺瘤旁正常甲状腺组织 11 例作对照,男 2 例、女 9 例,年龄 34~46(41.78 $\pm$ 3.56)岁。

1.2 检测方法 行 S-P 免疫组织化学染色。兔抗人 Livin 多克隆抗体、兔抗人 HSP90 $\alpha$  多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。S-P 免疫组织化学染色试剂盒、DAB 显色剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司。操作步骤按说明书进行。用已知表达 Livin、HSP90 $\alpha$  的乳腺癌组织作为阳性对照,结果阳性;以正常血清代替一抗作为阴性对照,以 PBS 代替一抗作为空白对照,结果均为阴性。

1.3 结果判定 以 GD、HT 及正常甲状腺组织细胞质、细胞膜和(或)细胞核被染成棕黄色颗粒状物作为 Livin 和 HSP90 $\alpha$  蛋白阳性染色。在随机选取的 10 个高倍视野( $\times 400$ )下半定量划分染色等级:—:显色强度与背景无明显差别;+:阳性细胞数 $<10\%$ ,显色强度为淡黄色或仅个别细胞呈黄至棕黄色染色;++:阳性细胞数及显色强度介于弱阳性与强阳性之间;+++ :阳性细胞数 $>60\%$ ,多数细胞呈黄至棕黄色染色。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 10.0 软件。两样本率的比较

采用  $\chi^2$  检验,条件不满足者用确切概率法;相关性检验采用 Spearman 等级相关分析。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

#### 2 结果

2.1 各组 Livin、HSP90 $\alpha$  蛋白的表达 S-P 免疫组化染色, Livin 蛋白定位于甲状腺滤泡上皮细胞的胞质和胞核,呈异质性表达,阳性着色为棕黄色颗粒。Livin 蛋白在正常甲状腺组织和 GD(图 1A)主要表达在胞核,在 GD 中淋巴细胞浸润区与远离淋巴细胞浸润区的甲状腺上皮细胞表达无明显差别。Livin 蛋白在 HT 主要表达在胞质,淋巴细胞浸润区附近的上皮细胞表达较强(图 1B),甲状腺滤泡结构完整、上皮细胞数目多、胞质丰富的上皮细胞 Livin 蛋白表达较强,而结构破坏、胞质少、萎缩的滤泡上皮细胞 Livin 蛋白表达相对较弱(图 1B)。Livin 蛋白在 HT 中滤泡腔侧细胞质与基底膜侧细胞质着色无明显差别。HSP90 $\alpha$  蛋白也定位于甲状腺滤泡上皮细胞的胞质和胞核,呈异质性表达,HSP90 $\alpha$  蛋白在正常甲状腺组织、GD 和 HT(图 1C)中均以胞质表达为主。HSP90 $\alpha$  蛋白在 GD、HT 中淋巴细胞浸润区的表达与远离淋巴细胞浸润区的表达均无明显差别,滤泡腔侧细胞质与基底膜侧细胞质着色亦无明显差别。

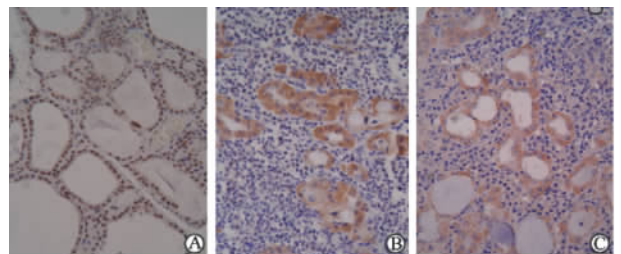


图 1 Livin 在 Graves 病细胞核(A)、桥本甲状腺炎细胞质(B)及 HSP90 $\alpha$  在桥本甲状腺炎细胞质(C)中的表达(S-P 法)

Original magnification:  $\times 400$

Livin、HSP90 $\alpha$  蛋白在 GD 和 HT 中的表达均明显高于正常甲状腺组织( $P$  均 $<0.05$ ),Livin、HSP90 $\alpha$  蛋白在 GD 和 HT 中的表达均无明显差别( $P$  均 $>0.05$ )。见表 1。

[收稿日期] 2008-07-21

[接受日期] 2008-09-29

[作者简介] 赵艳利, 硕士生. E-mail: Y201065zhaoyanli@126.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel:0371-66295042, E-mail: rjmlj@163.com

**表 1 各组甲状腺组织中 Livin、HSP90 $\alpha$  蛋白的表达**

组别	例数	Livin				HSP90 $\alpha$			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
GD*	26	5	4	8	9	6	3	12	5
HT*	15	3	2	3	7	3	2	3	7
对照组	11	7	2	2	0	7	3	1	0

\*  $P < 0.05$  与对照组比较. GD:Graves病;HT:桥本甲状腺炎

2.2 GD和HT中Livin与HSP90 $\alpha$ 蛋白表达的相关性  
Livin与HSP90 $\alpha$ 蛋白在GD、HT中表达呈显著正相关( $r = 0.486, P < 0.01$ )。见表2。

**表 2 GD和HT中Livin与HSP90 $\alpha$ 蛋白表达的相关性**

Livin	HSP90 $\alpha$				总例数
	-	+	++	+++	
-	4	2	2	0	8
+	1	0	3	2	6
++	3	3	3	2	11
+++	1	0	7	8	16
合计	9	5	15	12	41

