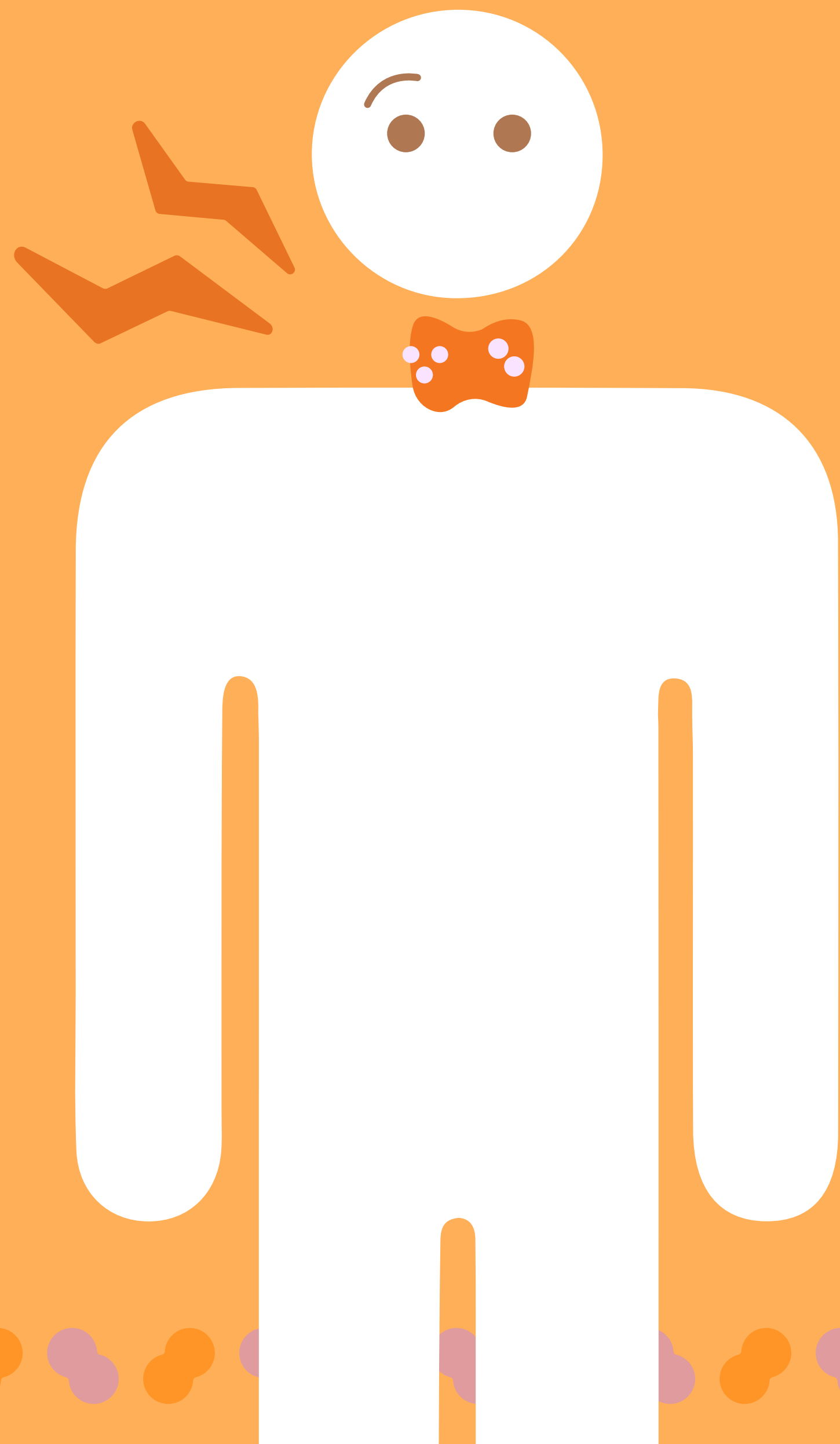
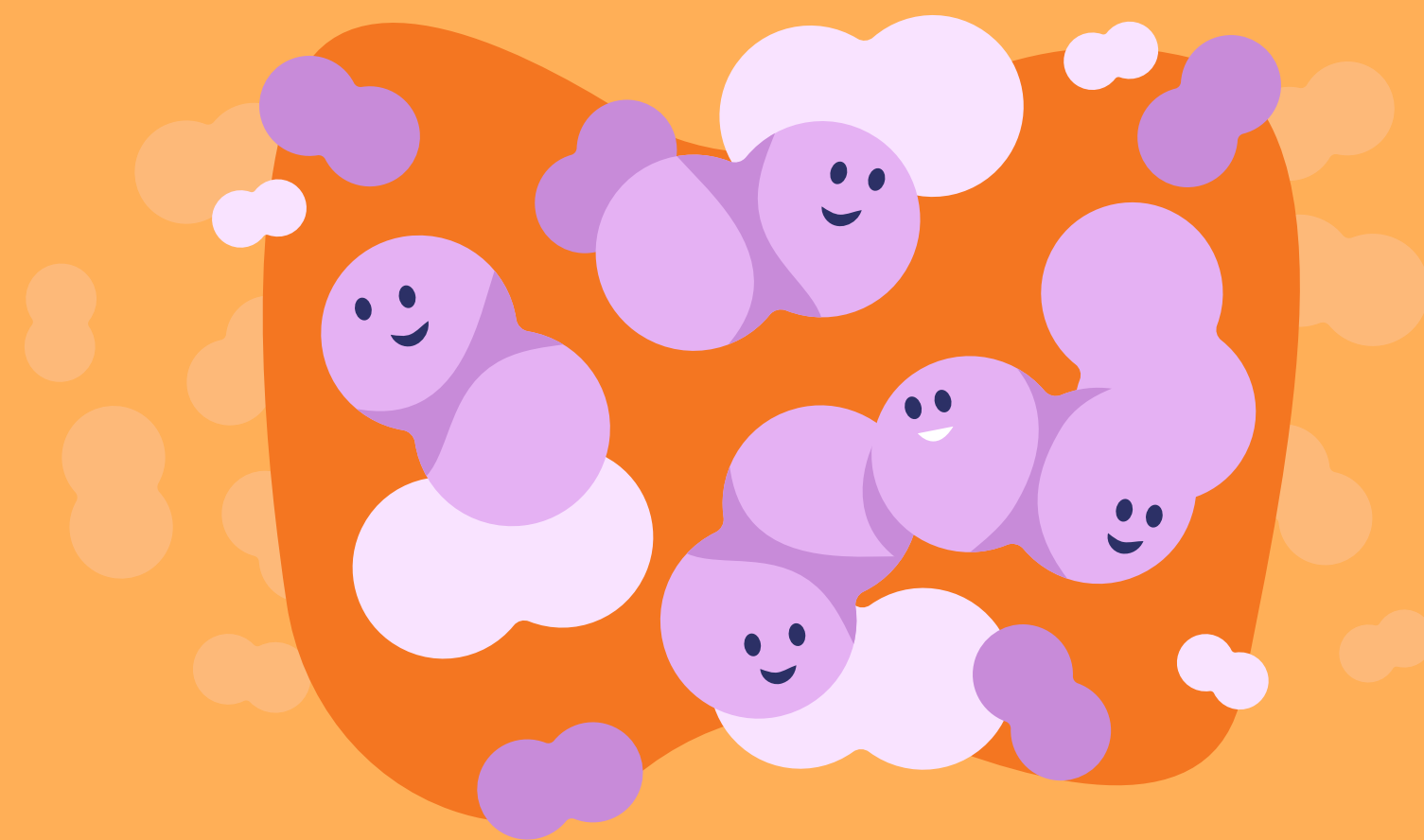