GD:Graves病;HT:桥本甲状腺炎

### 3 讨论

Livin是新发现的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein,IAP)家族成员之一。Livin基因抗凋亡的作用机制主要是:(1)直接抑制Caspase或procaspase;Livin基因可以和下游caspases的活性形式caspase-3和caspase-7直接作用,也可以抑制caspase-9蛋白的水解过程<sup>[2]</sup>。(2)转化因子 $\beta$ 激酶1(TAK1)依赖的c-jun N端激酶1(JNK1)的激活,近年来有很多研究表明JNK1途径在IAP抗凋亡中发挥重要作用。Sanna等<sup>[6]</sup>发现Livin通过选择性激活由TAK1的结合蛋白因子(TAB1)/TAK1介导的丝裂原激活的蛋白(MAP)激酶JNK1,明显抑制TNF- $\alpha$ 和白介素-1 $\beta$ 转换酶(ICE)诱导的凋亡,这种抗凋亡途径独立于caspase途径。本研究结果显示,Livin蛋白在HT中淋巴细胞浸润区附近的甲状腺上皮细胞表达较强,推测浸润的T淋巴细胞产生的一些细胞因子可能诱导邻近的甲状腺上皮细胞表达Livin蛋白。GD和HT中凋亡相关蛋白Livin的表达明显高于正常甲状腺组织。此结果提示在GD中高表达的Livin蛋白可能通过抑制部分甲状腺细胞凋亡,促进甲状腺组织增生。本研究发现,在HT中甲状腺滤泡结构完整、上皮细胞数目多、胞质丰富的上皮细胞Livin蛋白表达较强,而结构破坏、胞质少、萎缩的滤泡上皮细胞Livin蛋白表达相对较弱。提示在HT中Livin蛋白表达异常增多可能是机体产生的一种代偿现象,以拮抗甲状腺组织的进一步破坏和萎缩。另外,本研究还观察到,Livin蛋白在正常甲状腺组织和GD主要表达在胞核,而在HT则主要表达在胞质。

研究证实,HSP90 $\alpha$ 蛋白可通过阻止细胞分裂来发挥重要的抗凋亡作用<sup>[9]</sup>。在抗凋亡作用中扮演重要角色的丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(AKT)及上游的3磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1(PDK1)激酶同属于HSP90的底物蛋白。磷脂酰肌

醇-3激酶/AKT信号转导通路与许多细胞的抗凋亡以及增殖、分化密切相关。AKT的活化需要AKT与HSP90及辅助伴侣分子cdc37组成复合体。HSP90的伴侣功能对于维持该复合体的存在是至关重要的<sup>[3,7]</sup>。另外HSP90 $\alpha$ 还具有重要的免疫作用。实验和临床观察表明,在自身免疫性疾病的发病过程中存在着对HSP90的免疫应答<sup>[8]</sup>。本研究结果表明GD和HT甲状腺HSP90 $\alpha$ 蛋白表达水平较正常对照组明显升高,提示可能与以下3个方面有关:(1)HSP90 $\alpha$ 蛋白在GD中高表达抑制部分甲状腺滤泡上皮细胞的凋亡,促使甲状腺增生肿大。HSP90 $\alpha$ 在HT中高表达可能是机体的一种代偿现象,能阻止部分甲状腺细胞凋亡,对机体产生保护作用。(2)HSP90 $\alpha$ 蛋白可能作为一种自身抗原<sup>[9]</sup>被抗原递呈细胞递呈给免疫细胞,参与甲状腺自身免疫反应的发生发展。(3)GD和HT中甲状腺组织增生肿大,其增生的组织存在相对血供不足,缺氧和应激环境也可诱导HSP90 $\alpha$ 蛋白的过度表达<sup>[10]</sup>。

相关性分析结果显示,在GD和HT中Livin蛋白与HSP90 $\alpha$ 蛋白呈显著正相关,提示Livin、HSP90 $\alpha$ 蛋白可能通过作用于细胞凋亡的不同途径或不同阶段协同发挥抗凋亡作用,其具体机制还有待于进一步研究。

### [参考文献]

- [1] 孙富军,田恩江,陈祖培.自身免疫性甲状腺疾病与细胞凋亡[J].中国地方病学杂志,2004,23:279-282.
- [2] Kasof G M, Gomes B C. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member[J]. J Biol Chem, 2001, 276: 3238-3246.
- [3] Hartson S D, Matts R L. Association of hsp90 with cellular src family kinases in a cell free system correlates with altered kinase structure and function [J]. Biochemistry, 1994, 33: 8912-8920.
- [4] 甄海宁,章翔.新的凋亡抑制因子Livin[J].第四军医大学学报, 2004, 25: 1822-1823.
- [5] 胡鹤本,朱人敏.热休克蛋白90 $\alpha$ 与胃癌的关系[J].医学研究生学报, 2004, 17: 749-752.
- [6] Sanna M G, Correia J S, Ducrey O, Lee J, Nomoto K, Schrantz N. IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: the TAK1/ JNK1 signaling cascade and caspase inhibition[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22: 1754-1766.
- [7] Scholz G M, Hartson S D, Cartledge K, Volk L, Matts R L, Dunn A R. The molecular chaperone Hsp90 is required for signal transduction by wild type Hck and maintenance of its constitutively active counterpart [J]. Cell Growth Differ, 2001, 12: 409-417.
- [8] van Eden W, van der Zee R, Paul A G A, Prakken B J, Wendling U, Anderton S M, et al. Do heat shock proteins control the balance of T cell regulation in inflammatory diseases[J]? Immunol Today, 1998, 19: 303-307.
- [9] 朱里,涂亚庭,冯爱平,黄长征,刘厚君.热休克蛋白90在系统性红斑狼疮外周血单核细胞中的表达[J].华中科技大学学报:医学版, 2005, 34: 777-779.
- [10] 陈怡,冉志华,陈翔,朱长清,萧树东. HSP70、HSP90在结肠癌中的表达及其和生物学行为的相关性[J].世界华人消化杂志, 2006, 14: 3201-3205.

[本文编辑] 尹茶