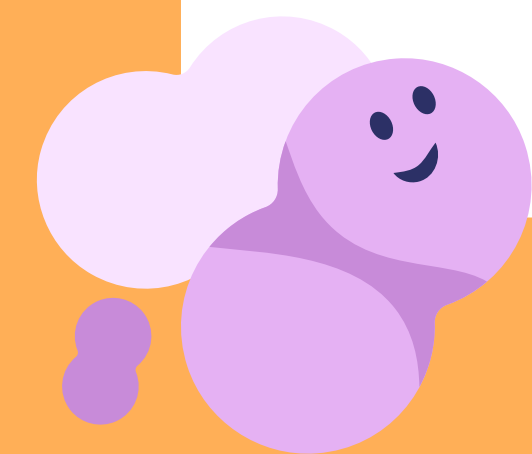
RNAscope幫助揭示 橋本氏甲狀腺炎發病機制



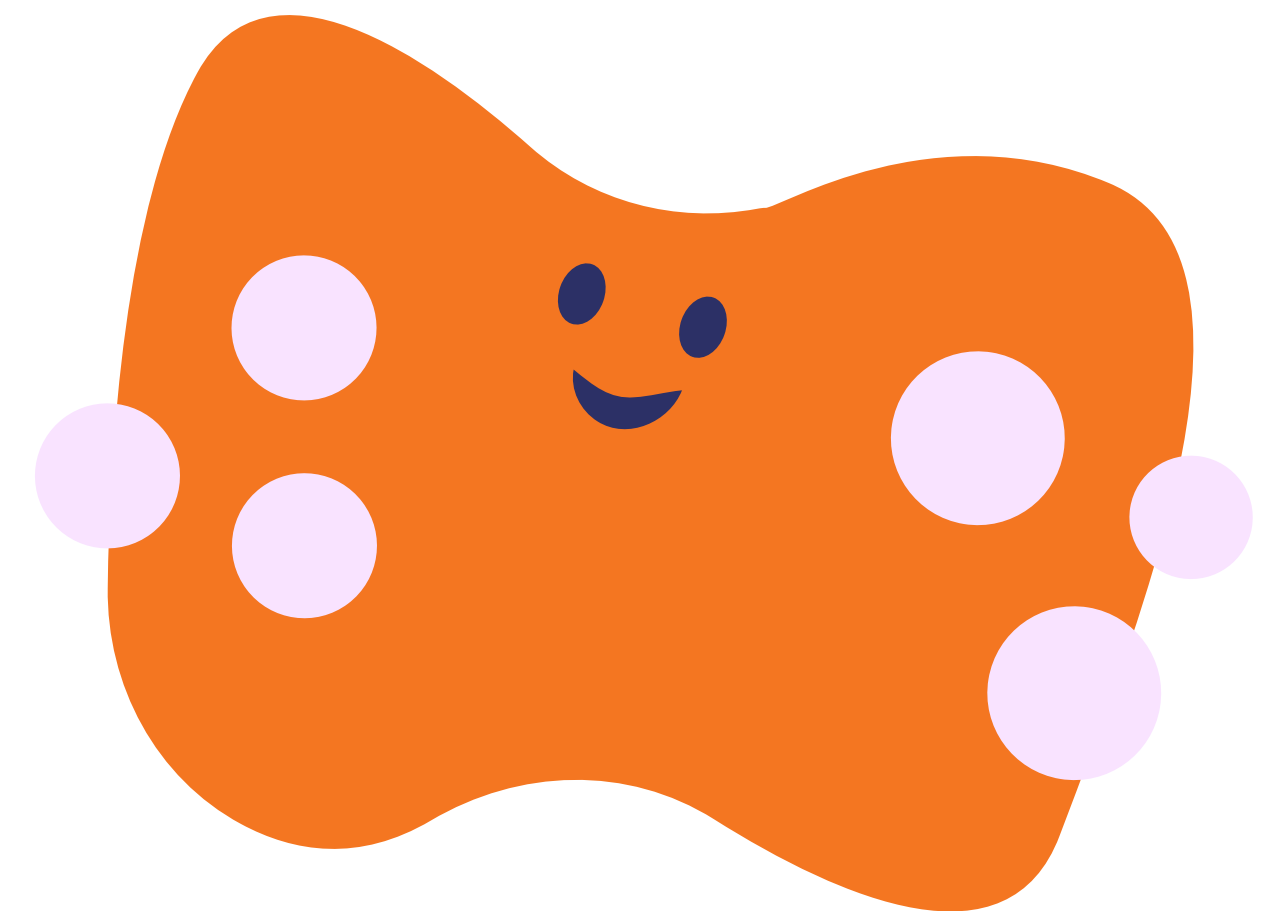
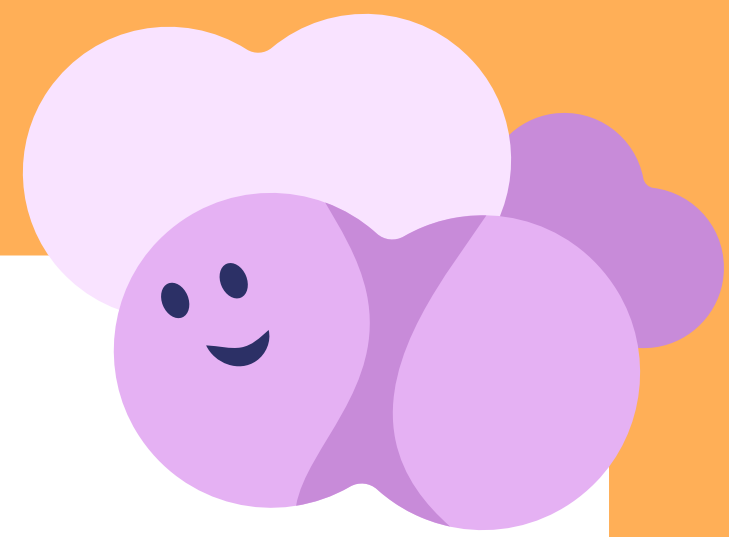
弘晉有限公司
Hong Jing Co., Ltd.



橋本氏甲狀腺炎(HT)是最常見的自體免疫性甲狀腺疾病，在女性人群中患病率超過10%。典型的HT以甲狀腺組織大量的淋巴細胞浸潤、異位淋巴組織的形成，並伴有甲狀腺濾泡細胞破壞為特徵，同時出現甲狀腺過氧化物酶抗體(Thyroid peroxidase antibody, TP0Ab)和甲狀腺球蛋白抗體(Thyroglobulin antibody, TGAb)，但到目前為止，導致HT患者甲狀腺組織中大量淋巴細胞浸潤和甲狀腺細胞破壞的機制了解很少。橋本氏甲狀腺炎患者的自然病程多是先出現TP0Ab或TGAb陽性，且早期患者甲狀腺功能多為正常，但隨著病程的進展，甲狀腺濾泡細胞逐漸被破壞，患者出現亞臨床和臨床甲狀腺功能減退症(簡稱甲減)。



2022年2月，上海交通大學醫學院附屬第九人民醫院宋懷東教授研究團隊在《Nature Communications》上發表了一篇題為 “Lymphocyte Infiltration and Thyrocyte Destruction is Driven by Stromal and Immune Cell Components in Hashimoto's Thyroiditis” 的研究論文。該研究揭示了長期困擾人們的橋本氏甲狀腺炎患者淋巴細胞異位浸潤到甲狀腺組織，導致甲狀腺濾泡細胞破壞的分子機制，為開發減少淋巴細胞浸潤、阻止甲狀腺細胞破壞，延緩臨床或亞臨床甲減的發生提供了新的思路。



ARTICLE



<https://doi.org/10.1038/s41467-022-28120-2>

OPEN

Lymphocyte infiltration and thyrocyte destruction are driven by stromal and immune cell components in Hashimoto's thyroiditis

Qian-Yue Zhang ^{1,5}, Xiao-Ping Ye ^{1,5}✉, Zheng Zhou^{1,4,5}, Chen-Fang Zhu^{2,5}, Rui Li¹, Ya Fang¹,
Rui-Jia Zhang ¹, Lu Li³, Wei Liu³, Zheng Wang¹, Shi-Yang Song¹, Sang-Yu Lu¹, Shuang-Xia Zhao¹,
Jian-Nan Lin ¹✉ & Huai-Dong Song ^{1,3}✉



宋懷東研究團隊通過單細胞定序鑑定了HT患者甲狀腺組織基質細胞的多個亞群，其中CCL21+肌纖維母細胞(Myofibroblasts)和CCL21+纖維母細胞(Fibroblasts)均大量表現CCL19和CCL21。然後通過RNAscope與免疫螢光共同檢測，用CCL21探針和不同的抗體進行多色染色(圖1)，下圖中紅色螢光訊號為RNAscope檢測的CCL21的表達和分布，綠色與白色螢光訊號分別為免疫螢光檢測的淋巴細胞標記物(CD45)、白血球標記物(CD20)、T細胞標記物(CD3E)，血管內皮細胞標記物(VWF)，肌纖維母細胞或纖維母細胞標記物(COL1A1)和肌纖維母細胞或平滑肌細胞標記物(ACTA2)。他們發現CCL21+纖維母細胞在HT患者的甲狀腺組織主要呈現三種不同的分布。其一是分布在異常增多的高內皮靜脈周圍，其二是零散分布在甲狀腺的不同區域，且都圍繞有聚集的免疫細胞；三是分布在有生發中心(Germinal center)形成的三級淋巴組織的T細胞區。而CCL21+肌纖維母細胞分布於高內皮靜脈外膜。這些結果提示在免疫細胞自高內皮靜脈進入到甲狀腺組織，浸潤到甲狀腺組織的不同部位，並在某些部位逐漸形成結構完整的有明顯分區的三級淋巴組織的過程中，CCL21+纖維母細胞都發揮著不可或缺的作用。



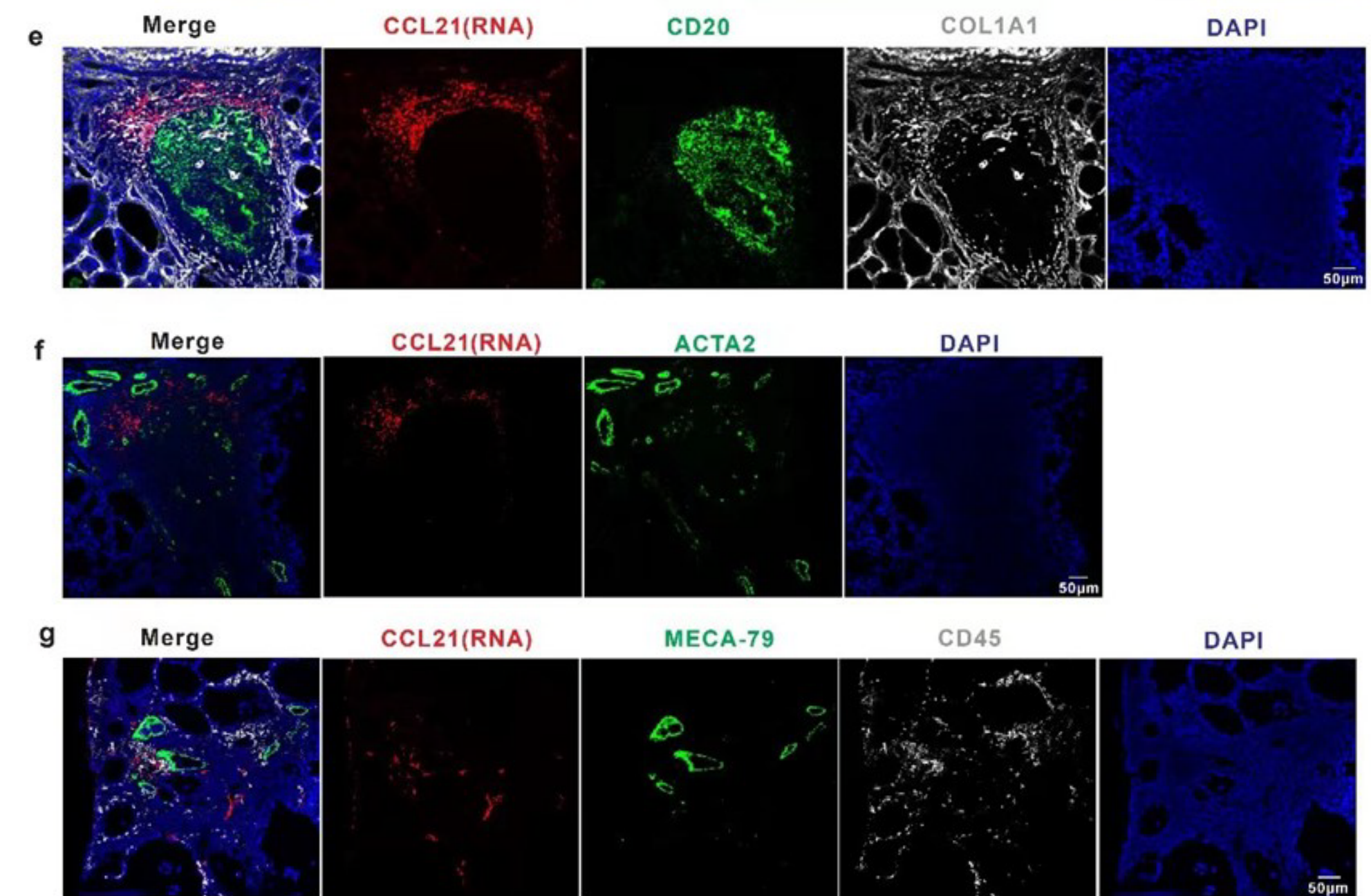
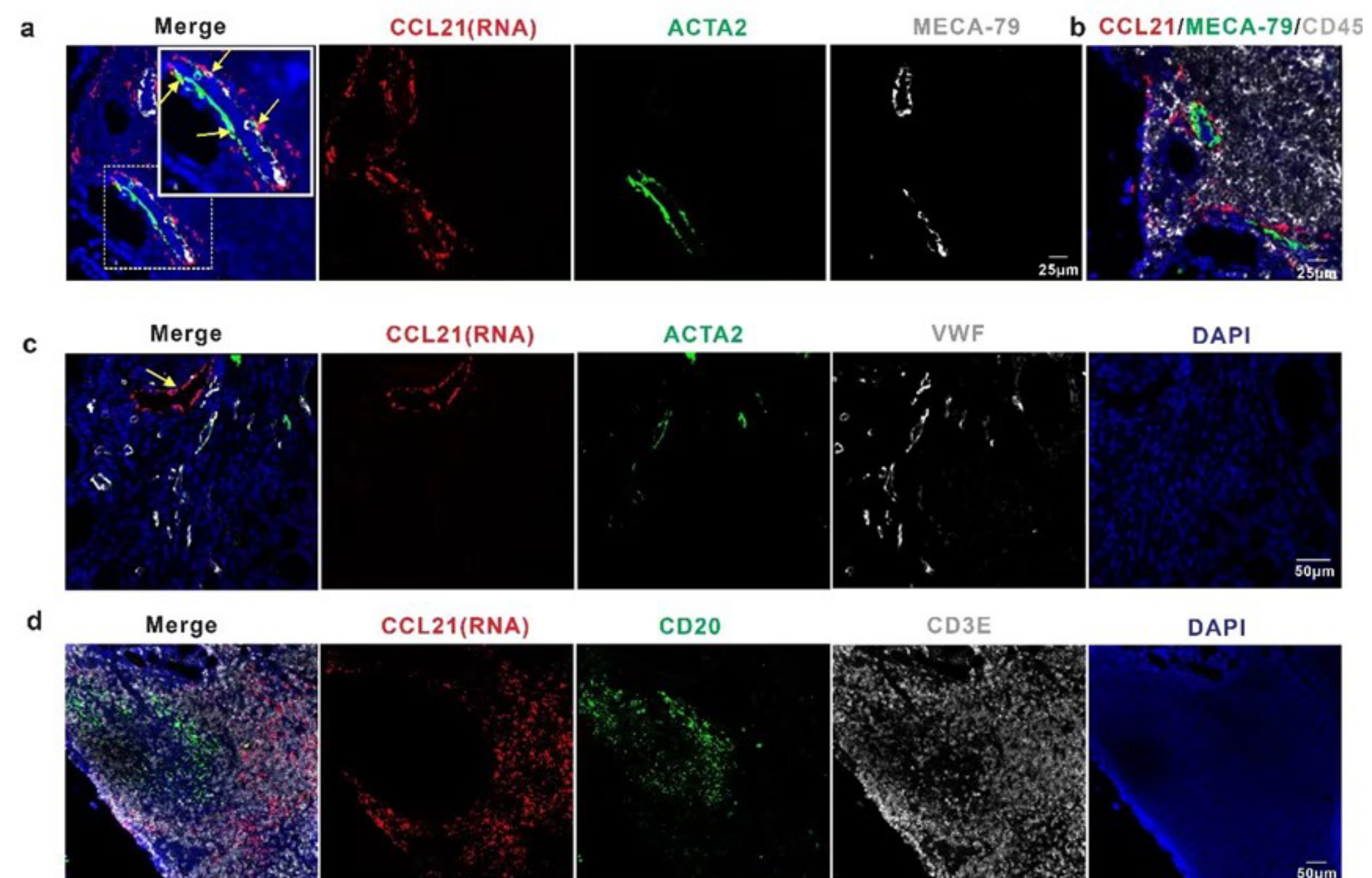
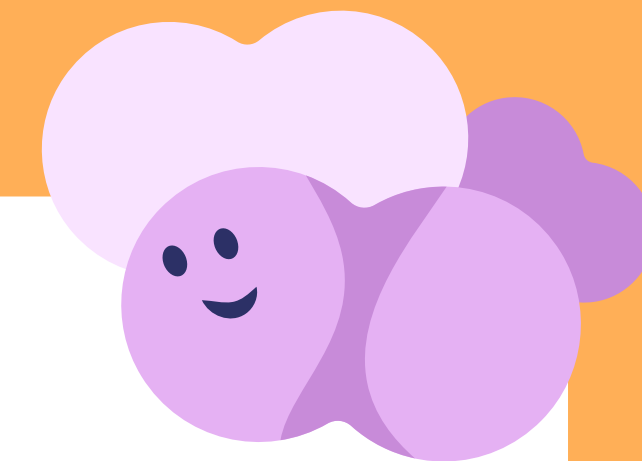


圖1. HT患者甲狀腺組織切片RNAscope與免疫螢光共檢測顯示CCL21+基質細胞分布

進一步使用RNAscope技術在非HT對照組與HT患者甲狀腺組織中檢測CCL21的表達(圖2, 紅色螢光訊號), 發現與非HT對照組相比, HT患者甲狀腺組織中CCL21+纖維母細胞或肌纖維母細胞顯著增加。RNAscope結合免疫螢光共檢測顯示(圖2), HT患者甲狀腺組織中容易觀察到FSP1+CCL21+纖維母細胞或肌纖維母細胞分布在生發中心, 淋巴細胞聚集區或血管外膜區(白色箭頭), 以及較少淋巴浸潤的甲狀腺濾泡結構完整區。而在非HT對照的甲狀腺組織中, 很少有纖維母細胞, 而CCL21+細胞幾乎沒有。這一結果進一步提示CCL21在HT發生過程中, 對甲狀腺組織的免疫細胞浸潤和三級淋巴組織形成均有重要作用, 因此, 開發針對CCL21的藥物有望阻斷甲狀腺免疫細胞浸潤, 從而減少甲狀腺濾泡破壞, 延緩甲狀腺功能減退的發生。



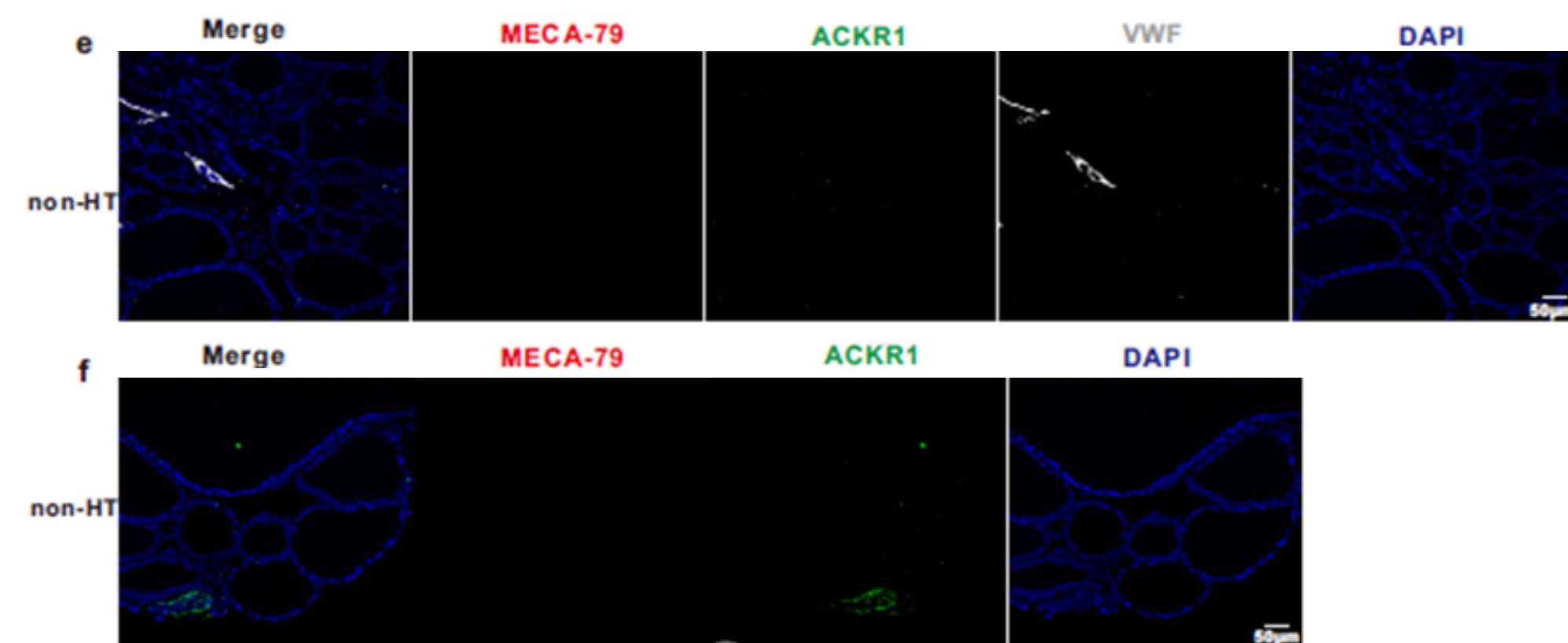
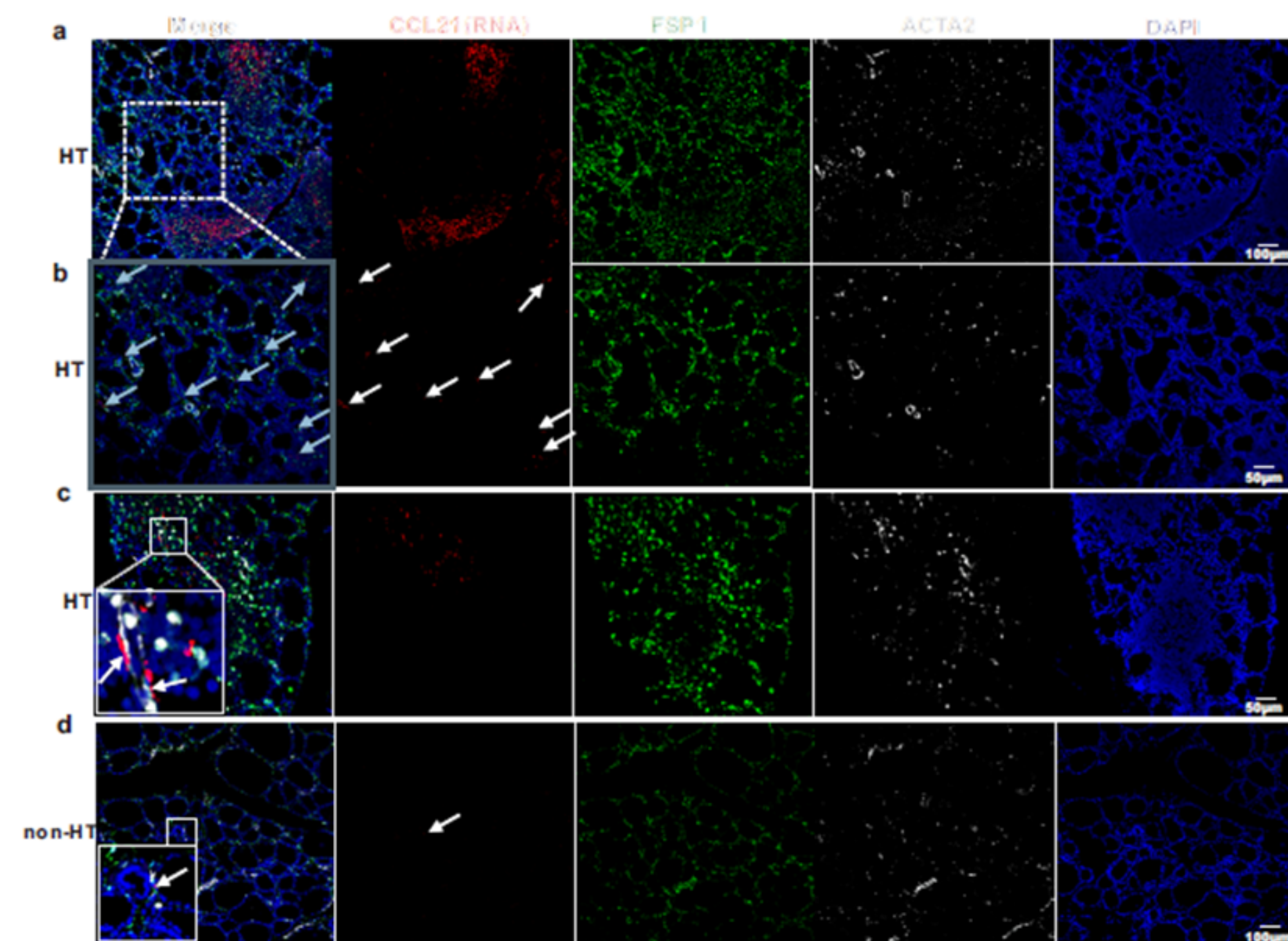
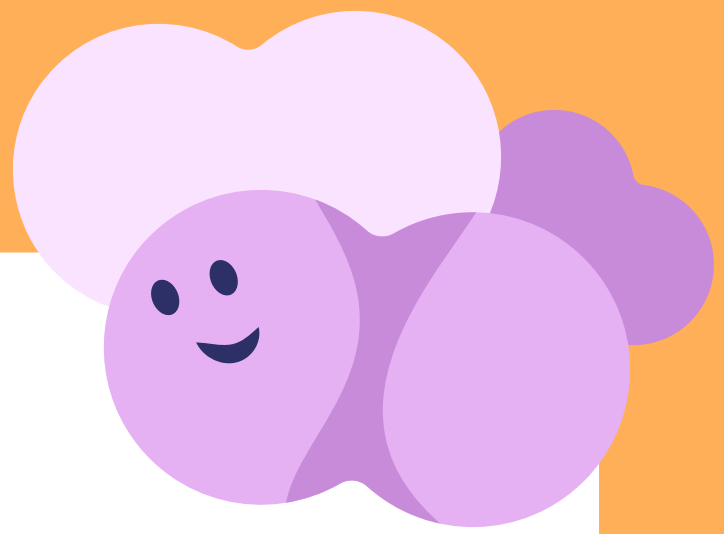
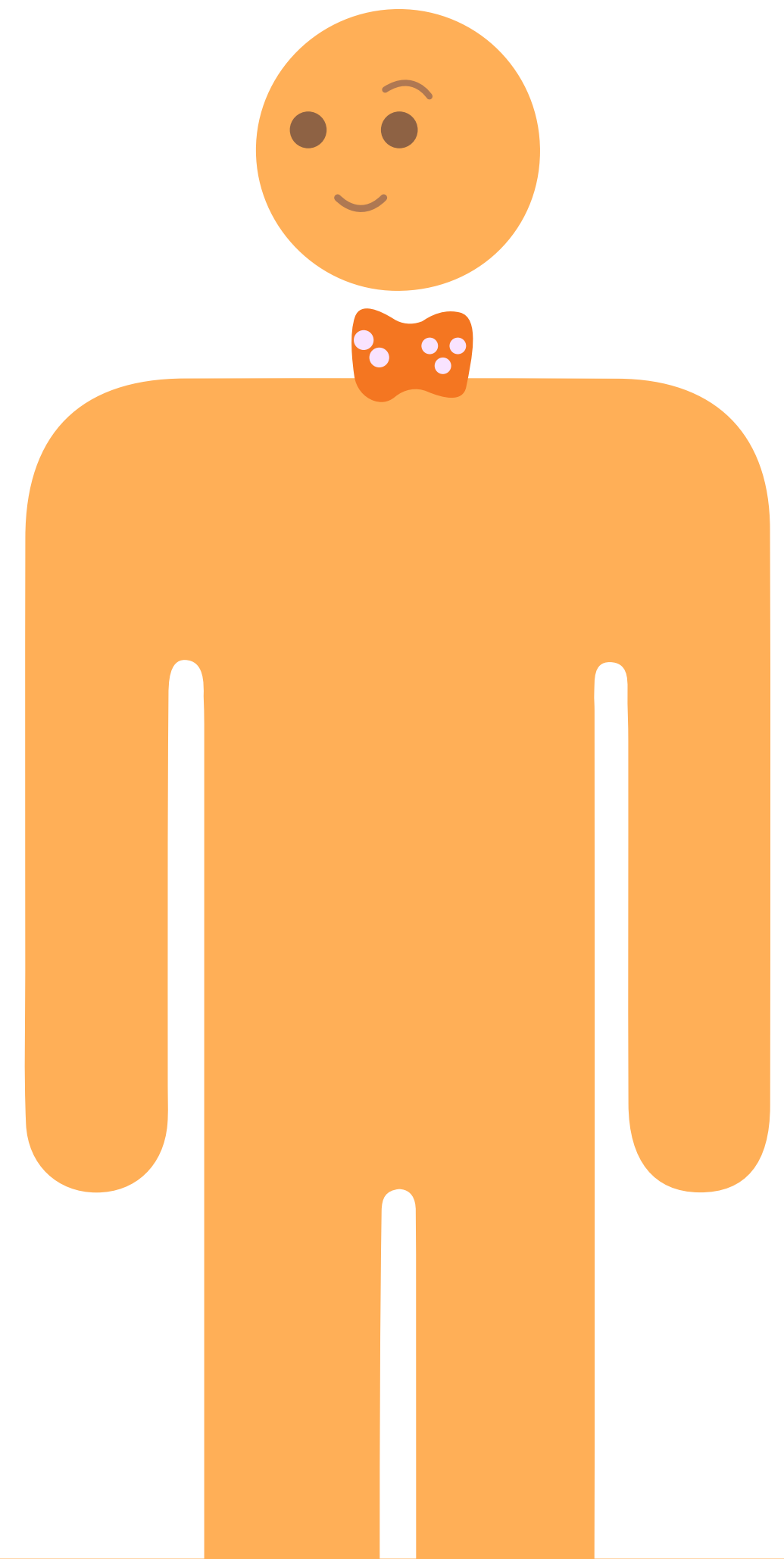
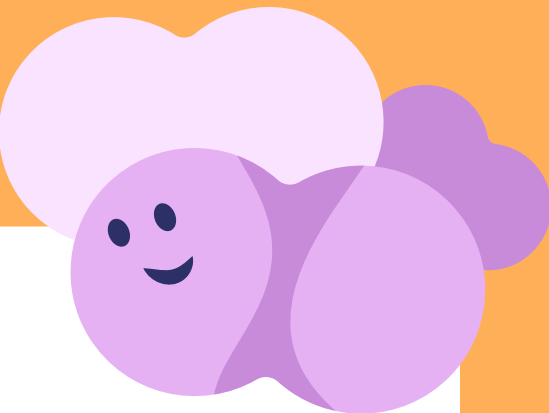


圖2. RNAscope與免疫螢光共檢測顯示非HT對照組與HT患者甲狀腺組織中CCL21的表達以及CCL21+纖維母細胞的分布。

RNAscope技術是由Bio-Techne旗下Advanced Cell Diagnostics (ACD)公司研發的RNA原位雜交產品，在近年來的生物檢測領域發展迅速。與傳統的RNA原位雜交相比，RNAscope技術屬於新一代RNA原位雜交技術，其特異性的雙Z探針設計避免了傳統長鏈RNA探針的弊端，配以自身級聯放大檢測原理，可以高效敏感地檢測到目標RNA。該方法的具體優勢如下：





1. 應用廣泛：

使用RNAscope技術，目標RNA為大於等於300個鹼基的特異序列，即可進行探針設計。因而RNAscope技術可以應用於幾乎所有物種，所有組織以及所有基因的檢測。

2. 特異性強：

RNAscope獨特的雙Z（ZZ）探針設計有效的防止了探針的非特異性結合，同時降低了背景干擾。由於結合在非特異性位點的單個的Z探針不會產生完整的訊號放大分子結合位點，並會在雜交過程中被洗脫掉，從而防止非特異性訊號的放大，使得探針的訊號具有高度特異性。探針設計合成需要2~4週時間即可完成。



3. 靈敏度高：

RNAscope方法檢測每個RNA分子時，只需三對雙Z（ZZ）探針即可完成雜交和訊號的檢測。

4. 單分子檢測和單細胞定量：

使用RNAscope技術雜交上三對及以上雙Z探針即可在標準的顯微鏡下呈現可觀察到的點狀訊號。

ACD公司提供的分析軟體更可以定量每一個單細胞內RNA的表達量。

5. 相容降解的RNA：

由於RNAscope三對雙Z探針即可檢測到目標RNA，而通常針對靶點RNA設計的探針為20對雙Z探針，因而即使目標RNA發生部分降解，仍可以穩定有效地檢測到目標RNA。



6. 檢測結果穩定一致性：

RNAscope技術用到的探針以及所有檢測試劑全部由工業化合成，且該技術針對不同樣本類型（冷凍切片、石蠟切片、懸浮細胞、貼附細胞等）已經有成熟的實驗操作流程，故使得RNA-scope技術檢測結果具有穩定性和一致性。除了可以在實驗室進行手工操作外，該產品也可以在Leica以及羅氏Ventana自動平臺上運行，為結果的一致性和穩定性提供了可靠的依據。

7. 多通道多目標同時檢測：

由於RNAscope技術可以同時進行多通道探針雜交以及訊號放大，故在可見光檢測中可以在同一張切片上同時檢測兩個目標；而在螢光檢測過程中，可以在同一張切片上檢測三個或三個以上目標RNA。

